

ISOCITRATE AND LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITIES IN HUMAN BLOOD SERUM AFTER A SINGLE, MODERATE DOSE OF VARIOUS ALCOHOLIC BEVERAGES

Roman MADRO¹, Hanna CZEKAJSKA-ŁUCKIEWICZ¹,
Kazimierz PASTERNAK²

¹*Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin*

²*Department of General Chemistry, Medical Academy, Lublin*

ABSTRACT: The studies were performed on 12 healthy men who were given ethanol (first vodka, then wine and finally beer) in a single, oral dose of 0.84 g/kg b.w. The activities of both dehydrogenases were determined by calorimetric methods in serum collected prior to alcohol administration and when its blood level $\leq 0.1\%$. During the experiment, the blood levels of ethanol and total acetaldehyde were examined. As we expected, alcohol resulted in a statistically significant increase in enzyme activities (except for isocitrate dehydrogenase after beer). Considering the remaining results, the authors conclude that an increase in serum lactate dehydrogenase may result from the impaired function of the hepatocyte membrane, while an increase in isocitrate dehydrogenase depends on the ethanol elimination rate.

KEY WORDS: Alcholemlia; Lactate dehydrogenase (LDH); Isocitrate dehydrogenase (ICDH); Serum levels; Alcoholic beverages.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLI, 2000, 27–36

Received 22 February 2000; accepted 23 May 2000

INTRODUCTION

Isocitrate dehydrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42) is one of the Krebs cycle enzymes which is involved in cellular metabolism, while lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) catalyses the conversion of pyruvate into lactate [5]. Both are directly involved in the systemic conversion of ethanol (EtOH) into acetaldehyde and then acetic acid. Thus, their serum activities should be affected by EtOH.

With this assumption, comparative studies of ICDH and LDH activities were performed before and after the experimental alcholemlia induced by vodka, wine or beer consumption.

MATERIAL AND METHODS

The study was initiated with the consent of the Committee of Clinical Research Ethics of the Medical Academy in Lublin (KE-0254/96). The research encompassed 12 healthy¹ males aged 18–37 years. Two hours after light breakfast they were orally administered EtOH in a single dose of 0.84 g/kg of b.w., which according to Widmark's Formula (taking into account 20% deficit) should theoretically result in maximal blood concentration of approximately 1.0‰. In the first stage of the experiment the subjects consumed 40% vodka. A week later the same volunteers were given 11.5% semi-dry, white wine, and 7 days later – 5.6% beer.

Prior to EtOH administration, the patients' ulnar veins were cannulated and their blood samples were collected. The testing for alcoholemia and aldehydemia was initiated half an hour after alcohol consumption. The subsequent blood samples were collected every half an hour. The first seven drops (i.e. the canula volume) were excluded. The next drops flowed directly into the heparinised test tubes. The test was stopped when the EtOH concentration decreased below 0.1‰.

The ICDH and LDH activities were determined in serum collected before EtOH administration and in the final stage of the study, i.e. 5–7 hours after alcohol consumption. Colorimetric methods using Cormay Diagnostics S.A. sets were used.

The results were analysed by means of t-Student's and C-Cochran-Cox tests ($p \leq 0.05$).

RESULTS

The average activity values (\bar{x}), standard deviations (SD) and results of the statistical analysis are presented in Tables I and II.

Tables I and II reveal that the ICDH and LDH activities in serum collected before the study were normal [9]. Moreover, they show that the activity of both enzymes was elevated in the final stage of alcoholemia (only in the case of ICDH after beer consumption was the increase statistically insignificant), however, the increase did not exceed the upper physiological levels.

¹ Negative medical history, normal bilirubin, total protein, urea, creatinine, cholesterol and glucose levels in fasting state, normal AspAt and AlAT, normal results of blood and urine analysis.

TABLE I. ISOCITRATE DEHYDROGENASE ACTIVITY (IU/L) IN HUMAN BLOOD SERUM BEFORE AND AFTER A SINGLE DOSE OF VARIOUS ALCOHOLIC BEVERAGES

	VODKA		WINE		BEER	
	BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER
\bar{x}	2.72	4.45	2.67	4.35	2.22	2.52
SD	0.84	0.93	0.82	0.92	0.40	0.36
	p < 0.0001		p = 0.0007		p = 0.075	
			p = 0.81			
					p = 0.0004	
	p < 0.0001					

\bar{x} – average values; SD – standard deviation; p – significance level.

TABLE II. LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY (IU/L) IN HUMAN BLOOD SERUM AFTER A SINGLE DOSE OF VARIOUS ALCOHOLIC BEVERAGES

	VODKA		WINE		BEER	
	BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER
\bar{x}	158	213	154	191	161	190
SD	23	19	19	18	21	24
	p < 0.0001		p < 0.0001		p < 0.0001	
			p = 0.014			
					p = 0.896	
	p = 0.029					

\bar{x} – average values; SD – standard deviation; p – significance level.

It should be stressed that no significant differences in ICDH activity were observed after vodka and wine consumption, while in both cases this increase was significantly higher compared to beer consumption. However, in the case of LDH no significant differences were observed between the activity increases induced by wine and beer, which in both cases were significantly lower than the LDH activity increase following vodka consumption.

Thus, the experiment proved that a single, moderate EtOH dose resulted in increased ICDH and LDH activities in serum and that the increase depended on the kind of alcohol consumed.

DISCUSSION

The experimental differences in the LDH activity increases observed in serum may be attributed to the changes in the permeability of the hepatocyte cell membranes, since it is known that acetaldehyde (ethanol metabolite) forms adducts with tubulin, which leads to protein retention in hepatocytes [7, 8, 10]. Our studies, however, show that the whole alcoholemia period is accompanied by stabilised aldehydemia² (in mg/l), which, after wine and beer consumption, is significantly higher than after the same amount of vodka (0.68 ± 0.09 ; 0.69 ± 0.08 ; 0.53 ± 0.07 , respectively). Thus, if we assume that the serum LDH activity depends on its hepatocyte cytoplasm activity, and if we also assume that due to the decreased levels of energetic substrates [6], identical EtOH doses result in similar LDH activity increases in hepatocyte cytoplasm, then we may conclude that lower LDH activities in serum after wine and beer consumption are caused by greater difficulties in its permeation through microtubules compared to vodka consumption, where total aldehyde level in blood is significantly lower than the levels observed after wine or beer.

The experimental differences in the serum ICDH activity increases cannot be explained by the acetaldehyde effects on the microtubule function. Those increases were similar after vodka and wine consumption i.e., when acetaldehyde concentrations were significantly different. Thus, this fact may be related to different molecule sizes of both enzymes. LDH molecular weight in mammals is approximately 135 000, i.e. two times larger than ICDH molecular weight, which is 64 000 [3]. So, if the acetaldehyde adducts retain mainly high-molecular protein in the hepatocytes, their effects may be significant with respect to proteins of LDH molecular weight and very weak with regard to the twice smaller ICDH molecules.

We believe that the results of the studies concerning the alcoholemia course (when the dependence of aldehydemia on the kind of alcoholic beverage was observed – see footnote 2) explain the differences in serum ICDH activity increases. The statistical data concerning the ICDH activity increase

² Presented on XI Congress of Polish Society of Forensic Medicine and Criminology held in Łódź, 2–5 September, 1998.

and average values of hourly alcohol elimination rate (β_{60}) prove that both parameters were similarly dependent on the kind of alcohol consumed. We found no statistically significant changes between average β_{60} after vodka ($\bar{x} = 0.142\%$, $SD = 0.04$) and β_{60} after wine ($\bar{x} = 0.152\%$, $SD = 0.05$) and no significant differences between serum ICDH increases observed after vodka and wine (see Table I). However, after beer both β_{60} ($\bar{x} = 0.129\%$, $SD = 0.04$) and ICDH level were significantly lower compared to those after vodka and wine. Thus, if we agree that at blood EtOH concentrations = 1.0‰ the MEOS system does not play a significant role [1] and that there is no evidence of marked effects of the hepatocyte membrane permeability on ICDH migration from the hepatocyte to serum, it should be assumed that the ICDH activity in hepatocyte cytoplasm and serum increases with an increase in the activity of the alcohol dehydrogenase system. For β_{60} is a measure of the activity of this system, which depends on the kind of alcohol consumed: β_{60} after beer < β_{60} after wine \approx β_{60} after vodka > β_{60} after beer.

Our experiment does not explain the way in which the alcoholic beverages used change the activity of alcohol dehydrogenase and (secondarily) ICDH. On the basis of the studies on alcoholemia effects on the serum concentration of electrolytes and chosen microelements [4], one can only state that it is not related to Zn³ and Mg⁴ deficiencies. For the studies showed that only vodka resulted in Mg level decrease (statistically significant) and Zn level decrease (nearly statistically significant), but it was vodka consumption which caused increased activities of both enzymes compared to beer.

CONCLUSIONS

1. A single, moderate ethanol dose results in LDH and ICDH activity increases.
2. The serum LDH activity increase after a single moderate amount of ethanol probably depends on the hepatocyte membrane permeability.
3. The serum ICDH activity increase after a single moderate dose of ethanol is probably related to ADH activity.

³ Zn deficiency decreases the ADH system activity [2].

⁴ The ICDH activity depends on the presence of Mg [9].

References:

1. Bogdanik T. [red.], Toksykologia kliniczna, PZWL, Warszawa 1988, s. 442.
2. Das I., Burch R. E., Hahn H. K., Effects of zinc deficiency on ethanol metabolism and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1984, vol. 104, pp. 610–617.
3. Dixon M., Webb E. C., Enzymes, Longmans, London 1964, pp. 453–454.
4. Mądro R., Czekajska-Łuckiewicz H., Pasternak K., The effect of alcoholemia on the serum levels of electrolytes and selected trace elements, *Blutalkohol* 1999, vol. 36, pp. 371–377.
5. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. [i in.], Biochemia Harpera, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995, s. 198–216.
6. Nasiłowski W., Szczepański J., Olszowy Z., Niektóre wskaźniki biochemiczne w alkoolemii – badania doświadczalne, [w]: Wypadkowość drogowa, alkoholizm oraz inne przyczyny biologiczne, Materiały Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej, Katowice – Chorzów, 5–6.05.1977 r., s. 365–379.
7. Smith S. L., Jennett R. B., Sorrell M. F. [et al.], Acetaldehyde substoichiometrically inhibits bovine neurotubulin polymerization, *Journal of Clinical Investigation* 1989, vol. 84, pp. 337–341.
8. Smith S. L., Jennett R. B., Sorrell M. F. [et al.], Substoichiometric inhibition of microtubule formation by acetaldehyde-tubulin adducts, *Biochemistry and Pharmacology* 1992, vol. 44, pp. 65–72.
9. Szczeklik E. [red.], Enzymologia kliniczna, PZWL, Warszawa 1974, s. 203–218.
10. Tuma D. J., Hoffman T., Sorrell M. F., The chemistry of acetaldehyde-protein adducts, *Alcohol and Alcoholism*, 1991, suppl. 1, pp. 271–276.

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY IZOCYTRYNIANOWEJ I DEHYDROGENAZY MLECZANOWEJ PO JEDNORAZOWEJ, UMIARKOWANEJ DAWCE RÓŻNYCH NAPOJÓW ALKOHOLOWYCH

Roman MAĐRO, Hanna CZEKAJSKA-ŁUCKIEWICZ, Kazimierz PASTERNAK

WSTĘP

Dehydrogenaza izocytrynianowa (ICDH, EC. 1.1.1.42) jest jednym z enzymów cyklu Krebsa i uczestniczy we wszystkich kluczowych przemianach metabolicznych komórki [5]. Natomiast dehydrogenaza mleczanowa (LDH, EC 1.1.1.27) katalizuje przemianę pirogronianu do mleczanu [5]. Obie dehydrogenazy biorą więc pośrednio udział w ustrojowej przemianie etanolu (EtOH) do aldehydu octowego, a następnie do kwasu octowego. Ich aktywność w surowicy powinna się zatem zmieniać pod wpływem działania EtOH.

Z tym założeniem autorzy przystąpili do badań porównawczych nad aktywnością ICDH i LDH przed i po eksperymentalnej alkoholemii spowodowanej wypiciem wódki, ewentualnie wina lub piwa.

MATERIAŁ I METODY

Badania rozpoczęto po uzyskaniu zgody Komisji ds. Etyki Badań Klinicznych przy Akademii Medycznej w Lublinie (KE-0254/96). Uczestniczyło w nich 12 zdrowych¹ mężczyzn w wieku 18–37 lat. Po 2 godzinach od spożycia lekkiego śniadania otrzymywali oni doustnie EtOH w jednorazowej dawce 0,84 g/kg masy ciała, która według wzoru Widmarka (z uwzględnieniem 20% deficytu) powinna teoretycznie doprowadzić do jego maksymalnego stężenia we krwi w wysokości ok. 1,0‰. W pierwszym etapie eksperymentu była to 40% wódka. Po upływie tygodnia ci sami ochotnicy otrzymywali 11,5% półwytrawne, białe wino, a po kolejnych 7 dniach 5,6% piwo.

Przed podaniem EtOH uczestnikom eksperymentu zakładano wenflon do żyły łokciowej i pobierano próbkę krwi. Testowanie alkoholemii i aldehydemii rozpoczęto pół godziny od zakończenia picia alkoholu. Kolejne próbki krwi pobierano co pół godziny. Pierwsze 7 kropli (tj. objętość wenflonu) za każdym razem odrzucano. Następne spływały bezpośrednio do heparynizowanych probówek. Doświadczenie kończono w momencie, gdy oznaczane na bieżąco stężenie etanolu spadało poniżej 0,1‰.

Aktywność ICDH i LDH oznaczano w surowicy pobranej przed podaniem EtOH i w końcowej fazie eksperymentu, tj. po 5–7 godzinach od chwili zakończenia picia al-

¹ Negatywny wywiad chorobowy; prawidłowy poziom bilirubiny, białka całkowitego, mocznika, kreatyniny, cholesterolu i glukozy na czczo; prawidłowa aktywność AspAt i AlAT; prawidłowe wyniki analizy krwi i moczu.

koholu. Do badań zastosowano metody kolorymetryczne przy użyciu zestawów firmy Cormay Diagnostyka S.A. Rezultaty oznaczeń analizowano testami t-Studenta lub C-Cochrana-Coxa ($p \leq 0,05$).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zestawienie danych na temat średnich aktywności badanych enzymów (\bar{x}), odchyłeń standardowych (SD) oraz rezultatów analizy statystycznej zawierają tabele I i II. Z tabel tych wynika, że w surowicy pobranej przed rozpoczęciem doświadczenia aktywność ICDH i LDH mieściła się w granicach normy [9]. Wynika z nich również, że w końcowej fazie alkoholismu aktywność obu enzymów była podwyższona (przy czym tylko w przypadku ICDH po konsumpcji piwa nie był to wzrost statystycznie istotny), ale wzrost ten nie przekraczał górnej granicy stężeń uznawanych za fizjologiczne.

Na uwagę zdaniem autorów zasługuje fakt, iż po spożyciu wódki i wina nie stwierdzono istotnych różnic we wzroście aktywności ICDH, jednakże wzrost ten był istotnie wyższy od tego, który powodowało wypicie piwa. Natomiast w przypadku LDH nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między wzrostem aktywności spowodowanym konsumpcją wina i piwa, który był istotnie niższy od wzrostu aktywności enzymu po wódce.

Eksperymentalnie wykazano zatem, że jednorazowa konsumpcja EtOH w umiarkowanej dawce powoduje wzrost aktywności ICDH oraz LDH w surowicy oraz że wzrost ten zależy od rodzaju wypitego alkoholu.

DYSKUSJA

Wykazane doświadczalnie różnice we wzroście aktywności LDH w surowicy można, zdaniem autorów, wyjaśnić zmianami przepuszczalności błon komórkowych hepatocytów. Wiadomo bowiem, że aldehyd octowy (metabolit etanolu) tworzy addukty z tubuliną, co prowadzi do retencji białek w hepatocytach [7, 8, 10]. Z badań² autorów wynika natomiast, że przez całą alkoholismu trwa ustabilizowana aldehydemia (mg/l), która po konsumpcji wina i piwa jest istotnie wyższa od spowodowanej wypiciem takiej samej ilości EtOH pod postacią wódki (odpowiednio $0,68 \pm 0,09$; $0,69 \pm 0,08$; $0,53 \pm 0,07$). Zatem jeżeli przyjmie się, że aktywność LDH w surowicy zależy od jej aktywności w cytoplazmie hepatocytów oraz założy się, że w związku z obniżaniem poziomu substratów energetycznych [6] identyczne dawki etanolu powodują podobny wzrost aktywności LDH w cytoplazmie hepatocytów, można dojść do wniosku, że niższe poziomy LDH w surowicy po konsumpcji wina i piwa są spowodowane większym utrudnieniem w jego przenikaniu przez mikrotubule, niż ma to miej-

² Badania nad aldehydemią w przebiegu alkoholismu spowodowanej spożyciem różnych alkoholi konsumpcyjnych (wódki, ew. wina lub piwa) – przedstawione na XI Krajowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, który odbył się w Łodzi w dniach 2–5 września 1998 roku.

sce po wypiciu wódki, w przypadku której poziom aldehydu całkowitego we krwi jest istotnie niższy od obserwowanego po winie i piwie.

Oddziaływaniem aldehydu octowego na funkcję mikrotubuli nie można wyjaśnić wykazanych eksperymentalnie różnic we wzroście aktywności ICDH w surowicy. Był on bowiem podobny po wódce i po winie, a więc wówczas, gdy stężenia aldehydu octowego różniły się w sposób statystycznie istotny. Być może wiąże się to z różną wielkością cząsteczek obu enzymów. Masa cząsteczkowa LDH u ssaków wynosi bowiem ok. 135000, a więc jest dwa razy większa od masy cząsteczkowej ICDH, która u ssaków wynosi 64000 [3]. Jeżeli zatem addukty aldehydu octowego zatrzymują w hepatocytach przede wszystkim białko wysokocząsteczkowe, to ich wpływ może zaznaczyć się w sposób istotny w odniesieniu do białek o masie cząsteczkowej LDH, natomiast może być bardzo słaby w odniesieniu do dwukrotnie mniejszej cząsteczki ICDH.

Można przyjąć, że wyniki przeprowadzonych przez autorów badań nad przebiegiem alkoholemii (w trakcie której poznano zależność aldehydemii od rodzaju napoju alkoholowego – por. przypis 2) wyjaśniają różnice we wzroście aktywności ICDH w surowicy. Z zestawienia statystycznych opracowań danych na temat wzrostu aktywności ICDH oraz danych na temat średniej wartości współczynnika godzinowej eliminacji alkoholu (β_{60}) wynika bowiem, że oba badane parametry w podobny sposób zależą od rodzaju spożytego alkoholu. Nie stwierdzono bowiem istotnych statystycznie różnic między β_{60} po wódce ($\bar{x} = 0,142\%$, $SD = 0,04$) i β_{60} po winie ($\bar{x} = 0,152\%$, $SD = 0,05$), podobnie jak nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wzrostem ICDH obserwowanym w surowicy po wódce i po winie (por. tabela I). Natomiast po piwie zarówno β_{60} ($\bar{x} = 0,129\%$, $SD = 0,04$), jak i poziom ICDH, były mniejsze w stopniu statystycznie istotnym od β_{60} i poziomu ICDH po winie i po wódce. Jeżeli zatem uwzględnimy, że przy stężeniach etanolu we krwi $\leq 1,0\%$ układ MEOS nie odgrywa znaczącej roli [1] oraz że brakuje danych, by uwzględnić znaczący wpływ przepuszczalności błony komórkowej hepatocytów na migrację ICDH z ich wnętrza do surowicy, to przyjąć należy, że aktywność ICDH w cytoplazmie hepatocytów i w surowicy zwiększa się wraz ze wzrostem aktywności układu dehydrogenazy alkoholowej. Współczynnik β_{60} jest bowiem miarą aktywności tego układu, która zależy od rodzaju wypitego alkoholu w kolejności: β_{60} po piwie $<$ β_{60} po winie \approx β_{60} po wódce $>$ β_{60} po piwie.

Przeprowadzony eksperyment nie wyjaśnia, w jaki sposób użyte w nim alkohole zmieniają aktywność ADH oraz (wtórnie) ICDH. Na podstawie badań nad wpływem alkoholemii na stężenie elektrolitów i wybranych mikroelementów w surowicy [4] możemy jedynie stwierdzić, że nie kojarzy się to z deficytem cynku (Zn)³ i magnezu (Mg)⁴. Badania te wykazały bowiem, że jedynie po spożyciu wódki dochodzi do obniżenia stężenia Mg (statystycznie istotnego) i Zn (w stopniu bliskim statystycznej istotności), a właśnie po podaniu wódki aktywność obu enzymów była większa niż po piwie.

³ Niedobór Zn zmniejsza aktywność ADH [2].

⁴ Aktywność ICDH zależy od obecności Mg [9].

WNIOSKI

1. Jednorazowa konsumpcja etanolu w umiarkowanej dawce powoduje wzrost aktywności LDH i ICDH.
2. Wzrost aktywności LDH w surowicy po jednorazowym wypiciu umiarkowanej ilości etanolu zależy prawdopodobnie od przepuszczalności błony komórkowej hepatocytów.
3. Wzrost aktywności ICDH w surowicy po jednorazowym wypiciu umiarkowanej ilości etanolu jest prawdopodobnie związany z aktywnością ADH.