

NON-OXIDATIVE METABOLISM OF ETHANOL AND ITS INFLUENCE ON THE METABOLIC PATHWAY OF SEROTONIN AND TRANSFERRIN

Ewa CZECH¹, Marek HARTLEB²

¹ *The Chair and Department of Nuclear Medicine, Silesian Medical School, Katowice*

² *Department of Gastroenterology Clinic, Silesian Medical School, Katowice*

ABSTRACT: About 95% of ethanol is metabolised via the oxidative pathway. Trace amounts of ethanol are a substrate of non-oxidative metabolism, which generates such products as fatty acid ethyl esters, phosphatidylethanol and ethyl glucuronide. Ethanol also changes the metabolic pathway of serotonin (5-hydroxytryptophol) and transferrin. Multiorgan toxicity of these metabolites increases our understanding of many clinical symptoms of alcoholic disease, which up to now have erroneously been ascribed solely to acetoaldehyde (a metabolite of the oxidative pathway). Due to a long biological half-life and tissue accumulation, non-oxidative metabolites of ethanol and serotonin (5-hydroxytryptophol) and carbohydrate deficient transferrin are used increasingly in clinical and forensic medicine in the detection of alcohol consumption.

KEY WORDS: Ethanol; Non-oxidative metabolism; Fatty acid ethyl esters; Phosphatidylethanol; Ethyl glucuronide; 5-hydroxytryptophol; Carbohydrate deficient transferrin (CDT).

Problems of Forensic Sciences, vol. LII, 2002, 37–51

Received 11 November 2002; accepted 27 December 2002

INTRODUCTION

Alcoholism is one of the greatest social, economic and health problems of the present world, and alcohol one of the most often consumed beverages. Protracted consumption of ethyl alcohol results in pathological changes of a somatic and psychological nature. Alcohol induces a series of abnormalities in the metabolism of cells, leading to structural and functional disturbances of internal organs, especially the liver [23, 26].

About 90–95% of the consumed ethanol undergoes biotransformation via oxidative metabolism. Non-metabolised alcohol is eliminated in small quantities by the kidneys (0.5–2%), lungs (1.6–6%) and the skin (< 0.5%). Alcohol (ADH) and aldehyde (ALDH) dehydrogenases, the microsomal system (MEOS) and catalase are responsible for the oxidative metabolism of etha-

nol. The main metabolite of the oxidative biotransformation of ethanol is acetaldehyde. This compound is considered the main cause of the damage to internal organs of alcoholics. Metabolites of the oxidation of ethanol arise above all in the liver, appearing in the circulatory system only in trace quantities. Thus, it is supposed that damage to organs in which the process of oxidation of alcohol is of marginal significance or absent may have a different metabolic basis.

In the nineteen eighties, the presence of non-oxidative metabolism of ethanol was noticed [22]. In the current work, compounds that arise as a result of these transformations and their multi-organ toxic effects are discussed. The influence of ethanol on the change of metabolic pathways of serotonin and the isoforms of transferrin is also described. Due to their long half-lives and their tendency to accumulate in tissues, most of these metabolites may have a diagnostic application. They show a high sensitivity in detecting alcoholic disease or alcoholism hidden by patients, in comparison to more popular but not very specific indicators like (GGT, ALT, AST) hepatic enzyme, ferritin or the average volume of the erythrocyte.

NON-OXIDATIVE METABOLISM OF ETHANOL

Ethylesters of fatty acids

The main products of the non-oxidative metabolism of ethanol are fatty acid ethyl esters (FAEE), which have been found in organs of persons who died from acute alcoholic poisoning. FAEE are synthesised with the participation of specific synthases, whose activity has been revealed in the heart, brain, liver and above all the pancreas [19, 20]. Synthases of FAEE show substrate specificity in relation to cis-unsaturated 18-carbon free fatty acids.

Serum levels of FAEE are correlated with the concentration of ethanol in blood. FAEE are transported in the blood by lipoproteins belonging to the LDL class, and to a considerably smaller degree by other plasma proteins [8]. FAEE are compounds of proven cellular and organ toxicity. In *in vitro* research, FAEE reveal particular toxicity in relation to cellular membranes, especially mitochondrial and lysosomal ones [11, 16, 20]. Furthermore, FAEE disturb the cellular antioxidative potential, causing oxidative stress. It has been ascertained that FAEE increase the activity of glutathione S-transferase and cause an increase in the concentration of lipid hydroxyperoxides [6, 7]. FAEE also have the ability to inhibit cellular proliferation and synthesis of proteins [36].

The organ which is most susceptible to the toxic activity of FAEE is the pancreas. In studies on rats that received FAEE intravenously, swelling of

the pancreas was ascertained together with an increase in concentration of the protein activating trypsinogen, and also ultrastructural changes in the form of cytoplasmatic lipid vacuolisation of the pancreatic acinar cells [30, 40]. Thus, in alcoholics FAEE can play an important role in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis, activating trypsinogen already in the acinar cells, while in physiological conditions, the protein is activated by intestinal enterokinases only after is transferred with the pancreatic juice to the duodenum. The factors activating the trypsinogen *in situ* can also be certain enzymes (e.g. cathepsin B), originating from lysosomes damaged by FAEE. The role of FAEE in the pathogenesis of acute pancreatitis has been confirmed by engendering this disease in animals fed with ethanol, whose oxidative pathways of the metabolism of ethanol were blocked by 4-methylpyrazole, aminotriazole and diallyl sulphate [41].

FAEE possess a long biological half-life of about 16 hours and the ability to accumulate in, among other organs, the brain, the pancreas and the myocardium, where they can attain concentrations of up to 100 μM [21]. Furthermore, FAEE accumulate in the adipose tissue and in hair. The measurement of FAEE in these tissues was used as a *post mortem* test for the consumption of ethanol before death [4, 28, 29]. Moreover, studying the presence of FAEE in the meconium enables one to estimate the degree of embryonal exposure to ethanol [27].

Phosphatidylethanol

Phosphatide acid esters have been well known in the plant world for a long time. In 1967 Yang and Dowson discovered the process of phosphatidylation of ethanol during its incubation with phosphatidylcholine in the presence of the plant phospholipase D. At the end of the nineteen seventies, phospholipase D was also detected in mammals in microsomal fractions of the liver, lungs and the brain [18]. However, an exact characterisation of this enzyme was carried out only at the end of the nineties [24].

Examining the influence of ethanol on the metabolism of fatty acids and prostaglandins in rats, Alling et al. [1, 5] found the presence of a hitherto unknown acidic lipid in the brain, the liver, kidney and skeletal muscles of this animal. As result of chromatographic analysis, it was established that this compound was phosphatidylethanol (PEth). This particle is created in the cellular membrane in the presence of ethanol by transphosphatidylation of phosphatidylcholine with the participation of phospholipase D. If there is a lack of ethanol, instead of PEth, phosphatide acid is created, which is an important regulator of intracellular and transmembrane communication. Creation of PEth, on the other hand, disturbs these processes, as a consequence of increasing the fluidity of cellular membranes and of changes in the function of proteins constituting an integral part of these membranes.

The formation of PEth in brain and renal tissue of mammals after the consumption of ethanol has been proved both in *in vitro* and *in vivo* studies [1, 5, 10, 25]. PEth has been detected recently also in neutrophils and erythrocytes, and in trace quantities in platelets in persons regularly drinking alcohol [38]. On the first day of abstinence, the concentrations of PEth are very diverse, which is probably a result of individual differences in the activity of phospholipase D. This compound is eliminated from the blood by a one-compartment model with the biological half-life of 4 days. In the majority of examined patients, the presence of PEth in blood, but not in plasma, was still detected for about 14 days after ceasing alcohol consumption. A long half-life makes PEth a potential laboratory indicator of alcohol consumption over a preceding 2 week period [38], whereas the accumulation of this compound in tissues allows measurements of its concentration to be utilised for forensic purposes. Aradottir et al. [3] showed that feeding rats with ethanol for a period of 4–6 weeks causes an accumulation of PEth in the brain, the mucular layer of the stomach, lungs, kidney, liver and spleen, which is linked to the high activity of phospholipase D in these organs. Moreover, the high concentration of PEth in the spleen is a result of the splenic degradation of erythrocytes [37]. According to the authors, a lack of PEth in the pancreas may be a real absence or may be the result of quick degradation of this compound by pancreatic lipases.

Ethyl glucuronide

Ethyl glucuronide (EtG) arises exclusively as result of the consumption of ethanol, of which 0.5–1.6% of the entire dose becomes conjugated with an active form of glucuronic acid [31]. The synthesis of glucuronides is a very important reaction of the second phase of the detoxification of xenobiotics, and the liver shows the greatest activity in this field. UDP glucuronyl-transferase activity has also been shown in the kidneys, the intestine, the brain, the myocardium, the suprarenal gland, the spleen and the lungs.

The concentration of EtG in blood is the result of the efficiency of such processes like absorption from the alimentary track, distribution and elimination of ethanol and of the individual activity of UDP-glucuronyl-transferase. The maximum concentration of EtG in blood is observed for 2.5–5.5 hours after the consumption of alcohol [9]. Depending on the dose of alcohol, the presence of EtG can still be ascertained in blood for 6–18 hours, and in urine even up to 84 hours after the consumption of ethanol [32]. EtG constitutes a link between markers with short and long half-lives [41] and is a prospective marker for the consumption of alcohol, which, thanks to its high sensitivity and specificity, can be used to assess the effectiveness of the addiction treatment. Determination of ethyl glucuronide in post mortem material (both in body fluids and tissues) also has promising prospects in the

forensic field [43]. It has been shown that the presence of EtG in, amongst other tissues, the hair of deceased persons is indisputable evidence of the consumption of alcohol ante mortem [2, 44].

THE INFLUENCE OF ETHANOL ON THE METABOLIC PATHWAY OF SEROTONIN AND ISOFORMS OF TRANSFERRIN

5-hydroxytryptophol

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a neurotransmitter playing an important role in many physiological processes. Irregular functioning of the serotonergic system is an essential element of many diseases connected with regulations of the basal tonus of vascular smooth muscle, eating, sleep and emotional equilibrium.

Catabolism of 5-HT begins with deamination to 5-hydroxyindole acetaldehyde (5-HIAL), with the participation of monoamine oxidase. In human, 5-HIAL is then degraded to 5-hydroxyindole acid (5-HIAA) in the presence of aldehyde dehydrogenase (ALDH). Minimum quantities of 5-HIAL are in physiological conditions reduced to 5-hydroxytryptophol (5-HTOL) with the participation of alcohol dehydrogenase or aldehyde reductase. 5-HTOL is eliminated with urine almost exclusively in a form coupled with sulphuric or glucuronic acid [12]. In a twenty-four hour collection of urine, the quantitative relation of 5-HTOL to 5-HIAA is smaller than 0.01. In carcinoids and after the consumption of fruits containing a large amount of serotonin (e.g. banana, kiwi and pineapple), besides an increase in the concentration of 5-HIAA in urine, a 7–10-fold increase in the concentration of 5-HTOL is also observed.

Due to the coexisting growth in production of 5-HIAA, the ratio 5-HTOL to 5-HIAA attains values in the range 0.007–0.01. Prolonged consumption of ethanol disturbs the oxidative-reductive equilibrium, also modifying the metabolism of serotonin, in which this compound undergoes reduction instead of oxidation.

Thus, the production of the main metabolite 5-HIAA decreases and, simultaneously, the concentration of 5-HTOL increases about 50 times [15]. In these conditions, the proportion 5-HTOL/5-HIAA grows to 0.4–0.5 [12]. The intensification of 5-HTOL production can be also an effect of competitive restriction of the activity of ALDH by acetaldehyde (the first product of alcohol oxidising) and (or) the increase in the concentration of NADH as a result of the oxidation of ethanol and of acetaldehyde [13]. The efficiency of the process of bonding of excessive quantities of 5-HTOL with sulphuric or glucuronic acid, which takes place not only in the liver, but also in the plasma, is significant for detection of 5-HTOL and the extent of its toxicity

[12]. The increased concentration of 5-HTOL can still be observed in the blood for a dozen or so hours after the disappearance of ethanol from both blood and urine. Detection of 5-HTOL in body fluids was utilised as a test of consumption of alcohol, as by determining the ratio 5-HTOL to 5-HIAA in successive samples of urine, one can ascertain consumption of even moderate quantities of ethanol in the 24 hour period preceding the examination [14].

Carbohydrate deficient transferrin

Transferrin is a glycoprotein, which can bind 2 atoms of trivalent iron. Its particle contains 5.3% carbohydrates. The carbohydrate group has 2 identical side chains composed of 4 carbohydrates, i.e. N-acetylglucosamine, mannose, galactose and sialic acid (N-acetylneuramine acid), constituting the end of these chains.

Sialic acid, carrying a strong negative charge, gives the particle an acidic character. Missing one particle of the acid is responsible for a rise in pH of the environment of about 0.1. Furthermore, depending on the quantity of particles of sialic acid, transferrin creates isoforms of different values of the isoelectric point (pI). Splintering off of N-acetylneuramine acid leads to a diminution of the negative charge and an increase in pI. The quantity of the sialic acid residues in the particle of transferrin determines the existence of its 4 main isoforms, i.e. of the following values of pI: pI = 5.2 (5 SA), pI = 5.4 (4 SA), pI = 5.6 (3 SA), pI = 5.7 (2 SA). The isoform of transferrin in healthy people possesses pI = 5.2, whereas the fraction with pI = 5.7 constitutes no more than 0.8% of the entire amount of transferrin.

In 1976 Stibler and Kjellin [34] detected irregular forms of transferrin in serum and in the cerebrospinal fluid of persons with postalcoholic symptoms of the cerebellum damage. These irregularities consisted in a complete or partial deficiency of N-acetylneuramine acid. Further study of persons addicted to alcohol showed that the concentration of the fraction of pI = 5.7 increases in them by nearly 10 times, and in some persons an isomeric form of pI = 5.9 appears that is completely devoid of N-acetylneuramine acid, i.e. carbohydrate-deficient transferrin (CDT).

Vesterberg et al. [39], using the method of the isoelectric focusing effect on agarose, determined the proportion – transferrin with pI = 5.7: total transferrin, in serum and in plasma of the blood. In the group of persons not drinking alcohol this indicator was 0.8–4.1 in serum and 0.5–2.9 in plasma, and in alcoholics these values were 2.7–9.8 and 2.7–8.8 in serum and plasma respectively. In various examinations, the diagnostic specificity of CDT in the recognition of alcoholism varied from 92.2% to 100% (higher values were obtained for measurements performed in plasma). In turn, Jeppsson et al. [17], using the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC), rated the diagnostic sensitivity of CDT as just 55% for persons con-

suming about 40 g of ethanol daily, but in the case of consumption of over 70 g of ethanol, the sensitivity increased to 100%. Determination of CDT is currently considered the most specific laboratory marker of alcoholic disease. The long half-life of the isoform of transferrin with $pI = 5.7$ (about 10 days) and CDT (about 15 days) enable using these compounds for estimation of the alcohol consumption during 3 weeks preceding an examination [17, 35]. The risk of a false positive result is minimal, as neither damage to the liver nor taking of drugs affect results of the test. However, the presence of CDT in the blood can be caused by inborn errors of glycoprotein metabolism. Individual cases of a slight elevation in the concentration of non-typical isoforms of transferrin have also been described in persons with neuro-psychiatric disorders [33].

Summing up, one should state that oxidative metabolism in the liver is the main metabolic pathway and the main source of the hepatotoxicity of ethanol. It is known, however, that protracted consumption of ethanol causes a series of detrimental effects in many organs. In small amounts, ethanol is metabolised *via* a non-oxidative pathway, causing the formation of lipophilic toxic compounds. These substances easily penetrate through to tissues and organs, where, as highly reactive compounds, they interfere with important biological processes. Products of the non-oxidative metabolism of ethanol and metabolites of the ethanol-induced altered transformation of serotonin and transferrin, being compounds with a long half-lives, are used for diagnostic purposes both in clinical and forensic medicine.

References:

1. Alling C., Gustavsson L., Månsson J. [et al.], Phosphatidylethanol formation in rat after ethanol treatment, *Biochimica et Biophysica Acta* 1984, vol. 793, pp. 119–123.
2. Alt A., Janda I., Seidel S. [et al.], Determination of ethyl glucuronide in hair samples, *Alcohol & Alcoholism* 2000, vol. 35, pp. 313–314.
3. Aradottir S., Lundqvist C., Alling C., Phosphatidylethanol in rat organs after ethanol exposure, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2002, vol. 26, pp. 514–518.
4. Auwärter V., Sporkert F., Hartwig S. [et al.], Fatty acid ethyl esters as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotallers, *Clinical Chemistry* 2001, vol. 47, pp. 2114–2123.
5. Benthin G., Änggård E., Gustavsson L. [et al.], Formation of phosphatidylethanol in frozen kidneys from ethanol-treated rats, *Biochimica et Biophysica Acta* 1985, vol. 835, pp. 385–389.
6. Calabrese V., Rizza V., Effects of L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat, *Neurochemical Research* 1999, vol. 24, pp. 79–84.

7. Calabrese V., Scapagnini G., Catalano C. [et al.], Effects of acetyl-L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat, *Neurochemical Research* 2001, vol. 26, pp. 167–174.
8. Doyle K., Bird D., al-Salihi S. [et al.], Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion, *Journal of Lipid Research* 1994, vol. 35, pp. 428–437.
9. Droenner P., Schmitt G., Aderjan R. [et al.], A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans, *Forensic Science International* 2002, vol. 126(1), pp. 24–29.
10. Gatalica Z., Moehren G., Hoeck., Unilateral nephrectomy selectively stimulates phospholipase D in the remaining kidney, *Biochimica et Biophysica Acta* 1993, vol. 177, pp. 87–92.
11. Haber P., Wilson J., Apte M. [et al.], Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility, *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 1993, vol. 121, pp. 759–764.
12. Helander A., Beck O., Boysen L., 5-hydroxytryptophol conjugation in man: influence of alcohol consumption and altered serotonin turnover, *Life Sciences* 1995, vol. 56, pp. 1529–1534.
13. Helander A., Beck O., Jacobsson G. [et al.], Time course of ethanol-induced changes in serotonin metabolism, *Life Sciences* 1993, vol. 53, pp. 847–855.
14. Helander A., Beck O., Jones W., Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol and 5-hydroxytryptophol, *Clinical Chemistry* 1996, vol. 42, pp. 618–624.
15. Helander A., Wikström T., Löwenmo C. [et al.], Urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 5-hydroxytryptophol after oral loading with serotonin, *Life Sciences* 1992, vol. 50, pp. 1207–1213.
16. Hungund B., Goldstein D., Vollegas F. [et al.], Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice, *Biochemical Pharmacology* 1988, vol. 73, pp. 3001–3004.
17. Jeppsson J., Kristensson H., Fimiani C., Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol, *Clinical Chemistry* 1993, vol. 39, pp. 2115–2120.
18. Kanfer J., The base exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue, *Canadian Journal of Biochemistry* 1980, vol. 58, pp. 1370–1380.
19. Kaphalia B., Green S., Ansari G., Fatty acid ethyl ester synthases, and fatty acid anilide synthase in HepG2 and AR42J cell: interrelationships and inhibition by tri-*o*-tolyl phosphate, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999, vol. 159, pp. 134–141.
20. Lange L., Sobel B., Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol, *Journal of Clinical Investigation* 1983, vol. 72, pp. 724–731.
21. Lange L., Mechanism of fatty acid ethyl ester formation and biological significance, *Annals of the New York Academy Sciences* 1991, vol. 625, pp. 802–805.

22. Laposata E., Lange L., Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse, *Science* 1986, vol. 231, pp. 497–499.
23. Lieber C., Medical disorders of alcoholism, *New England Journal of Medicine* 1995, vol. 333, pp. 1058–1065.
24. Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G. [et al.], Localization and possible functions of phospholipase D isozymes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1999, vol. 1439, pp. 245–263.
25. Lundqvist C., Aradottir S., Alling C. [et al.], Phosphatidylethanol formation and degradation in brains of acutely and repeatedly ethanol-treated rats, *Neuroscience Letters* 1994, vol. 179, pp. 127–131.
26. Menon N., Gores G., Shah V., Pathogenesis, diagnosis and treatment of alcoholic disease, *Mayo Clinic Proceedings* 2001, vol. 76, pp. 1021–1029.
27. Moore C., Lewis D., Fatty acid ethyl esters in meconium: biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates, *Clinica Chimica Acta* 2001, vol. 312, pp. 235–237.
28. Pragst F., Auwaerter V., Sporkert F. [et al.], Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Forensic Science International* 2001, vol. 121, pp. 76–88.
29. Reffai M., Nguyen P., Steffensen T. [et al.], Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for pre-mortem ethanol intake, *Clinical Chemistry* 2002, vol. 48, pp. 77–83.
30. Schmidt J., Fernandez-del Castillo C., Rattner W. [et al.], Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates, *Gastroenterology* 1992, vol. 103, pp. 1009–1016.
31. Schmitt G., Droenner P., Skopp G. [et al.], Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotallers, and suspected drinking drivers, *Journal of Forensic Sciences* 1997, vol. 42, pp. 1099–1102.
32. Seidl S., Wurst F.M., Alt A., Ethyl glucuronide – a biological marker for recent alcohol consumption, *Addiction Biology* 2001, vol. 6, pp. 205–212.
33. Stibler H., Kjellin K., Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins, *Journal of Neurology Sciences* 1976, vol. 30, pp. 269–285.
34. Stibler H., Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed, *Clinical Chemistry* 1991, vol. 37, pp. 2029–2037.
35. Storey E., Mack U., Powell L. [et al.], Use of chromatofocusing to detect a transferrin variant in serum of alcoholic subjects, *Clinical Chemistry* 1985, vol. 31, pp. 1543–1545.
36. Szczepiorkowski Z., Dickersin R., Laposata M., Fatty acid ethyl esters decrease human hepatoblastoma cell proliferation and protein synthesis, *Gastroenterology* 1995, vol. 108, pp. 515–522.

37. Varga A., Alling C., Formation of phosphatidylethanol in vitro in red blood cells from healthy volunteers and chronic alcoholics, *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 2002, vol. 140, pp. 79–83.
38. Varga A., Hansson P., Johnson G. [et al.], Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics, *Clinica Chimica Acta* 2000, vol. 299, pp. 141–150.
39. Vesterberg O., Petren S., Schmidt D., Increased concentrations of a transferrin variant after alcohol abuse, *Clinica Chimica Acta* 1984, vol. 141, pp. 33–39.
40. Werner J., Laposata M., Fernandez-Del Castillo C. [et al.], Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol, *Gastroenterology* 1997, vol. 113, pp. 286–294.
41. Werner J., Saghir M., Warshaw A. [et al.], Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol, *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 2002, vol. 283, pp. G65–G73.
42. Wurst F., Kempter C., Seidl S. [et al.], Ethyl glucuronide – a marker of alcohol consumption and relapse marker with clinical and forensic implications, *Alcohol & Alcoholism* 1999, vol. 34, pp. 71–77.
43. Wurst F., Schüttler R., Kempter C. [et al.], Can ethyl glucuronide be determined in post-mortem body fluids and tissues?, *Alcohol & Alcoholism* 1999, vol. 34, pp. 262–263.
44. Zimmer H., Schmitt G., Aderjan R., Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, vol. 26, pp. 11–16.

BEZTLENOWY METABOLIZM ETANOLU ORAZ JEGO WPŁYW NA SZLAK METABOLICZNY SEROTONINY I TRANSFERRYNY

Ewa CZECH, Marek HARTLEB

WSTĘP

Alkoholizm jest jednym z największych społecznych, ekonomicznych i zdrowotnych problemów współczesnego świata, a alkohol jedną z najczęściej stosowanych używek. Następstwem przewlekłego spożywania alkoholu etylowego są zmiany patologiczne o charakterze somatycznym i psychicznym. Alkohol indukuje szereg nieprawidłowości w metabolizmie komórek, prowadząc do zaburzeń strukturalnych i czynnościowych narządów wewnętrznych, zwłaszcza wątroby [23, 26].

Okolo 90–95% spożytego etanolu ulega biotransformacji na drodze metabolizmu tlenowego. Niezmetabolizowany alkohol jest eliminowany w niewielkich ilościach przez nerki (0,5–2%), płuca (1,6–6%) i skórę (<0,5%). Za tlenowy metabolizm etanolu odpowiadają: dehydrogenazy – alkoholowa (ADH) i aldehydowa (ALDH), układ mikrosomalny (MEOS) i katalaza. Podstawowym metabolitem tlenowej biotransformacji etanolu jest aldehyd octowy. Związek ten jest uważany za główną przyczynę uszkodzenia narządów wewnętrznych u alkoholików. Metabolity utleniania etanolu powstają przede wszystkim w wątrobie, a w układzie krążenia występują jedynie w ilościach śladowych. Przypuszcza się więc, że uszkodzenie narządów, w których proces utleniania alkoholu posiada znaczenie marginalne lub jest nieobecny, może mieć odmienne podłoże metaboliczne.

W latach osiemdziesiątych dwudziestego wieku zwrócono uwagę na obecność beztlenowego metabolizmu etanolu [22]. W niniejszej pracy omówiono związki, które powstają w wyniku tych przemian oraz ich wielonarządowe efekty toksyczne. Wspomniano również o wpływie etanolu na zmianę szlaków metabolicznych serotoniny oraz izoform transferryny. Ze względu na długie okresy półtrwania i tkankowe zdolności kumulacyjne, większość tych metabolitów znalazła zastosowanie diagnostyczne, wykazując wysoką czułość w rozpoznawaniu ukrywanej przez pacjenta choroby alkoholowej w porównaniu do bardziej popularnych, lecz mało swoistych wskaźników enzymatycznych (GGT, ALT, AST) ferrytyny lub średniej objętości krwinki czerwonej.

BEZTLENOWY METABOLIZM ETANOLU

Estry etylowe kwasów tłuszczowych

Głównym produktem metabolizmu beztlenowego etanolu są estry etylowe kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid ethyl esters; FAEE), których obecność wykazano w narządach osób zmarłych z powodu ostrego zatrucia alkoholowego. FAEE są syntetyzowane przy udziale swoistych syntaz, których aktywność ujawniono w sercu, mózgu, wątrobie, lecz przede wszystkim w trzustce [19, 20]. Syntazy FAEE

wykazują specyficzną substratową wobec cis-nienasyconych 18 węglowych wolnych kwasów tłuszczowych.

Surowicze stężenia FAEE korelują ze stężeniem etanolu we krwi. FAEE są transportowane we krwi przez lipoproteiny należące do klasy LDL, a w znacznie mniejszym stopniu przez inne białka osoczowe [8]. FAEE są związkami o udowodnionej toksyczności komórkowej i narządowej. W badaniach *in vitro* FAEE wykazują szczególną toksyczność wobec błon komórkowych, zwłaszcza mitochondrialnych i lizosomalnych [11, 16, 20]. Poza tym FAEE zaburzają antyoksydacyjny potencjał komórkowy, wywołując stres oksydacyjny. Stwierdzono, że FAEE podwyższają aktywność glutationowej (GSH) S-transferazy i powodują wzrost stężenia wodoronadtlenków lipidowych [6, 7]. FAEE mają też zdolność hamowania proliferacji komórkowej i syntezy białek [36].

Narządem najbardziej podatnym na toksyczne działanie FAEE jest trzustka. W badaniach na szczurach, którym podawano dożylnie FAEE, stwierdzono obrzęk trzustki z towarzyszącym mu wzrostem stężenia białka aktywującego trypsynogen oraz zmianami ultrastrukturalnymi pod postacią lipidowej wakuolizacji cytoplazmy komórek pęcherzykowych trzustki [30, 40]. Tak więc u alkoholików FAEE mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie ostrego alkoholowego zapalenia trzustki, aktywując trypsynogen już w komórkach pęcherzykowych tego narządu, podczas gdy w warunkach fizjologicznych białko to jest aktywowane przez enterokinazy jelitowe dopiero po przedostaniu się z sokiem trzustkowym do dwunastnicy. Czynnikiem aktywującym trypsynogen *in situ* mogą być także niektóre enzymy (np. katepsyna B) pochodzące z uszkodzonych przez FAEE lizosomów. Potwierdzeniem roli FAEE w patogenezie ostrego zapalenia trzustki jest możliwość wywołania tej choroby u zwierząt karmionych etanolem, u których zablokowano wszystkie tlenowe szlaki metabolizmu etanolu przy pomocy 4-metylopyrazolu, aminotriazolu i siarczanu diallilu [41].

FAEE posiadają długi okres biologicznego półtrwania wynoszący około 16 godzin oraz zdolność kumulacji m.in. w mózgu, trzustce i mięśniu sercowym, w którym może osiągać stężenia do 100 μM [21]. Poza tym FAEE gromadzą się w tkance tłuszczowej i we włosach. Pomiar FAEE w tych tkankach wykorzystano w badaniach pośmiertnych jako test na spożycie etanolu przed zgonem [4, 28, 29]. Z kolei badanie obecności FAEE w smółce pozwala na ocenę stopnia narażenia płodu na etanol [27].

Fosfatydyloetanol

Estry kwasu fosfatydowego są od dawna znanymi związkami w świecie roślinnym. Yang i Dowson odkryli w 1967 roku proces fosfatydytacji etanolu w czasie jego inkubacji z fosfatydylocholiną w obecności roślinnej fosfolipazy D. W końcu lat siedemdziesiątych dwudziestego wieku fosfolipaza D została wykryta także u ssaków we frakcjach mikrosomalnych wątroby, płuc i mózgu [18], jednak dokładna charakterystyka tego enzymu przypada dopiero na koniec lat dziewięćdziesiątych [24].

Badając u szczurów wpływ etanolu na metabolizm kwasów tłuszczowych i prostaglandyn, Alling i in. [1, 5] zauważyli w mózgu, wątrobie, nerkach i mięśniach szkieletowych tego zwierzęcia obecność nieznanego dotychczas kwaśnego lipidu. W wyniku analizy chromatograficznej ustalono, że związek ten jest fosfatydyloetanolem (ang. phosphatidylethanol; PEth). Cząsteczka ta tworzona jest w błonie komórkowej w reakcji transfosfatydytacji fosfatydylocholino przy udziale fosfolipazy D w obec-

ności etanolu. Przy braku etanolu zamiast PEth powstaje kwas fosfatydowy, który jest ważnym regulatorem komunikacji wewnątrzkomórkowej i przezłonowej. Natomiast utworzenie PEth zakłóca te procesy wskutek zwiększania płynności błon komórkowych i zmiany funkcji białek stanowiących integralną część tych błon.

Powstawanie PEth w tkance mózgowej i nerkowej ssaków po spożyciu etanolu zostało udokumentowane zarówno w badaniach *in vitro* jak również *in vivo* [1, 5, 10, 25]. U osób pijących regularnie alkohol obecność PEth wykryto ostatnio także w neutrofilach i erytrocytach, a w śladowych ilościach w płytkach krwi [38]. W pierwszym dniu abstynencji stężenia PEth są bardzo zróżnicowane, co prawdopodobnie wynika z indywidualnych różnic w aktywności fosfolipazy D. Związek ten jest eliminowany z krwi w modelu jednokompartamentowym. Jego biologiczny okres półtrwania wynosi 4 dni. U większości badanych stwierdza się obecność PEth we krwi, lecz nie w osoczu, jeszcze przez około 14 dni od zaprzestania spożycia alkoholu. Długi okres półtrwania czyni PEth potencjalnym wskaźnikiem laboratoryjnym konsumpcji alkoholu w okresie poprzedzających 2 tygodni [38], natomiast zdolność gromadzenia tego związku w tkankach pozwala na wykorzystanie pomiarów jego stężenia w orzecznictwie sądowym. Aradottir i in. [3] wykazali, że podawanie szczurom etanolu przez okres 4–6 tygodni powoduje kumulację PEth w mózgu, mięśniówce żołądkowej, płucach, nerkach, wątrobie i śledzionie, co wiąże się z wysoką aktywnością fosfolipazy D w tych narządach. Z kolei duże stężenie PEth w śledzionie jest następstwem degradacji w tym narządzie erytrocytów, w których związek ten osiąga najwyższą wartość [37]. Brak PEth w trzustce może być – według autorów – rzeczywistym brakiem lub rezultatem szybkiej degradacji tego związku przez lipazy trzustkowe.

Glukuronid etylu

Glukuronid etylu (ang. ethyl glucuronide; EtG) powstaje wyłącznie w wyniku spożycia etanolu, którego 0,5–1,6% dawki całkowitej zostaje sprzężone z aktywną formą kwasu glukuronowego [31]. Synteza glukuronidów jest bardzo ważną reakcją drugiej fazy detoksykacji ksenobiotyków, a największą aktywność w tym zakresie wykazuje wątrobia. Aktywność UDP glukuronilo-transferazy wykazano również w nerkach, jelicie, mózgu mięśniu sercowym, nadnerczu, śledzionie i płucach.

Stężenie EtG we krwi jest wypadkową wydolności procesów wchłaniania z przewodu pokarmowego, dystrybucji i eliminacji etanolu oraz indywidualnej aktywności UDP-glukuronilotransferazy. Maksymalne stężenie EtG we krwi obserwuje się po 2,5–5,5 godzinach od spożycia alkoholu [9]. W zależności od dawki alkoholu obecność EtG stwierdza się we krwi jeszcze przez 6–18 godzin, a w moczu nawet do 84 godzin po konsumpcji etanolu [32]. EtG stanowi pomost między wskaźnikami o krótkim i długim okresie półtrwania [41] i jest perspektywnym markerem spożywania alkoholu, który dzięki wysokiej czułości i swoistości może być wykorzystywany do oceny skuteczności leczenia odwykowego. Oznaczanie glukuronidu etylu w materiale pośmiertnym (zarówno w płynach, jak i tkankach) stwarza również obiecujące perspektywy dla orzecznictwa sądowego [43]. Wykazano bowiem, że obecność EtG m.in. we włosach osób zmarłych jest bezspornym dowodem spożycia alkoholu przed śmiercią [2, 44].

WPLYW ETANOLU NA SZLAK METABOLICZNY SEROTONINY I IZOFORM TRANSFERRYNY

5-hydroksytryptofol

Serotonina (5-hydroksytryptamina; 5-HT) jest hormonem odgrywającym ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Nieprawidłowe funkcjonowanie układu serotonergicznego jest istotnym elementem wielu chorób związanych z zaburzeniami napięcia spoczynkowego mięśniówki naczyniowej, łaknienia, snu i równowagi emocjonalnej.

Katabolizm 5-HT rozpoczyna się od tlenowej deaminacji do acetaldehydu 5-hydroksyindolowego (5-HIAL) przy udziale oksydazy monoaminowej. U ludzi 5-HIAL jest następnie degradowany do kwasu 5-hydroksyindolowego (5-HIAA) w obecności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). Minimalne ilości 5-HIAL są w warunkach fizjologicznych zredukowane do 5-hydroksytryptofolu (5-HTOL) przy udziale dehydrogenazy alkoholowej lub reduktazy aldehydowej. 5-HTOL jest wydalany z moczem prawie wyłącznie w formie sprzęgniętej z kwasem siarkowym lub glukuronowym [12]. W dobowej zbiórce moczu stosunek ilościowy 5-HTOL do 5-HIAA jest mniejszy od 0,01. W rakowiaku oraz po spożyciu owoców zawierających dużo serotoniny (np. banany, kiwi, ananasy), oprócz wzrostu stężenia 5-HIAA, obserwuje się w moczu także 7–10-krotny wzrost stężenia 5-HTOL. Ze względu na współistniejący wzrost produkcji 5-HIAA, proporcja 5-HTOL/5-HIAA osiąga wartości w zakresie 0,007–0,01. Przewlekłe spożywanie etanolu narusza równowagę oksydacyjno-redukcyjną, modyfikując również metabolizm serotoniny, w którym związek ten zamiast oksydacji ulega procesowi redukcji. W rezultacie zmniejsza się produkcja głównego metabolitu 5-HIAA przy równoczesnym, około 50-krotnym wzroście stężenia 5-HTOL [15]. W warunkach tych proporcja 5-HTOL/5-HIAA zwiększa się do 0,4–0,5 [12]. Nasilenie produkcji 5-HTOL może być również efektem kompetycyjnego hamowania aktywności ALDH przez aldehyd octowy (pierwszy produkt utlenienia alkoholu) i (lub) wzrostu stężenia NADH w wyniku utleniania etanolu i aldehydu octowego [13]. Wydolność procesu sprzęgania nadmiernych ilości 5-HTOL z kwasem siarkowym lub glukuronowym, który odbywa się nie tylko w wątrobie, lecz również w osoczu ma istotne znaczenie dla ujawnienia i rozmiarów toksyczności 5-HTOL [12]. Podwyższone stężenie 5-HTOL obserwuje się jeszcze we krwi przez kilkanaście godzin po zaniku etanolu zarówno krwi, jak również moczu. Wykrywanie 5-HTOL w płynach biologicznych zostało wykorzystane jako test konsumpcji alkoholu, bowiem określając proporcję 5-HTOL/5-HIAA w kolejnych próbkach moczu, można stwierdzić spożycie nawet umiarkowanych ilości etanolu w ciągu 24 godzin poprzedzających to badanie [14].

Transferyna z niedoborem kwasu sjałowego

Transferyna jest glikoproteina, która może wiązać 2 atomy trójwartościowego żelaza. W swojej cząsteczce zawiera 5,3% węglowodanów. Grupa węglowodanowa posiada 2 identyczne łańcuchy boczne, w skład których wchodzi 4 węglowodany, tj. N-acetyloglukozamina, mannoza, galaktoza oraz kwas sjałowy (N-acetyloneuraminowy) stanowiący zakończenie tych łańcuchów. Kwas sjałowy, niosąc silny ładunek ujemny, nadaje cząsteczce charakter kwaśny. Odszczepienie jednej cząsteczki

kwasy sjałowego odpowiada za podwyższenie pH środowiska o około 0,1. Ponadto, w zależności od ilości cząsteczek kwasu sjałowego, transferryna tworzy izoformy o różnych wartościach punktu izoelektrycznego (pI). Odszczepienie kwasu sjałowego prowadzi do zmniejszenia ładunku ujemnego i wzrostu pI. Ilość reszt kwasu sjałowego w cząsteczce transferryny determinuje istnienie 4 podstawowych jej izoform, tj. o pI = 5,2 (5 reszt), pI = 5,4 (4 reszty), pI = 5,6 (3 reszty), pI = 5,7 (2 reszty). Izofорма transferryny u ludzi zdrowych posiada pI = 5,2, natomiast frakcja o pI = 5,7 stanowi nie więcej niż 0,8% całkowitej transferryny.

W 1976 r. Stibler i Kjellin [34] wykryli nieprawidłowe postacie transferryny w surowicy i w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z poalkoholowymi objawami uszkodzenia mózdzku. Nieprawidłowości te polegały na całkowitym lub częściowym niedoborze kwasu sjałowego. Dalsze badania osób uzależnionych od alkoholu wykazały, że stężenie frakcji o pI = 5,7 zwiększa się u nich prawie dziesięciokrotnie, a u niektórych pojawia się izofорма pI = 5,9 całkowicie pozbawiona kwasu sjałowego (transferryna desjałowana; ang. carbohydrate-deficient transferrin; CDT).

Vesterberg i in. [39], stosując metodę izoelektrycznego ogniskowania na agarozie, wyznaczyli w surowicy i osoczu krwi proporcje transferryny o pI = 5,7 do transferryny całkowitej. W grupie osób nie pijących alkoholu wskaźnik ten w surowicy krwi wynosił 0,8–4,1 (0,5–2,9 w osoczu), a u alkoholików 2,7–9,8 (2,7–8,8 w osoczu). W różnych badaniach swoistość diagnostyczna transferryny desjałowanej w rozpoznawaniu alkoholizmu wynosiła od 92,2% do 100% (wyższe wartości dla pomiarów wykonywanych w osoczu). Z kolei Jeppsson i in. [17], stosując technikę wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), ocenili czułość diagnostyczną transferryny desjałowanej zaledwie na 55% u osób spożywających około 40 g etanolu dziennie, lecz w przypadku konsumpcji ponad 70 g etanolu czułość badania wzrastała do 100%. Oznaczanie transferryny desjałowanej uchodzi obecnie za najbardziej swoisty wskaźnik laboratoryjny choroby alkoholowej. Długi okres półtrwania izoformy transferryny o pI = 5,7 (około 10 dni) i transferryny desjałowanej (około 15 dni) można wykorzystać do oceny spożycia alkoholu w ciągu 3 tygodni poprzedzających badanie [17, 35]. Ryzyko wyniku fałszywie pozytywnego jest znikome, bowiem uszkodzenia wątroby, a także przyjmowane leki, nie powodują zafałszowania wyników testu. Przyczyną obecności we krwi transferryny desjałowanej mogą być natomiast wrodzone zaburzenia metabolizmu glikoprotein. Pojedyncze przypadki nieznacznego podwyższenia stężenia nietypowych izoform transferryny opisano również u osób z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi [33].

Podsumowując, należy stwierdzić, że wątrobowy metabolizm tlenowy jest podstawowym szlakiem metabolicznym i głównym źródłem hepatotoksyczności etanolu. Wiadomo jednak, iż przewlekłe spożywanie etanolu wywiera szereg niekorzystnych efektów o zasięgu wielonarządowym. W niewielkiej ilości etanol jest metabolizowany na drodze beztlenowej, powodując powstawanie lipofilnych związków toksycznych. Substancje te łatwo przenikają do tkanek i narządów, gdzie – jako związki o wysokiej reaktywności – ingerują w ważne procesy biologiczne. Produkty beztlenowego metabolizmu etanolu oraz metabolity zmienionej przez etanol przemiany serotoniny i transferryny jako związki o długim okresie półtrwania są wykorzystywane w celach diagnostycznych zarówno w medycynie klinicznej, jak i sądowej.