

DISTURBANCES OF ZINC HOMEOSTASIS AMONG ALCOHOLICS

Agnieszka MORAWSKA¹, Anna KRÓL¹, Ewa GOMÓŁKA¹,
Wojciech PIEKOSZEWSKI^{1, 2}, Aleksander KAMENCZAK³

¹ *Department of Clinical and Industrial Toxicology, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow*

² *Institute of Forensic Research, Cracow*

³ *Toxicology Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow*

ABSTRACT: Zinc is an essential trace element, performing important physiologic functions in the human organism. Many chronic diseases (growth inhibition, dermal lesions, hypogonadism, increased susceptibility to infections, psychic disturbances, and atherosclerotic changes) are accompanied by a deficiency of this bioelement, caused mainly by insufficient supply or lowered bioavailability. Conversely, exposure to zinc (oxide) fumes causes symptoms reminiscent of influenza. The purpose of this study was to determine the effect of duration of alcoholic disease and length of uninterrupted drinking episodes on the level of zinc in serum and on biochemical parameters characterising liver function.

The study was performed on men who were alcohol dependent and acutely intoxicated. The control group consisted of healthy volunteers who drank alcohol from time to time. Alcohol and zinc concentrations were determined in all the studied men, and biochemical and haematological analyses were also carried out (on all subjects). The obtained results show that chronic alcohol consumption causes disturbances of zinc homeostasis, leading to a decrease in its serum level of over 25% compared to healthy people. The zinc concentration decreased as the duration of uninterrupted drinking increased. Among persons with an uninterrupted drinking episode of more than 60 days, the differences were statistically significant in relation to persons drinking continuously for less than 14 days. The duration of an uninterrupted drinking episode has a significant effect on (disturbances of) essential liver function, evidenced by increased values of liver damage indicators i.e. AspAt, ALAT, GGTP, but the changes are not correlated with the patients' zinc levels.

KEY WORDS: Zinc; Ethanol; Alcoholism.

Problems of Forensic Sciences, vol. LV, 2003, 120–130
Received 5 December 2003; accepted 30 December 2003

INTRODUCTION

Zinc is an essential trace element, performing important physiologic functions in the human organism. The overall quantity of zinc in an adult or-

ganism amounts to 2–2.5 g, of which 55% is in muscles and about 30% in bones. Large quantities of the element are accumulated in brain structures involved in learning and memorising processes, i.e. the hippocampus, cerebral cortex, and amygdaloid nuclei. Normal blood plasma zinc levels range from 0.7 mg/l to 1.3 mg/l and are maintained at these levels thanks to homeostatic mechanisms that are not fully understood [9]. The biological role of zinc is connected with its presence in a number of enzymes regulating the basal metabolism (e.g. superoxide dismutase, alcoholic dehydrogenase, carbonic anhydrase) [7, 9, 14]. Zinc is also a modulator of synaptic transmission in the central nervous system. As has been demonstrated, zinc is a strong inhibitor of ionotropic NMDA receptors in stimulating (glutamatergic) synapses [4, 6, 9]. Deficiency of this bioelement, caused mostly by an insufficient supply or lowered bioavailability, accompanies many chronic diseases, including growth inhibition, dermal lesions, hypogonadism, increased susceptibility to infections, psychological disturbances (depression, emotional instability), agoraphobia, twilight blindness, atherosclerotic changes and others [1, 2, 7, 9]. Zinc deficiency also results in a drop in active – i.e. bound with zinc – thymulin (the thymus hormone involved in immunomodulation processes), atrophy of the thymus and a slowing down of division of thymocytes present in it. This results in increased susceptibility to viral, bacterial, and mycotic infections [4, 6, 9]. On the other hand, an excess of zinc, observed in workers exposed to zinc oxide fumes, may cause a disease known as “brass founders’ fever” reminiscent of symptoms of influenza. Significant quantities of zinc present in the alimentary tract modify the bio-availability of other essential metals, especially Cu and Fe, which can lead to their deficiency in an organism [3, 5, 9, 11]. Recently, research has been conducted into the role of zinc in the pathophysiology of depression and in mechanisms of antidepressant action [5, 9, 12, 15].

The aim of this work was to define the influence of the duration of alcoholic disease and length of uninterrupted drinking episodes on the level of zinc in serum and on biochemical parameters characterising liver function.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study was performed on alcohol dependent and acutely intoxicated men, admitted to the detoxification department of the L. Rydygier Voivodeship Specialist Hospital in Cracow. Data on the duration of dependence and length of uninterrupted drinking episode were gained on the basis of a medical interview. The control group consisted of healthy volunteers,

drinking alcohol from time to time. At the moment of admission to the department, blood was collected from all the patients, and alcohol and zinc concentration were determined and biochemical and haematological analyses were carried out. The authors gained the consent of the bioethics committee at the Collegium Medicum of the Jagiellonian University for conducting the research: consent designation number KBET/246/B/2002.

Analytical methods

Zinc in serum was determined by flame atomic absorption spectrophotometry with direct introduction into the flame of a serum sample diluted 1:5 with deionised water.

The working standard solution of concentration 10 mg/l zinc was prepared by a hundredfold dilution of the basic solution of concentration 1000 mg/l (Wzormat). Quality control of the determination was carried out by measurement of the zinc concentration in SERO reference material with Zinc concentration = 1.28–1.38 mg/l (Promochem).

Absorption measurements were performed using a Unicam Solar 939 spectrophotometer equipped with deuterium background correction. The following measurement parameters were used: wavelength of 213.8 nm, 0.5 nm slit, lamp current intensity – 4 mA, burner length – 10 cm, fuel blend – acetylene/compressed air. Calibration was carried out by the standard-series method, and a linear dependence between absorbency and Zn concentration was ascertained in the concentration range of 0.1–0.4 mg/l. The correlation coefficient was 0.999, and the straight regression equation was:

$$y = (5.907E - 0.04)x + (3.345E - 0.004) . \quad \{1\}$$

Ethanol was determined by means of the ADH enzymatic method with the use of SIGMA reagents and applying the procedure described by the test producer. During the zinc and ethanol determination, a routine intra-laboratory inspection was carried out.

The biochemical analyses were conducted in the Department of Laboratory Diagnostics of the L. Rydygier Voivodeship Specialist Hospital in Cracow.

RESULTS

The alcohol concentration in the blood of the alcohol dependent patients was in the range from 1.04 g/l to 3.68 g/l ($SD = 0.67$) (Figure 1). At the moment of admission to the detoxication department, 60% of patients showed a blood alcohol value exceeding 2 g/l. The volunteers' blood alcohol concentration was below the sensitivity of the method, i.e. 0.05 g/l. The duration of

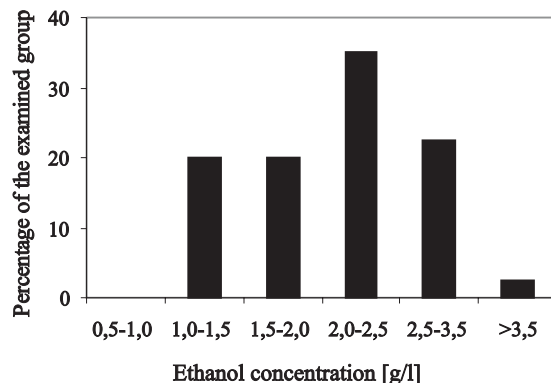


Fig. 1. The ethanol concentration distribution in the group of acutely intoxicated alcoholics.

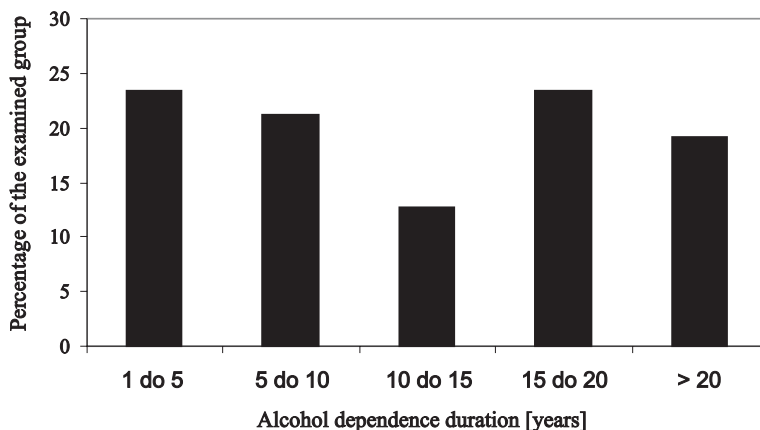


Fig. 2. Division of the examined population according to alcohol dependence duration.

alcohol dependence among the people in the examined group covered a broad range from 1 year to 30 years (Figure 2). Patients with an alcohol dependence duration of 5 to 15 years (44.68%) constituted the largest group. The length of uninterrupted drinking episodes was also very differentiated, from 2 days to 8 years; however, over 50% of patients had an uninterrupted drinking episode of up to 14 days (Figure 3).

Evaluating the effect of alcohol dependence on biochemical parameters characterising liver damage, it was found that most of the alcohol dependent patients showed increased activity of AlAt, AspAT, and GGTP, while in the control group, the level of these enzymes was within the limits of the normal

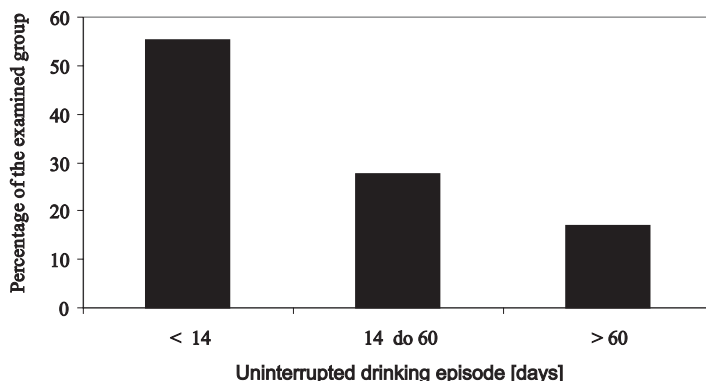


Fig. 3. Division of the examined population according to length of uninterrupted drinking episode.

physiologic range. Alcoholic disease duration and length of uninterrupted drinking episodes did not influence the magnitude of changes in biochemical parameters indicating liver damage (Table I), which can be explained by both the long dependence duration and the long time of uninterrupted drinking shown by a substantial number of the patients admitted to the detoxification department.

TABLE I. THE VALUES OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF LIVER DAMAGE IN ALCOHOLICS ACCORDING TO DEPENDENCE DURATION AND THE LENGTH OF UNINTERRUPTED DRINKING EPISODES

Norm	AlAT [U/l]	SD	AspAT [U/L]	SD	Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$]	SD	GGTP [U/l]	SD
	< 35		< 37		< 17		< 50	
Dependence duration [years]								
1–5	57.40	37.61	145.10	170.97	15.83	8.52	402.50	579.58
5–10	83.44	80.32	147.33	159.91	12.11	4.68	131.56	76.51
10–15	58.29	47.46	108.43	105.02	10.99	4.32	178.67	269.76
15–20	76.91	82.22	101.18	115.33	10.29	4.11	224.55	435.06
> 20	68.00	63.14	107.38	156.98	13.37	9.53	275.13	461.78
Duration of uninterrupted drinking episode [days]								
< 7	40.36	28.33	56.71	31.57	11.24	3.60	84.43	64.71
7–14	43.30	21.45	44.30	15.58	12.20	5.81	86.60	91.03
14–60	106.15	96.84	186.23	161.65	14.37	10.24	448.73	585.56
> 60	89.38	40.33	227.13	195.96	12.63	5.71	489.75	544.85

Serum zinc was lower in the alcohol dependent patients than in the healthy people, although its mean value was not lower than the lower level of the physiological range. This is in accordance with other authors' observa-

tions [10]. Average serum zinc concentrations in groups of patients according to alcohol dependence duration and length of uninterrupted drinking time are shown in Figures 4 and 5. Statistically significant differences ($p < 0.05$) in serum zinc values were observed only for patients with uninterrupted drinking time up to 14 days and ones drinking alcohol every day for over 60 days. Differences were also noticed in the other groups, but they were not statistically significant ($p > 0.05$).

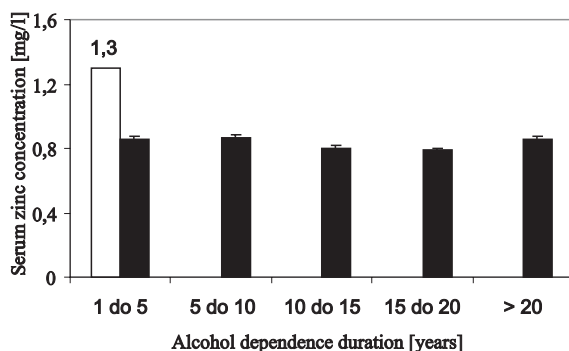


Fig. 4. The relationship between the blood zinc concentration and alcohol dependence duration.

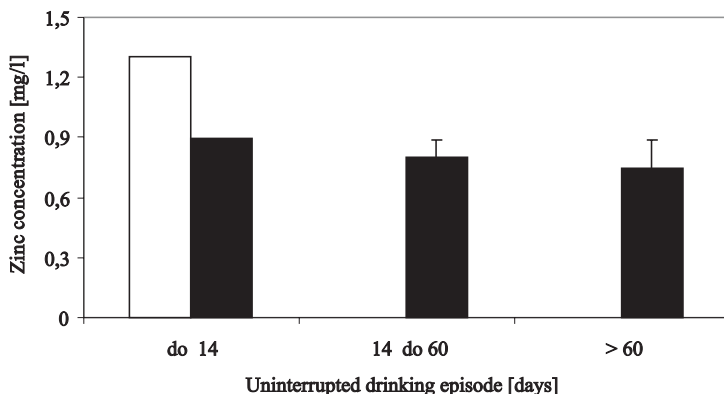


Fig. 5. The relationship between the blood zinc concentration and length of uninterrupted drinking episode.

In the alcoholics group examined by the study authors (similarly to experiments of Grungreiff et al. [7]) no correlation was observed between serum zinc value and liver function indicators (AlAT, AspAT, bilirubin,

GGTP). The best correlation coefficient was observed for the zinc – GTTP dependence ($r = 0.383$). Grungreiff et al. demonstrated, however, an inversely proportional relationship between zinc and ammonia concentration. However, other research workers indicate that the serum zinc level is connected with liver function, but not with length and frequency of alcohol drinking [10].

In summary, it can be stated that chronic heavy alcohol consumption causes disturbances of zinc homeostasis, leading to a decrease in its serum level by over 25% compared to concentrations shown by healthy people. It was also noticed that the zinc concentration decreased as the duration of the uninterrupted drinking episode increased. The observed differences were statistically significant in patients with uninterrupted drinking time up to 14 days and ones drinking alcohol every day for over 60 days ($p < 0.05$).

No correlation, however, was found between serum zinc level and ethanol values at the moment of admission of patients to the Detoxification Department. The length of the uninterrupted drinking episode significantly affects the magnitude of essential liver function disturbances, evidenced by increased values of organ damage indicators i.e. AspAt, ALAT, GGTP, but the changes are not correlated with the patients' zinc levels.

References:

1. Bjorneboe G. E., Johnsen J., Bjorneboe A., [et al.], Diminished serum concentration of vitamin E in alcoholics, *Annals of Nutrition and Metabolism* 1988, vol. 32 pp. 56–61.
2. Bjorneboe G. A., Johnsen J., Bjorneboe A. [et. al.], Effect of heavy alcohol consumption on serum concentrations of fat-soluble vitamins and selenium, *Alcohol* 1987, suppl. 1, pp. 533–537.
3. Conde-Martel A., Gonzalez-Reimers E., Santolaria F. [et. al.], Combined effects of ethanol and protein deficiency on hepatic iron, zinc, manganese, and copper contents, *Alcohol and Alcoholism* 1992, vol. 2, pp. 341–348.
4. Flora S. J., Pant S. C., Malhotra P. R. [et al.], Biochemical and histopathological changes in arsenic-intoxicated rats coexposed to ethanol, *Alcohol* 1997, vol. 14, pp. 563–568.
5. Gonzalez-Reimers E., Martinez-Riera A., Santolaria-Fernandez F. [et. al.], Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and faecal excretion, *Alcohol* 1998, vol. 16, pp. 7–12.
6. Gonzalez-Reimers E., Conde-Martel A., Santolaria-Fernandez F. [et. al.], Relative and combined roles of ethanol and protein malnutrition on muscle zinc, potassium, copper, iron, and magnesium, *Alcohol and Alcoholism* 1993, vol. 28, pp. 311–318.
7. Grungreiff K., Presser H. J., Franke D. [et. al.], Correlations between zinc, amino acids and ammonia in liver cirrhosis, *Zeitschrift für Gastroenterologie* 1988, Bd. 27 S. 731–735.

8. Menzano E., Carlen P. L., Zinc deficiency and corticosteroids in the pathogenesis of alcoholic brain dysfunction – a review, *Alcohol Clinical and Experimental Research* 1994, vol. 18, pp. 895–901.
9. Nowak G., Cynk w fizjologii, patofizjologii i terapii depresji, Instytut Farmakologii PAN, Kraków 2000.
10. Rodriguez-Moreno F., Gonzalez-Reimers E., Santolaria-Fernandez F. [et. al.], Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease, *Alcohol* 1997, vol. 14, pp. 39–44.
11. Rocchi E., Borella P., Borghi A. [et. al.], Zinc and magnesium in liver cirrhosis, *European Journal of Clinical Investigation* 1994, vol. 24, pp. 149–155.
12. Saksena H. C., Dhamija J. P., Jain H. R., Serum and urinary zinc levels in alcoholics, *Journal of the Association Physicians India* 1985, vol. 33, pp. 691–692.
13. Seri S., d'Alessandro A., Blackcurrant seed oil, zinc, and fetal alcohol syndrome, *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1997, vol. 73, pp. 5–21.
14. Yeh L. C., Cerklewski F. L., Interaction between ethanol and low dietary zinc during gestation and lactation in the rat, *Journal of Nutrition* 1984, vol. 114, 2027–2033.
15. Zima T., Fialova L., Mestek O. [et. al.], Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases, *Journal of Biomedical Science* 2001, vol. 8, pp 59–70.

ZABURZENIA HOMEOSTAZY CYNKU U OSÓB UZALEŻNIONYCH OD ALKOHOLU

Agnieszka MORAWSKA, Anna KRÓL, Ewa GOMÓŁKA,
Wojciech PIEKOSZEWSKI, Aleksander KAMENCZAK

WSTĘP

Cynk (Zn) jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym pełniącym w organizmie ważne funkcje fizjologiczne. U osoby dorosłej całkowita ilość cynku w ustroju wynosi 2–2,5 g, z czego 55% znajduje się w mięśniach, a około 30% w kościach. Duże ilości tego pierwiastka gromadzą struktury mózgu zaangażowane w procesy uczenia się i pamięci, tj. hipokamp, kora mózgowa i jądra migdałowe. Prawidłowe stężenia cynku w osoczu krwi wahają się między 0,7 mg/l a 1,3 mg/l i są utrzymywane na tym poziomie dzięki nie do końca poznanym mechanizmom homeostazy [9]. Biologiczna rola cynku związana jest z jego obecnością w szeregu enzymach regulujących podstawowe procesy przemiany materii (np. dysmutaza supernadtlenkowa, dehydrogenaza alkoholowa, anhydraza węglanowa) [7, 9, 14].

Cynk pełni też rolę modulatora transmisji synaptycznej w ośrodkowym układzie nerwowym. Jak wykazano, jest on silnym inhibitorem jonotropowych receptorów NMDA w synapsach pobudzających (glutaminianergicznym) [4, 6, 9].

Wielu schorzeniom towarzyszy niedobór tego biopierwiastka, najczęściej wywołany przez niedostateczną jego podaż lub obniżoną biodostępność. Należą do nich: zahamowanie wzrostu, zmiany skórne, hipogonadyzm, zwiększenie podatności na infekcje, zaburzenia psychiczne (depresje, chwiejność nastroju), jadłowstręt, ślepotą zmierzchowa, zmiany miażdżycowe i inne [1, 2, 7, 9]. Jego niedobór prowadzi również do spadku aktywnej, tj. związanej z cynkiem, tymuliny (hormonu grasicy zaangażowanego w procesy immunomodulacji), atrofi grasicy i spowolnienia podziałów obecnych w niej tymocytów. Efektem tego jest zwiększona zachorowalność na infekcje wirusowe, bakteryjne i grzybicze [4, 6, 9]. Z kolei nadmiar cynku obserwowany u pracowników narażonych na dymy tlenku cynku może wywołać chorobę znaną jako „gorączka odlewników” przypominającą objawami grypę. Znaczne ilości cynku obecne w przewodzie pokarmowym modyfikują biodostępność innych metali niezbędnych w organizmie, zwłaszcza Cu i Fe, co może prowadzić do ich niedoborów [3, 5, 9, 11].

Ostatnio prowadzone są badania nad rolą cynku w patofizjologii depresji i mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych [5, 9, 12, 15].

Celem pracy było określenie wpływu czasu trwania choroby alkoholowej i długości epizodów nieprzerwanego picia na poziom cynku w surowicy i na parametry biochemiczne charakteryzujące funkcję wątroby.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Badaniami objęto mężczyzn przyjętych na oddział detoksykacji Szpitala im. L. Rydygiera w Krakowie, uzależnionych od alkoholu i ostro zatrutych tym związkiem. Dane na temat czasu uzależnienia i trwania ciągu alkoholowego uzyskano na podstawie przeprowadzonego wywiadu lekarskiego. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy pijący alkohol okazynie. Od wszystkich pacjentów w momencie przyjęcia na oddział pobrano krew do oznaczenia stężenia alkoholu, cynku, wykonania badań biochemicznych i hematologicznych. Na badania uzyskano zgodę komisji bioetycznej działającej przy Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, nr zgody KBET/246/B/2002.

Metody analityczne

Cynk w surowicy oznaczano techniką płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej przez bezpośrednie wprowadzanie do płomienia próbki surowicy rozcieńczonej pięciokrotnie wodą dejonizowaną.

Wzorcowy roztwór roboczy cynku o stężeniu 10 mg/l otrzymany przez stukrotne rozcieńczenie podstawowego roztworu o stężeniu 1000 mg/l (Wzormat), Kontrolę jakości oznaczeń prowadzono w oparciu o pomiar stężenia cynku w materiale odniesienia firmy SERO o stężeniu Zn = 1,28–1,38 mg/l (Promochem).

Pomiaru absorpcji dokonano na spektrometrze SOLAR 939 firmy UNICAM wyposażonym w deuterową korekcję tła. Zastosowano następujące parametry pomiaru: długość fali – 213,8 nm, szerokość szczeliny monochromatora – 0,5 nm, natężenie prądu lampy – 4 mA, długość palnika – 10 cm, mieszanka paliwowa – acetylen/sprężone powietrze. Kalibrację wykonano metodą serii wzorców i stwierdzono zależność liniową absorbancji od stężenia Zn w zakresie stężeń od 0,1 do 0,4 mg/l. Otrzymany współczynnik korelacji wynosił 0,999, a równanie prostej regresji miało postać:

$$y = (5,907E - 0,04)x + (3,345E - 0,004) . \quad \{1\}$$

Etanol oznaczano metodą enzymatyczną ADH z wykorzystaniem odczynników firmy SIGMA i stosując procedurę opisaną przez producenta testu. W czasie oznaczeń cynku i etanolu prowadzono rutynową kontrolę wewnątrzlaboratoryjną.

Badania biochemiczne wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. L. Rydygiera w Krakowie.

WYNIKI

Stężenie alkoholu u pacjentów uzależnionych wahało się w granicach od 1,04 g/l do 3,68 g/l (SD = 0,67) (rycina 1). 60% stanowili pacjenci, u których stężenie etanolu w momencie przyjęcia na oddział detoksykacji wynosiło powyżej 2 g/l. Stężenie etanolu we krwi ochotników było poniżej czułości metody, czyli poniżej wartości 0.05 g/l. Czas uzależnienia od alkoholu osób z grupy badanej mieścił się w bardzo szerokim przedziale od 1 roku do 30 lat (rycina 2). Najliczniejszą grupę stanowili pacjenci uzależnieni od 5 do 15 lat (44,68%). Również czas ciągłego picia był bardzo zróż-

nicowany, od dwóch dni do ośmiu lat, z tym, że ponad 50% pacjentów było w ciągu alkoholowym do 14 dni (rycyna 3).

Oceniając wpływ uzależnienia od alkoholu na parametry biochemiczne charakteryzujące uszkodzenie wątroby, stwierdzono, że u większości pacjentów uzależnionych od alkoholu podwyższeniu uległa aktywność AlAT, AspAT i GGTP, natomiast w grupie kontrolnej poziom tych enzymów mieścił się w granicach normy fizjologicznej. Wpływ czasu trwania choroby alkoholowej oraz czasu trwania ciągu alkoholowego nie wpływał na wielkość zmian parametrów biochemicznych świadczących o uszkodzeniu wątroby (tabela 1), co można tłumaczyć zarówno długim okresem uzależnienia, jak i długim czasem nieprzerwanego picia u znacznej części pacjentów trafiających na oddział detoksykacji.

Stężenia cynku w surowicy pacjentów uzależnionych były niższe niż stwierdzane u ludzi zdrowych, jakkolwiek średnie ich wartości nie były niższe niż dolny poziom wartości fizjologicznych. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów [10]. Średnie stężenia cynku w surowicy pacjentów w grupach podzielonych ze względu na czas trwania uzależnienia od alkoholu i długość epizodu nieprzerwanego picia przedstawiono na rycinie 4 i rycinie 5. Różnice istotne statystycznie ($p < 0.05$) w stężeniu cynku w surowicy wykazano tylko dla pacjentów będących w ciągu alkoholowym do 14 dni, a pijącymi alkohol codziennie powyżej 60 dni. Dla pozostałych grup różnice te występowały, ale nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

Podobnie jak w doświadczeniach Grungreiff i in. [7], w badanej przez autorów tej pracy grupie alkoholików nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem cynku w surowicy i wskaźnikami funkcji wątroby (AlAT, AspAT, bilirubina, GGTP). Najlepszy współczynnik korelacji zaobserwowano dla zależności Zn – GTTP ($r = 0,383$). Grungreiff i in. wykazali jednak zależność odwrotnie proporcjonalną pomiędzy stężeniem cynku i amoniaku. Natomiast inni badacze wskazują na to, że poziom cynku w surowicy jest związany z funkcją wątroby, a nie z długością i częstością picia [10].

Podsumowując, można stwierdzić, że chroniczne picie alkoholu powoduje zaburzenie homeostazy cynku, prowadząc do obniżenia jego poziomu w surowicy o ponad 25% w stosunku do stężeń obserwowanych u ludzi zdrowych. Dostrzeżono również tendencję do obniżania się stężeń cynku w surowicy wraz ze wzrostem czasu trwania ciągu alkoholowego. Zaobserwowane różnice są istotne statystycznie dla grup uzależnionych będących w ciągu alkoholowym do 14 dni i uzależnionych w ciągu alkoholowym powyżej 60 dni ($p < 0.05$).

Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy poziomem cynku w surowicy a wartościami stężeń etanolu w chwili przyjęcia pacjentów na Oddział Detoksykacji. Długość trwania ciągu alkoholowego w istotny sposób zaburza funkcjonowanie wątroby, co manifestuje się podwyższonymi wartościami wskaźników uszkodzenia tego narządu, tj. AspAT, AlAT, GGTP ale zmiany te nie są skorelowane z poziomem cynku u tych pacjentów.