

Aspetti Tossicologici e relativi Markers nell' abuso Alcolico

Gaetano Magri

E-mail: gamagr@tin.it

Il consumo d'alcol è aumentato in modo considerevole negli ultimi anni, e con esso si è avuta una rapida crescita dei problemi correlati all'abuso d'alcol. Buona parte dei guidatori sorpresi alla guida in stato d'ebbrezza, hanno alla base un problema d'alcol dipendenza.

L'alcol etilico, di solito assunto per via orale, viene assorbito rapidamente da stomaco e primo tratto dell'intestino per diffusione semplice.

Il tempo necessario per completare il processo di assorbimento varia da 2 a 6 ore, in funzione di fattori quali la presenza di cibo e di altri liquidi, il tempo impiegato per l'ingestione della bevanda, la variabilità biologica fra individui [1].

L'alcol vista la solubilità in acqua ed il basso peso molecolare, appena assorbito si distribuisce rapidamente in tutti i tessuti (nei quali non può tuttavia essere immagazzinato) e fluidi del corpo, superando anche la barriera encefalica e quella placentare. L'andamento della concentrazione di alcol in alcuni liquidi biologici è stato determinato sperimentalmente da vari autori, anche recentemente.

Questi risultati mostrano che la massima concentrazione plasmatica viene raggiunta dopo circa 20 minuti dall'assunzione [2] e che saliva ed espirato seguono da vicino le variazioni dell' alcolemia, mentre le urine raggiungono un massimo con circa due ore di ritardo. Urine ed aria espirata rappresentano anche le principali vie di eliminazione dell'alcol e dei suoi prodotti di ossidazione. [3,4]

Le evidenze cliniche d'abuso alcolico sono piuttosto modeste nella sua fase precoce, mentre la maggior parte dei sintomi diventano manifesti solo dopo molti anni d'assunzioni eccessive. Tutte le sostanze che sono ingerite sia che abbiano un uso od un abuso "farmacologico" ubbidiscono alla regola che relaziona la dose al tempo che è la formula base per la definizione della tossicità.

L'effetto tossico è tanto maggiore quanto l'insulto è elevato, l'individualità biologica fa sì che la dipendenza sia un fattore individuale dove le tappe biochimiche del metabolismo sono più o meno suscettibili ai fattori tossici.

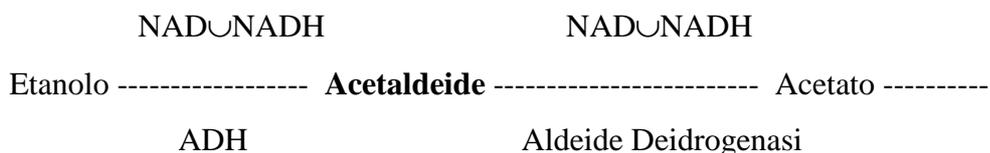
L'alcol etilico per sua natura, semplicità di struttura può inserirsi in più tappe del metabolismo cellulare inserendosi anche nel metabolismo celebrale manifestando una subdolezza negli effetti sia a breve che nel lungo periodo. Il limite generale di tossicità è di 0.8g/L ,considerato indice "di alterata percezione alla guida". Per arrivare a questo tasso alcolico nel sangue la quantità di alcol assunta a stomaco pieno dovrebbe essere vicina ai 65 g corrispondente ad una bottiglia di vino (750 ml) di 11/13 gradi e nella tabella qui riportata rappresentiamo le varie bevande in rapporto al peso corporeo di un adulto.

kg	g di Etanolo	ml di super Alcolico	ml di Vino	ml di Birra
50	40	127	414	1124
70	56	177	591	1576
90	72	228	769	2040

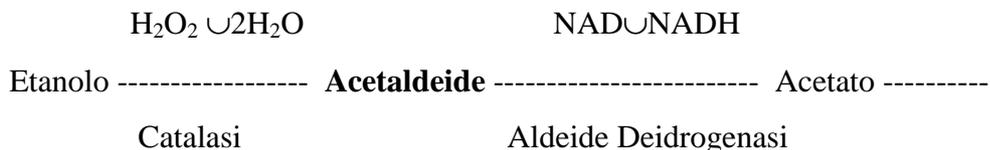
Dopo l'assorbimento l'etanolo viene prevalentemente metabolizzato (90-98 %) per via ossidativa, ad una velocità direttamente proporzionale al peso corporeo e costante nel tempo. Nell'uomo il fegato è da solo responsabile dell'80% del metabolismo dell'alcol, ed è in grado di ossidare 2 mmoli (92 mg di etanolo) di alcol per grammo di tessuto al minuto; la mucosa gastrica, il polmone e il rene contribuiscono in misura minore [10]

La reazione di ossidazione più importante avviene per azione dell'enzima Alcol Deidrogenasi con NAD come coenzima ed accettore di Idrogeno e produzione di Acetaldeide: l'alcol deidrogenasi (peso molecolare 85 KD), è un dimero di 4 tipi diversi di catene le cui possibili combinazioni danno luogo a 10 differenti isoenzimi, ciascuno contenente 2 atomi di Zn^{2+} per molecola. [5]

Lo ione Zn^{2+} coordinato agli atomi di zolfo di due residui di cisteina e all'atomo di azoto di un'istidina della catena polipeptidica, opera un attacco elettrofilo sull'ossigeno del gruppo alcolico, favorendo il distacco dello ione H^+ secondo lo schema di reazione

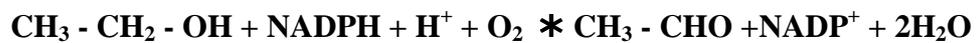
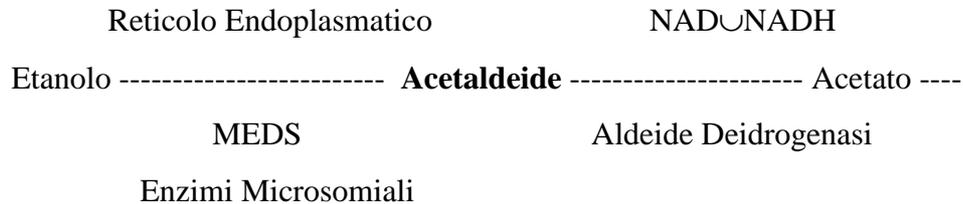


Quando la concentrazione di etanolo supera il valore di 20 mM, si può avere l'intervento della catalasi epatica, che catalizza la seguente reazione:



di nuovo con produzione di acetaldeide, ma con consumo di acqua ossigenata, quindi anche con funzione protettiva nei confronti dell'azione perossidica dell'acqua ossigenata.

Nel fegato esiste anche un sistema microsomiale che ossida l'etanolo (MEOS), che consiste di alcune ossidasi, a funzione mista, associate al reticolo endoplasmatico liscio dell'epatocita, e che fa parte essenzialmente del sistema del citocromo P-450. La reazione catalizzata è



in modo analogo ad altre ossidasi a funzione mista che intervengono nella detossicazione dei farmaci. Anche questo sistema, come la catalasi, ha una Km per Metanolo più elevata rispetto a quella dell'alcol deidrogenasi, tuttavia può accelerare l'azione di quest'ultima rimuovendo il NADH formato attraverso la transidrogenazione

In conclusione, in condizioni di non elevata assunzione di etanolo, l'enzima alcol deidrogenasi sembra essere il solo responsabile del catabolismo dell'alcol, mentre per livelli elevati di alcolemia anche il ruolo di catalasi e MEOS, ai quali non è però associata una produzione di ATP, diventa importante. Inoltre, tutte le condizioni che favoriscono la riossidazione del NADH e i fattori in grado di determinare un'induzione del sistema del citocromo P-450, quali alcuni trattamenti farmacologici, i corticosteroidi, l'assunzione cronica di alcol, determinano un ulteriore incremento della velocità di ossidazione dell'etanolo.

Altre modalità di eliminazione dell'etanolo

Quantità molto piccole di etanolo vengono coniugate con acido glicuronico, per opera di una delle glicuronil transferasi microsomiali, che richiedono l'utilizzo di acido glicuronico in forma di UDPGA, o con acido solforico, per azione di sulfotransferasi citoplasmatiche (reazioni di fase 2 della biotrasformazione dei farmaci); l'escrezione di questi prodotti è urinaria o biliare [4]. L'escrezione di alcol non modificato, di solito, interessa non più del 2% della quantità assunta ed avviene prevalentemente attraverso reni e polmoni, anche se piccole quantità si ritrovano anche nella saliva ed in altri liquidi organici [2]; può salire fino al 10 % in caso di ingestione massiva. La concentrazione urinaria è di poco superiore a quella ematica; quella alveolare è circa lo 0.05%.

Via metabolica non ossidativa.

Recentemente alcuni autori hanno messo in evidenza l'importanza di una via metabolica non ossidativa. Questa prevede, con meccanismo non del tutto chiarito, la idrolisi dei trigliceridi con produzione di acidi grassi e successiva esterificazione con etanolo con produzione di esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) [6]. Gli stessi

autori riportano la presenza dei FAEE su organi danneggiati da abuso alcolico, anche se non è dimostrata la loro tossicità "in vivo".

Effetti Metabolici dell' Etanolo

La trasformazione del NAD a NADH che risulta dal metabolismo dell' etanolo e dell' acetaldeide modifica altri processi metabolici collegati al NAD:

1. Il piruvato viene ridotto a lattato dalla lattato deidrogenasi (ossidando contemporaneamente il NADH a NAD), con aumento del lattato sierico e acidosi metabolica, il lattato aumentato inibisce la secrezione renale di urato e quindi può provocare attacchi di gotta.

2. L'aumentato livello epatico di NADH favorisce anche la riduzione di gliceraldeide-3-fosfato a glicerolo-3-fosfato, e inibisce la glicerolo fosfato deidrogenasi, portando a un aumentato livello di glicerolo-3-fosfato. L'eccesso di glicerolo-3-fosfato e di acidi grassi porta a un'aumentata esterificazione e accumulo di trigliceridi neutri nel fegato (steatosi epatica).

3. L'eccessiva produzione di acetato dall'acetaldeide, assieme agli aumentati livelli di NADH, stimola la sintesi di acidi grassi nel fegato mentre la loro ossidazione attraverso il ciclo di Krebs viene bloccata.

4. L'aumento del rapporto lattato/piruvato diminuisce la velocità della gluconeogenesi. Quindi, se le scorte epatiche di glicogeno sono esaurite per una scarsa assunzione di cibo, l'etanolo provoca ipoglicemia.

5. L'alto livello di NADH inibisce anche il sistema enzimatico che converte il galattosio in glucosio, con accumulo di galattosio.

6. L'ingestione cronica e massiva di alcol aumenta non solo la sua velocità di ossidazione, ma anche il consumo di O₂ (MEOS). Di conseguenza aumenta il rischio di ipossia epatica, specialmente alla fine dei sinusoidi venosi dove la PO₂ è già più bassa. Questo può spiegare perché la necrosi delle cellule epatiche nei forti bevitori si localizza soprattutto intorno alle vene collettrici (vene centrali).

7. Nel cervello l'azione delle MAO sulla dopamina, la noradrenalina e la serotonina dà origine a delle aldeidi che sono normalmente ossidate ad acidi (tra i quali 5-HIAA: acido 5-OH-indol-acetico) o ridotte a derivati del fenil-etilen-glicole. L'alcol o l'acetaldeide che si forma da esso, può inibire questi passaggi ossidativi o riduttivi, e aumentare di conseguenza il livello delle aldeidi intermedie. Queste aldeidi possono reagire tra loro, con l'acetaldeide o con le amine originate per formare dei prodotti di condensazione, alcuni dei quali hanno effetti farmacologici di vario tipo.

Il Laboratorio di analisi nell'intossicazione acuta da alcol

L'utilità dei metodi di indagine biologici di laboratorio è legata al fatto che forniscano informazioni oggettive sul consumo d'alcol e sulle variazioni nelle abitudini rispetto al bere. Di conseguenza, i tests di laboratorio sono utili nel ricercare i forti bevitori, nell'individuare il ruolo dell'alcol come agente eziologico di malattia, nel follow-up e monitoraggio di cambiamenti nel consumo d'alcol.

Pertanto c'è stata un'attiva ricerca di nuovi Markers di laboratorio oggettivi per il consumo alcolico. Sono qui presentati i Markers e i dosaggi di maggior rilevanza.

Da notare che spesso, a seguito di incidenti stradali, all'esigenza clinica e diagnostica (finalizzata a guidare l'intervento terapeutico) se ne aggiungono altre di tipo legale, volte all'accertamento di responsabilità sull'incidente stesso. In tali casi, tuttavia, entrano in gioco numerose norme legislative e procedurali che, qualora non siano rigorosamente rispettate, rendono di fatto inutilizzabili le risposte del Laboratorio ed espongono il medico richiedente a sanzioni anche penali. Ricordiamo soltanto che la Legislazione Italiana non considera reato il consumo di alcol, a meno che il bevitore non debba porsi alla guida di un autoveicolo (D.L. 30 Aprile 1992, n.285 - Art. 186). Il sospetto di tale reato autorizza gli organi di polizia stradale, e non il medico, ad effettuare l'accertamento di "alterazione psicofisica" dovuta all'alcol; accertamento che deve essere effettuato con strumenti e procedure determinati dal regolamento (DPR 16 Dicembre 1992, n. 495 - Art. 379). Questo stabilisce che l'accertamento dello stato di ebbrezza si effettua mediante l'analisi dell'aria alveolare espirata, con lo strumento chiamato etilometro che valuta indirettamente la concentrazione di alcol nel sangue. Per le limitazioni imposte dall'art. 13 della Costituzione non è infatti possibile imporre il prelievo di sangue ad una persona non consenziente, pena la nullità dell'atto e la possibilità di perseguire chi ha prescritto l'esame.

In mancanza del necessario consenso, è possibile chiedere un'alcolemia solo per pazienti in coma o impossibilitati ad esprimersi, ma l'esame è utilizzabile solo per fini diagnostici. In tal caso, ad esempio, una concentrazione inferiore a 3.0 g/L (300 mg/dL) permette di escludere il coma alcolico. Il livello di concentrazione ematica di etanolo a partire dal quale è, invece, dichiarato lo stato di ebbrezza è stato fissato, in Italia, a 0.8 g/L .

La difficile normativa limita, di fatto, la richiesta del dosaggio dell'alcol nel sangue a scopi legali; resta tuttavia manifesta l'importanza di tale accertamento per gli scopi diagnostici sopra citati. A ciò va aggiunta la possibilità che, previo consenso esplicito, il soggetto sottoposto alla prova dell'etilometro chieda di controllarne il risultato, o che acconsenta ad una verifica su richiesta della Polizia Stradale. In tali casi può essere legittimamente richiesto il dosaggio dell'alcol nel sangue del paziente. Occorre rilevare tuttavia che, in quest'ultimo caso, la richiesta non si configura mai come urgente e, proprio per la valenza legale e non sanitaria dell'accertamento, il campione potrà essere accettato dal Laboratorio solo se accompagnato dal consenso scritto del soggetto, dal pagamento della prestazione e da un'adeguata catena di custodia per l'invio del campione al laboratorio. A tal fine occorre anche ricordare che il campione d'elezione per accertare uno stato di ebbrezza è il sangue, che tuttavia dà risultati positivi per assunzioni avvenute entro le 6 ore precedenti il prelievo. Per tempi più lunghi sono stati proposti altri parametri.

Etilometro La misura dell'alcol nell'area alveolare è alla base del test del "palloncino" come è impropriamente chiamato l'etilometro, lo strumento di cui sono dotate le pattuglie della polizia stradale per controllare lo stato di ebbrezza dei guidatori. In base al regolamento applicativo del nuovo codice della strada questo è l'unico mezzo legale per la misura dell'alcolemia. I risultati ottenuti con l'etilometro correlano con quelli gascromatografici ottenuti nel sangue perché, dopo 15 minuti dall'assunzione, l'etanolo dell'area alveolare è in equilibrio con quello ematico. Il

principio analitico usato nello strumento si basa su un rivelatore posto sul cammino dell'aria espirata. Il rivelatore può essere elettrochimico, all'infrarosso, a semiconduttore o amperometrico. La misura fatta sull'espirato, moltiplicata per 2.300, dà con ottima approssimazione il valore dell'alcolemia. Per legge si devono fare due misure, separate da almeno 5 minuti (per evitare sopra valutazioni dovute alla presenza di alcol buccale) e i due valori devono essere concordi [7,8]

Come sopra ricordato, l'alcolemia è l'unico test diagnostico atto a stabilire se una persona, al momento del prelievo, è sobria o meno. Il riferimento temporale è necessario, a causa della veloce eliminazione di questa sostanza. Se la risposta ha un rilevante valore legale, per es. una perizia in tribunale, l'unico metodo analitico utilizzabile è quello gas-cromatografico con la tecnica dello "spazio di testa".

Questa tecnica permette di dosare separatamente l'etanolo e qualsiasi altro alcol volatile presente (metanolo, propanolo). Tuttavia la relativa complessità ne ha limitato la diffusione su larga scala.

Tecniche di "**spazio di testa**" sono caratterizzate dalla capacità di estrarre l'analita da matrici anche complesse (come ad es. il sangue) direttamente nella fase gassosa senza utilizzare solventi, sia a temperatura ambiente che a temperature superiori: in questo modo l'analita si trova già nella fase ideale dal punto di vista gas-cromatografico. L'estrazione in fase gassosa ha anche il vantaggio di essere esente da costi particolari e da rischi tossicologici e ambientali legati all'uso di solventi. Questa tecnica può risultare molto selettiva e può essere estesa, con strumenti adeguatamente progettati, fino a composti altobollenti come idrocarburi C₄₀.

Inoltre, proprio perché non utilizza solventi, è particolarmente adatta ad essere applicata all'analisi di sostanze che, come l'etanolo, sono molto solubili in acqua e quindi, di fatto, quasi impossibili da estrarre con solventi organici. Esistono due modalità operative: spazio di testa dinamico, in cui l'analita viene estratto termicamente dalla matrice e rimosso da un flusso continuo di gas inerte. Questa tecnica è quindi utile all'arricchimento nell'analisi in tracce ed è perciò più propriamente un metodo di estrazione, spazio di testa statico o di equilibrio: l'analita viene estratto in un sistema chiuso (come una fiala con tappo di gomma perforabile a temperatura controllata nel quale si stabilisce un equilibrio tra la concentrazione dell'analita nella matrice e nella fase gassosa, detta "spazio di testa".

La riproducibilità migliora ricorrendo a strumenti disponibili in commercio che effettuano automaticamente il prelievo dal campione e l'iniezione nel gas-cromatografo. Questi strumenti controllano anche altri parametri significativi quali: temperatura del sistema, programma temporale di incubazione, velocità di agitazione, sequenze di campionamento ed iniezione in modo da ottimizzare l'analisi Quantitativa in funzione del tipo di campione e di analita.

Il dosaggio dell'*etanolo* (**ETOH**) nel sangue, nelle urine, non fornisce alcun'informazione sulla gravità dell'assunzione alcolica; tuttavia può essere valutata la presenza di un'elevata tolleranza. L'etanolo può essere dosato facilmente nel sangue o nell'aria espirata, anche in concentrazioni minime. Considerando la ridotta emivita dell'etanolo ed il fatto che l'assunzione non significa necessariamente abuso d'alcool, il suo valore come marker d'abuso alcolico è assai limitato.

Il rapporto tra il **5-idrossi-trip-tofolo** (5HTOL), un metabolita della serotonina, e la creatinina oppure *l'acido 5-idrossiindoloacetico* (HIAA) presenti nelle urine, viene proposto come marker specifico a breve termine del consumo d'alcool. Il 5HTOL rimane elevato 6-20 ore dopo la scomparsa dell'etanolo. Valori falsi positivi sono stati riportati in pazienti che assumevano farmaci ad azione inibente sull'aldeide deidrogenasi. Se viene utilizzato il rapporto 5HTOL sulla creatinina (anziché su HIAA) anche una dieta ricca di serotonina può portare a false positività.

Il 5HTOL sembra essere un marker assai promettente per la determinazione di consumi alcolici recenti, grazie all'elevata sensibilità e specificità. La misurazione si basa su tecniche GC-MS oppure HPLC con rilevazione elettrochimica (Helander 1992); pertanto il problema vero oggi risiede nella difficoltà di applicarlo in routine. Un livello sierico elevato della **gamma-glutamyl-transferasi** (GGT), un enzima legato alla membrana, è stato ampiamente utilizzato come indicatore d'abuso alcolico.

La sensibilità della GGT, riportata in letteratura, nella determinazione d'abuso alcolico varia tra 34% e 85%. Le GGT non aumentano a seguito d'assunzioni acute d'alcool, e richiede probabilmente un consumo di 80-200 gr/die per un periodo di una o più settimane.

L'emivita di GGT elevate è di circa 2-3 settimane. In aggiunta ai casi d'abuso alcolico, le GGT si ritrovano frequentemente positive in soggetti con epatopatie non alcoliche, diabete, obesità, pancreatiti, iperlipidemia, problemi cardiaci, gravi traumi, ed in soggetti che assumono barbiturici, antiepilettici o anticoagulanti. Nonostante la modesta specificità, 50-72% dei valori elevati di GGT possono essere spiegati da un consumo eccessivo d'alcol (Kristenson et al. 1980, Pennet al. 1981).

Il **volume corpuscolare medio** (MCV) è un indice della dimensione dei globuli rossi. Valori elevati di MCV sono stati osservati nel 34-89% dei soggetti abusatori d'alcool. Valori elevati di MCV vengono rilevati anche in casi con deficit di vitamina B12 ed acido folico, epatopatie, numerose malattie ematiche, ipotiroidismo, reticolo-citosi, e negli utilizzatori di antiepilettici come pure nei fumatori. Nel 89% degli uomini e 56% delle donne con valore MCV positivo la causa era riconducibile ad un abuso d'alcool. L'MCV si normalizza lentamente in una situazione d'astinenza; più del 40% dei casi può mantenere valori elevati di MCV anche dopo tre mesi d'astinenza.

Altri Markers ampiamente impiegati sono **aspartato amino-transferasi** (ASAT) ed **alanina amino-transferasi** (ALAT) sieriche.

Gli enzimi intracellulari sono indici più di danno epatico che d'abuso alcolico. La sensibilità complessiva dell'ASAT è stimata in 35% come marker d'abuso alcolico.

La sensibilità dell'ALAT può essere anche minore. [10, 11, 12, 13, 14, 15]

Acetaldeide e suoi addotti

L'acetaldeide è il primo prodotto dell'ossidazione dell'etanolo, ma la sua emivita è troppo breve per essere utile come marcatore del consumo di alcol. L'acetaldeide è però capace di formare degli addotti con alcune proteine del sangue quali emoglobina, albumina, lipoproteine; tali prodotti sono presenti nei consumatori di alcol, ma non negli astemi. Dapprima si formano come intermedi delle basi di Schiff e, da queste, i prodotti stabili. Gli addotti plasmatici persistono per circa 2 settimane

dall'ultima assunzione.

E' stato proposto di usare il dosaggio di questi addotti per monitorare l'astinenza di alcolisti in trattamento, alla stregua dell'HbA_{1c} per i diabetici, ma grosse difficoltà metodologiche ne hanno limitato l'applicazione routinaria. L'addotto con l'emoglobina è reversibile e per dosarlo è possibile usare dei metodi HPLC dopo che l'acetaldeide è stata trasformata in un derivato che può essere dosato con normali rilevatori, usando prodotti cromofori o fluorofori. In alternativa è possibile usare la determinazione gas-cromatografica (con spazio di testa) dell'acetaldeide liberata dall'emoglobina.

Tutti i metodi, se non sono preceduti da una purificazione del campione dall'alcol residuo (con una cromatografia ionica) sovrastimano la concentrazione di acetaldeide per la spontanea ossidazione dell'etanolo. Ⓞ16Ⓞ

Sono stati anche proposti metodi immunochimici, tuttora poco diffusi. La specificità del test nell'individuare i consumatori di alcol e' del 71%. Tuttavia anche questi parametri, come MCV, non sono adatti a valutare il danno epatico.

Disulfiram

Il disulfiram (tetra-etil-tiuram-disolfuro) inibisce le acetaldeidi deidrogenasi epatiche: il consumo di alcol è seguito dall'accumulo di acetaldeide nel sangue e nei tessuti.

Si ha in un primo momento liberazione massiva di catecolamine dai terminali nervosi simpatici, con aumento di frequenza e gittata cardiaca e di ritmo respiratorio. Dopo 30-60 minuti però il tono simpatico crolla, perché l'acetaldeide inibisce anche l'enzima dopamina \exists idrossilasi, ne consegue una ridotta sintesi di catecolamine. La riduzione del tono simpatico produce calo della pressione arteriosa, pallore e nausea [4]; questi effetti possono durare fino a due ore e fanno sì che questo farmaco sia impiegato come deterrente a bere negli alcolisti abituali.

Sarebbe auspicabile poter dosare questo importante farmaco nel sangue, per verificare che la concentrazione sia efficace, e anche in considerazione dei suoi possibili effetti "tossici" con un metodo semplice e veloce. Purtroppo esistono molti problemi metodologici: il disulfiram è instabile e idrolizza rapidamente formando due monomeri che a loro volta si decompongono producendo solfuro di carbonio.

Molto spesso è usato proprio questo prodotto per valutare la concentrazione ematica di disulfiram, ma per farlo occorre una strumentazione accessibile a pochi laboratori: un gascromatografo-spettrometro di massa, con iniettore per spazio di testa.

In ogni caso il dosaggio del disulfiram, se non è eseguito subito, richiede un metodo di prelievo e di stoccaggio che garantisca la conservazione dell'analita fino al momento dell'analisi (uso di un conservante e congelamento a -80°C). Tutto questo ne impedisce, di fatto, la diffusione.

Marcatori precoci di fibrosi epatica

Dato che la malattia epatica alcol-correlata può portare a danni irreversibili, i clinici sono interessati a ricercare indicatori precoci di fibrosi, allo scopo di identificare quanto prima i pazienti ad alto rischio di sviluppare cirrosi [17]

La fibrosi epatica è caratterizzata dalla aumentata deposizione di tessuto connettivo nello spazio extra-cellulare.

Questo tessuto comprende collagene (in particolare tipo I e tipo III), glicoproteine (laminina) e proteoglicani. Il collagene viene secreto dalle cellule sotto forma di precursori nella matrice extra-cellulare; le regioni amino- e carbossil terminale del procollagene sono distaccate da peptidasi, con la successiva formazione di collagene, che si assembla in fibre. L'eccesso di deposizione può dipendere non solo da aumento di sintesi, ma anche da diminuzione di attività della collagenasi.

Fra i marcatori proposti in letteratura per individuare l'inizio del processo fibrotico risalta il pro-peptide amino-terminale del collagene tipo I (P - III - P), che sembra in grado di differenziare soggetti con fibrosi o cirrosi da quelli con sola steatosi [18].

Per lo stesso obiettivo sono allo studio vari altri marcatori derivanti dal collagene, tra i quali:

- peptide carbossi-terminale del procollagene tipo I;
- prodotti di degradazione del procollagene tipo I e IV;
- prodotti di degradazione del collagene tipo I;
- sostanze del connettivo non collagenico.

In un altro studio viene proposto l'inibitore tissutale della metallo proteinasi-1 come marcatore di fibrosi epatica[19]

Acido Ialuronico

Fra i metodi oggi disponibili, anche per un uso di routine, risulta molto interessante il dosaggio dell'acido ialuronico (HA). Infatti è stata messa in evidenza una interessante correlazione fra i livelli serici di HA ed istologia epatica. L'acido ialuronico aumenta nel siero in conseguenza della perdita di attività delle cellule endoteliali sinusoidali del fegato; queste cellule possiedono un recettore specifico per HA ed eliminano, in condizioni fisiologiche, il 90% di quello in circolo.

Il dosaggio dell'acido ialuronico sembra pertanto in grado di discriminare soggetti con epatopatia non cirrotica dai pazienti cirrotici, risultando così utile nella diagnosi precoce di cirrosi di qualunque eziologia. Uno dei test di laboratorio recentemente sviluppati per l'abuso alcolico è la **transferrina carboidrato carente (CDT)**.

Nel corso dell'astinenza il valore della CDT si normalizza con una emivita media di 14-17 giorni. Questa correlazione rende la CDT idonea al lavoro di routine per la determinazione dell'abuso alcolico e per il monitoraggio del trattamento (sia per controllare l'astinenza che per individuare le ricadute). Inoltre se vengono utilizzate le variazioni relative della CDT rispetto ai valori basali propri di ciascun individuo, piuttosto che riferirsi ai valori di cut-off convenzionali basati invece sulla popolazione, è possibile migliorare sensibilmente l'individuazione delle ricadute nella fase di monitoraggio.

Transferrina

La Transferrina, $pI = 5.7$, è la glicoproteina più importante tra quelle che trasportano il ferro, viene sintetizzata dall'epatocita dove nel RER viene incorporato l'oligosaccaride e la glicosazione finale si ha nell'apparato del Golgi. Studi di sequenza hanno dimostrato che la proteina è un prodotto di una duplicazione genica derivata da un gene ancestrale che codificava una proteina in grado di legare solo un

atomo di ferro. Sebbene diversi altri metalli si leghino alla transferrina, la più alta affinità compete allo ione ferrico.

La transferrina non lega ioni ferrosi. Il legame di ciascun ione ferrico è assolutamente dipendente dal legame coordinato di un anione, che in condizioni fisiologiche è il carbonato. Sperimentalmente si è trovato che altri polianioni organici possono sostituire il carbonato.

Le misure delle costanti d'associazione per il legame dello ione ferrico a transferrine di differenti specie variano indicando che in presenza di un eccesso di transferrina non si hanno praticamente ioni ferrici liberi. Non ci sono prove che il legame del ferro ai due siti possa essere di tipo cooperativo. In condizioni fisiologiche, circa un nono di tutte le molecole di transferrina sono saturate di ferro su entrambi i siti di legame; quattro noni legano il ferro su uno dei due siti; e quattro noni della transferrina circolante sono privi di ferro.

I due siti di legame del ferro, sebbene omologhi, non sono completamente identici: presentano alcune differenze nella sequenza e nelle affinità per altri metalli (specialmente per i lantanidi). La transferrina si lega a recettori specifici della membrana cellulare che mediano l'internalizzazione della proteina. Il recettore è una proteina di membrana costituita da due monomeri, ciascuno di peso 90.000 dalton; ha maggiore affinità per la forma diferrica della transferrina.

Il complesso transferrina recettore è internalizzato con rilascio di ferro dal complesso,

seguito dal ritorno del complesso recettore apotransferrina sulla superficie cellulare dove l'apotransferrina è rilasciata per essere riutilizzata nel plasma.

La concentrazione del recettore nei differenti tessuti è proporzionale al fabbisogno di ferro del tessuto; i valori più alti sono stati osservati nei globuli rossi che sintetizzano emoglobina e nella placenta.

Prima di venire rilasciata nel torrente circolatorio subisce ancora diversi processi post traslazionali. [21, 22]

Le unità glucidiche vengono aggiunte nella fase post traslazione da una reazione enzimatica glicosil transferasi.

La Transferrina può essere considerata formata da tre domini

- una singola catena polipeptidica (679 AA)
- due siti indipendenti che legano il ferro metallico, una nel dominio N- terminale e l'altro nel dominio C-terminale
- due catene complesse di N-glicani legate all'AA 413 e all'AA 611

L'analisi elettroforetica su acetato di cellulosa evidenzia che la transferrina del siero umano migra nella zona delle globuline, mentre con la tecnica della isoelectric focusing (IEF) si evidenziano molte piccole bande, questo poiché le sottostrutture della Transferrina mostrano un'elevata variabilità anche in condizioni fisiologiche tanto da non poter essere considerata una molecola omogenea, ma una molecola con elevata microeterogeneità.

La Transferrina che normalmente viene dosata in Laboratorio è l'insieme di tutte queste isoforme . [24]

Definizione di CDT

Stibler e Kjiellin per primi nel 1976 osservarono nel liquido cefalorachidiano d'etilisti la presenza di Tf con pI superiore a 5.7.

Queste isoforme sono presenti nelle persone che assumono forti quantità d'alcol e scompaiono dopo astinenza. Viene allora definito come CDT (Transferrina Carboidrato carente o desialata) l'insieme delle isoforme ASIALO, MONOSIALO e DISIALO-Fe₂-Tf.

Struttura del CDT nel siero umano

In particolare l'isoforma disialo è formata da una catena N-glicanica a forma di biantenna con due residui d'acido sialico, mentre l'isoforma asialo manca della struttura di carboidrati.

La forma Trisialo contiene due catene di N-glicani a forma di biantenna uno con due residui d'acido sialico, e l'altro con un residuo d'acido sialico e uno di galattosio.

N° di residui d'acido Sialico	Isoforma	% Transferrina totale negli astemi
8	Ottasialo	Inferiore a 0.1%
7	Eptasialo	Inferiore a 0.1%
6	Esasialo	1/3 %
5	Pentasialo	12/18 %
4	Tetrasialo	64/80 %
3	Trisialo	4.5/9 %
2	Disialo	Inferiore a 2.5%
1	Monosialo	Inferiore a 0.9%
0	Asialo	Inferiore a 0.5%

Le Transferrine più importanti per la determinazione dell' abuso alcolico sono: l'isoforma "CDT Disialo ", seguita dalla "Asialo " e "Monosialo".

Per la Transferrina Trisialo si è molto discusso se questa aumenta in casi alcol indotti e se c'è un vantaggio diagnostico nell'inserirla nel gruppo destinato all' individuazione dei soggetti che fanno abuso di alcol.

In un articolo apparso su Clinical Chemistry nel 2000 Dibeit dimostra che nel siero la quantità di Trisialo Tf dosata in HPLC è la stessa sia in caso di CDT normali che patologiche. Pertanto se l'aumento della forma Trisialo non è associato all'incremento della CDT, secondo Dibeit la Trisialo Tf non ha ovviamente nessun valore diagnostico e non dovrebbe essere inclusa nella CDT. Ecco allora che assume importanza il metodo analitico da utilizzare: per una corretta interpretazione del valore di CDT: è auspicabile utilizzare metodi che non dosino, o lo facciano in minima parte, la frazione Trisialo. [25]

Microeterogenità in relazione alla saturazione del ferro

Ciascuna molecola di Transferrina può legare al massimo due ioni ferrici. In funzione della riserva di ferro 3+ nell'organismo ci sono molecole di transferrina senza ferro, con uno o con due ioni ferrici.

Nel soggetto sano la saturazione della Tf è circa il 30%, nelle carenze marziali aumenta invece la Tf senza ferro o con un solo ione. Nell' emocromatosi (un eccesso di ferro) la saturazione di ferro della Tf aumenta considerevolmente e nel siero si trova esclusivamente Tf con due ioni di ferro. Ogni ione ferro abbassa di 0.2 unità di pH il pI della Tf.

Differenti catene di N Glicani

Le due catene N-glicaniche differiscono per il loro grado di ramificazione, si possono paragonare a strutture a bi, tri e tetra antenna. Ciascuna antenna termina con una molecola di acido sialico (carica negativa) E' per questo che nel siero si possono avere forme senza acido sialico (asialo), con un residuo di acido sialico fino ad otto residui di acido sialico. Ogni residuo di acido sialico abbassa di 0.1 unità di pH il pI della Transferrina .

Catene polipeptidiche modificate

Esistono differenti varianti genetiche di Tf dovute alla sostituzione di diversi AA nella catena polipeptidica. Sono conosciute circa una quarantina di sostituzioni differenti, di cui almeno quattro con prevalenza maggiore dell' 1 %. La Tf-C è la variante più frequente (oltre il 95%) nella popolazione Caucasica. Le varianti Tf-B e Tf-D possono interferire con la determinazione della CDT.

Infatti il pI della forma non-CDT della Tf-D è simile alla forma CDT della Tf-C per questo persone assumono quantità normali di alcol possono risultare falsamente positivi anche quando eterozigoti Tf-CD.

Tuttavia l'interferenza della Tf-D nel senso di dare sovrastime inesistenti di CDT dipende naturalmente dal diverso sottotipo e dal metodo di determinazione. Infatti i metodi che incorporano la Trisialo nel CDT sono più facilmente soggette alla interferenza della Tf-D. [26]

Circa la Tf-B invece ha un pI minore, pertanto coeluisce con le forme non-CDT e il bevitore cronico di alcol che per corredo genetico ha una Tf-B, risulta falsamente negativo.

La microeterogeneità diventa ancora più pronunciata se si pensa che le modifiche in questi tre siti avvengono contemporaneamente.

Meccanismo dell'incremento di CDT etanolo indotto

Non è chiaro il meccanismo attraverso il quale la CDT aumenta nell'abuso cronico di alcol, tuttavia sembra che l'etanolo e/o il suo metabolita acetaldeide influenzino la sintesi della catena N-glicanica nell'apparato del Golgi. E' stato dimostrato che nell'alcolismo l'attività di galattosil e N-acetilglucosamiltransferasi siano notevolmente diminuite rispetto alle condizioni normali, per difetti legati alla presenza di alcol o metaboliti dell' etanolo. A differenza delle altre glicoproteine, la mancanza dei residui di acido sialico rallenta la degradazione, pertanto la CDT è degradata molto più lentamente delle altre Tf tanto che la sua emivita è di circa 14 gg, mentre quella delle Tf normali 7 gg. [28]

Nella sindrome CDG (Disordini congeniti della glicosazione) le glicoproteine Tf, al antitripsina e la catena B dell' aptoglobina sono simili a quelle delle persone che

abusano cronicamente di alcol. Pazienti con il trapianto di fegato e rene oscillano, anche senza essere bevitori, da valori normali a valori patologici, mentre nel trapianto di solo rene si hanno sempre valori normali.

Correlazione tra CDT nel siero e consumo di alcol

Il consumo alcolico di 50-80 g di etanolo/die per sette giorni induce l'aumento delle CDT, ma è interessante osservare che questo è anche il valore critico per le cirrosi epatiche alcol-indotte. Esempio di bevande a diverso contenuto di etanolo.

Bevanda	% di Alcol	Volume in ml che contiene 50/80 mg di EtOH
Birra	6	1020-1660
Vino	12	510-830
Superalcolico	45	137-220

PARTE METODOLOGICA: DETERMINAZIONE DEL CDT

Fase preanalitica

Interferenze

- EDTA o eparina possono influenzare la saturazione di Fe in vitro della Tf e quindi la separazione nelle colonnine scambio anioniche delle forme CDT da quelle non-CDT.
- Conservazione per tre giorni a temperatura ambiente fa aumentare fino a 25% il CDT.
- Lipemia ed emolisi possono portare a risultati falsamente positivi
- Momento del prelievo variazioni circadiane dell' 8%
- Provette con acceleratori di coagulazione di caolino o gel di acrilamide
- Successivi congelamenti e scongelamenti
- Dieta, farmaci più comuni, disulfiram
- Nessuna interferenza con conservazione a t. ambiente fino a 30 h, sette gg a 4°C, molti mesi a -20°C

Fase analitica

Poiché la Tf è caratterizzata da una grande microeterogeneità le isoforme CDT e non CDT hanno struttura simile le isoforme CDT sono presenti in bassa concentrazione.

Il dosaggio del CDT richiede Selettività, Specificità, Sensibilità. Reazioni CDT-specifiche o meglio anticorpi anti-CDT e quindi analisi in fase omogenea per il momento non sono ancora disponibili. Nella routine di Laboratorio la determinazione della CDT richiede la separazione di tali isoforme dalla matrice del siero e dalle altre isoforme non-CDT. Per fare questo si utilizzano metodi cromatografici, ad esempio colonnine scambio anioniche o metodi elettroforetici (isoelettrofocusing) che sfruttano il diverso pI delle differenti isoforme, anche se esistono isoforme con uguali

pI es. Disialo (la più importante isoforma CDT), Tetrasialo , Pentasialo ed Eptasialo .

Per ridurre il numero di isoforme native che hanno uguale pI si effettua un'aggiunta di sali Fe con lo scopo di saturare tutta la Tf presente ed avere un carico uniforme di ferro: in questo modo tutte le transferrine sono caricate di due ioni ferrici. Con le colonnine a scambio anioniche si separa la frazione CDT da quella non CDT e si procede all'analisi immunologica. Indipendentemente dal frazionamento o dall'analisi immunologica la saturazione con Fe della Tf è un momento cruciale dell'analisi. Una incompleta saturazione porta inevitabilmente a soprastime della frazione CDT.

Metodi utilizzati nei laboratori di ricerca:

Per la sua elevata selettività il metodo di riferimento è l'isoelettrofocusing, quindi un'indagine elettroforetica. E' stata recentemente proposta anche l'elettroforesi capillare che ha ancora dei limiti soprattutto nella preparazione del rivestimento interno del capillare per prevenire l'adsorbimento delle proteine.

Le tecniche cromatografiche in confronto all'elettroforesi sono meno sensibili (volumi più elevati 100-500 µl) e selettive.

D'altra parte la tecnica scambio anionica con dosaggio immunologico, che è quella utilizzata nella routine, non evidenzia le varianti genetiche della Tf.

La tecnica in HPLC è in grado di rilevare le varianti genetiche ed è oggi utilizzata per verificare i valori di CDT ottenuti con Cromatografia scambio anionica e determinazione immunologica.

L'analisi in HPLC richiede corse di 20 minuti e tempi elevati per il ricondizionamento della colonna analitica per cui è di difficile applicazione su serie ad elevata numerosità. Nel 1999 in Giappone è stato messo a punto un metodo di elettroforesi per affinità con lecitine.

Metodi commerciali per il dosaggio del CDT

Il primo test per CDT fu proposto nel 1993 con il kit CDT Tect RIA (Pharmacia) seguito poi da %CDT(Axis sempre in RIA) e dal CDT Tect EIA della Pharmacia in immunoenzimatica. Questi kit analizzano asialo-monosialo e disialo Tf. Più tardi fu sviluppato un kit che dosava anche il 50% della isoforma trisialo.

Tutti questi metodi commerciali utilizzano le colonnine scambio anioniche per separare la frazione CDT da quella non CDT.

Standardizzazione nell'analisi CDT

La disponibilità del dosaggio del CDT nella diagnostica di laboratorio ha incrementato ed accelerato il consenso sul CDT come marcatore molto specifico dell'abuso alcolico cronico. Una standardizzazione dell'analisi del CDT attraverso uno standard internazionale non è stata ancora effettuata.

C'è molta confusione sulla definizione di CDT, tuttavia va ribadito che la frazione CDT, così come definita da Stibler, è costituita solo da asialo, monosialo e disialo Tf. I metodi poi dosano differenti isoforme, per cui è difficile paragonare i risultati, la specificità e sensibilità, i valori predittivi quando si utilizzano metodi analitici così differenti. Per superare questo ostacolo nel Maggio del 2000 a Berlino si tenne un meeting per la standardizzazione del CDT con lo scopo era quello di sviluppare un

metodo in HPLC, altamente sensibile da utilizzare come metodo standard e per definire i calibratori utilizzati negli analizzatori di laboratorio.

Altra importante conclusione del congresso fu quella di ribadire che i metodi che dosano anche la frazione trisialo non devono essere più utilizzati.

La CDT è paragonabile alla HbA_{1c}, quest'ultima è stata ben definita e i metodi per la sua misura sono stati standardizzati tanto che sul dosaggio individuale dell'emoglobina glicata si mette in atto la terapia per il diabete.

Fase postanalitica:

Interpretazione del risultato CDT: Intervalli di riferimento. I valori di CDT possono essere espressi come concentrazione assoluta o come rapporto % rispetto alla Transferrina totale, naturalmente i valori di riferimento o meglio i valori soglia dipendono dal metodo utilizzato. Sarebbe buona norma che accanto al risultato, al valore soglia fosse indicato anche il metodo utilizzato. E' così più facile comparare i risultati e seguire il comportamento del soggetto. Cambiando metodo cambiano i valori e questo potrebbe indurre una cattiva interpretazione sullo stato del bevitore. Quando si cambia il metodo, in parallelo si dovrebbe fornire il risultato sia con il metodo vecchio che con quello nuovo per un determinato periodo di tempo da abituare ai nuovi valori.

Di norma si utilizzano come limiti le soglie indicate dalla ditta, se una popolazione di donatori ha una media di %CDT pari a 1.2 e le nostre condizioni analitiche sono tali da avere una DS pari a 0.4, il valore per discriminare il bevitore dal non bevitore dovrebbe essere: $1.2 + (3 \times 0.4) = 2.4 \text{ CDT}$. In valore assoluto il CDT nelle donne sane è maggiore come concentrazione di quello degli uomini sani.

Il motivo che può spiegare i valori maggiori di CDT delle donne rispetto agli uomini è legato al fatto che le donne hanno carenza di ferro e quindi un aumento di Tf.

Se viene utilizzato il rapporto CDT/Tf totale si supera questo problema perchè aumenta l'accuratezza diagnostica del dato, specialmente nei casi di anemia, anche se ne diminuisce la precisione, perchè il risultato finale sarà affetto da errori dovuti alla determinazione della CDT e della Tf.

Il dosaggio dell'attività della GGT è, a differenza di quello della CDT, più automatizzabile, più standardizzato e più economico, è per questo che oltre all'etanolo, la GGT è il marcatore di abuso alcolico più usato.

C'è da chiedersi se la GGT da sola sia sufficiente e se il valore della CDT sia realmente necessario per la diagnosi in laboratorio dell'abuso alcolico.

Sono state studiate da sole e congiuntamente in correlazione Sensibilità, Specificità ed Efficienza diagnostica di GGT e CDT. Su questi argomenti sono state fatte numerosissime pubblicazioni in cui le popolazioni studiate sono difficilmente paragonabili e quindi anche i risultati e le elaborazioni sono difficilmente confrontabili. In generale si può dire che non c'è correlazione tra CDT, %CDT e GGT. Tuttavia il dosaggio del CDT e della GGT contemporaneamente dà informazioni più complete.

A questo riguardo in letteratura sono stati pubblicati studi:

- per seguire le abitudini dei bevitori che manifestano GGT ancora normali,
- per valutare il procedere dei pazienti in trattamento per alcolismo

- per verificare il consumo alcolico
- per monitorare il consumo di alcol in uomini che ingeriscono 20-60g etanolo/die,

Patologie che inducono dei "Falsi Positivi, Falsi Negativi"

Falso Positivo	% di interferenza	Reference
Genetic D-variante	<<1%	Gibblett(1962)
CDG syndrome	1/300-500	Stibter(1991)
Primary biliary cirrhosis	36%	Beanetal. (1995)
Hepatocellular carcinoma	46%	Murawakietal.(1997)
Viral liver cirrhosis	37%	Murawaki et al. (1997)
Pancreas and kidney transplantation	83%	Arndtetal.(1997)
Falsi Negativi		
Genetic B-variante	Rare	Qtibler (1991)
Unknow reasons	6/19 %	Stibter(1991)

In conclusione nell'abuso alcolico la CDT è il marcatore più specifico, mentre la GGT è più sensibile. Quest'ultima osservazione è molto vera nelle donne, anche se non è chiaro se ciò dipenda dal sesso o dalla più elevata vulnerabilità del fegato femminile al danno alcolindotto. Paragonata alla CDT, la GGT dà risultati falsamente positivi nello studio dell'abuso alcolico in particolari malattie come malattie ostruttive del fegato, cirrosi, carcinomi e metastasi epatiche ma anche insufficienza cardiaca, mononucleosi, trapianto renale, ipertiroidismo, pancreatici e diabete mellito, solo per fare gli esempi più frequenti. In contrasto con la CDT, la GGT risente di interferenze da parte di numerosi farmaci barbiturici, cefalosporine, estrogeni, contraccettivi orali, fenitoina, primidone, tireostatici, sferoidi anabolizzanti, fenotiazine e farmaci antireumatici.

EFFICIENZA DIAGNOSTICA DELLA CDT

Numerosi trias sono stati pubblicati sulla specificità e sensibilità della CDT come marcatore dell'abuso alcolico. Per quel che riguarda la

Specificità: le principali cause di falsi positivi sono, secondo Stibler, le sindromi CDG (Disordini congeniti della glicosazione), le varianti genetiche Tf-D e alcune patologie epatiche, mentre nelle carenze marziali qualora si utilizzi il rapporto tra CDT e Tf tale valore rientra nella norma; comunque gli errori indotti dall'uso della CDT sono di gran lunga inferiori come numero di quelli indotti dal dosaggio della GGT. In conclusione la CDT è il marcatore di laboratorio più specifico per l'abuso alcolico.

Per quel che riguarda la **Sensibilità:** l'emivita della CDT è circa 14 gg., il risultato ottenuto dopo assunzione di alcol per tre settimane mostra che consumi cronici di piccole quantità modificano la concentrazione di CDT, mentre quantità più importanti bevute in tempi più ristretti non modificano la concentrazione di CDT. D'altra parte è noto che l'alcolemia è influenzata dalla quantità di alcol consumata, dalla quantità per periodo di tempo e dalla massa corporea.: più corto è il periodo nel quale un grammo di alcol è consumato e più bassa la massa corporea, più alto è il picco di etanolo nel sangue

In conclusione possiamo affermare di possedere numerosi strumenti per la diagnosi e il follow-up nell'intossicazione da alcool ma il loro utilizzo deve essere mirato allo scopo da raggiungere. Infatti se si intende monitorare il paziente durante la disintossicazione, le transaminasi ammino-transferasi (ASAT) ed alanina ammino-transferasi (ALAT) sieriche, gamma GT gamma-glutamil-transferasi, CDT transferrina carboidrato carente, il volume corpuscolare medio (MCV), ci daranno un sicuro riscontro del livello di recupero del paziente. Se al contrario cerchiamo dei Markers che possano rilevare abusi in condizioni di pericolo per l'incolumità delle persone, come la guida in stato di ebbrezza, allora il rapporto tra il 5-idrossi-triptofolo (5HTOL) e l'acido 5-idrossiindoloacetico (HIAA), la transferrina carboidrato carente (CDT), il dosaggio del Metanolo (ETOH) nel sangue, nelle urine o nell'aria espirata, sono i markers ottimali. Ma in entrambi gli scopi che ci prefissiamo un rilevante apporto è senza dubbio dato dalla transferrina desialata CDT che si impone come veramente innovativo.

BIBLIOGRAFIA

1. «MURDOCH RITCHIE J. - The Aliphatic Alcohols - in "The Pharmacological Basis of Therapeutics" (Goodman and Gilman's) - MacMillan Publi. Comp., New York, **1985**, p. 372-386.
2. «LODI F., MAROZZI E. - Alcol Etilico - in "Tossicologia Forense e Chimica Tossicologica" - Ed. Cortina, Milano, **1982**, p. 309-324.
3. • HATHAWAY D.E. - Kinetic considerations - in "Molecular Aspects of Toxicology" - Royal Society of Chemistry, London, **1984**, p. 164-165.
4. • KALANT H., KHANNA J. M. - Gli Alcoli - in "Elementi di Farmacologia e Terapia Medica" (Kalant Roschiau) - Casa Editrice Ambrosiana, Milano, **1992**, p. 246-256.
5. • CLO' C. - Il Fegato - in "Biochimica Sistemica Umana" (Caldarera) - CLUED, Bologna, **1995**, p. 51-54.
6. • LAPOSATA M. - Fatty acid ethyl esters : short-term and long-term serum markers of ethanol intake - CLINICAL CHEMISTRY - **1997** - 43 (8-B) -p. 1527-1534.
7. • FERRARA S. D., SUNSHINE I. - Liquidi Volatili Tossici - in "II Laboratorio di Farmacologia e Tossicologia Clinica" - C.G. Ed. Med. Scient., Torino, **1989**, p. 79-84.
8. • BACCINI C. - Alcol etilico - in Caleidoscopio, **1988**, 36, p.66-7
9. • MACCHIA T. ed altri - Quantificazione dell'alcoemia per studi epidemiologici nella prevenzione degli incidenti stradali - Boll. Med. It. Trasporti, 1991, 2, p.5-19.
10. • PASQUINELLI F., CALDINI M. VALENZA T. - Diagnostica e Tecniche di Laboratorio - Ed. Rosini, **1980**, vol.1, p. 1706; 1708-1709.
11. • MAJCHROWICZ E., HENDELSON J. H. - Blood methanol concentrations during experimentally induced ethanol intoxication in alcoholics - J. Pharm. Exp. Ther., **1971**, 179, p. 293-300.
12. • ROINE R. P., ERIKSSON C. J. P. et al. - Methanol as a marker of alcoholic abuse - Alcohol Clin. Exp. Res., **1989**, 13, p.172-175.
13. • HELANDER A., BECK O., WAYNE JONES A. - Laboratory testing for recent alcoholic consumption : co. of ethanol, methanol and 5-hydroxytryptophol - Clin. Chem., **1996**, 42, 4, p.618-624.
14. • BECK O., HELANDER A., CARLSSON S., BORO S. - Changes in serotonin metabolism during treatment with the aldehyde dehydrogenase inhibitors disulfiram and cyanamide - Pharmacol. Toxicol., **1995**, 77, p.323-326.
15. • HELANDER A., BECK O., BORG S. - Determination of urinary 5-hydroxytryptophol by high performance liquid chromatography with electrochemical detection - J. Chromatogr., **1992**, 579, p.340-345.
16. • ROSMAN A.S., LIEBER C.S. - Diagnostic utility of laboratory test in alcoholic liver disease - Clin. Chem., **1994**, 40, 8, p. 1645-1646.
17. • ROSMAN A.S., LIEBER C.S. - Diagnostic utility of Laboratory tests in Alcoholic liver disease - Clin. Chem., **1994**, 40/8, p.1641-1651.
18. • NOUCHI T, WORTNER T.M., SATO S., LIEBER C.S. - Serum procollagen type III N-terminal peptides and laminin P1 peptide in alcoholic liver disease - Alcohol Clin. Exp. Res., **1987**, 11, p.287-91.
19. • MUZZILLO D.A., IMOTO M. et al. - Clinical evaluation of serum tissue inhibitor of metallo-proteinases-1 levels in patients with liver diseases - J. Gastroenterol. Hepatol., **1993**, 8, p.437-41.
20. • VENO T., INUZUKA S., TORIMURA T. et al. - Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization - Gastroenterology, **1993**, 105, p.475-81.
21. • MACCHIA T. - Abuso alcolico : prospettive diagnostiche di alcuni markers di recente introduzione - in "Droga e Tossicodipendenza" (Ist. Sup. San.) - Ed. Clas 1., Brescia, **1992**, vol.1, p.349.
22. • STRYER L. - Trasporto delle proteine - in "Biochimica" - Zanichelli Editore, Bologna, **1989**, 673.
23. • STIBLER H., BORG S. - Carbohydrate composition of transferrin in alcoholic patients - Alcohol Clin. Exp. Res., **1986**, 10, p.61-4.
24. • SILLANAUKEE P. et al - CDT by anion-exchange chromatography followed by RIA as a marker of heavy drinking among men - Alcohol Clin. Exp. Res., **1993**, 17, p.230-3.
25. • STIBLER H. - Carbohydrate deficient transferrin: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed - Clin. Chem., **1991**, 37, p.2029-2037.
26. • STIBLER H., JAEKEN J. - Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome - Arch. Dis. Child., **1990**, 65, p.107-111.
27. • PEKKA S. NURIA S. ed Al. - Possible reasons why heavy drinking increases CDT - Clin. And Expe. Research vol.25 n°1 Jan 2001
28. • Atti del seminario alcolico del 7 maggio 2001 A.Allamani, G.Bardazzi Pavia