

Il laboratorio nell'intossicazione acuta e nell'abuso cronico di alcol

MARIO BADI, SILVIA COREZZI, DELFINO TAVANTI
Laboratorio Analisi, Azienda USL8 - Arezzo

Introduzione

Il consumo di alcol, oltre che costituire un problema sociale e clinico di grande rilevanza, ha richiesto nel tempo anche un crescente impegno da parte del Laboratorio di Analisi di Biochimica Clinica e Tossicologia, cui vengono inviati campioni biologici con vari scopi: accertare l'avvenuta assunzione di etanolo, stabilire se il paziente è un etilista, valutare gli eventuali danni prodotti all'organismo del bevitore. L'approccio al problema segue due percorsi nettamente distinti a seconda che si tratti di intossicazione acuta, a volte con implicazioni medico-legali, o di abuso cronico.

In ambedue i casi, tuttavia, il laboratorio può mettere a disposizione sia indagini diagnostiche consolidate dall'uso, se pur con qualche limite interpretativo, sia esami nuovi volti a migliorare il processo diagnostico. Delle nuove proposte alcune sono veramente utili, altre hanno forte interesse per la ricerca ma sono poco praticabili per la normale routine, altre ancora risultano troppo indaginose o costose rispetto alla loro utilità effettiva.

La logica gestionale delle Aziende Sanitarie impone oggi al clinico ed al laboratorista, forse diversamente dal passato, di valutare rigorosamente il rapporto fra costi e benefici per ogni prestazione fornita, ed in base ad esso decidere o meno l'introduzione di nuove procedure. Nelle pagine seguenti cercheremo di dare un quadro breve ma più chiaro possibile sul contributo che il laboratorio di Biochimica-Clinica e Tossicologia può dare in questo campo.

Biochimica e metabolismo

L'alcol etilico, di solito assunto per via orale, viene assorbito rapidamente da stomaco, piccolo intestino e colon. 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 e fluidi del corpo, superando anche la barriera encefalica e quella placentare. L'andamento della concentrazione di alcol in alcuni liquidi biologici è stata determinata sperimentalmente da vari autori, anche recentemente. I 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 (Fig.1).

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. La prima reazione di ossidazione avviene nel fegato, per azione dell'enzima *Alcol deidrogenasi* con NAD come coenzima ed accettore di Idrogeno con produzione di *Acetaldeide*; questa viene successivamente ossidata ad *Acido acetico*, per azione dell'enzima *Aldeide deidrogenasi*. La cinetica di eliminazione non ha un andamento esponenziale, come la maggior parte delle sostanze esogene, ma lineare; dopo il completamento della fase di assorbimento e distribuzione, quando la concentrazione raggiunge il valore massimo C_0 , la relazione fra concentrazione ematica C_t e tempo t , è data dall'equazione: $C_t = C_0 - kt$, con k compresa fra 10 e 25 mg/dL/h (3).

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

L'escrezione di alcol non modificato, di solito, interessa il 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%.

Intossicazione acuta

L'assunzione eccessiva di alcol provoca, in tempi rapidi, situazioni cliniche di varia gravità che possono richiedere l'intervento del Medico del Pronto Soccorso, sia per gli effetti diretti dell'ebbrezza che per quelli indiretti (incidenti stradali). In tali casi il Medico si può rivolgere al Laboratorio con vari obiettivi:

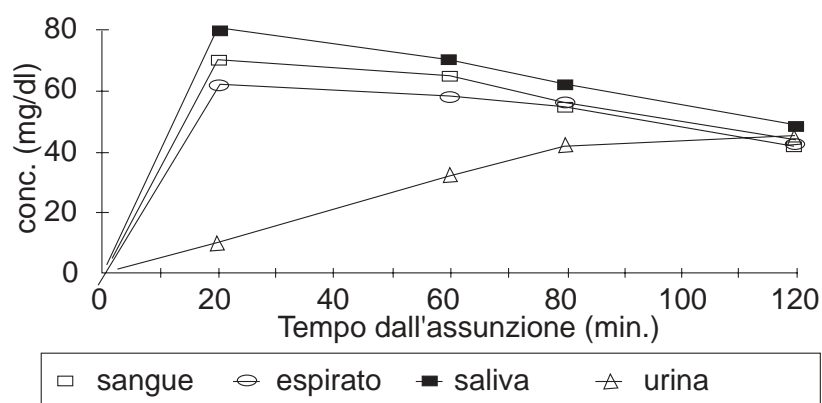
- accertare una possibile causa di coma, in paziente senza trauma cranico;
- accertare la causa di coma in paziente con trauma cranico (per es. a seguito di incidente stradale);
- diagnosticare uno stato di ebbrezza in paziente con sintomatologia dubbia.

Esiste, ed ormai è largamente accettata, una relazione tra l'alcolemia (blood alcohol concentration - BAC) e l'ebbrezza di una persona. La valutazione anche indiretta della BAC è l'unico test oggi significativo a fini diagnostici. A tale scopo, oltre al sangue, possono essere usati altri fluidi biologici purchè i risultati ottenuti siano linearmente correlabili con l'alcolemia (5). Sono idonei a questo scopo la saliva e l'espirsto, mentre non lo è l'urina perché alcolemia ed alcoluria raggiungono i valori massimi in tempi diversi e soprattutto perché l'apporto di liquidi e la diuresi rendono estremamente variabile la concentrazione urinaria a parità di assunzione (fig1).

Da notare che spesso, a seguito di incidenti stradali, alla esigenza clinica e diagnostica (finalizzata a guidare l'intervento terapeutico) si aggiungono esigenze 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 vengano 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 psico-fisica" 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.

Fig. 1 - Alcol etilico: concentrazione nei liquidi biologici



In mancanza del necessario consenso, è possibile chiedere un'alcolemia solo per pazienti in coma o impossibilitati ad esprimersi, ma l'esame è usabile 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 viene, 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 una 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 nelle 6 ore precedenti il prelievo. Per tempi più lunghi sono stati proposti altri parametri, tuttora allo studio.

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 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 (6).

Alcolemia

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, tipo 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 scarsa praticabilità ne ha limitato la diffusione su larga scala.

Nella maggior parte dei laboratori l'alcol viene dosato con un metodo enzimatico: un enzima, l'alcol deidrogenasi (ADH), trasforma la coppia etanolo + NAD in aldeide acetica e NADH; questa reazione può essere seguita spettro-fotometricamente. Alcune ditte aggiungono un secondo enzima, l'aldeide deidrogenasi (AIDH) che trasforma la coppia aldeide acetica + NAD in acido acetico + NADH raddoppiando la sensibilità della reazione (si formano due molecole di NADH per ogni molecola di etanolo). Il substrato NADH ha un picco di assorbimento a 340 nm (UV); se si preferisce effettuare la misura nel visibile occorre far reagire il NADH con un cromogeno in modo da formare un prodotto colorato che assorba in questa zona dello spettro. La minima quantità dosabile risulta di 0,1 g/L. La specificità è buona per l'utilizzo corrente; infatti la reattività crociata di circa 1-2% di metanolo, propanolo e glicole etilenico può creare problemi solo di fronte a concentrazioni delle sostanze interferenti molto elevate e di fatto inesistenti nei campioni biologici di origine umana.

Per quanto riguarda il prelievo, sono necessarie alcune semplici precauzioni: non possono essere usati disinfettanti alcolici e, dopo il prelievo, la provetta deve essere conservata ben tappata in frigo se l'analisi non è fatta subito. È preferibile il prelievo con K3EDTA+NaF come anticoagulante, ma può essere usato qualsiasi altro tipo di provetta purché ben tappata (7).

Abuso cronico

In corso di abuso cronico di alcol, il medico deve affrontare problemi di natura completamente diversa. Infatti il consumo continuativo di grosse quantità di bevande alcoliche può portare a danni molti seri, anche senza episodi significativi di intossicazione acuta: gli organi più colpiti sono il fegato ed il pancreas, trascurando i danni al sistema nervoso su cui il laboratorio non può dare, oggi, informazioni di rilievo.

Il Laboratorio mette oggi a disposizione del clinico vari esami che, se opportunamente valutati, lo aiuteranno a prendere le decisioni più giuste in relazione a problemi diagnostici e prognostici, quali :

- 1 - individuare con certezza i forti bevitori;
- 2 - controllare se un alcolista in terapia si mantiene astemio;
- 3 - riconoscere le epatopatie di origine alcolica (ALD) dalle altre (NALD);
- 4 - in corso di epatopatia alcolica, valutare lo stadio della malattia.

I marcatori storicamente più utilizzati, per le varie finalità, sono descritti di seguito :

Alcoluria

L'etanolo urinario non è un buon indicatore per valutare lo stato di ebrezza, data l'estrema variabilità della concentrazione, a parità di assunzione. Tuttavia, la maggiore permanenza dell'etanolo nelle urine, rispetto al sangue, lo rende utile per monitorare l'astinenza: a questo scopo occorre che l'esame venga richiesto quasi giornalmente, a causa del basso tempo di emivita dell'etanolo. Rispetto al sangue, le urine hanno il grosso vantaggio di non richiedere prelievi invasivi. La presenza di etanolo nelle urine va valutata caso per caso. La positività a bassi valori di concentrazione (30-50 mg/dL) in urine prelevate dopo pranzo è poco significativa mentre è preoccupante se il prelievo è fatto di mattina. Un solo valore positivo non significa nulla mentre più valori positivi indicano evidentemente l'assunzione cronica di alcol. Valori positivi in persone che dovrebbero essere astinenti sono ovviamente indice di interruzione dello stato di sobrietà. L'etanolo, come visto, persiste in circolo per circa 6 ore e si ritrova nelle urine fino a 12 ore dopo l'assunzione. Per assunzioni precedenti tale intervallo, in letteratura sono riportati altri marcatori che persistono nelle urine fino a 24 ore. I metodi analitici sono gli stessi che per l'alcolemia.

Altri marcatori di recente introduzione

Il *metanolo* è normalmente presente nei liquidi biologici a concentrazioni minori di 0.05 mmoli/L. Esso può avere origine endogena ma è anche presente in piccole quantità nelle bevande alcoliche ed in alcuni cibi, essendo anche il prodotto di idrolisi di alcuni esteri presenti nella frutta. Poiché metanolo ed etanolo competono per l'azione dell'enzima ADH, dopo assunzione di etanolo la concentrazione di *metanolo* aumenta sia nel sangue che nelle urine (8). Tuttavia è stato notato che nei soggetti non bevitori la concentrazione urinaria di MeOH aumenta fino a tre volte quella basale persistendo fino a 10-12 h; viceversa nei forti bevitori il consumo cronico di EtOH induce un accumulo di MeOH, la cui clearance può richiedere alcuni giorni. Pertanto, in questi casi, il metanolo urinario può essere utilizzato come indicatore del consumo cronico di alcol (9); ma l'unico metodo analitico utilizzabile è quello gas-cromatografico, inadatto per analizzare velocemente anche pochi campioni.

Un altro indicatore proposto è il *5-Idrossi-triptofolo* (5 HTOL) urinario, metabolita intermedio della serotonina, che di solito viene eliminata prevalentemente come Acido 5-idrossi-Indolacetico (5-HIAA). La inibizione competitiva dell'acetaldeide, derivante dall'alcol etilico, sull'enzima aldeide-deidrogenasi (ALDH) fa aumentare la eliminazione di 5-HTOL rispetto all'Acido 5-HIAA (10). Il rapporto 5-HTOL/5-HIAA ha elevata specificità per il consumo di etanolo. Inoltre è dose-dipendente e non risente di effetto accumulo, per cui può essere utilizzato per individuare un consumo recente sia nei forti bevitori che in quelli saltuari. Il CUT-OFF indicato è di 15 pmoli/nmole di 5-HIAA; il valore del rapporto viene marcatamente influenzato dal trattamento con inibitori della ALDH, ma non risente invece di uno stato di chetoacidosi diabetica (11). Sia 5-HTOL che 5-HIAA possono essere dosati quantitativamente con HPLC e rivelatore elettrochimico (12).

Anche la concentrazione ematica degli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE), restando elevata anche 24 h dopo una forte assunzione di etanolo, può essere considerata un buon marcatore di consumo alcolico recente. Tuttavia anche questo analita presenta a tutt'oggi difficoltà metodologiche per l'utilizzo in routine, vista la necessità di metodi cromatografici (2).

Gamma-glutamyl-transpeptidasi

La *Gamma-glutamyl-transpeptidasi* (GGT) è un enzima di membrana presente in moltissimi organi quali rene, pancreas, ghiandole mammarie, fegato, intestino, polmone, milza, tiroide, midollo osseo. Catalizza il trasporto del gruppo g-glutamile da un g-glutamyl-peptide ad un altro peptide o ad un aminoacido. Contrariamente a quanto avviene per la fosfatasi alcalina l'aumento dell'attività di questo enzima è legato soprattutto al fegato piuttosto che ad altri organi o tessuti. Aumenti di attività della GGT serica possono essere dovuti a stasi biliare, a tumori del fegato, all'assunzione di induttori epatici quali farmaci (fenobarbital o difenil-idantoina) e alcol. In mancanza di altri dati diagnostici, una GGT elevata deve far sospettare un caso di alcolismo. Questo enzima è particolarmente utile per seguire l'astinenza di un alcolista in terapia di disintossicazione perché la sua attività sierica torna nell'intervallo di normalità dopo circa 5-6 settimane di non assunzione di alcol. Questo tempo però risulterà molto più lungo se sussiste un danno epatico. Inoltre la GGT aumenta marcatamente nei bevitori che assumono alcol dopo un periodo di astinenza, mentre lo stesso fenomeno non si ripete per gli astemi. Una limitazione a questo utilizzo è dovuta al fatto che l'attività di questo enzima resta elevata nei primi 5 anni di dipendenza alcolica mentre tende a normalizzarsi per periodi più lunghi. Se è usata per valutare l'incidenza dell'alcolismo su una popolazione la sensibilità di questo marker è del 65% e la specificità dell'85%, ma il valore effettivo di questi parametri dipende molto dalla prevalenza.

La combinazione con altri test, quali l'MCV, fa aumentare la sensibilità a discapito della specificità (13). In ogni caso la GGT non dà indicazioni per valutare il danno epatico, mentre è utile per individuare i forti assuntori e per valutarne lo stato di astinenza.

Volume corpuscolare medio

La dieta degli alcolisti cronici, basata soprattutto sull'alcol e carente di alimenti freschi, porta quasi costantemente ad uno stato di avitaminosi. In particolare la mancanza di folati fa aumentare il volume corpuscolare medio (MCV). Questo marcatore è quindi utile per individuare gli alcolisti, ma a causa della bassa sensibilità (37%) non può essere mai usato da solo, ma sempre associato ad altri indici. L'emivita di questo parametro dipende dalla vita dei globuli rossi, circa 120 giorni, ed è pertanto troppo lunga per usarlo come indice per il controllo dell'astinenza. Inoltre, come la GGT, anche l'MCV non ha alcun legame con il danno epatico (13).

Transaminasi

Questi due enzimi, asparato ammino transferasi (AST) e alanino ammino transferasi (ALT) catalizzano il trasporto di un gruppo amminico da un'amminoacido ad un chetoacido. Sono presenti in numerosi organi o tessuti e particolarmente nel cuore, cervello e fegato. L'aumento di questi enzimi è sempre legato alla rottura della membrana cellulare e quindi sono correlabili al danno epatico.

Nell'epatopatia di origine non alcolica il rapporto ASL/ALT è solitamente inferiore ad 1 mentre si inverte, fino ad arrivare a 2 in quella di origine alcolica. Per discriminare tra queste forme di epatopatie è stato proposto anche la valutazione del rapporto AST mitocondriale/AST totale (mAST/tAST) che aumenta fino a 4 volte la norma in caso di ALD. Purtroppo la determinazione dell'attività degli isoenzimi è una pratica laboratoristica poco diffusa, non perfettamente riproducibile e piuttosto costosa. Gli isoenzimi dell'AST sono 2, uno mitocondriale e l'altro citoplasmatico e con proprietà immunologiche ben diverse. Infatti il metodo più semplice per determinare l'mAST è basato sull'aggiunta al siero di anticorpi anti cAST + PEG, precipitazione del complesso Ab-Ag, separazione per centrifugazione e determinazione dell'attività AST residua. L'AST degli alcolisti, in assenza di danno epatico permanente (alcolico o non alcolico), torna normale in 1-4 settimane. La sola AST non è usabile per individuare i forti bevitori dato che ha una sensibilità, rispetto all'abuso di alcol, solo del 35% (14).

Glutammato-deidrogenasi

La glutammato deidrogenasi (GLDH) è localizzata soprattutto nel fegato anche se rene, cervello, pancreas, polmoni e cuore ne sono abbondantemente provvisti. Dato che è localizzata nei mitocondri, l'aumento di attività serica della GLDH è correlabile ad un danno cellulare oppure a un processo che la coinvolge. Come indice di danno epatico è poco richiesta perché non dà più informazioni delle attività seriche dell'AST e dell'ALT. Negli alcolisti però ha la caratteristica di restare alta in caso di abuso

continuato di alcol e di abbassarsi bruscamente con l'inizio dell'astinenza. A 24 ore di distanza dall'ultima bevuta l'abbassamento medio di attività è del 36%. La riduzione dell'attività di questo enzima in una situazione di astinenza forzata e controllata è indice di alcolismo con sensibilità di circa il 90% (14).

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.

È stato proposto di usare il dosaggio di questi addotti per monitorare l'astinenza di alcolisti in trattamento, alla stregua dell'HbA1C 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 rivelabile dai normali rivelatori 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 (13). Sono stati anche proposti metodi immunochimici, tuttora poco diffusi. La specificità del test nell'individuare i consumatori di alcol è del 71%. Tuttavia anche questi parametri, come l'MCV, non sono adatti a valutare il danno epatico.

Disulfiram

Sarebbe auspicabile poter dosare, nel sangue, questo importante farmaco impiegato per combattere l'alcolismo 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, difatto, la diffusione.

Marcatori di consumo cronico di recente introduzione: la Transferrina desialata (cdt)

Un marcatore diagnostico ideale di abuso alcolico dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- 1) essere il prodotto di un fenomeno biochimico specificatamente correlato alla presenza o al metabolismo dell'alcol;
- 2) essere dipendente dal consumo di alcol;
- 3) essere abbastanza sensibile da permettere una valutazione dei livelli di consumo alcolico minimi che si associano a danni fisici o psichici;
- 4) essere caratterizzato da una cinetica di eliminazione ben nota cioè avere un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) definito e relativamente breve in modo da poter monitorare l'astinenza.

Nessuno dei marcatori biochimici finora utilizzati possiede tutte queste caratteristiche. Tuttavia, in questi ultimi anni, ha suscitato molto interesse l'introduzione nella diagnostica biochimica di un nuovo indicatore che sembra soddisfare i criteri elencati in precedenza più dei marcatori classici. Si tratta della transferrina desialata o CDT (Carbohydrate-Deficient Transferrin) i cui livelli serici risultano aumentati in caso di consumo elevato di alcol.

È noto che l'abuso alcolico interferisce con il metabolismo di vari tipi di glicoproteine, il più studiato dei quali è la transferrina. Si tratta di una glicoproteina con PM 80.000 Dalton costituita da una singola catena polipeptidica di 679 amminoacidi e da 2 unità oligosaccaridiche complesse contenenti N-acetilglucosamina, Mannosio, Galattosio ed Acido sialico. Ogni molecola di Transferrina presenta 2 siti di legame per il Ferro. La microeterogeneità della molecola dipende essenzialmente dal diverso grado di

saturazione con il Ferro e dal diverso contenuto di carboidrati, soprattutto Acido sialico. La presenza di isoforme carboidrato-carenti (note con il nome complessivo di CDT) è correlata con l'abuso alcolico, probabilmente per l'inibizione della glicosil-trasferasi da parte dell'Acetaldeide, principale metabolita dell'Etanolo (15).

Le varie isoforme di CDT, a diverso contenuto di acido sialico, hanno diverso punto isoelettrico e perciò, dopo saturazione con Fe-citrato, possono venir separate con micro-cromatografia a scambio anionico dalla Transferrina normale e quindi dosate con metodo immunometrico (16). Diversi studi hanno indicato che consumi > 50-80 g Etanolo/die per almeno una settimana inducono un innalzamento dei livelli di CDT nella maggioranza dei pazienti esaminati. Durante l'astinenza alcolica la CDT mostra un t_{1/2} di circa 15 giorni. È stato riscontrato che il valore di CDT in individui non bevitori è più alto nelle donne (fino a 26 U/L) che negli uomini (fino a 20 U/L). Helena Stibler riporta in una review (17) il risultato di 21 lavori basati sulla determinazione micro-cromatografica della CDT che hanno esaminato circa 2500 individui fra alcol-dipendenti, controlli sani e pazienti con patologie epatiche non alcol-correlate. Applicando lo schema di Bayes sul totale dei casi esaminati, si ricava che, rispetto alla pregressa assunzione di alcol, la CDT ha una sensibilità diagnostica dell'82%, ed una specificità del 97%.

Nel dosaggio della CDT si riscontrano pochi casi di falsi positivi (FP), soprattutto in pazienti con grave insufficienza epatica (cirrosi da epatite cronica attiva o cirrosi primaria delle vie biliari). Altre cause di FP possono essere i pazienti ed il 25% dei portatori sani della sindrome CDG (carbohydrate - deficient-glycoprotein syndrome) (18), oltre ai pazienti con una variante D, geneticamente rara, della Transferrina. Non si sono osservati casi di FP con l'uso di un gran numero di farmaci o droghe, in particolare oppiacei. Per i casi di falsi negativi sembra che una spiegazione possa risiedere nella presenza di fattori genetici o metabolici che proteggano le glicoproteine dall'azione dell'Etanolo e dei suoi metaboliti.

Marcatori precoci di fibrosi

L'evoluzione della malattia epatica alcol-correlata costringe il clinico a ricercare indicatori precoci di fibrosi, allo scopo di identificare quanto prima i pazienti ad alto rischio di sviluppare cirrosi (19). 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. L'eccesso di deposizione può dipendere sia da aumento di sintesi che da diminuzione di attività della collagenesi. Durante quest'ultima fase le cellule secernono precursori del collagene nella matrice extra-cellulare; le regioni amino- e carbossi- terminale del pro-collagene sono distaccate da peptidasi, con la successiva formazione di collagene, che si assembla in fibre.

Fra i marcatori proposti in letteratura per individuare l'inizio del processo fibrotico risalta il propeptide amino-terminale del collagene tipo I (P - III - P), che sembra in grado di differenziare soggetti con fibrosi o cirrosi da quelli solo con steatosi (20). Per lo stesso obiettivo sono allo studio vari altri marcatori derivanti dal collagene: peptide carbossi-terminale del pro-collagene tipo I; prodotti di degradazione del pro-collagene tipo I e IV; prodotti di degradazione del collagene tipo I; sostanze del connettivo non collagenico. Un altro studio ha messo in evidenza che, nei soggetti con fibrosi, è aumentata l'attività collagenasica (inibitore tissutale della metallo proteinasi) (21).

Fra i metodi oggi disponibili, anche per un uso di routine, risulta molto interessante il dosaggio dell'acido *Ialunorico* (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 posseggono un recettore specifico per HA ed eliminano, in condizioni fisiologiche, il 90% di quello in circolo (22).

Il dosaggio dell'HA 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.

Bibliografia

1. MURDOCH RITCHIE J. -The Aliphatic Alcohols - in *The pharmacological basis of therapeutics (goodman AND gilman's) macmillan publ.comp., New York, 1985, p. 372-386.*
2. LODI F., MAROZZI E. - *Alcol Etílico* - 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. 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.
5. BACCINI C.- *Alcol etilico* - in *Caleidoscopio*, 1988,36, p.66-7
6. MACCHIA T. ed altri - *Quantificazione dell'alcolemia per studi epidemiologici nella prevenzione degli incidenti stradali* - *Boll.Med. It. Trasporti* ,1991, 2, p.5-19.
7. Pasquinelli F, CALDINI M., VALENZA T. - *Diagnostica e tecniche di laboratorio* - Ed.Rosini - 1980 -VOL.1- p.1708-9.
8. MAJCHROWICZ E., HENDELSON JH. - *Blood methanol concentrations during experimentally induced ethanol intoxication in alcoholics* - *J.Pharm.Exp.Ther.* 1971, 179, p.293-300
9. ROINE RP., ERIKSSON CJP et al.: *Methanol as a marker of alcoholic abuse* - *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1989,13, p.172-175.
10. 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.
11. BECK O., HELANDER A., CARLSSON S., BORG S. - *Changes in serotonin metabolism during treatment with the aldehyde dehydrogenase inhibitors disulfiram and cyanamide* - *Pharmacol.Toxicol.* 1995, 77, p.323-326.
12. 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.
13. ROSMAN A.S., LIEBER C.S. - *Diagnostic utility of laboratory test in alcoholic liver disease* - *Clin.Chem.* 1994, 40,8, p.1645-1646.
14. MACCHIA T. - *Abuso alcolico: prospettive diagnostiche di alcuni markers di recente introduzione* - in *Droga e tossicodipendenza* - *Ist.Sup.San.- Ed. Clas I. - Brescia*, 1992, vol.1, p.349.
15. STIBLER H., BORG S. - *Carbohydrate composition of transferrin in alcoholic patients* - *Alcohol Clin. Exp.Res.-* 1986, 10, p.61-4.
16. 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, 177, p.230-3.
17. STIBLER H. - *Carbohydrate deficient transferrin: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed* - *Clin.Chem.* 1991, 37, p.2029-2037.
18. STIBLER H, JAEKEN J. - *Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome.* *Arch.Dis. Child.* 1990, 65, p.107-111.
19. ROSMAN A.S., LIEBER C.S. - *Diagnostic utility of Laboratory tests in Alcoholic liver disease*, *Clin.Chem.* 1994, 40/8, p.1641-1651.
20. NOUCHI T, WORNER 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.
21. 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.
22. VENO T., INUZUKA S., TORIMURA T. et al. - *Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization* - *Gastroenterology*, 1993, 105, p.475-81.