

Ilımlı Alkol Alan Erkeklerde Laktat Dehidrogenaz İzoenzim Değişiklikleri

Sadık Büyükbaş*, Ali İnal**

Özet:

Amaç: Alkol toplumda en yaygın suistimal edilen madde olup bu yanlış kullanım genel ve gizli bir problemdir. Epidemiyolojik çalışmalar alkol kullanımı ile koroner arter hastalığının ilişkili olduğunu belirtmektedir. Klinisyen hekimlerin isteği erken dönemde yanlış alkol kullanımının saptanmasıdır. İnsan dokularında LDH enziminin beş izoenzimi vardır ve bunlardan özellikle LDH₅ izoenzimi karaciğer dokusunda yüksek miktarlardadır. Bu nedenlerle biz bu çalışmamızda alkol kullanımının total LDH ve LDH₅ izoenzimlerine olası etkilerini araştırdık.

Yöntem: Çalışma gruplarımız alkol kullanan 64 erkek ve alkol kullanmayan 48 erkek kişiden oluşmaktadır. Venöz kan örnekleri çalışma grubunda alkol alımından 8-12 saat sonra ve kontrol grubunda akşam yemeğinden 8-12 saat sonra alındı. GGT ve total LDH aktiviteleri ticari kit yöntemlerine göre, ve LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ ve LDH₅ izoenzimleri Helena elektroforeziyle saptandı.

Bulgular: LDH₅ ve GGT aktiviteleri alkol grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek ($p<0.01$) iken LDH₁ ($p<0.01$) ve LDH₂ ($p<0.02$) aktiviteleri alkol grubunda istatistiksel olarak daha düşüktür ($p<0.01$). Total LDH, LDH₃ ve LDH₄ aktiviteleri gruplar arasında fark göstermemiştir.

Sonuç: Alkol grubumuzun LDH₅ ve GGT enzim aktiviteleri alkol grubunda belirgin olarak yüksektir ve bu nedenle LDH₅ ve/veya GGT enzim aktivitelerinin ölçümü; alkol suistimalinin erken belirteçleri olabilir.

Anahtar Kelime: Alkol, LDH, LDH₅, izoenzyme

Siroz vakalarının %74'ünün, kronik pankreatitlerin %72'sinin alkol kullanımı ile ilgili olduğu literatür bilgisi bu problemin sağlık boyutunu göstermektedir (1). Alkolün neden olduğu biyokimyasal değişiklikler farklı mekanizmalarla (2) oluşmakla beraber karaciğer dokusunda hafif bir enflamasyondan toksik karaciğer hasarına kadar değişebilen etkilenme söz konusudur. Aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT) hepatosellüler hasar için ve alkalen fosfataz (ALP) ile gamma glutamil transferaz (GGT), 5' nukleotidaz enzim aktiviteleri hepatobiliyer fonksiyon için kullanılır (3,4).

Alkol kullanımının yaygın olduğu toplumlarda alkol suistimalinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir ve bazı belirteçlerin (CDT-carbohydrate deficient transferin, GGT vb.) bu amaçla kullanılması gereklidir (1). GGT serum düzeyi halen önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır (5-8). GGT membrana bağlı glikoprotein yapıda bir enzim olup

karaciğerde en yoğun olarak safra kanalikülleri ve periportal alandaki duktal epitelde bulunmaktadır (9). Nilssen ve arkadaşları (8) alkol alımı ile GGT arasında kuvvetli bir ilişki belirtmişlerdir.

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi glikolizin anahtar enzimidir ve laktat üretimini katalizler (10). Bu enzim tüm dokularda yaygın olup klinik yönden LDH izoenzimlerinin aktivite ölçümleri total aktivite ölçümünden daha yararlıdır. LDH enziminin beş izoenzimi vardır. Kalp kası LDH₁ ve karaciğer dokusu LDH₅ yönünden daha zengindir ve bu nedenle LDH₁ izoenzimi kalp patolojilerinde LDH₅ izoenzimi ise karaciğer patolojilerinde daha çok etkilenirler (11). LDH₃ izoenzimi ise akciğer patolojilerinden etkilenir. Miyokard infarktüsünde hasar akut başlayıp kısa sürerken hepatitte ise yavaş başlayıp uzun süren bir incinme söz konusudur. Akut miyokard infarktüsü ayırıcı tanısında uzun yıllar CKMB ve LDH₁ izoenzimleri kullanıldı. Kardiyolojik problemler (12) dışında LDH ve izoenzimleri ile ilgili çalışmalar, genellikle karaciğer maligniteleri (13) başta olmak üzere çeşitli malignitelere (10,14-16) ve bazı karaciğer hastalıklarına (17-19) yöneliktir. Alkol kullanımı ile LDH ve izoenzimlerinin etkilenmesini ele alan çok az çalışma (20,21) mevcuttur. Kaldı ki alkol kullanımının karaciğere etkileri açısından da özellikle

* Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

** Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya

Yazışma Adresi: Doç. Dr. Sadık Büyükbaş

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Meram/Konya

Tablo I: LDH izoenzim ve GGT enzim değerleri.

	Kontrol	Alkol	t veya z	p
N	48	64		
Yaş	37.9±9.3	38.6±7.8	t = -0.23	0.823
LDH (U/L)	428.94±98.90	381.69±62.33	t = 1.62	0.116
LDH ₁ (U/L)	95.99±23.33	73.80±13.95	t = 3.27	0.003
LDH ₂ (U/L)	150.35±35.03	124.15±21.31	t = 2.56	0.016
LDH ₃ (U/L)	91.03±24.10	79.01±15.02	t = 1.69	0.101
LDH ₄ (U/L)	46.14±13.68	44.08±8.99	t = 0.50	0.619
LDH ₅ (U/L)	45.33±18.76	63.19±24.86	z = -2.32	0.020
GGT (U/L)	31.81±23.95	51.31±27.09	z = -2.26	0.024

GGT başta olmak üzere ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri genellikle çalışılmıştır.

Literatürde alkol kullanımının LDH izoenzimleri üzerine etkileri ile ilgili olarak sadece Nemesanszky ve ark. çalışmaları (21) göze çarpmakta ve bu çalışmanın vaka grubu 14 kişiden oluşmaktadır. Gerek literatürün kısıtlı olması gerekse literatürdeki vaka grubunun küçük olması nedeniyle, alkolün LDH izoenzimleri üzerine olası etkisini ele alan bu çalışmamız daha geniş vaka grubunda planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu araştırma yaşları 26-52 (37.9±9.3) arası hiç alkol almayan 48 erkek kontrol grubu ve yaşları 26-50 (38.6±7.8) arası 3-5 yıldır günde 30-70 (55.45±12.49) gram alkol alan 64 erkek alkol grubu üzerinde gerçekleştirildi.

Kontrol grubumuzun yaş değerlerinin (26-52), alkol grubumuzun yaş değerlerine (26-50) uyumlu olması göz önüne alınarak kontrol grubu oluşturuldu. Böylelikle yaş farkından kaynaklanabilecek farklılıklar önlenmiştir.

Kişisel bilgilerin gizli tutulacağı ve bu bilgilerin bu araştırma kapsamı dışında kullanılmayacağı hususu belirtilerek sözlü veya yazılı olarak izni alınan kişiler bu araştırmaya dahil edilmişlerdir. Yaş, boy, ağırlık, sigara ve ilaç alışkanlığı, fizik aktivite, geçirilen hastalıklar (özellikle hepatit, siroz vb. kronik karaciğer hastalığı) ile ilgili bilgiler alındı. Karaciğer hastalığı hikayesi veya şüphesi olan kişiler araştırmaya alınmadı. Ayrıca hangi içkiden ne miktarda ve haftada kaç defa kullandığı sorgulandı.

Alkol alımı ile ilgili kişisel bilgiler ve alkollü içkilerin içerdiği alkol miktarları (15, 17) göz önüne alınarak günlük alkol miktarı hesaplandı. Türk rakasında %45 (0.7 litrede 315 gr), birada çeşidine göre % 2.8-8.3 arası (bir şişe birada yaklaşık 20 gr), viskide %45-50 arası, votkada %45 oranında alkol bulunur. Alkol yüzde oranlarından hesaplanan alkol miktarı, 1 ml alkolün 0.8 gr olduğu düşünülerek grama çevrildi. Hesaplanan haftalık alkol tüketim miktarı, alkol alınan gün sayısına bölünerek günlük

alkol kullanımı hesaplandı. Günlük 20 gramdan az alkol alımını 'hafif içici', 20-70 gr alkol alımını 'ılımlı içici', 70 gramdan daha fazla alkol alımını 'ağır içici' olarak tanımlayan literatür bilgisi göz önüne alınarak grubumuz 'ılımlı içici' olarak belirlenmiştir.

Alkol grubunda alkol alımından 8-12 saat sonra ve kontrol grubunda 8-12 saatlik açlık sonrasında venöz kan örnekleri alındı. Serum örnekleri +4 °C'de 24 saat süreyle saklandı, Serum GGT ve total LDH enzim analizleri kinetik ticari kitlerle spektrofotometrik olarak, LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄, LDH₅ izoenzim ölçümleri ise Helena elektroforez sisteminde gerçekleştirildi.

İstatistiki değerlendirme için SPSS paket programı kullanıldı. Grup homojenliği için Levene testi ve istatistiksel değerlendirme için Student t testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Analiz parametreleri arasında korelasyon değerlendirmesi Pearson testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için p < 0.05 değeri yeterli olarak kabul edildi.

Bulgular

Tabloda görüldüğü gibi yaş değerleri bakımından kontrol (37.9±9.3) ve alkol (38.6±7.8) gruplarımız birbirine yakındır (yaş p =0.823). Bu durum yaş farklılığından kaynaklanabilecek farklılıkların asgari seviyede tutulmasını sağlamaktadır.

Alkol grubumuzun GGT değerleri (51.31±27.09 U/L) kontrol grubuna (31.81±23.95 U/L) kıyasla yüksek olup bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p = 0.024). Bu artış alkolün hücre membran akışkanlığını etkilemesini yansıtmaktadır.

Total LDH aktiviteleri bakımından alkol grubu (381.69±62.33 U/L) ile kontrol grubu (428.94±98.90 U/L) arasında fark yoktur. Kontrol grubuna kıyasla alkol grubunda LDH₅ aktivitesi anlamlı artış (z = 1.67, p= 0.094) gösterirken LDH₁ (p=0.003) ve LDH₂ (p=0.016) aktiviteleri ise anlamlı olarak azalmıştır. LDH₃ ve LDH₄ aktiviteleri her iki grup arasında önemli bir fark göstermemiştir.

Alınan alkol miktarı ile GGT, total LDH ve LDH izoenzim değerleri arasında herhangi bir korelasyon belirlenemedi.

Tartışma

Alkol özellikle karaciğer için kimyasal toksik bir ajandır. Sağlıklı kişilerde alınan alkol 8 saat gibi kısa bir sürede kandan uzaklaştırılabilirken karaciğer incinmesi olan kişilerde ise kan alkol düzeyi 24 saatten fazla yüksek kalabilir (22).

Genellikle alkolle ilgili yapılan araştırmalarda kontrol grupları, ya alkolü bırakmış kişilerden (7,23) veya alkol kullandıkları halde belirli bir süre alkol perhizine alınan kişilerden oluşturulmaktadır (24). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu yaşamı boyunca hemen hemen hiç alkol kullanmamış kişilerden oluşturuldu. Bu nedenle kontrol grubu seçiminizin daha özenli yapıldığını söyleyebiliriz.

Alkol grubumuzda serum GGT düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.02$). Nemesanszky ve arkadaşlarının bulguları da (21) bu yöndedir ($p<0.001$). Serum GGT aktivite artışı, alkolün karaciğer hücrelerindeki mikrozomal yapılara olan toksik etkiyi ve bu etkiye karşın antioksidan cevabı (25) yansıtmaktadır. Alkolün membran akışkanlığını etkilemesi de söz konusudur.

Karaciğer hastalıkları teşhisinde oldukça kullanışlı olmasına rağmen bu enzimin spesifitesi oldukça düşük (21) olduğu göz önünde tutulmalıdır. Bu nedenle serum GGT aktivitesindeki anormal bir artışın her zaman için karaciğer harabiyeti ile ilişkisi olmayabilir. Alkol kullanan kişilerde herhangi bir karaciğer hastalığı yokluğunda, GGT düzeyindeki bir artışın 'alkol suistimalinin erken uyarıcısı' olarak yorumlanmasının daha uygun olduğu kanaatindeyiz. Bu enzim aynı zamanda antioksidan savunmada da yer almaktadır (25). Kaldı ki GGT enziminin hücrel sentez ve salgılanması üzerine alkolün etkisi ile ilgili bilgiler yeterli değildir (7, 21, 25). Alkolün muhtemel indüktif ve incitici etkilerine karşı hepatosit hücrelerinin hassasiyeti, serum GGT artışını kısmen izah edebilir. Alkol hücre membran akışkanlığını etkileyerek membranda yer alan GGT'nin serbestleşmesini kolaylaştırabilir.

Nilssen ve ark. (8) alkol alımı ile GGT arasında kuvvetli bir ilişki belirtmekle beraber alkol alım miktarı değişiklikleri ile GGT değişimleri arasındaki ilişkinin zayıf olduğunu belirtmektedir. Bazı araştırmacılar (26,27) alkol alanlardaki GGT aktivite artışının, tüketilen alkol miktarından daha çok alkolün biyolojik etkileriyle daha yakından ilişkili olarak düşünmektedirler. Bizim düşüncemiz de alkolün biyolojik etkisinin alkol miktarından daha önemli olduğu yönündedir.

LDH izoenzimleri ile ilgili literatür tarandığında kalp patolojileri haricindeki LDH ile ilgili çalışmaların (13,14,16-18); genellikle kanser ve

benzeri malign durumla ilgili olarak gerçekleştiği görülmektedir. Kaito ve ark. (13) primer karaciğer karsinomunda LDH₅ artışının belirgin olduğunu bulmuşlar ve bu artışın metastatik karaciğer karsinomlarından ayırt etmede yardımcı olacağını bildirmişlerdir. Yasuda ve ark. (17) hayvan çalışmalarında; karaciğer konjesyonunda LDH₃, LDH₄ ve LDH₅ aktivitelerinde artış ve LDH₁ aktivitesinde azalma tespit ederken karaciğer nekrozunda ise LDH₃, LDH₄ ve LDH₅ aktivitelerinde artış ve LDH₁ ile LDH₂ aktivitelerinde azalma tespit etmişlerdir. Rotenberg ve ark. (18) çeşitli karaciğer bozukluklarında LDH ve izoenzimlerini değerlendirerek LDH₅'in kronik karaciğer bozukluklarından daha çok akut karaciğer bozukluklarında daha hassas olduğunu belirtmişlerdir.

İlmlı alkol alımının etkileriyle ilgili olarak Gill ve ark. (20), Nemesanszky ve ark. (21) total LDH aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını belirtmektedirler. Nemesanszky ve ark. ilmlı içicilere dört haftalık bir alkol perhizinden sonra yaptıkları alkol yüklemesinde 24 saat içinde LDH₅ aktivitesinde belirgin artış gözlerken total LDH aktivitesini normal bulmuşlardır. Bu araştırmacılar LDH₁, LDH₂, LDH₃ ve LDH₄ ile ilgili herhangi bir değerlendirme yapmamışlardır.

Çalışmamızda her iki gruba ait total LDH düzeylerinde önemli bir fark yokken alkol grubunda LDH₅ aktivitesi ($p=0.020$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgu Nemesanszky ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumludur. Alkol grubumuzdaki GGT aktivitesindeki artış da bu bulguyu desteklemektedir. Bizim çalışmamızda ayrıca LDH₁ ($p=0.003$) ve LDH₂ ($p=0.016$) aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Alkolün LDH₁ ve LDH₂ aktivitelerine etkisiyle ilgili herhangi bir literatüre rastlamadık.

Wieme ve ark. (28) deneysel hayvan çalışmasında karbon tetra klorür (CCl₄) uygulayarak oluşturdukları karaciğer nekrozunda LDH₅ aktivite artışını gösterdiler. İncinen hücrelerden 24 saat içinde enzimin kana serbestlenmesine bağlı olarak LDH₅ yükselmekle beraber CCl₄ uygulaması devam ettirilerek LDH₅ aktivitesi düşmesi de gösterilmiştir. Bu durum karaciğerde CCl₄ toksisitesine bağlı muhtemel reverzibl akut bir konjesyonla ilgilidir.

Bizim kanaatimize göre LDH₅ izoenzim aktivitesinin serumda belirgin artışı alkolün toksik etkisi nedeniyle muhtemelen karaciğer hücre membranından plazmaya enzim sızmasını yansıtmaktadır. Alkol grubunda LDH₁ ve LDH₂ aktivitelerinde görülen azalmayı izah edemedik ve bu konuda herhangi bir araştırmaya da rastlamadık.

Sonuç olarak; GGT ve LDH₅ enzim aktivitelerindeki artış birlikte düşünüldüğünde ciddi sağlık problemi olmayan ve bu nedenle sağlıklı

görünen alkol kullanıcıları için 'alkol suistimalinin erken belirtici' olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca LDH₁ ve LDH₂ aktivite azalmasına yönelik yeni çalışmaların alkol kullanan daha fazla kişide planlanması yararlı olacaktır.

Changes In Serum Lactate Dehydrogenase Isoenzymes In Moderate Drinkers

Abstract:

Objective: Alcohol is the most commonly abused substance in the general population. The misuse of alcohol is common and frequently an occult problem. Epidemiological studies suggest that alcohol intake is associated with the risk of coronary arter disease. The challenge for the clinician is to detect alcohol misuse at an early stage. Five active isoenzymes of Lactate dehydrogenase (LDH) can be found in human tissues, and especially LDH₅ isoenzyme is high in the liver tissue. Therefore, in this study, we investigated the effect of alcohol consumption on the activities of total LDH and its isoenzymes.

Methods: The study group consisted of 64 alcohol drinkers men, and the control group consisted of 48 healthy men. Venous blood samples were obtained from a cubital vein 8-12 hours after alcohol consumption or the dinner for study group or control group. Serum activities of GGT and total LDH were measured by commercial kit procedure, and LDH isoenzymes were determined by Helena electrophoresis.

Results: LDH₅ and GGT activities of the alcohol group were statistically higher than the control group ($p<0.01$), and LDH₁ and LDH₂ activities were lower than the control ($p<0.01$ and $p<0.02$, respectively). There is no statistically significant difference between alcohol group and control group in view of LDH₃, LDH₄ and total LDH activities.

Conclusions: Alcohol group had higher LDH₅ and GGT activities than control group. Therefore, the assay of LDH₅ and/or GGT activities can be taken as early markers for alcohol abuse.

Key Words: Alcohol, LDH, LDH₅, isoenzyme

Kaynaklar

- Montalto NJ, Bean P. Use of contemporary biomarkers in the detection of chronic alcohol use. *Med Sci Monit*;9(12):RA285-90,2003.
- Lippi G, Fedi S, Grassi M et al. Acute phase proteins in alcoholics with or without liver injury. *Ital J Gastroenterol*;24:383-385,1992.
- Stolz A, Kaplowitz N: Biochemical tests for liver disease. In Zakim D, Boyer T (eds): *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990,pp 637-67.
- Weisiger RA: Laboratory tests in liver disease. In Wyngaarden JB, Smith LH, Jr, Bennett JC (eds): *Cecil Textbook of Medicine* 19th ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1992, pp760-63.
- Daeppen JB, Anex F, Leutwyler J, Secretan F, Gammeter R, Besson J, Darioli R, Chossis I. Role of high normal gamma-glutamyltransferase level in identifying heavy alcohol use in young men. *Alcohol*;32(2):157-61,. 2004.
- Hietala J, Puukka K, Koivisto H, Anttila P, Niemela O. Serum gamma-glutamyl transferase in alcoholics, moderate drinkers and abstainers: effect on gt reference intervals at population level. *Alcohol*. 2005;40(6):511-4.
- Matsuka Y, Wang DH, Suganuma N, Imai K, Ikeda S, Taketa K, Kira S. Differential responses of serum gamma-glutamyltransferase to alcohol intake in Japanese males. *Acta Med Okayama*. 2003;57(4):171-8.
- Nilssen O, Forde OH. Seven-year longitudinal population study of change in gamma-glutamyltransferase: the Tromsø Study. *Am J Epidemiol*. 1994;139(8):787-92.
- Stolz A, Kaplowitz N: Biochemical tests for liver disease. In Zakim D, Boyer T (eds): *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990,pp 637-67.
- Augoff K, Grabowski K. [Significance of lactate dehydrogenase measurements in diagnosis of malignancies] *Pol Merkuriusz Lek*. 2004;17(102):644-7.
- Ozel AT, Ibrahim G, Awad EA, Fish LA. Lactate dehydrogenase isoenzyme levels in collagen disease. *Arch Phys Med Rehabil*. 1977;58(10):431-4.
- Penttilä I, Penttilä K, Rantanen T. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Mar;38(3):187-97.
- Kaito I, Sato S, Ishii T. [Serum lactic dehydrogenase isoenzymes in metastatic and primary liver carcinoma (author's transl)] *Leber Magen Darm*. 1976 Dec;6(6):335-9.
- Von Eyben FE. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. *Clin Biochem. Sep*;34(6):441-54,2001.
- Von Eyben FE. Laboratory markers and germ cell tumors. *Crit Rev Clin Lab Sci*;40(4):377-427,2003.
- MacVicar GR, Pienta KJ. Testicular cancer. *Curr Opin Oncol*;16(3):253-6,2004.
- Yasuda J, Syuto B, Too K, Ohfuji S. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bovine liver tissue. *Nippon Juigaku Zasshi*;51(4):733-9,1989.
- Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, Fuchs J, Harell D, Agmon J. Alterations in total lactate dehydrogenase and its isoenzyme-5 in hepatic disorders. *Ann Clin Lab Sci*;20(4):268-73,1990.
- Mantel E, Lukesch KH. [Significance of LDH5 in liver cirrhosis] *Z Gesamte Inn Med*;26(20):287-8,1971.
- Gill GV, Baylis PH, Flear CT, Skillen AW, Diggle PH. Acute biochemical responses to moderate beer drinking. *Br Med J*;285(6357):1770-3,1982.
- Nemesanszky E, Lott JA, Arato M. Changes in serum enzymes in moderate drinkers after an alcohol challenge. *Clin Chem*;34(3):525-7,1988.

22. Saunders JB, Paton A. ABC of alcohol. Alcohol in the body. *Br Med J*.;283(6303):1380-1,1981.
23. Pai JK, Hankinson SE, Thadhani R, Rifai N, Pischon T, Rimm EB. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. *Atherosclerosis*. 2005 Jul 28; [Epub ahead of print]
24. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Marquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*.;175(1):117-23,2004.
25. Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A. High serum carotenoids are inversely associated with serum gamma-glutamyltransferase in alcohol drinkers within normal liver function. *J Epidemiol. Sep*.;15(5):180-6,2005.
26. Duckert F, Johnsen J, Amundsen A, Stromme J, Morland J. Co-variation between biological markers and self-reported alcohol consumption. A two-year study of the relationship between changes in consumption and changes in the biological markers gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and average volume per erythrocyte (MCV) among problem drinkers. *Alcohol Alcohol*.;27(5):545-55,1992.
27. Pikolainen K, Karkkainen P, Pikkarainen J. Correlations between biological markers and alcohol intake as measured by diary and questionnaire in men. *J Stud Alcohol*.;46(5):383-7,1985.
28. Wieme RJ, Van Maercke Y. The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. *Ann N Y Acad Sci. Nov 2*;94:898-911,1961.