

METABOLISM OF ETHYL ALCOHOL AND THE DEVELOPMENT OF CANCER

METABOLIZM ALKOHOLU ETYLOWEGO A ROZWÓJ CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Wanda Dyr

Institute of Psychiatry and Neurology, Department of Pharmacology and Physiology of the Nervous System, Warsaw, Poland

Instytut Psychiatrii i Neurologii, Zakład Farmakologii i Fizjologii Ośrodkowego Układu Nerwowego, Warszawa, Polska

Alcohol Drug Addict 2017; 30 (4): 295-306

DOI: <https://doi.org/10.5114/ain.2017.73876>

Abstract

The main metabolic pathway of ethanol elimination occurs in the liver. Ethanol is oxidised by an alcohol dehydrogenase (ADH) to a very toxic acetaldehyde. The aldehyde is converted to acetate by an aldehyde dehydrogenase (ALDH). Studies of animals with genetic predisposition to drink ethanol indicate the relationship between spontaneous drinking of alcohol and its increased metabolism.

Chronic alcohol consumption is significantly related to the risk of developing cancer in the upper gastrointestinal tract (oral cavity and oesophagus) as well as liver, pancreas, and large intestine. Studies show that the carcinogenic effect of alcohol is due to the action of acetaldehyde, which interferes in many places with DNA synthesis, influences DNA repair capacity, and binding to cellular proteins causes cellular dysfunction.

The aldehyde can generate errors of gene replication. Other mechanisms involved in ethanol metabolism are associated with reactive oxygen

Streszczenie

Główny szlak metaboliczny etanolu występuje w wątrobie. W pierwszym etapie etanol jest utleniany przez dehydrogenazę alkoholową (ADH – *alcohol dehydrogenase*) do bardzo toksycznego aldehydu octowego. Aldehyd jest przekształcany do octanu przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH – *aldehyde dehydrogenase*). Badania zwierząt o genetycznej predyspozycji do picia etanolu wskazują na zależność między spontanicznym piciem alkoholu a jego zwiększonym metabolizmem.

Przewlekłe nadużywanie alkoholu w znaczący sposób jest związane z ryzykiem rozwoju nowotworu górnego odcinka przewodu pokarmowego (jama ustna, przełyk), a także wątroby, trzustki i jelita grubego. Z badań wynika, że karcinogeny efekt alkoholu jest związany z działaniem aldehydu octowego, który interferuje w wielu miejscach z syntezą DNA, wpływa na zdolności systemów naprawczych DNA oraz wiążąc się z białkami komórkowymi, powoduje zaburzenia funkcjonowania komórek.

Aldehyd może generować błędy replikacji genów. Inne mechanizmy związane z metabolizmem etano-

Correspondence to/Adres do korespondencji: Wanda Dyr, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Zakład Farmakologii i Fizjologii Ośrodkowego Układu Nerwowego, ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa, phone: 48 22 4582 728, e-mail: wdyr@ipin.edu.pl

Authors' contribution/Wkład pracy autorów:

No ghostwriting declared./Nie występuje zjawisko *ghostwriting*.

Submitted/Otrzymano: 24.10.2017 • **Accepted/**Przyjęto do druku: 11.01.2018

species (ROS) resulting from induction of cytochrome P4502E1. Reactive oxygen species can directly affect DNA or by lipid oxidation resulting in breaks in the DNA chain.

Both the formation and metabolism of acetaldehyde is modified by ADH and ALDH. Alcohol dehydrogenase activity is significantly higher in tumour tissues than in healthy tissues and is disproportionately higher in relation to ALDH activity. Such enzyme activity may indicate faster alcohol oxidation and significantly reduced removal of acetaldehyde in the case of cancer. As a result of the diminished acetic aldehyde reduction, its concentration may increase in the tumour tissue and thus may potentiate its carcinogenic effect.

Keywords: Ethanol, Alcohol dehydrogenase (ADH), Aldehyde dehydrogenase (ALDH), Cancer

lu wiążą się z reaktywnymi formami tlenu powstającymi na skutek indukcji cytochromu P4502E1. Reaktywne formy tlenu mogą wpływać bezpośrednio na DNA lub przez utlenianie lipidów powodować powstawanie przerw w łańcuchu DNA.

Zarówno tworzenie, jak i metabolizowanie aldehydu octowego jest modyfikowane przez ADH i ALDH. Aktywność dehydrogenazy alkoholowej jest znacząco wyższa w tkankach nowotworowych niż w tkankach zdrowych i nieproporcjonalnie wyższa w stosunku do aktywności ALDH. Taka aktywność enzymów może wskazywać na szybsze utlenianie alkoholu i znacząco mniejsze usuwanie aldehydu octowego w przypadku nowotworu. Na skutek zanizonej redukcji aldehydu octowego jego stężenie może ulec zwiększeniu w tkance nowotworowej, a tym samym może nasilić się jego działanie karcinogenne.

Słowa kluczowe: alkohol etylowy, dehydrogenaza alkoholowa (ADH), dehydrogenaza aldehydowa (ALDH), nowotwór

■ INTRODUCTION

The main metabolic pathway for the elimination of ethanol in rats takes place in the liver as a two-stage process. The first factor limiting the speed of elimination is the oxidation of ethanol by alcohol dehydrogenase (ADH), located mainly in cytosol, into the very toxic acetaldehyde. In normal conditions, aldehyde is immediately converted into acetate by aldehyde dehydrogenase (ALDH).

In mammals, liver ALDH exists in the form of several isoenzymes, which differ in terms of subcellular location, electrophoretic migration, kinetic properties, particle size and substrate specificity. Isoenzymes are normally distinguished in terms of high K_m and low K_m (K_m is the Michaelis-Menten constant; that is the substrate concentration at which the speed of enzyme reaction is equal to half the maximum speed of that reaction). This constant expressed in moles per dm^3 defines affinity of enzyme to substrate so the lower it is the higher the affinity, while the higher constant value expresses the small enzyme affinity to the substrate. It is understood that among people and rats mitochondrial low K_m ALDH (ALDH2) is the most important acetaldehyde oxidant.

■ WPROWADZENIE

Główny szlak metaboliczny eliminacji etanolu u szczurów występuje w wątrobie jako dwuetapowy proces. Pierwszym krokiem ograniczającym szybkość eliminacji jest utlenianie etanolu przez dehydrogenazę alkoholową (ADH – *alcohol dehydrogenase*), zlokalizowaną głównie w cytozolu, do bardzo toksycznego aldehydu octowego. W normalnych warunkach aldehyd jest natychmiast przekształcany do octanu przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH – *aldehyde dehydrogenase*).

U ssaków wątrobowa ALDH istnieje w postaci kilku izoenzymów, które różnią się subkomórkową lokalizacją, mobilnością elektroforetyczną, właściwościami kinetycznymi, rozmiarem cząsteczki i specyficnością substratową. Izoenzymy dzieli się zwykle na wysokie K_m i niskie K_m (K_m oznacza stałą Michaelisa-Menten, czyli takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej równa się połowie szybkości maksymalnej tej reakcji). Stała ta wyrażana w molach na dm^3 określa powinowactwo enzymu do substratu: im jest mniejsza, tym powinowactwo większe, natomiast duża wartość tej stałej mówi o małym powinowactwie enzymu do substratu. Uważa się, że u ludzi i szczurów mitochondrialne niskie K_m ALDH (ALDH2) jest najważniejszym enzymem utleniającym aldehyd octowy.

Studies on rodents with genetic predisposition to ethanol drinking indicate a correlation between spontaneous alcohol consumption and its increased metabolism [1]. An increase in ADH activity was found in C57BL6 alcohol preferring mice in comparison to DBA mice that did not prefer alcohol [2, 3]. In Fawn-Hooded (FH alcohol preferring) rats compared to Wistar-Kyoto (WKY non-alcohol preferring) rats, there was an increase in ADH activity by 61% [4]. The increased ADH activity in FH rats indicates a genetic adaptation to drinking alcohol. Alcohol preferring rats AA (Alco, Alcohol) and non-alcohol preferring rats ANA (Alco, Non-Alcohol) reveal differences in acetaldehyde metabolism: the concentration of acetaldehyde in the blood during ethanol metabolism is clearly higher in ANA rats than AA [5, 6]. The reason for this difference is unknown. Studies indicate that the changed ALDH activity may be linked to the avoidance of ethanol [7].

Chronic alcohol drinking presents a very serious risk factor for the development of cancer of the upper gastrointestinal tract (oral cavity and oesophagus) as well as the liver, pancreas and colon. Epidemiological studies indicate a correlation between consumed alcohol and the occurrence of cancer in these organs [8, 9]. It is believed that the acetaldehyde rather than the alcohol is carcinogenic. Acetaldehyde is formed as a result of the alcohol metabolism. It interferes with DNA synthesis in many places, disrupts the DNA repair capacity and bonding with cellular proteins disturbs cell functioning. Acetaldehyde may generate errors in gene replication [11] through the formation of stable adducts.

Other mechanisms related to ethanol metabolism may also influence the carcinogenic effects of alcohol. One of these is the reactive oxygen species (ROS) arising from cytochrome P4502E1 induction [12]. ROS may directly affect DNA or by lipid oxidation causing breaks in the DNA chain. The creation of reactive oxygen species takes place during inflammation processes being the etiologic factor in many types of human cancer [13].

Acetaldehyde would seem to be a significant alcohol related carcinogenic factor. The amount of active acetaldehyde following alcohol consumption may therefore have a great carcinogenic impact. Acetaldehyde concentration depends on

Rezultaty badań gryzoni o genetycznej predyspozycji do picia etanolu wskazują na korelację między spontanicznym pićm alkoholu a jego zwiększonym metabolizmem [1]. Wykazano wzrost aktywności ADH u myszy C57BL6 preferujących alkohol w porównaniu z myszami DBA niepreferującymi alkoholu [2, 3]. U szczurów Fawn-Hooded (FH preferujących alkohol) w porównaniu ze szczurami Wistar-Kyoto (WKY niepreferującymi alkoholu) wykazano wzrost aktywności ADH (o 61%) [4]. Nasiloną czynność ADH u szczurów FH wskazuje na genetyczną adaptację do picia alkoholu. Preferujące alkohol szczury AA (Alco, Alcohol) i niepreferujące ANA (Alco, Non-Alcohol) wykazują różnice w metabolizmie aldehydu octowego: stężenie aldehydu octowego we krwi podczas metabolizmu etanolu jest wyraźnie wyższe u szczurów ANA niż u szczurów AA [5, 6]. Nieznana jest przyczyna tej różnicy. Badania wskazują, że zmieniona aktywność ALDH może wiązać się z unikaniem etanolu [7].

Przewlekłe picie alkoholu stanowi bardzo poważny czynnik ryzyka rozwoju nowotworu górnego odcinka przewodu pokarmowego (jama ustna, przełyk), jak również wątroby, trzustki, jelita grubego. Badania epidemiologiczne wskazują na korelację między spożywaniem alkoholu a występowaniem nowotworu tych narządów [8, 9]. Uważa się, że to raczej aldehyd octowy niż alkohol jest carcinogeny [10]. Aldehyd powstaje w wyniku przemiany metabolicznej alkoholu. Interferuje w wielu miejscach z syntezą DNA, zaburza zdolności systemów naprawczych DNA i wiążąc się z białkami komórkowymi, powoduje zaburzenia funkcji komórkowej. Aldehyd może generować błędy replikacji genów [11] przez tworzenie stabilnych adduktów.

Inne mechanizmy związane z metabolizmem etanolu również mogą wpływać na rakotwórcze działanie alkoholu. Jednym z nich są reaktywne formy tlenu powstające na skutek indukcji cytochromu P4502E1 [12]. Reaktywne formy tlenu mogą wpływać bezpośrednio na DNA lub poprzez utlenianie lipidów powodują powstawanie przerw w łańcuchu DNA. Tworzenie reaktywnych form tlenu zachodzi podczas procesów zapalnych, będących etiologicznym czynnikiem wielu typów nowotworów u ludzi [13].

Aldehyd octowy wydaje się istotnym czynnikiem rakotwórczym związanym z alkoholem. Ilość aldehydu działającego po spożyciu alkoholu może mieć zatem duże znaczenie carcinogenne. Stężenie aldehydu jest zależne od jego powstawa-

its generation and reduction, which is linked to the functioning of two enzymes, ADH and ALDH. In humans, ADH and ALDH exist in a number of forms that are grouped in classes. Different ADH and ALDH isoenzymes have various catalytic properties. Hence in the case of alcohol consumption the polymorphism of these enzymes may be a risk factor in the development of cancers in a different organs [14, 15].

■ ALCOHOL METABOLISM

Alcohol dehydrogenase

Alcohol dehydrogenase plays the most important role in the biotransformation of ethyl alcohol in the human organism. It catalyses the ethanol oxidation reaction into acetaldehyde in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide. Ethyl alcohol is effectively oxidised by the class I and IV isoenzymes. It is worth noting that ADH II oxidises ethanol only at its high concentrations.

Alcohol dehydrogenase is considered oxidoreductase. In humans, ADH occurs in the form of a number of isoenzymes divided into classes. The division is based on a differing substrate specificity, inhibitor sensitivity and tissue location. ADH I isoenzymes are dimers, which are the simplest oligomers consisting of only twomers (chain elements). Dimers may be gained as a result of reaction of two compounds, of which each only has one function group capable of polymerisation.

Isoenzymes of the ADH I class are composed of the α , β , γ subunits encoded by three separately structured genetic loci ADH1A, ADH1B and ADH1C. The polymorphism of ADH1B and ADH1C was identified through the coding of three β (β_1 , β_2 , β_3) chains and two γ (γ_1 i γ_2) chains [16]. This polymorphism clearly modulates the level of acetaldehyde. ADH1B*2 is 40 times more active than the ADH1B*1 and ADH1C*1 enzymes, and 2.5 times stronger than ADH1C*2. Alcohol dehydrogenase is verified in many organs, but it mainly takes place in the liver (up to 95% of total activity). Class I isoenzymes exist also in the gastrointestinal tract, kidneys and lungs.

ADH II is a homodimeric of isoenzymes $\pi\pi$, encoded by the ADH2 locus and occurs only in the liver [17]. Homodimers are proteins the quaternary structure of which is formed by two identical

nia i redukcji, co wiąże się z czynnością dwóch enzymów – dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). U ludzi ADH i ALDH istnieje w kilku formach, które są pogrupowane w klasy. Różne izoenzymy ADH i ALDH mają odmienne właściwości katalityczne. Stąd też polimorfizm tych enzymów w przypadku konsumpcji alkoholu może być czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworu różnych organów [14, 15].

■ METABOLIZM ALKOHOLU

Dehydrogenaza alkoholowa

Dehydrogenaza alkoholowa odgrywa najważniejszą rolę w biotransformacji alkoholu etylowego w organizmie człowieka. Katalizuje ona reakcję utlenienia etanolu do aldehydu octowego w obecności dinukleotydu nikotynamidoadeninowego. Alkohol etylowy jest skutecznie utleniany przez izoenzymy klasy I i IV. Warto zwrócić uwagę, że ADH II utlenia etanol dopiero przy jego wysokich stężeniach.

Dehydrogenaza alkoholowa zaliczana jest do oksydoreduktaz. U ludzi ADH występuje w postaci kilkunastu izoenzymów podzielonych na klasy. Podział opiera się na odmiennej specyficy substratowej, wrażliwości na inhibitory, lokalizacji tkankowej. Isoenzymy klasy ADH I są dimerami. Dimery to najprostsze oligomery składające się tylko z dwóch merów (elementów łańcucha). Dimery można otrzymać w wyniku reakcji dwóch związków, z których każdy ma tylko jedną grupę funkcyjną zdolną do polimeryzacji.

Isoenzymy klasy ADH I składają się z podjednostek α , β , γ , oznaczonych przez trzy oddzielne strukturalnie loci genowe ADH1A, ADH1B, ADH1C. Stwierdzono polimorfizm ADH1B i ADH1C przez kodowanie trzech łańcuchów β (β_1 , β_2 , β_3) i dwóch łańcuchów γ (γ_1 i γ_2) [16]. Ten polimorfizm w wyraźny sposób moduluje poziom aldehydu octowego. ADH1B*2 jest 40 razy bardziej aktywny niż enzym ADH1B*1 i ADH1C*1, a 2,5 razy silniejszy niż ADH1C*2. Obecność dehydrogenazy alkoholowej stwierdza się w wielu narządach, ale głównie w wątrobie (aż do 95% całkowitej aktywności). Isoenzymy I klasy istnieją również w przewodzie pokarmowym, nerkach i płucach.

Isoenzym klasy ADH II jest homodimerem podjednostek polipeptydowych typu π , kodowanym przez locus ADH2 i występuje tylko w wątrobie [17]. Homodimery są to białka, których strukturę czwar-

polypeptides. The isoenzyme of the ADH III class includes subunits $\alpha\alpha$ coded by the ADH3 locus and is found in all the studied tissues. The ADH IV isoenzyme is composed of the subunits $\delta\delta$ (or $\mu\mu$) coded by the ADH 4 locus. This is found mainly in the stomach and oesophagus, while it does occur in smaller amounts in other tissues like the liver, skin and cornea. The higher classes of mammalian alcohol dehydrogenase like ADH V and ADH VI are less well known. The class V isoenzyme was found in the stomach epithelium and is made up of the homodimer coded by the ADH 5 locus. The class VI isoenzyme is basically expressed in the liver and in minimal amounts in the kidneys of rats.

Alcohol dehydrogenase plays a basic role in the metabolism of many biologically important substances as it catalyses the oxidation or reduction of a wide spectrum of substrate specificity. The best characterised functions of ADH are protection against excess of endogenous alcohols, products of lipid peroxidation and some exogenous xenobiotics [18]. It has also been noted that ADH metabolises bioamines and prostaglandins. Because ADH reveals a high substrate specificity, it may catalyse the oxidation of retinol, which is also an alcohol. Retinol plays a significant role in the growth and differentiation of cells.

Aldehyde dehydrogenase

Aldehyde dehydrogenases are a group of enzymes catalysing the oxidation of more than 90% of acetaldehyde products arising in the conversion of ethanol into acetic acid in the reaction associated with NAD⁺ reduction. On the basis of physicochemical properties, cell location and tissue distribution, many different types of aldehyde dehydrogenase become apparent [19].

Isoenzymes ALDH I and ALDH II belong to the *low* K_m (3-50 $\mu\text{mol/l}$) group while ALDH III and ALDH IV to the *high* K_m (5-83 $\mu\text{mol/l}$) [20]. The class I and II isoenzymes have a fundamental importance in the metabolism of acetaldehyde. ALDH I is a cytosolic enzyme widespread in liver, stomach and brain tissue. This class has a tetrameric structure with 54 kDa subunits encoded by the ALDH-1 gene found in chromosome 9. The tetramer is a quaternary protein with four (tetrameric) subunits.

ALDH II is present in the mitochondrial matrix of various tissues, with its greatest presence

torzędową tworzą dwa identyczne polipeptydy. Izoenzym klasy ADH III zawiera podjednostki $\alpha\alpha$ kodowane przez locus ADH3 i znajduje się we wszystkich badanych tkankach. Izoenzym klasy ADH IV składa się z podjednostek $\delta\delta$ (lub $\mu\mu$) kodowanych przez locus ADH 4. Znajduje się głównie w żołądku i przełyku, natomiast w mniejszych ilościach występuje w innych tkankach, takich jak wątroba, skóra, rogówka. Wyższe klasy dehydrogenazy alkoholowej ssaków, ADH V i ADH VI są słabo poznane. Izoenzym V klasy został zidentyfikowany w nabłonku żołądka i składa się z homodimeru kodowanego przez locus ADH 5. Izoenzym VI klasy jest zasadniczo wyrażony w wątrobie i w minimalnych ilościach w nerkach szczurów.

Dehydrogenaza alkoholowa odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie wielu substancji mających ważne znaczenie biologiczne, katalizuje utlenianie lub redukcję szerokiego spektrum specyficzności substratów. Najlepiej określonymi funkcjami ADH jest ochrona przed nadmiarem endogennych alkoholi, produktami peroksydacji lipidowej i przed egzogennymi ksenobiotykami [18]. Stwierdzono również, że ADH metabolizuje bioaminy i prostaglandyny. Ponieważ ADH wykazuje dużą swoistość substratową, może katalizować utlenianie retinolu, który również jest alkoholem. Retinol odgrywa istotną rolę we wzroście i różnicowaniu komórek.

Dehydrogenaza aldehydowa

Dehydrogenazy aldehydowe są grupą enzymów katalizujących utlenianie więcej niż 90% produktów aldehydu octowego powstałych z przekształcenia etanolu do kwasu octowego w reakcji związanej z redukcją NAD⁺. Na podstawie właściwości fizykochemicznych, lokalizacji komórkowej, dystrybucji tkankowej wyróżnia się wiele różnych typów dehydrogenazy aldehydowej [19].

Izoenzymy ALDH I i ALDH II należą do grupy *low* K_m (3-50 $\mu\text{mol/l}$), podczas gdy ALDH III i ALDH IV do grupy *high* K_m (5-83 $\mu\text{mol/l}$) [20]. Izoenzymy I i II klasy mają zasadnicze znaczenie w metabolizmie aldehydu octowego. ALDH I jest enzymem cytozolemowym, wszechobecnym w tkankach wątroby, żołądka, mózgu. Ma budowę tetramery z podjednostką 54 kDa kodowaną przez gen *ALDH-1*, który istnieje w chromosomie 9. Tetramer jest białkiem o czwartorzędowej strukturze czterech podjednostek (tetramerycznych).

ALDH II istnieje w macierzy mitochondrialnej w różnych tkankach, największą jego ilość stwier-

detected in the liver. It is made up of tetrameric enzymes with 5kDa subunits coded by the *ALDH-2* genes found in chromosome 12 that has two alleles, *ALDH2*1* and *ALDH2*2*. There is a high correlation between alcohol consumption and an insufficiency of ALDH II.

Goedde et al. [21] were the first who demonstrate the lack of liver ALDH2 activity in around 50% of Japanese and Chinese. This ALDH under-activity has been shown to be a consequence of structural mutation leading to the enzymatic synthesis of inactive protein. Glutamic acid in position 487 has been replaced by lisyne. Today we know that this mutation causes increased sensitivity to alcohol and as a result the consumption of alcohol is moderate in people of the Asiatic population. People with a lack of ALDH2 consume less alcohol than those with normal ALDH isoenzyme.

In persons with gene *ALDH2*2*, adverse symptoms may occur following alcohol consumption like tachycardia, reddening of the face and headaches. Accumulation of acetaldehyde in the blood is probably the direct cause of these symptoms. Experiencing reactions of this kind naturally contributes to the avoidance of drinking alcohol. Mitochondrial liver ALDH II is responsible for more than 65% of acetaldehyde metabolism while the cytosol form (ALDH I) catalyses 20% of acetaldehyde [22].

■ THE ROLE OF ADH AND ALDH IN TUMOUR FORMATION

The loss of control mechanisms, the disorders of cell differentiation and their uncontrolled proliferation is a serious cause of the change of healthy cells into tumours that have a totally different metabolism to the healthy. The resulting difference between ADH and ALDH activity in healthy tissue and in cancer cells is a serious factor in the growing risk of tumour formation. The direct correlation mechanism between alcohol abuse and the development of hepatocyte cancer is still little understood. It has been demonstrated that following alcohol consumption, ADH activity in cancer liver cells increases 26% compared with healthy hepatocytes. Research results show significantly higher total ADH and ALDH activity in case of liver tumour. This suggests that cancer cells

dzono w wątrobie. Składa się z tetramerycznych enzymów z podjednostkami 5kDa kodowanymi przez geny *ALDH-2* znajdujące się w chromosomie 12, które mają dwa allele, *ALDH2*1* i *ALDH2*2*. Występuje wysoka korelacja między konsumpcją alkoholu a niedoborem ALDH II.

Goedde i wsp. [21] jako pierwsi wykazali, że u około 50% Japończyków i Chińczyków brak jest aktywności wątrobowej ALDH2. Ten niedobór aktywności ALDH okazał się konsekwencją mutacji strukturalnych, prowadzących do syntezy enzymatycznie nieaktywnego białka. Kwas glutaminowy w pozycji 487 został zastąpiony lizyną. Dzisiaj wiadomo, że ta mutacja powoduje zwiększoną wrażliwość na alkohol, a konsekwencją tego jest spożywanie umiarkowanych ilości alkoholu przez ludzi z populacji azjatyckiej. Osoby z niedoborem ALDH2 spożywają mniej alkoholu niż osoby z normalnym izoenzymem ALDH.

U osób mających gen *ALDH2*2*, po spożyciu alkoholu mogą wystąpić niekorzystne objawy, takie jak przyspieszona czynność serca, zaczerwienienie twarzy, ból głowy. Akumulacja aldehydu octowego we krwi jest prawdopodobnie bezpośrednim powodem tych objawów. Doznawanie takich reakcji w naturalny sposób przyczynia się do unikania picia alkoholu. Mitochondrialna ALDH II wątrobowa jest odpowiedzialna za więcej niż 65% metabolizmu aldehydu octowego, podczas gdy postać cytozolowa (ALDH I) katalizuje 20% aldehydu octowego [22].

■ ROLA ADH I ALDH W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW

Utrata mechanizmów kontrolnych, zaburzenie różnicowania komórek i ich niepohamowany wzrost stanowią poważną przyczynę zmiany zdrowych komórek w nowotworowe, które mają całkiem inny metabolizm niż zdrowe. Powstające różnice między aktywnością ADH i ALDH w zdrowych tkankach i w komórkach nowotworowych są poważnym czynnikiem nasilającym ryzyko powstania nowotworu. Ciągłe jest mało poznany bezpośredni mechanizm korelacji między nadużywaniem alkoholu a rozwojem nowotworu hepatocytów. Wykazano, że po spożyciu alkoholu aktywność ADH w komórkach nowotworowych wątroby zwiększa się o 26% w porównaniu ze zdrowymi hepatocytami. Wyniki badań wskazują na znacząco wyższą, całkowitą aktywność ADH i ALDH w przypadku nowotworu wątroby. To nasuwa przypuszczenie,

much more strongly oxidise exogenous ethanol and have a greater capacity to eliminate acetaldehyde than healthy hepatocytes.

The activity of ALDH is significantly lower with respect to ADH activity in tumour tissue. The increased activity of ADH I in cancer liver cells may multiply carcinogenesis in the liver through the increased level of acetaldehyde from ethanol [23]. Research has shown that in the blood of patients with liver cancer, the activity of ADH I isoenzyme is increased. This increase in activity seems to be caused by the production of the enzyme in the cancer liver cells [24].

Large intestine cancer cells are characterised by intensified ADH and ALDH activity. ADH activity is higher by around 30% in tumour tissue than in that of healthy individuals and in the case of ALDH it is lower by around 25% in tumours. The ALDH activity seems disproportionately low compared to ADH activity at 1:20.5 in cancer cells and only 1:10 in their healthy counterparts. This clinical picture suggests that cancer cells have a greater capacity to oxidise ethanol and a lower capacity to remove acetaldehyde. This leads to an accumulation of acetaldehyde in the large intestine mucous membrane and contributes to the development of large intestine alcohol related tumour [25]. ADH activity in the tumour tissue of drinking persons does not differ to that in non-drinking persons. This may suggest that a rise in ADH activity in large intestine tumour tissue is carcinogenic. In the case of large intestine tumours, type I ADH isoenzyme levels are raised in the blood of patients due to its secretion from cancer cells in the large intestines [26].

In the case of tumours of the gastrointestinal tract, ADH activity is significantly higher than in healthy tissue while that of ALDH does not differ. Also important is that ADH activity is significantly stronger than that of ALDH. Among the ADH isoenzymes, the greatest activity has been demonstrated in class IV, and this is significantly higher in stomach cancer than in that of healthy stomach tissue. Similarly with cancer of the oesophagus there is relatively more ADH and less ALDH than in healthy mucous membranes, which suggests the oxidation of ethanol is very great but that of acetaldehyde is small. Research data suggests that ADH class IV isoenzymes play a fundamental role in acetaldehyde production due to their

że komórki nowotworowe znacznie silniej utleniają egzogeny etanol i mają większą zdolność do eliminowania aldehydu octowego niż zdrowe hepatocyty.

W odniesieniu do aktywności ADH w tkance nowotworowej, aktywność ALDH jest znacznie niższa. Zwiększona aktywność ADH I w komórkach nowotworowych wątroby może potęgować karcynogenezę w wątrobie przez zawyżony poziom aldehydu octowego z etanolu [23]. Badania wykazały, że we krwi pacjentów z nowotworem wątroby aktywność izoenzymu ADH I jest podwyższona. Ten wzrost aktywności wydaje się spowodowany wydzielaniem enzymu z komórek nowotworowych wątroby [24].

Komórki nowotworu jelita grubego cechuje wzmożona aktywność ADH i ALDH. Aktywność ADH jest wyższa o około 30% w tkance nowotworowej niż w tkance osobników zdrowych, a w przypadku ALDH – niższa o około 25% w chorobie nowotworowej. Czynność ALDH wydaje się nieproporcjonalnie niska w stosunku do czynności ADH i wynosi 1:20,5 w komórkach nowotworowych i tylko 1:10 w prawidłowych. Taki obraz kliniczny nasuwa przypuszczenie, że komórki nowotworowe mają większą zdolność utleniania etanolu i mniejszą usuwania aldehydu octowego. To prowadzi do akumulacji aldehydu octowego w błonie śluzowej jelita grubego i przyczynia się do rozwoju nowotworu jelita grubego związanego z alkoholem [25]. Aktywność ADH w tkance nowotworowej osób pijących nie różni się od jej aktywności w tkance nowotworowej osobników niepijących. To może sugerować, że wzrost aktywności ADH w tkance nowotworowej jelita grubego jest rakotwórczy. W przypadku nowotworu jelita grubego izoenzym ADH typu I jest podwyższony we krwi pacjentów na skutek jego wydzielania z komórek nowotworowych jelita grubego [26].

Przy nowotworach przewodu pokarmowego czynność ADH jest znacząco wyższa niż w zdrowej tkance, natomiast aktywność ALDH nie różni się. Również ważne jest to, że działanie ADH jest znacznie silniejsze niż działanie ALDH. Spośród izoenzymów ADH najwyższą aktywność wykazano w IV klasie i jest ona znacząco wyższa w nowotworze żołądka niż w tkance zdrowej żołądka. Podobnie w nowotworze przełyku jest relatywnie więcej ADH i mniej ALDH niż w zdrowej błonie śluzowej, co sugeruje, że utlenianie etanolu jest bardzo duże, ale utlenianie aldehydu octowego małe. Dane badawcze wskazują, że izoenzymy IV klasy ADH – ze względu na ich właściwości

kinetic properties and location in the external part of the stomach or on the oesophageal mucous membrane. A rise of this class isoenzyme activity in tumour cells leads to an increase in the capacity to produce acetaldehyde from exogenous ethanol.

The rise in alcohol dehydrogenase and class IV isoenzyme activity in blood plasma in patients with stomach and oesophageal cancer may be an effect of the secretion of that enzyme from cancer cells [27, 28].

■ OTHER RISK-FACTORS OF CANCER ASSOCIATED WITH ALCOHOL ABUSE

Various parameters associated with alcohol abuse may affect the development of cancer, e.g. the reduction of vitamin A and E and iron levels or the adopted eating habits. The occurrence of breast cancer may be treated as a consequence of alcohol drinking. However, the results of epidemiological studies are rather inconsistent and the occurrence of an ambiguity of relations may indicate the existence of a factor responsible for the link between alcohol and breast cancer [29]. Eating habits are considered one such element. Closer attention to this issue indicates that despite the doubts, there is a link between alcohol consumption and breast cancer [30-32]. The results of certain studies suggest that alcohol probably plays an intermediary role in the development of this cancer due to causing a rise in oestrogen concentration in women prior to menopause, which may be a mechanism stimulating the occurrence of breast cancers [33].

As demonstrated in studies conducted on rats (34), alcohol exacerbates the action of tobacco, stimulating the formation of tumours. People who both drink and smoke are 35 times more likely to develop cancer of the oral cavity, trachea or oesophagus than those who do not [35]. This may suggest the interaction of alcohol and carcinogenic factors linked to tobacco smoking may additionally favour the occurrence of cancer [34].

The carcinogenic mechanism of alcohol action may result from its effect on specific enzymes. In normal conditions certain enzymes help to deactivate substances entering the organism but may also increase the toxic influence of certain carcino-

kinetyczne i lokalizację w zewnętrznej części żołądka lub w błonach śluzowych przełyku – odgrywają zasadniczą rolę w wytwarzaniu aldehydu octowego. Wzrost aktywności tej klasy izoenzymu w komórkach nowotworowych prowadzi do zwiększonej zdolności wytwarzania aldehydu octowego z etanolu pochodzenia egzogenego.

Wzrost aktywności dehydrogenazy alkoholowej i IV klasy izoenzymu w surowicy krwi pacjentów z nowotworem żołądka i przełyku może być efektem wydzielania tego enzymu z komórek nowotworowych [27, 28].

■ INNE CZYNNIKI RYZYKA CHOROBY NOWOTWOROWYCH ZWIĄZANE Z NADUŻYWANIEM ALKOHOLU

Na rozwój choroby nowotworowej mogą wpływać różne parametry związane z nadużywaniem alkoholu, np. zmniejszenie poziomu witamin A, E, żelaza czy sposób odżywiania. Występowanie nowotworu sutka można by traktować jako konsekwencję picia alkoholu. Wyniki badań epidemiologicznych są jednak dość niespójne i występująca niejednoznaczność powiązań może wskazywać na istnienie czynnika odpowiedzialnego za związek między alkoholem a nowotworem sutka [29]. Jak się uważa, takim elementem mógłby być sposób odżywiania się. Bliższe zapoznanie się z tym problemem wskazuje, że mimo wątpliwości istnieje związek między konsumpcją alkoholu a nowotworem sutka [30-32]. Wyniki niektórych badań sugerują, że alkohol prawdopodobnie odgrywa pośrednią rolę w rozwoju tego nowotworu przez powodowanie wzrostu stężenia estrogenów u kobiet przed menopauzą, co może być mechanizmem stymulującym powstawanie nowotworu piersi [33].

Jak wykazano w badaniach przeprowadzonych na szczurach [34] alkohol potęguje działanie tytoniu pobudzające tworzenie się guzów nowotworowych. U ludzi, którzy zarówno piją, jak i palą, ryzyko nowotworu jamy ustnej, tchawicy czy przełyku jest 35 razy większe niż u osób, które ani nie piją, ani nie palą [35]. To może sugerować, że wzajemne oddziaływanie alkoholu i czynników rakotwórczych, związanych z paleniem tytoniu, może dodatkowo sprzyjać powstawaniu nowotworów [34].

Rakotwórczy mechanizm działania alkoholu może również wynikać z jego oddziaływania na określone enzymy. W normalnych warunkach pewne enzymy pomagają unieczynnić substancje wnika-

gens. An example of this is the enzyme cytochrome P-450 [36, 37]. Consumed alcohol activates cytochrome P-450 in the liver, lungs, oesophagus and intestines [34, 37], in organs where alcohol-related tumours arise.

Long-term alcohol consumption is linked to disrupted digestion of food and absorption of various substances from the gastrointestinal tract. A reduction in the concentration of iron, zinc, vitamin E and certain vitamins of the B group has been demonstrated under experimental conditions. This relation has been observed in persons dependent on alcohol and is accompanied by certain cancers [34]. Vitamin A is supposed to counter cancer formation, however, its level is very reduced in the liver and oesophagus of rats in the course of long-term alcohol consumption [39, 40].

Study results show that a diet containing large amounts of fresh vegetables and fruits, rich in folic acid and group B vitamins reduces the risk of colon cancer. Alcohol consumption counters the protective action of diet and even increases the risk as a result of the reduction of folic acid [41]. Even small amounts of alcohol (e.g. two drinks a day) reduce to zero the beneficial influence of a correct diet reducing the risk of colon cancer.

It has been estimated that 2-4% of all cases of cancer are directly or indirectly caused by alcohol. The regular drinking of alcohol increases the risk of cancer of the oral cavity, throat, oesophagus, larynx, liver and breasts in women. Cigarette smoking amplifies the activity of alcohol. Research shows that cut-off drinking alcohol and smoking would limit the number of oral cavity cancer cases by at least 83%. By just reducing the amount of consumed alcohol, we can prevent 42% of oral cavity, throat and oesophagus cancer, 34% of larynx cancer and 21% of liver cancer [42].

■ SUMMARY

The main elimination of ethanol takes place in the liver. Alcohol dehydrogenase (ADH), located mainly in cytosol, oxidises alcohol into the very toxic acetaldehyde, which is deactivated by aldehyde dehydrogenase (ALDH).

Chronic alcohol drinking is a very serious risk factor in the development of cancer of the upper

part of the body, but they can also increase the toxic effect of some carcinogens. An example is the enzyme – cytochrome P-450 [36, 37]. Consumed alcohol activates cytochrome P-450 in the liver, lungs, oesophagus and intestines [34, 38], in organs where tumours arise related to alcohol.

Excessive alcohol consumption is linked to disrupted digestion of food and absorption of various substances from the gastrointestinal tract. A reduction in the concentration of iron, zinc, vitamin E, and certain vitamins of the B group has been demonstrated under experimental conditions. This relation has been observed in persons dependent on alcohol and is accompanied by certain cancers [34]. Vitamin A is supposed to counter cancer formation, however, its level is very reduced in the liver and oesophagus of rats in the course of long-term alcohol consumption [39, 40].

Study results show that a diet containing large amounts of fresh vegetables and fruits, rich in folic acid and group B vitamins reduces the risk of colon cancer. Alcohol consumption counters the protective action of diet and even increases the risk as a result of the reduction of folic acid [41]. Even small amounts of alcohol (e.g. two drinks a day) reduce to zero the beneficial influence of a correct diet reducing the risk of colon cancer.

It has been estimated that 2-4% of all cases of cancer are directly or indirectly caused by alcohol. The regular drinking of alcohol increases the risk of cancer of the oral cavity, throat, oesophagus, larynx, liver and breasts in women. Cigarette smoking amplifies the activity of alcohol. Research shows that cut-off drinking alcohol and smoking would limit the number of oral cavity cancer cases by at least 83%. By just reducing the amount of consumed alcohol, we can prevent 42% of oral cavity, throat and oesophagus cancer, 34% of larynx cancer and 21% of liver cancer [42].

■ PODSUMOWANIE

Zasadnicza eliminacja etanolu zachodzi w wątrobie. Dehydrogenaza alkoholowa (ADH), zlokalizowana głównie w cytozolu, utlenia alkohol do bardzo toksycznego aldehydu octowego, który jest dezaktywowany przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH).

Przewlekłe picie alkoholu jest bardzo poważnym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworu gór-

gastrointestinal tract (oral cavity and oesophagus) as well as the liver, pancreas and large intestine. It is accepted that acetaldehyde is carcinogenic more than alcohol. Aldehyd interferes with the synthesis of DNA in many places generates errors of gene replication causing the cellular dysfunction. The amount of acetaldehyde created as the result of consumed alcohol may have a great influence on cancer formation. The concentration of acetaldehyde is linked to ADH and ALDH activity. The polymorphism of these enzymes in the case of alcohol consumption may be a risk factor in the development of cancer in a variety of organs. Following alcohol consumption, ADH activity increases by 26% in liver tumour cells compared to healthy hepatocytes. Increased ADH I activity in cancer liver cells may enhance carcinogenesis as a result of the higher level of acetaldehyde arising from ethanol. There has been shown to be a reduction of around 25% in the ALDH activity in cancer cases. This suggests that cancer cells have a greater capacity to oxidise ethanol and a lower capacity to remove acetaldehyde.

Study results indicate unequivocally that alcohol abstinence may cause a reduction in various forms of cancer incidence, especially those in the area of the gastrointestinal tract.

nego odcinka przewodu pokarmowego (jama ustna, przełyk), jak również wątroby, trzustki, jelita grubego. Sądzi się, że to raczej aldehyd octowy niż alkohol jest karcynogeny. Aldehyd, interferując w wielu miejscach z syntezą DNA, generuje błędy replikacji genów, powoduje zaburzenie funkcji komórkowej. Ilość aldehydu octowego powstałego w wyniku spożytego alkoholu może mieć duży wpływ na tworzenie się nowotworów. Stężenie aldehydu octowego jest związane z czynnością ADH i ALDH. Polimorfizm tych enzymów w przypadku konsumpcji alkoholu może być czynnikiem ryzyka dla rozwoju nowotworu różnych organów. Po spożyciu alkoholu, aktywność ADH zwiększa się o 26% w komórkach nowotworowych wątroby w porównaniu ze zdrowymi hepatocytami. Nasiloną czynność ADH I w komórkach nowotworowych wątroby może potęgować karcynogenezę w wyniku zawyżonego poziomu aldehydu octowego powstałego z etanolu. W przypadku ALDH wykazano obniżoną aktywność o około 25% w chorobie nowotworowej. To nasuwa przypuszczenie, że komórki nowotworowe mają większą zdolność utleniania etanolu i mniejszą zdolność usuwania aldehydu octowego.

Wyniki badań w sposób jednoznaczny wskazują, że utrzymywanie abstynencji alkoholowej może spowodować zmniejszenie zachorowalności na różne nowotwory, szczególnie nowotwory w obrębie przewodu pokarmowego.

Conflict of interest/Konflikt interesów

None declared./Nie występuje.

Financial support/Finansowanie

None declared./Nie zadeklarowano.

Ethics/Etyka

The work described in this article has been carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) on medical research involving human subjects, EU Directive (210/63/EU) on protection of animals used for scientific purposes, Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals and the ethical principles defined in the Farmington Consensus of 1997.

Treści przedstawione w pracy są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej odnoszącymi się do badań z udziałem ludzi, dyrektywami UE dotyczącymi ochrony zwierząt używanych do celów naukowych, ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych oraz z zasadami etycznymi określonymi w Porozumieniu z Farmington w 1997 r.

References/Piśmiennictwo

1. Petrova MA. Serum and liver alcohol dehydrogenase levels in rats differing in alcohol motivation. *Byulleten Esperimentalnoi Biologii i Meditsiny* 1985; 100: 583-84.
2. Sheppard JR, Albersheim P and McClearn GE. Enzyme activities and ethanol preference in mice. *Biochem Gen* 1968; 2: 205-12.
3. Algar E, Holmes RS. Liver cytosolic aldehyde dehydrogenases from “alcohol-drinking” and “alcohol-avoiding” mouse strains: purification and molecular properties. *Int J Biochem* 1986; 18: 49-56.
4. Lodge DJ, Lawrence AJ. Comparative analysis of hepatic ethanol metabolism in Fawn-Hooded and Wistar-Kyoto rats. *Alcohol* 2003; 30: 75-9.
5. Ericsson CJP. Ethanol and acetaldehyde metabolism in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 2283-92.
6. Koivisto T, Carr LG, Li T-K and Eriksson CPJ. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) polymorphism in AA and ANA rat lines: lack of genotype and phenotype line differences. *Pharmacol Biochem Pharmacol* 1993; 24: 215-22.
7. Koivisto T, Eriksson CJP. Hepatic aldehyde and alcohol dehydrogenases in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Biochemical Pharmacol* 1994; 48, 8: 1551-58.
8. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004; 39: 155-65.
9. Seits HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Vakevainen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 137-43.
10. Seitz HK, Strickel F, Homann N. Pathogenic mechanism of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer* 2004; 108: 483-87.
11. Homann N. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. *Addict Biol* 2001; 6: 309-23.
12. Badger TM, Huang J, Ronis M, Lumpki CK. Induction of cytochrome P4502E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP 2E1 gene when blood alcohol concentration are high. *Biochem Biophys Res Com* 1993; 190: 780-5.
13. Issa D, Patel V, Sanyal AJ. Future therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2018; 38: Suppl 1: 56-63.
14. Baraona E, Yokoyama A, Ishii H, Hernández-Muñoz R, Takagi T, Tsuchiya M, et al. Lack of alcohol dehydrogenase isoenzyme activities in the stomach of Japanese subjects. *Life Sci* 1991; 49: 1929-34.
15. Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Yokoyama T, Matsushita S, Higuchi S, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancer in Japanese alcoholics. *Carcinogen* 2001; 22: 433-9.
16. Chen YC, Peng GS, Wang MF, Tsao TP, Yin SJ. Polymorphism of ethanol-metabolism genes and alcoholism: correlation of allelic variations with the pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Chem Biol Interact* 2009; 178: 2-7.
17. Hoog JO, Svensson S. Mammalian class II alcohol dehydrogenase. A highly variable enzyme. *Adv Exp Med Biol* 1997; 414: 303-11.
18. Hoog JO, Hedberg JJ, Stromberg P, Svensson S. Mammalian alcohol dehydrogenases – functional and structural implications. *J Biomed Sci* 2001; 8: 71-6.
19. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur Biochem* 1998; 251: 549-57.
20. Wall TL. Genetic associations of alcohol and aldehyde dehydrogenase with alcohol dependence and their mechanisms of action. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 700-3.
21. Goedde HW, Agarwal DP. Polymorphism of aldehyde dehydrogenase and alcohol sensitivity: a new hypothesis. *Enzyme* 1987; 37: 29-44.
22. Ehrig T, Bosron WF, Li TK. Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 105-16.
23. Jelski W, Zalewski B, Szmitowski M. The activity of class I, II, III and IV of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in liver cancer. *Dig Dis Sci* 2008; 53(9): 2550-5.

24. Jelski W, Zalewski B, Szmitowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with liver cancer. *J Clin Lab Anal* 2008; 22: 204-9.
25. Jelski W, Zalewski B, Chrostek I, Szmitowski M. The activity of class I, II, III and IV of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 977-81.
26. Jelski W, Zalewski B, Chrostek I, Szmitowski M. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the sera of patients colorectal cancer. *Clin Exp Med* 2007; 7: 154-7.
27. Jelski W, Chrostek I, Zalewski B, Szmitowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2008; 53(8): 2101-5.
28. Jelski W, Kozłowski M, Laudański J, Nikliński J, Szmitowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with esophageal cancer. *Dig Dis Sci* 2009; 54(4): 725-30.
29. Longnecker MP. Alcohol consumption in relation to risk of cancers of the breast and large bowel. *Alcohol Health & Res World* 1992; 16(3): 223-9.
30. Friedenreich CM, Howe GR, Miller AB, Jain MG. A cohort study of alcohol consumption and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1993; 137(5): 512-20.
31. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Speizer FE. Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *New Eng J Med* 1987; 316(19): 1174-80.
32. Schatzkin A, Jones DY, Hoover RN, Taylor PR, Brinton LA, Ziegler RG, et al. Alcohol consumption and breast cancer in the Epidemiologic Follow-up Study of the First National Health and Nutrition Examination Survey. *New Eng J Med* 1987; 316(19): 1169-73.
33. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, et al. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85(9): 722-7.
34. Garro AJ, Lieber CS. Alcohol and cancer. *An Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 219-49.
35. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Can Res* 1988; 48(11): 3282-7.
36. Seitz HK, Osswald B. Effect of ethanol on procarcinogen activation. In: Watson RR (ed.). *Alcohol Can. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992; 55-72.*
37. Garro AJ, Espina N, Lieber CS. Alcohol and cancer. *Alcohol Health & Res World* 1992; 16(1): 81-6.
38. Farinati F, Lieber CS, Garro AJ. Effects of chronic ethanol consumption on carcinogen activating and detoxifying systems in rat upper alimentary tract tissue. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1989; 13(3): 357-60.
39. Mobarhan S., Layden TJ, Friedman H, Kunigk A, Donahue P. Depletion of liver and esophageal epithelium vitamin A after chronic moderate ethanol consumption in rats: Inverse relation to zinc nutriture. *Hepatology* 1986; 6(4): 615-21.
40. Ziegler RG. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J Nutri* 1989; 119(1): 116-22.
41. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, et al. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85(11): 875-84.
42. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie; <http://onkologia.org.pl/k/baza-on-line/> [Access: 08.01.2018].