



Euroopa Liit
Euroopa
Regionaalarengu Fond



Eesti
tuleviku heaks

RITA 2 projekti lõpparuanne

Valdkondliku teadus- ja arendustegevuse tugevdamise programmi ehk Riigi Teadus- ja Arendustegevuse toetamine (edaspidi RITA) tegevuse 2 „Teadmispõhise poliitikakujundamise toetamine“ elluviimise raames läbiviidava projekti **“Alkoholist põhjustatud tervisehäirete ja käitumisriskide vähendamine: alkoholi ja alkoholisurrogaatide tarvitamise tagajärjel tekkivate ainevahetusproduktide (metaboliitide) uuring”**.

Uuring seondub Sotsiaalministeeriumi Rahvastiku tervise arengukavas 2009–2020 märgitud „Alkoholi liigtarvitamise ennetamise valdkonna tegevuste ja eesmärkidega“, mis on kokku lepitud Rahvastiku Tervise Arengukava 2009–2020 valdkonna „Tervislik eluviis“ all ja Vabariigi Valitsuse tegevusprogrammiga 2015–2019 Alkoholi- ja tubakakahjude vähendamine.

Projekti kogumaksumus oli 150 000 eurot, millest 75 000 moodustas omafinantseering. Projekti elluviimiseks sõlmisid Justiitsministeerium ja Eesti Kohtuekspertiisi Instituut koostöökokkuleppe NR 7-6/4115.

Projekti kestus oli 1,5 aastat ja projekti tegevuste abikõlblikkuse periood oli 30.01.2017 kuni 29.07.2018.

Projektis osalesid:

Justiitsministeeriumi poolne projekti juht: Anne Kruusement

EKEI poolne projekti koordinaator Marika Väli

Projekti osalised Aime Riikoja, Tarmo Barndök, Mailis Tõnisson ja Marika Väli

Teoreetiline taustainfo

Uuringu teema on seotud alkoholi tarbimise ennetamise ja inimeste turvatunde tõstmisega läbi kohtuekspertiisi valdkonna arendamise. Eestis pole selliseid uuringuid varem tehtud ja ei olnud ka meetodikaid alkoholi metaboliitide määramiseks. Kuigi kasutatav aparatuur, kemikaalid, laboritingimused ja bioloogiline materjal ning proovimaterjali transportimistingimused võivad olla sarnased erinevates riikides, kuid ka juba väikesed erinevused materjalides ja tingimustes nõuavad uut meetodikat. Iga labor peab välja töötama, valideerima ning kohendama oma aparatuurile ja tingimustele vastava määramismetoodika.

Projekti vajalikkus

Alkoholi tarbimise ajahetke täpsema hindamise ja alkoholi tarbimise diagnoosimise kvaliteedi parandamise vajadus tuleneb alkoholijoobes juhtide suurest arvust ja alkoholi tarbimisega seotud tervisehäirete rohkusest.

Praegusel ajal teostatakse Eestis liiklusõnnetuse põhjustanud juhtidel alkoholi kontsentratsiooni tagasiarvutust. Selline meetod ei ole alati piisavalt objektiivne, sest põhineb juhi ja tunnistajate ütlustest tuleneval kaudsel kalkulatsioonil, mitte otsesel tõendusmaterjali mõõtmisel. Uuringud on näidanud, et EtG ja EtS on kasulikud kliinilises meditsiinis (nt välistamaks patsiendil alkoholismi) ja on olulised ka nendel juhtudel, kui tunnistajateta liiklusõnnetuste korral joobes autojuht lahkub sündmuskohalt väites hiljem, et liiklusõnnetuse hetkel oli ta kaine. Alkoholi metaboliitide etüülglükuronidi (EtG), etüülsulfaadi (EtS) ja alkoholi kontsentratsioonide omavaheline suhe võimaldab kindlaks teha alkoholi tarbimise aega ja seega anda täiendavat väärtust alkoholitarbimise hindamisel surmaeelset.

Pärast alkoholi tarbimist viiakse suurem osa alkoholist organismist välja, kuid väike (<1%) osa muudetakse ainevahetuse käigus metaboliitideks, mille teke võtab aega. Sõltuvalt bioloogilisest materjalist võib EtG ja EtS jääda positiivseks mitu päeva pärast etanooli tarbimist ja võib anda täiendavat väärtust alkoholitarbimise hindamisel nt haiglas koomas patsiendil. Uuringud on näidanud, et EtG ja EtS on kasulikud ka postmortaalselt elupuhuselt alkoholi tarbimise hindamiseks, nt on leitud metaboliite juustest üks nädal pärast alkoholi tarvitamist.

Eristamiseks tervisehäire põhjust: haigust (diabeet), alkoholi surrogaatide mürgistust või alkoholi kroonilist tarvitamist, kasutatakse ühe ainevahetuseproduktina β -hüdroksübutüraati ehk β HB. Keto kehad tekivad maksas rasvhapete metabolismi tulemusena. Tervetel inimestel on keto kehade

tootmine ja ärakasutamine tasakaalus. Kui ketokehasid toodetakse rohkem, kui organism neid utiliseerida jõuab, tõuseb nende kontsentratsioon veres, põhjustades ketoneemia. Ketokehad on happelised, nende kõrge kontsentratsioon viib alla vere pH ja tekib ketoatsidoos.

β HB määramine abistab eristamist, kas organismis olev β -hüdrosübutüraat on põhjustatud alkoholist või on see tekkinud diabeedist, mis omakorda aitab kaasa täpsemale ravikäsitlusele. Diabeedi korral tekib ketoatsidoos insuliini puudusest tingitud ketokehade kuhjumisest organismis ning alkohoolse ketoatsidoosi korral tekib organismis metaboolne protsess, mis seisneb selles, et alkoholi oksüdatsioonil alkoholi dehüdrogenaasi toimel tekib rohkem NADH-i, mis tingib β -hüdrosübutüraadi sünteesi. Diabeetilise ketoatsidoosi korral tõuseb β -hüdrosübutüraadi tase tavaliselt >2 mmol/L, alkohoolse ketoatsidoosi korral on see tase madalam.

Diabeetilise ketoatsidoosi korral on kõrgem vere glükoosisisaldus ja madalam β -hüdrosübutüraadi suhe atseetoatsetaati ning laktaadi suhe püruvaati võrreldes alkohoolse ketoatsidoosiga. Silma klaaskehavedelikust ja liikvorist glükoosi, β -hüdrosübutüraadi, Na^+ , K^+ , laktaadi, ja verest glükeeritud hemoglobiini määramine täiendab surmajärgseid uuringuid ja annab teavet surmapõhjuse kindlakstegemiseks. Alkohoolne ketoatsidoos võib tekkida üks päev pärast joomist ja see sõltub toitumisastmest, üldisest tervislikust seisundist ja tarbitud alkoholi kogusest. Alkohoolne ketoatsidoos võib põhjustada elektrolüütide kõrvalekaldeid ja südame arütmiaid. Alkoholi jooja foonil hüpotermia korral on leitud, et ketoosi raskus on pöördvõrdelises sõltuvuses vere alkoholisaldusest.

Lähteülesanne ja uurimiseesmärgid

Alkoholi tarbimise järgselt tekivad organismis alkoholi lagunemisel ainevahetusproduktid (ehk metaboliidid), mis võivad jääda määratavaks veres ca 1,5 päeva ja uriinis mitu päeva pärast alkoholi tarbimist ja seega annavad täiendavat väärtust alkoholitarbimise hindamisel, kui etanool on juba organismist välja viidud.

Uuringu põhieesmärk oli selgitada välja kindla koguse alkoholi tarvitamise järel organismis tekkivate alkoholi ainevahetusproduktide (metaboliitide) tekkimise kiirus ja ulatus aja jooksul.

Selle eesmärgi saavutamiseks püstitati järgmised ülesanded:

- EtG ja EtS määramise meetodika väljatöötamine ja valideerimine.
- EtG ja EtS määramine alkoholijoobes autojuhtidel ning alkoholi tarbimise algusaja kalkulatsioon EtG ja EtS ning etanooli suhtest lähtuvalt.

- EtG ja EtS taset mõjutavate võimalike faktorite, nt tarbitud alkoholi tüüp, eelnev toitumine, autojuhil esinenud haigused, uuring.

Projekti teiseks eesmärgiks oli β -hüdroksübutüraadi määramise metoodika väljatöötamine ja seejärel kasutamine alkoholi ägeda ja kroonilise tarbimise ning diabeediga patsientidel ning surnutel β HB kontsentratsiooni seose leidmine diabeedi või alkoholi mürgistusega. β HB määramine võimaldab määrata kvaliteetsemalt surma põhjust ja aidata seeläbi kaasa õiguslike probleemide lahendamisele.

Lähteülesanded olid:

- β -hüdroksübutüraadi metoodika väljatöötamine ja valideerimine.
- β -hüdroksübutüraadi määramine alkoholi ägeda ja kroonilise tarbimise ning diabeediga patsientidel ja surnutel ning β HB kontsentratsiooni seose uuring diabeedi või alkoholi mürgistusega.
- β HB korrelatsiooni esinemise võrdlus teiste ketoatsidoosi korral esinevate biokeemiliste markeritega (atsetoon, glükoos, glükeeritud hemoglobiin, laktaat).

Tulemused püstitatud eesmärkidest lähtuvalt

2017. aastal toimus proovimaterjali kogumine ja metoodikate väljatöötamiseks kirjandusega tutvumine.

2018. aasta esimesel poolaastal toimus õppereis Karolinska Ülikool Karolinska Haigla Kliinilise Farmakoloogia Instituudi Farmakoloogia laboratooriumi eesmärgiga tutvuda etüülglükuroniidi ja etüülsulfaadi määramise metoodikate ja tulemuste interpreteerimisega.

Samal perioodil jätkus metoodikate väljatöötamine, valideerimine ja analüüside läbiviimine. Lisaks eelnevale toimus andmete töötlus, metoodikate vormistamine ja avalikkuse teavitamine tulemustest.

Metoodikate väljatöötamine

Projekti raames töötati välja ja valideeriti etanooli metaboliitide etüülglukuronidi (EtG) ja etüülsulfaadi (EtS) kvantitatiivse määramise metoodika verest ja uriinist.

Uuritavate proovide ettevalmistamisel kasutati uriini puhul lahjendamist, vere korral valkude sadestamist atsetonitriiliga ja fosfolipiidide eemaldamist Phree (Phenomenex) kolonnide abil.

Analüüs viidi läbi vedelikkromatograaf tandemmassispektromeetriga (LC MS MS, ESI, neg).

Vedelikkromatograafi (Agilent 1260 Infinity) kolonnis (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1×100 mm, 1.8 µm) toimub proovikomponentide, sh uuritavate ainete lahutamine.

Tandemmassispektromeetris (Agilent 6410 Triple Quad LC/MS) toimus uuritavate ainete fragmenteerimine ja tekkinud fragmentide detekteerimine.

Uuritavad ained identifitseeriti analüüdi prekursor- ja produktioonide ning retentsiooniaegade järgi.

Tabel nr 1. Analüütide ja sisestandardite prekursorioonid ja produktioonid.

	Q ₁ , prekursorioon	Q ₃ , produktioon
EtG	221,1	85
		75
		57
EtG-d5	226,1	85
		75
EtS	125	97
		80,1
EtS-d5	130,1	98,1
		79,9

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et uuritavad ained omavad spetsiifilisi prekursorioone ja produktioone ning retentsiooniaegu, mistõttu teised ained uuritavate ainete määramist ei sega.

Kvantitatiivne sisaldus määrati uuritava aine ja sisestandardi piigialuste pindalade suhte abil.

Selleks oli eelnevalt koostatud kalibreerimisgraafik: uuritava aine ja sisestandardi piigialuste pindade suhte sõltuvus uuritava aine kontsentratsioonist. Sisestandardina kasutati deuteriummargistatud EtG-d ja EtS-i. Maatriksefektide elimineerimiseks kasutati kalibreerimisgraafikute koostamisel uuritavaid aineid mittesisaldavat verd ja sünteetilist uriini.

Metoodika määramispiirkond oli: EtG veres 0,2-10 µg/ml, uriinis 2-500 µg/ml, EtS veres 0,1-10 µg/ml, uriinis 1-500 µg/ml. Valideerimiskatsete käigus tõestati, et kalibreerimisgraafikud (EtG veres, EtG uriinis, EtS veres, EtS uriinis) on määramispiirkonnas lineaarsed.

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et ühe analüüsitsükli jooksul saadud tulemused on stabiilsed (korduvus).

Tabel nr 2. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused EtG veres.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1		4,31	0,15	4,3
2		2,07	0,07	3,3
3		5,60	0,2	3,6
4	0,2	0,15	0,015	10
5	5	4,96	0,11	2,3
6	10	9,62	0,44	4,6

Tabel nr 3. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused EtS veres.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1		1,36	0,06	4,1
2		0,89	0,008	0,9
3		1,44	0,02	1,5
4	0,1	0,12	0,004	3,5
5	5	5,13	0,13	2,6
6	10	9,58	0,34	3,6

Tabel nr 4. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused EtG uriinis.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1		32,24	0,67	2,1
2		288,84	6,54	2,3
3	2	2,07	0,14	6,7
4	2	2,17	0,13	5,8

Tabel nr 5. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused EtS uriinis.

Nr	Teoreetiline knts., µg/ml	Keskmine knts., µg/ml	STDEV	CV%
1		29,58	0,74	2,5
2		102,08	3,22	3,2
3	1	1,05	0,037	3,6
4	1	1,06	0,028	2,6

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et meetodika korratavusega on kõik korras st. erinevatel analüüsitüüpidel erineva kalibreeringuga ja kontroll-lahustega saadud tulemused on stabiilsed.

Tabel nr 6. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused EtG veres.

Nr	Teoreetiline knts., µg/ml	Keskmine knts., µg/ml	STDEV	CV%
1		4,09	0,23	5,7
2		2,06	0,10	4,8
3		5,32	0,35	6,6
4	5	4,91	0,41	8,3

Tabel nr 7. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused EtS veres.

Nr	Teoreetiline knts., µg/ml	Keskmine knts., µg/ml	STDEV	CV%
1		1,34	0,04	2,9
2		0,9	0,008	0,9
3		1,41	0,03	2,3
4	5	5,13	0,31	6,0

Tabel nr 8. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused EtG uriinis.

Nr	Teoreetiline knts., µg/ml	Keskmine knts., µg/ml	STDEV	CV%
1		31,85	0,77	2,4
2		291,21	7,6	2,6
3	100	102,47	4,2	4,0

Tabel nr 9. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused EtS uriinis.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1		29,63	0,73	2,5
2		101,27	3,07	3,0
3	100	99,58	5,49	5,5

Korduvuse ja korratavuse katsed viidi läbi nii reaalse proovidega, kui ka isevalmistatud proovidega. Isevalmistatud proovid kujutavad endast verd või uriini, millele on lisatud kindel kogus etalonaineid.

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et antud meetodikaga saadud tulemused on tõesed.

Keskmise tulemuse erinevus teoreetilisest on rahuldav. EtG kontsentratsioon määramispiiril erines teoreetilisest 25%, aga kuna antud juhul ei kontrollitud tõesust vaid süsteemi stabiilsust, siis võib sellega rahule jääda.

Tabel nr 10. Hinnang tõesusele

Maatriks	Analüüt	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	Erinevus %
Veri	EtG	0,2	0,15	-25
		5	4,96	-0,8
		5	4,91	-1,8
		10	9,62	-3,8
	EtS	0,1	0,12	20
		5	5,13	2,6
		10	9,58	-4,2
		5	5,13	2,6
Uriin	EtG	2	2,07	3,5
		2	2,17	8,5
		100	102,47	2,5
	EtS	1	1,05	5
		1	1,06	6
		100	99,58	-0,4

Mõõtemääramatuse arvutamiseks kasutati Nordtest meetodit.

Määramatuse arvutamiseks kasutati valideerimise käigus saadud korduvuse ja korratavuse andmeid.

Laiendmääramatus EtG ja EtS määramisel verest on 20% ja määramisel uriinist 25%.

Metoodika välja töötamisel kasutatud kirjanduse loetelu:

- 1 *Quantitative Determination of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Postmortem Blood Using Hybrid-SPE-PPT and UHPLC-MS/MS* Delvin Zuher Abdullah, Master tesis, Norwegian University of Life Sciences, 2015.
- 2 *Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neoformation of ethanol.* Sara Vezzoli, Marzia Bernini and Francesco De Ferrari *Ann Ist Super Sanita* 2015 | Vol. 51, No. 1: 19-27.
- 3 *Simultaneous quantitative determination of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in human urine using UPLC MS MS* Russell Watts¹, Jennifer Button², David W Holt², Michelle Wood¹. ¹Waters Corporation, MS Technologies Centre, Manchester, UK. ²Analytical Unit, St George's – University of London, London, UK.

Projekti raames töötati välja ja valideeriti metoodika ka β -hüdrosübutüraadi (β HB) kvantitatiivseks määramiseks verest ja uriinist.

Uuritavate proovide ettevalmistamisel kasutati uriini puhul lahjendamist, vere korral valkude sadestamist atsetonitriiliga ja fosfolipiidide eemaldamist Phree (Phenomenex) kolonnide abil. Analüüs viidi läbi vedelikkromatograaf tandemmassispektromeetriga (LC MS MS, ESI, pos). Vedelikkromatograafi (Agilent 1260 Infinity) kolonnis (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1×100 mm, 1.8 μ m) toimus proovikomponentide, sh uuritavate ainete lahutamine. Tandemmassispektromeetris (Agilent 6410 Triple Quad LC/MS) toimus uuritavate ainete fragmenteerimine ja tekkinud fragmentide detekteerimine. Uuritavad ained identifitseeriti analüüdi prekursor- ja produktioonide ning retentsiooniaegade järgi.

Tabel nr 11. Analüüdi ja sisestandardi prekursorioonid ja produktioonid.

	Q ₁ , prekursorioon	Q ₃ , produktioon
βHB	105	87
		43
GHB-D6	111	93
		49

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et βHB ja GHB-D6 omavad spetsiifilisi prekursorioone ja produktioone ning retentsiooniaegu, mistõttu teised ained uuritavate ainete määramist ei sega. GHB omab βHB-ga sama prekursoriooni ja samu produktioone aga valideerimise käigus tõestati, et nende retentsiooniajad on niivõrd erinevad, et GHB ei sega βHB määramist.

Kvantitatiivne sisaldus määrati uuritava aine ja sisestandardi piigialuste pindalade suhte abil. Selleks on eelnevalt koostatud kalibreerimisgraafik: uuritava aine ja sisestandardi piigialuste pindade suhte sõltuvus uuritava aine kontsentratsioonist. Sisestandardina kasutati deuteriummärgistatud GHB-d. Maatriksefektide elimineerimiseks kasutati kalibreerimisgraafikute koostamisel uuritavat ainet mittesisaldavat verd ja sünteetilist uriini.

Metoodika määramispiirkond veres ja uriinis oli 50-1000 µg/ml. βHB tekib organismis metabolismi tulemusena. Kontsentratsiooni kuni 50 µg/ml loetakse normaalseks, 50-250 µg/ml on niinimetatud hall ala, üle 250 µg/ml juhtudel on tegemist ketoatsidoosiga.

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et kalibreerimisgraafikud (βHB veres, βHB uriinis) on määramispiirkonnas lineaarsed.

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et ühe analüüsitsükli jooksul saadud tulemused on stabiilsed (korduvus).

Tabel nr 12. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused βHB veres.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1	50	39,93	1,84	4,6
2	50	50,26	3,02	6,0
3	500	509,43	24,22	4,8
4	1000	995,41	38,97	3,9
5	1000	953,76	27,44	2,9

Tabel nr 13. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused β HB uriinis.

Nr	Teoreetiline konts., $\mu\text{g/ml}$	Keskmine konts., $\mu\text{g/ml}$	STDEV	CV%
1	50	50,16	3,03	6,1
2	50	52,36	1,04	2,0
3	500	497,05	13,66	2,8
4	1000	944,42	21,01	2,2

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et meetodika korratavusega on kõik korras st. erinevatel analüüsitsüklitel erineva kalibreeringuga ja kontroll-lahustega saadud tulemused on stabiilsed.

Tabel nr 14. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused β HB veres

Nr	Teoreetiline konts., $\mu\text{g/ml}$	Keskmine konts., $\mu\text{g/ml}$	STDEV	CV%
1	50	50,07	3,47	6,9
2	500	458,7	35,03	7,6
3	1000	962,15	34,32	3,6

Tabel nr 15. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused β HB uriinis.

Nr	Teoreetiline konts., $\mu\text{g/ml}$	Keskmine konts., $\mu\text{g/ml}$	STDEV	CV%
1	50	51,62	2,35	4,6
2	500	502,07	25,87	5,2
3	1000	956,73	43,94	4,6

Korduvuse ja korratavuse katsed viidi isevalmistatud proovidega. Isevalmistatud proovid kujutavad endast verd või uriini, millele on lisatud kindel kogus etalonaineid.

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et antud meetodikaga saadud tulemused on tõesed.

Tabel nr 16. Hinnang tõesusele

Maatriks	Teoreetiline kontsentratsioon, $\mu\text{g/ml}$	Keskmine kontsentratsioon, $\mu\text{g/ml}$	Erinevus, %
Veri	50	50,07	0,14
	500	458,70	-8,26
	1000	962,15	-3,79
Maatriks	50	51,62	3,22
	500	502,07	0,41
	1000	956,73	-4,33

Keskmise tulemuse erinevus teoreetilisest on rahuldav.

Mõõtemääramatuse arvutamiseks kasutati Nordtest meetodit.

Määramatuse arvutamiseks kasutati valideerimise käigus saadud korduvuse ja korratavuse andmeid.

Antud meetoodika laiendmääramatused on järgmised: β HB verest 25% (k=2) ja uriinist 20% (k=2).

Metoodika välja töötamisel kasutatud kirjanduse loetelu:

- 1 *Determination of Hydroxybutyrate in blood and urine using Gas Chromatography- Mass Spectrometry* Huda M.A. Hassan and Gail A.A. Cooper. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, October 2009
- 2 *The Postmortem Diagnosis of Alcoholic Ketoacidosis* Cristian Palmiere and Marc Augsburger. Alcohol and Alcoholism Vol. 49, No. 3, pp. 271–281, 2014
- 3 *Investigation of markers to indicate and distinguish death due to Alcoholic Ketoacidosis, Diabetic Ketoacidosis and Hyperosmolar Hyperglycemic State using post-mortem samples* Forensic Science International Volume 214, Issues 1–3, 10 January 2012, Pages 142-147

Vabatahtlike uuringud

Uuringu alguses toimus isikute uuringu andmete kogumiseks protokollide koostamine ja TÜ Inimuuringute eetikakomitee loa taotluse koostamine.

Isikute uuringuks kutsuti vabatahtlikud uuringus osalejad kutse ja selgitusega uuringu olemusest ning teostusest EKEI kodulehel ja isikliku pöördumisega. Uuringus osalejad said tutvustuslehe, täideti nõusoleku vorm (säilitatakse lukustatud kapis valvega ruumis) ning iga uuringus osaleja sai uuringunumbri, mis tagas tema proovimaterjalide ning tulemuste anonüümsuse. Isikute uuring teostati vastavalt Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee loale.

Isikute uuringuks alkoholi manustamine, vereproovide võtmine ja kliiniliste joobetunnuste fikseerimine toimus 5 korral (09.02, 09.03, 29.03, 19.04, 18.05), igas grupis ~10 uuritavat. Kokku osales 49 vabatahtlikku, neist 31 naist ja 18 meest. Uuritavate keskmine vanus oli 41,6 a (18–59.a), naistel keskmine vanus 42,1 aastat ja meestel 41 aastat.

Vabatahtlikult uurimuses osalejatelt võeti venoosne vereproov, milleks paigaldati veenisisene kanüül vähendamaks võimalikku valu veenivere võtmisel. Katsutid markeeriti, protokollid kodeeriti ja protokollide märgiti ilma isikuandmeteta sugu, vanus ja kehamass.

Vastavalt vabatahtliku soovile paluti manustada suu kaudu erinevat tüüpi alkoholi (veini, viina, konjakit või muud) 1 tunni jooksul talle sobivas koguses, kuid mitte suuremas koguses kui arvutuslik etanooli kontsentratsioon 2,0 mg/g veres. Joodud alkoholi koguse ja kanguse kohta tehti

vastav märke protokoll. Puhta etanooli sisaldus joogis arvutati välja kehamassi kohta vastavalt tarbitavale alkoholi kogusele ja margile 0,5 või 1 g kg kehakaalu kohta puhast etanooli. Üks tund ja kaks tundi peale alkoholi manustamise lõppu võeti uued vereproovid.

I vereproov võeti enne alkoholi tarbimise algust. Seejärel tarbis uuritav ühe tunni jooksul talle sobivat alkoholi, mille kangus ja kogus fikseeriti protokoll.

II vereproov võeti üks tund peale alkoholi tarbimist ning teostati kliiniliste joobetunnuste fikseerimine.

III vereproov võeti kaks tundi peale alkoholi tarbimist ning teostati taas kliiniliste joobetunnuste fikseerimine.

Uuringus osaleja kohta kulus puhast etanooli keskmiselt 66,8 g (vastab ~212 ml 40 vw% viinale või ~769 ml 11 vw% veinile). Minimaalseim manustatud annus oli 19,7 g ja maksimaalne manustatud annus 186,2 g puhast etanooli. Kokku manustati 3271 g puhast etanooli (vastab ~10365 ml 40 vw% viinale või ~37689 ml 11 vw% veinile).

Tulemused

Keskmine alkoholi kontsentratsioon veres oli 0,83 mg/g. Minimaalne alkoholi kontsentratsioon oli 0,17 mg/g (manustati 29,6 g puhast etanooli) ning maksimaalne alkoholi kontsentratsioon oli 2,25 mg/g (manustati 173,6 g puhast etanooli).

Mitte ükski enne alkoholi tarbimist võetud vereproov (I vereproov) ei sisaldanud etanooli ja etanooli metaboolite EtG ja EtS-i. Võrreldes omavahel teisi ja kolmandaid proove, võib öelda, et etanooli kontsentratsioon hakkab selle aja jooksul langema ja EtG ja EtS kontsentratsioonid hakkavad tõusma, mida on näha ka allpool toodud tabelist. Kui võrrelda etanooli eliminatsioonikõverat EtG ja EtS eliminatsioonikõveratega, siis joonistub välja selge ajaline nihe.

Tabel 17. EtG ja EtS tulemused

Proovi nr	Analüüt	alla määramispiiri	Min	Max
II	etanool (mg/g)	2	0,2	2,25
	EtG (µg/ml)	15	0,2	1,45
	EtS (µg/ml)	11	0,11	0,77
III	etanool (mg/g)	8	0,2	2,09
	EtG (µg/ml)	10	0,25	2,28
	EtS (µg/ml)	7	0,12	0,98

Bioloogilise materjali kogumine surnutelt

Bioloogiline materjal koguti surnutelt, kellel oli morfoloogiliste tunnuste alusel võimalik diagnoosida diabeeti või tekkis kahtlus sellele, samuti surnutelt, kellel esinesid ägeda alkoholimürgistuse või kroonilise alkoholi toime tunnused.

Koguti veri HbA1c, etanooli, EtG, EtS ja β HB määramiseks, uriiniproov etanooli, EtG, EtS ja β HB määramiseks, silma klaaskehavedelik ning liikvor glükoosi ja laktaadi määramiseks.

Proovimaterjale koguti 212 surnult ning kõigil juhtudel teostati biokeemilised uuringud (glükeeritud hemoglobiin verest, glükoos ja laktaat silma klaaskeha vedelikust ning liikvorist) haigla laboris. 38 juhul on lisatud lahanguprotokollidest täiendavad andmed uuringuprotokollile. Selleks, et oleks võimalik teha olemasolevate andmete statistiline analüüs, lõpetati surnutelt proovimaterjali kogumine 28.02.2018. Uuringus oli 212 (proovid koguti ajavahemikus 19.04.2017–28.02.2018) surnut, neist suurem osa (N=180) Lõuna-Eesti piirkonnast.

Tulemused

Projekti käigus töötati välja juhised kohtuarstidele selgitamiseks, millal on vajalik määrata β HB kontsentratsioon diabeedi või alkoholi mürgistuse kahtluse korral.

HbA1c referentsist kõrgem ehk diabeedi risk $>5,9$ mmol/l 19,8% ning diabeet esines 10,9% uuritavatest.

Kõrgenenud glükeeritud hemoglobiini leiu korral interpreteeriti HbA1c leiu tulemust ja konsulteeriti lahangu teostanud kohtuarsti kõrgenenud HbA1c põhjustest vastavalt diagnooside, eelkõige alkoholi kroonilise toksilise toime valguses.

β HB-d määrati 212 surnu vereproovist. Kontsentratsiooni kuni 50 μ g/ml loetakse normaalseks, 50-250 μ g/ml on niinimetatud hall ala, üle 250 μ g/ml juhtudel on tegemist ketoatsidoosiga. 164 – s vereproovis oli β HB sisaldus <50 μ g/ml, 35 sisaldus jäi vahemikku 50-250 μ g/ml ja 13 sisaldus oli >250 μ g/ml. Uriini analüüsiks võeti need proovid, millede korral β HB sisaldus oli >50 μ g/ml. Kuna kõikidel juhtudel ei olnud uriini, siis kokku analüüsiti 29 isiku uriini. Neist 9-1 oli sisaldus <50 μ g/ml, nende surnute vereproovide tulemused jäid nn. halli alasse. 9 uriiniproovi tulemused olid >250 μ g/ml, neist 7 vereproovi tulemused olid samuti >250 μ g/ml ja 2 vereproovi β HB kontsentratsioon jäi vahemikku 50-250 μ g/ml. 11 uriiniproovi tulemused jäid niiõelda halli alasse, analoogsed olid ka vereproovide tulemused välja arvatud üks vereproov, mille tulemus ületas 250 μ g/ml.

EtG ja EtS määrati 212 surnu verest ja 146 uriinist. EtG suhtes olid negatiivsed 87 vereproovi ja 44 uriiniproovi, EtS suhtes olid negatiivsed 85 vereproovi ja 45 uriiniproovi. EtG kontsentratsioon veres jäi vahemikku (0,2 – 99,9)µg/ml ja uriinis (2,4-2726)µg/ml. EtS kontsentratsioon veres jäi vahemikku (0,2 – 55,8)µg/ml ja uriinis (1-660,9)µg/ml.

Projekti tulemuste tutvustamine

Kahel korral toimus RITA 2 projekti raames läbiviidud uuringutulemuste tutvustused Eesti Kohtuekspertiisi Instituudi töötajatele: jaanuaris tutvustas M. Väli RITA 2 projekti EKEI aasta avauuringul ja märtsis M. Tõnisson EKEI Teadus-ja arendusnõukoja (TAN) koosolekul.

18. juunil 2018 toimus projekti tulemusi tutvustav seminar, millest võttis osa 74 inimest. Seminaril tegid kaasettekande Advokaadibüroo „Sirk ja Saareväli“ advokaat Indrek Sirk, Maanteeameti liiklusosakonna liiklusekspert Villu Vane, Tervise Arengu Instituudi Terviseriskide Ennetamise Keskuse juht Anneli Sammel, SA Põhja Eesti Regionaalhaigla psühhiaater Ants Kask, justiitsministeeriumi kriminaalpoliitika osakonna analüüsitalituse nõunik Krister Tüllinen ning projektis osalenud Tarmo Barndök, Aime Riikoja ja Mailis Tõnisson. Konverentsi ettekanded andsid ülevaate mitte ainult alkoholi metaboliitidest, vaid ka alkoholipoliitikast Eestis tervikuna, samuti võimalustest, mida saab kasutada alkoholismivastases võitluses.

Aime Riikoja ja Tarmo Barndök tegid ettekande teemal “Alkoholi metaboliidid EtG, EtS, BHB ja nende määramine”, mille käigus andsid ülevaate meetodikate valideerimisest.

ne ja väljatöötamine ning andsid ülevaate, mida nad tegid uuringu raames EtG, EtS ja βHB verest ja uriinist määramise meetodikate väljatöötamiseks.

Mailis Tõnisson andis ülevaate projekti oodatavatest tulemustest ning kuidas EtG ja EtS saaks kasutada alkoholi kuritarvitamise hindamiseks.

Projekti sotsiaalmajanduslik ja ühiskondlik väljund

Projekti tulemuste analüüs võimaldab paremini aru saada alkoholi käitumisest organismis ning sellest lähtuvalt tõhusamalt hinnata alkoholi tarbimise riske (nt alkoholist tingitud tervisehäired ja liiklusohutus).

EtG ja EtS määramine võimaldab lahendada liiklusõnnetuse põhjustanud autojuhi alkoholise joobe tagamaid, mis omakorda aitab kaasa õiguslike probleemide lahendamisele. Uuringu tulemusena paraneb mootorsõidukijuhtide alkoholihoobe diagnoosimise kvaliteet.

Alkoholi metaboliitide määramine võimaldab haiglas viibivatel patsientidel lahendada selgusetu atsidoosi diagnoosi tagamaid. β HB määramine võimaldab täpsustada ketoatsidoosi põhjuseid, mistõttu muutub patsiendi intensiivravi haiglas täpsemaks, lühendades haiglas viibimise aega ning vähendades ravikulusid ja surmasid. β HB määramine võimaldab määrata kvaliteetsemalt surma põhjust ja aidata seeläbi kaasa õiguslike probleemide lahendamisele.

Uuringu tulemuste praktikasse rakendamisel peab arvestama, et joobetunnuste kirjeldamine on võimalik abistav mõõdetulemus, bioloogilist materjali (verd) peab olema piisavalt, et lisaks etanooli kontsentratsiooni määramisele jaguks seda ka metaboliitide määramiseks. Juriidilise poole pealt võib tekkida probleeme vereproovi kogumise seadusliku alusega metaboliitide uuringuks, mistõttu see vajab täiendavat juriidilist analüüsi.