



Euroopa Liit  
Euroopa  
Regionaalarengu Fond



Eesti  
tuleviku heaks

## **Justiitsministeeriumi RITA 2 Alkoholist põhjustatud tervisehäirete ja käitumisriskide vähendamine: alkoholi ja alkoholi surrogaatide tarvitamise tagajärjel tekkivate ainevahetusproduktide (metaboliitide) uuring. Tegevus nr 2. lõpparuanne**

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

Uuring seondus 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.

*Jätkuprojekti kogumaksumus oli 34 550,36eurot, millest 50% moodustas omafinantseering. Projekti elluviimiseks sõlmisid justiitsministeerium ja Eesti Kohtuekspertiisi Instituut partnerluslepingu nr 7.8-3/17/2 muutmise kokkulepe*

*Projekti kestus oli 6 kuud ja projekti tegevuste abikõlblikkuse periood oli kuni 13.07.2019.*

*Projektis osalesid:*

*Projekti juht: Anne Kruusement*

*EKEI poolne projekti koordinaator Marika Väli*

*Projektis osalesid Aime Riikoja, Tarmo Barndõk*

## **Teoreetiline taust**

Uuringu teema oli seotud alkoholi tarbimise preventsiiooni ja inimeste turvatunde tõstmisega läbi kohtuekspertiisi valdkonna arendamise. Eestis polnud selliseid uuringuid varem tehtud ja ei olnud ka meetodikaid alkoholi metaboliitide määramiseks.

Eelmise projekti raames töötasime välja etüülglükuroniidi (EtG) ja etüülsulfaadi (EtS) meetodikad, mis näitavad hiljutist alkoholi tarvitamist, ning  $\beta$ HB meetodika, mis on ketoatsidoosi markeriks. Ketoatsidoosi võib põhjustada ka alkoholism.

Tegevus nr 2 oli kroonilise alkoholi tarbimise markeri fosfatidüületanooli (PEth) määramise meetodika välja töötamine. Eestis pole selliseid uuringuid varem tehtud ja ei ole ka meetodikat kroonilise alkoholi tarbimise markeri fosfatidüületanooli (PEth) määramiseks. Rahvusvaheliselt osad riigid määravad PEth-i, kuid Eestis on see esmakordne. Kuigi kasutatav aparatuur, kemikaalid, laboritingimused ja bioloogiline materjal ning proovimaterjali transportimistingimused võivad olla erinevates riikides sarnased, siis ka juba väikesed erinevused materjalides ja tingimustes nõuavad uut meetodikat. Seetõttu toksikoloogias ei ole standardseid meetodikaid ja iga labor peab välja töötama, valideerima ning kohendama oma aparatuurile ja tingimustele vastava määramismetodika. Juriidilisel eesmärgil kasutatavad meetodikad peavad olema läbipaistavad ja jälgitavad, mis tagatakse valideerimisega

Projekt on seotud samuti strateegiaga „Teadmistepõhine Eesti 2014–2020“. Teadus- ja arendustegevus (TA) toimub Eesti ühiskonna ja majanduse huvides, kuna alkoholi liigtarvitamisest tingitud haigestumiste ja surmade arvu vähenemine aitab parandada inimeste heaolu ja suurendada töövõimet.

## **Projekti vajalikkus**

Projekt on seotud konkurentsivõime kava „Eesti 2020 Haritud rahvas ja sidus ühiskond“ Eesti 2020 tööhõive alaeesmärgid ja Tööhõiveprogramm 2014–2015 eesmärkidega.

Tervena elatud eluaastate pikendamine läbi tervisekäitumise parandamise ja õnnetusjuhtumite edasise vähendamise ning läbi tervishoiutaristu arendamise.

Tööealise elanikkonna hulgas põhjustavad olulist inimressursi kadu nii inimeste kahjustav tervisekäitumine kui enneaegne suremus. Enneaegsete surmade puhul on oluline osa tervist ohustaval ja riskeerival käitumisel (nt alkoholi tarvitamisel). Uue meetodika rakendamise tulemusena paraneb alkoholi ja alkoholi surrogaatidega mürgistusjuhtumite diagnostika, võimaldades muuta ravi diagnoosipõhisemaks ja täpsemaks ning vähendades alkoholitarbimisega seotud surmajuhtumite arvu ja aitaks kaasa eluea pikendamisel.

## Projekti tähtsus

Uuringu teema on seotud alkoholi tarbimise preventsiiooni ja inimeste turvatunde tõstmisega. 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. Fosfatidüületanool kujutab endast fosfolipiidide gruppi, mis tekkib etanooli olemasolu korral fosfatidüülkoliinist fosfolipaas D toimel. Praeguseks on suudetud identifitseerida 48 PEth homoloogi, milledest PEth 16:0/18:1 moodustab 37-46% kogu veres olevast PEth-st ning seetõttu tavaliselt määrataksegi PEth 16:0/18:1. Üle teatud kontsentratsiooni (Rootsis 210 ng/ml) võib öelda, et tegemist on ülemäärase alkoholi tarbimisega.

PEth madalad kontsentratsioonid näitavad:

1. hiljutist väikese koguse alkoholi tarvitamist;
2. ühekordset tugevat tarvitamist, mille korral PEth kontsentratsiooni langemine võtab kauem aega;
3. kroonilist alkoholi tarbimist isiku puhul, kellel tekib PEth-i vähem või PEth elimineerub kiiremini.

Elavisikutel võimaldaks selle markeri määramine diagnoosida kroonilist alkoholismi, mis võimaldaks inimesi suunata alkoholiravile ja teostada alkoholi ravi üle kontrolli. Samuti võimaldaks PEth-i määramine tõhusamalt teostada järelevalvet kriminaalhoolduse jälgimisel olevaid isikuid. Praegu on kroonilist alkoholismi laboritingimustes Eesti Vabariigis võimalik diagnoosida ainult Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris ja seda siis ensümaatilise meetodiga alkoholi biomarkerit CDT-d määrates. Tegemist on sõeluuringuga, mille puhul eksimise võimalus on suur. CDT puhul antakse hinnang suhtelise osakaalu järgi, mis võib olla ka ekslik,

kuna inimorganismid on väga erinevad. Alkoholimarkeri PEth-i määramine LC MS MS-ga, mis on kinnitusmeetod, võimaldaks kroonilist alkoholismi diagnoosida märksa täpsemalt. See oleks eriti oluline sõidukijuhtide puhul, kes on korduvalt joobes juhtimisega vahele jäänud.

Selle markeri määramine muudaks surma põhjuse tuvastamise täpsemaks st saaks tuvastada alkoholismi ka juhtudel, kui surma hetkel ei ole veres alkoholi. Surma põhjuse tuvastamisel saab praegu kroonilist alkoholismi diagnoosida muutuste järgi siseelundites. Kroonilise alkoholi markeri PEth määramisega muutuks diagnoos täpsemaks/teaduspõhisemaks.

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

## Lähteülesanne ja uurimiseesmärgid

Konkreetses lähteülesanneteks olid:

1. PEth meetodika väljatöötamine ja valideerimine.
2. Tegevus 1 käigus  $\beta$ HB suhtes positiivsetest proovidest PEth-i määramine.

Eeldatav mõju:

1. Parandab kohtuarstlike lahanguete diagnoosimise kvaliteet.
2. Võimaldab elavisikutel paremini diagnoosida alkoholismi ja teostada alkoholi ravi üle järelevalvet.

## Tulemused püstitatud eesmärkidest lähtuvalt

1. PEth meetodika väljatöötamine ja valideerimine.

Projekti raames töötati välja ja valideeriti etanooli metaboliidi PEth 16:0/18:1 kvantitatiivse määramise meetodika verest.

Uuritavate proovide ettevalmistamisel kasutatakse isopropanooliga ekstraheerimist.

Analüüs viiakse läbi vedelikkromatograaf tandemmassispektromeetriga (LC MS MS, ESI, neg). Vedelikkromatograafi (Agilent 1260 Infinity) kolonnis (Agilent ZORBAX RRHT C18 2.1×50 mm, 1.8  $\mu$ m) toimub proovikomponentide, sh uuritavate ainete lahutamine.

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

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

Tabel nr 1. Analüüdi ja sisestandardi prekursorioonid ja produktioonid.

	Q <sub>1</sub> , prekursorioon	Q <sub>3</sub> , produktioon
<b>PEth</b> <b>16:0/18:1</b>	701,5	281,3
		255
<b>PEth d5</b> <b>16:0/18:1</b>	706,5	281,3
		255

Valideerimiskatsete käigus tõestati, et uuritavad ained omavad spetsiifilisi prekursorioone ja produktioone ning retentsiooniaegu, mistõttu teised ained uuritavate ainete määramist ei sega. Kvantitatiivne sisaldus määratakse 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 kasutatakse deuteeriummärgistatud PEth 16:0/18:1. Maatriksefekti elimineerimiseks kasutati kalibreerimisgraafikute koostamisel uuritavaid aineid mittesisaldavat verd.

Metoodika määramispiirkond on 50-2000 ng/ml. Valideerimiskatsete käigus tõestati, et kalibreerimisgraafik veres on määramispiirkonnas lineaarne.

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

Tabel nr 2. Kokkuvõtlikud korduvuse tulemused PEth 16:0/18:1veres.

Nr	Teoreetiline konts., µg/ml	Keskmine konts., µg/ml	STDEV	CV%
1	50	50,5	3,5	7,0
2	50	50,9	5,6	11,0
3	50	56,2	6,3	11,1
4	50	50,5	2,8	5,5
5	50	49,4	2,7	5,4

6	200	196,9	7,5	3,8
7	200	186,2	16,8	9,0
8	200	202,5	14,7	7,2
9	200	211,2	9,6	4,5
10	200	204,3	13,4	6,6
11	2000	2094,6	166,7	8,0
12	2000	2067,3	41,1	2,0
13	2000	1999,9	11,8	0,6
14	2000	2043,2	115,0	5,6
15		57,3	3,7	6,5
16		63,8	7,2	11,3
17		63,1	3,9	6,3
18		1117,9	47,3	4,2
19		1142,9	18,8	1,6
20		1195,9	34,9	2,9
21		1138,9	8,2	0,71
22		1185,1	59,9	5,1
23		1193,1	33,4	2,8

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

Tabel nr 3. Kokkuvõtlikud korratavuse tulemused PEth 16:0/18:1 veres.

Nr	Teoreetiline konts., ng/ml	Keskmine konts., ng/ml	STDEV	CV%
1	50	50,07	3,47	6,9
2	200	199,9	14,2	7,1
3	2000	2056,1	112,9	5,5
4		61,4	5,7	9,3
5		1130,4	36,7	3,2
6		1186,1	42,9	3,6
7		574,8	24,1	4,2
8		1567,5	133,3	8,5

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

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

Keskmise tulemuse erinevus teoreetilisest on rahuldav.

Tabel nr 4. Hinnang tõesusele

Maatriks	Teoreetiline kontsentratsioon, ng/ml	Keskmine kontsentratsioon, ng/ml	Erinevus, %
Veri	50	50,07	0,14
	200	199,9	-0,05
	2000	2056,1	2,8

Mõõtemääramatuse arvutamiseks kasutati Nordtest meetodit.

Määramatuse arvutamiseks kasutati valideerimise käigus saadud korduvuse ja korratavuse andmeid.

Laiendmääramatus PEth 16:0/18:1 määramisel verest on 30% (k=2).

Metoodika välja töötamisel kasutatud kirjanduse loetelu:

- 9.1 *Simultaneous determination of Phosphatidylethanol and Phosphatidylcholine in animal tissue by LC-MS/MS* Sytske Willem, A Master dissertation for the study programme Master in Drug Development, Bern University, 2016-2017.
- 9.2 *Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study* Stergios Kechagias, Dženeta Nezirevic Dernroth, Anders Blomgren, Therese Hansson, Anders Isaksson, Lisa Walther, Robert Kronstrand, Bertil Kågedal, and Fredrik H. Nystrom, *Alcohol and Alcoholism*, 2015, 50(4) 399–406.
- 9.3 *Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1 and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers* Natalie Kummer, Ann-Sofie Ingels, Sarah M. R. Wille, Catherine Hanak, Paul Verbanck, Willy E. E. Lambert, Nele Samyn, Christophe P. Stove, *Anal Bioanal Chem*, 2015.
- 9.4 *High-Throughput LC-MS/MS Method for Determination of the Alcohol Use Biomarker Phosphatidylethanol in Clinical Samples by Use of a Simple Automated Extraction Procedure—Preanalytical and Analytical Conditions* Anders Isaksson, Lisa Walther, Therese Hansson, Anders Andersson, Joanna Stenton, and Anders Blomgren, *American Association for Clinical Chemistry*, 2018, 1-13.
- 9.5 *Development and application of an LC-MS method for the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood* Yufang Zheng, Karolinska Institutet, Stockholm 2011.
- 9.6 *Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS* Thomas Berg, Elin Eliassen, Benedicte Jorgenrud, Saranda Kabashi, Alexey Petukhov, Stig Tore Bogstrand, *J Clin Lab anal.* 2018;e22631.

- 9.7 *Phosphatidylethanol in Blood as a Marker of Chronic Alcohol Use: A Systematic Review and Meta-Analysis* Guido Viel, Rafael Boscolo-Berto, Giovanni Cecchetto, Paolo Fais, Alessandro Nalesso, Santo davide Ferrara *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 14788-14812
- 9.8 *Biomolecules and Biomarkers Used in Diagnosis of Alcohol Drinking and in Monitoring Therapeutic Interventions* Radu M. Nanau and Manuela G. Neuman. *Biomolecules* 2015, 5, 1339-1385
- 9.9 *Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS* Anders Helander, Yufang Zheng. *Clinical Chemistry* 55:7 1395-1405, 2009.

### 3. Tegevus 1 käigus $\beta$ HB suhtes positiivsetest proovidest PEth-i määramine.

$\beta$ HB-d määrati 212 surnu vereproovist. Kontsentratsiooni kuni 50  $\mu\text{g/ml}$  loetakse referentsväärtuses olevaks, 50-250  $\mu\text{g/ml}$  on niinimetatud hall ala, üle 250  $\mu\text{g/ml}$  juhtudel on tegemist ketoatsidoosiga. 164-s vereproovis oli  $\beta$ HB sisaldus  $<50 \mu\text{g/ml}$ , 35 sisaldus jäi vahemikku 50–250  $\mu\text{g/ml}$  ja 13 sisaldus oli  $>250 \mu\text{g/ml}$ . Uriini analüüsiks võeti need proovid, millede korral  $\beta$ HB sisaldus oli  $>50 \mu\text{g/ml}$ . Kuna kõikidel juhtudel ei olnud uriini, siis kokku analüüsiti 29 uriini. Neist 9 sisaldus oli  $<50 \mu\text{g/ml}$ , nende surnute vereproovide tulemused jäid nn. halli alasse. 9 uriiniproovi tulemused olid  $>250 \mu\text{g/ml}$ , neist 7 vereproovi tulemused olid samuti  $>250 \mu\text{g/ml}$  ja 2 vereproovi  $\beta$ HB kontsentratsioon jäi vahemikku 50–250  $\mu\text{g/ml}$ . 11 uriiniproovi tulemused jäid nii öelda halli alasse, analoogsed olid ka vereproovide tulemused välja arvatud üks vereproov, mille tulemus ületas 250  $\mu\text{g/ml}$ . PEth 16:0/18:1 määrati vereproovidest, milledes  $\beta$ HB sisaldus oli  $>50 \mu\text{g/ml}$ . Kokku oli neid proove 48. 4 proovis oli PEth 16:0/18:1 sisaldus 0, kusjuures ühel juhul oli  $\beta$ HB sisaldus  $>250 \mu\text{g/ml}$ . 3-s proovis oli PEth 16:0/18:1 alla 210 ng/ml (Rootsis kroonilise alkoholismi piir). Ülejäänud 41-s proovis oli PEth 16:0/18:1 sisaldus üle 360 ng/ml, seejuures neist 12 proovis oli  $\beta$ HB sisaldus  $>250 \mu\text{g/ml}$ . Nende 12 proovi puhul võib järeldada, et tegemist on alkohoolse ketoatsidoosiga.

### Juhendid metoodikate rakendamiseks

01.07.2019 direktori käskkirja nr 83 kinnitati **Keemiaosakonna toksikoloogiavaldkonna metoodika kinnitamine (ERI 20.1) PEth metoodika**

### Projekti tutvustus



Kahel korral toimus RITA 2 projekti raames läbiviidud uuringutulemuste tutvustus Eesti Kohtuekspertiisi Instituudi töötajatele: jaanuaris tutvustas M. Väli RITA 2 projekti EKEI avaläbitusel ja märtsis A. Riikoja ning M. Tõnisson EKEI Teadus-ja arendusnõukoja koosolekul. 18. juunil 2018 toimus projekti tulemusi tutvustav seminar, millest võttis osa 74 inimest.

Rita 2 jätkuprojekti tutvustas Aime Riikoja EKEI Teadus-ja arendusnõukoja koosolekul 14.03.2019 ja 8.07.2019 EKEI töötajatele ja Saksa kolleegidele.

Rita 2 jätkuprojekti raames koostati infovoldik (lisa 1), mida jagatakse ja tutvustatakse asjasse puudutavatele menetlejatele EKEI poolt läbiviidavatel koolitustel. Infovoldik sisaldab informatsiooni alkoholijooobe ja alkoholi tarvitamise kindlakstegemise võimalustest Eesti Kohtuekspertiisi Instituudis. Informatiivses materjalis on ära toodud ajalised intervallid alkoholi metaboliitide määramiseks, samuti informatsioon menetlejatele, millist materjali uuringuks võtma peab. Alkoholi metaboliitide tuvastamiseks kasutakse proovimaterjalina verd või/ja uriini.

Projekti tulemusena on valmimas artikkel „Relationship between ethanol concentration and alcohol biomarkers EtG, EtS, and clinical signs of alcohol intoxication“, mis saadetakse ajakirja „Forensic Sciences Research“ august 2019.

## **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).

Surma põhjuse tuvastamisel saab praegu kroonilist alkoholismi diagnoosida muutuste järgi siseelundites. Kroonilise alkoholi markeri PEth määramisega muutub diagnoos täpsemaks/teaduspõhisemaks.

Elavisikutel võimaldaks selle markeri määramine diagnoosida kroonilist alkoholismi, mis võimaldaks inimesi suunata alkoholiravile ja teostada alkoholi ravi üle kontrolli. Samuti võimaldaks PEth-i määramine tõhusamalt teostada järelevalvet kriminaalhoolduse jälgimisel olevaid isikuid.

Projekti tulemusena saavad mentlejad ja teised asjast huvitatud ametnikud täpse informatsiooni, millal ja mis juhtudel on vajalik määrata alkoholi metaboliite.

**Ajaliselt on võimalik etanooli ja tema metaboliite määrata järgmiselt:**

<b>Aine nimetus</b>	<b>Referentsväärtusesse jõudmise aeg</b>
Etanool	Tavaliselt alla 12 (20) tundi
Etüülglükuroniid (EtG) ja etüülsulfaat (EtS) veres	Kuni 30 (36) tundi
Etüülglükuroniid (EtG) ja etüülsulfaat (EtS) uriinis	Kuni 120 tundi
Fosfatidüületanool (PEth) veres	3–12 päeva