

Anders Helander, docent, Beroendecentrum, Karolinska sjukhuset och Karolinska institutet, Stockholm
(anders.helander@spo.sll.se)

A Wayne Jones, adjungerad professor, rättskemiska avdelningen, Universitetssjukhuset, Linköping

5-HTOL – ny biokemisk alkoholmarkör med rättsmedicinska tillämpningar

■ Förekomst av alkohol (etanol) i utandningsluften eller i en kroppsvätska, såsom blod, urin eller saliv, anses normalt vara ett säkert bevis på att personen i fråga nyligen har konsumerat alkoholhaltiga drycker. Bestämning av etanol utförs rutinmässigt på misstänkta rattfyllerister, och analysresultatet har högt bevisvärde i domstol. Det händer dock inte sällan att riktigheten i analysresultatet ifrågasätts vid rättegången. Som skäl härtil anges t ex att provet kan ha kontaminerats med etanol i samband med provtagningen (etanol används ibland som desinfektionsmedel) eller att provet/provresultatet kan ha förväxlats under transport eller hantering vid laboratoriet [1]. Ett annat vanligt påstående är att etanolen bildats i provröret efter provtagningen (»artefaktmässig bildning«).

Artefaktmässig bildning av etanol kan förekomma

Förekomsten av etanol i ett prov kan ibland ha andra orsaker än förtäring av alkoholhaltiga drycker. Biologiska prov kan vara infekterade med bakterier eller jästsvampar, såsom *Candida albicans*, vilka under lämpliga betingelser omvandlar glukos eller annat substrat till etanol genom en jäsningsprocess [2-4] (Figur 1). Risken för artefaktmässig bildning av etanol är därför speciellt stor hos patienter som lider av diabetes [5].

Problemet med etanolens ursprung har framför allt uppmärksammats i rättsmedicinska sammanhang, eftersom analysresultaten ofta används som bevis i rätten för att avgöra skuldfrågor. Risken för artefaktmässig bildning av etanol efter döden (s k postmortal bildning) är speciellt stor om kroppen utsatts för omfattande skador, t ex i samband med trafikolycka eller flyghaveri eller om den är stadd i förruttnelse [6]. Ett flertal studier har också visat att postmortal etanolbildning är vanligt förekommande i obduktionsärenden [6, 7]. I dessa sammanhang är det därför väsentligt att kunna skilja mellan etanol som härrör från alkoholförtäring och den som bildats i kroppen efter döden eller i provröret efter provtagningen. Det bör påpekas att etanolhalten även kan sjunka i biologiska prov genom inverkan av mikroorganismer [8].

För att minimera risken för etanolproduktion genom inverkan av mikroorganismer i blod- och urinprov avsedda för toxikologisk analys är det viktigt att provtagning och -hantering sker på korrekt sätt. Provtagningskärlen skall innehålla fluorid tillsats eller annan enzymhämmare, vilket, tillsammans med att proverna förvaras nedkylda, effektivt förhind-

SAMMANFATTAT

Förekomsten av etanol i ett blod- eller urinprov kan ibland ha andra orsaker än förtäring av alkoholhaltiga drycker. Om biologiska prov är infekterade med bakterier eller jästsvampar kan dessa omvandla glukos eller annat substrat till etanol genom en jäsningsprocess.

En ny biokemisk markör för akut alkoholintag, 5-hydroxytryptofol (5-HTOL) i urin, kan utnyttjas i rättskemiska undersökningar för att skilja mellan etanol som härrör från alkoholförtäring och den som bildats i kroppen efter döden (postmortal) eller i provröret efter provtagningen.

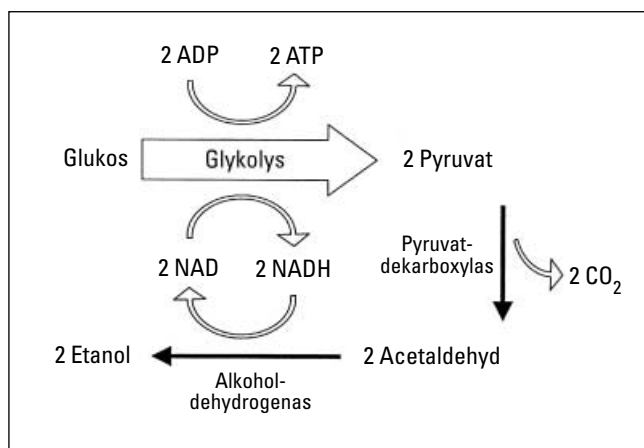
Artikeln redovisar ett antal fallbeskrivningar där 5-HTOL-markören utnyttjats som ett viktigt kompletterande bevisunderlag. Exempelen är hämtade från ett 25-tal rättskemiska utredningar under de senaste åren där det har varit väsentligt att utreda orsaken till förekomsten av etanol i proven.

Resultaten visar att 5-HTOL-markören har ett stort värde inom rättsmedicinen när det gäller att klarlägga etanolens ursprung i biologiska prov.

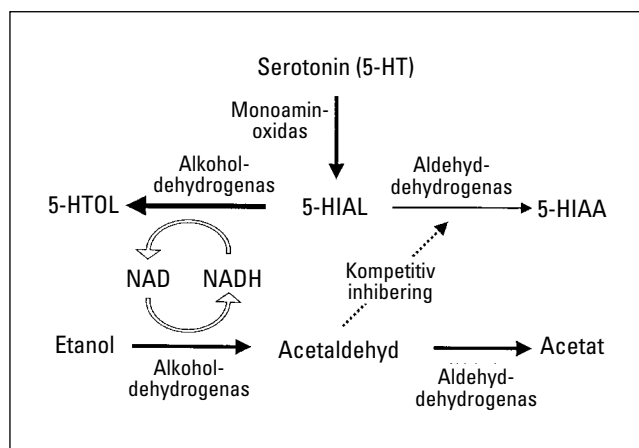
rar omvandling av glukos till etanol [9]. Enbart förvaring i kyla utesluter däremot inte en fortsatt jäsningsprocess [10]. I obduktionsärenden kan dock etanolen redan ha bildats i kroppen mellan dödsögonblicket och provtagningstillfället.

Etanolens ursprung fastställs med olika metoder

I de fall där det råder tveksamhet om etanolens ursprung kan kompletterande laboratorieundersökningar utnyttjas för att påvisa eller avfärda artefaktmässig bildning av etanol. En vanlig metod är att jämföra etanolkoncentrationen i olika kroppsvätskor. En hög etanolhalt i blodet i kombination med ett negativt urinprov gör att etanolbildning genom inverkan av mikroorganismer inte kan uteslutas i blodprovet, förutsatt



Figur 1. Schematisk beskrivning av alkoholjäsningen från glukos.



Figur 2. Schematisk beskrivning av interaktionen mellan etanol och serotoninmetabolismen. Såväl förändringen i redoxpotential vid alkoholförbränning (ökad NADH/NAD-kvot) som den kompetitiva inhiberingen av aldehyddehydrogenas via acetaldehyd främjar bildning av 5-HTOL framför 5-HIAA.

Tabell I. Rättsmedicinska frågeställningar kring förekomsten av etanol i biologiska prov där alkoholmarkören 5-HTOL/5-HIAA kan utnyttjas som kompletterande bevisunderlag. ↑ = ökar; ↓ = minskar; – = oförändrat.

Frågeställning	Etanol	U-5-HTOL	U-5-HIAA	U-5-HTOL/5-HIAA
Alkoholkonsumtion	↑	↑	↓	↑
Artefaktmässig bildning av etanol efter provinsamling	↑	–	–	–
Postmortal etanolbildning	↑	–	–	–
Kontaminering av prov med etanol	↑	–	–	–
Avsiktlig utspädning av etanolpositivt urinprov	↓	↓	↓	–

att proven tagits vid ungefär samma tillfälle. Det är dock fortfarande möjligt att alkohol som intagits omedelbart före provtagningen ännu inte hunnit utsöndras i urinen, och/eller att etanolen späts ut kraftigt om urinblåsan redan innehöll en stor volym (etanolfri) urin. På motsvarande sätt kan en hög etanolkoncentration i urinen men en negativ eller låg blod-etanolhalt antyda artefaktmässig bildning i urinprovet. Risken för detta är speciellt stor hos personer med diabetes, eftersom deras urin ofta innehåller glukos som kan omvandlas till etanol [5, 10]. Om blåsan inte har tömts på länge kan dock förekomsten av etanol i ett urinprov härröra från ett tidigare alkoholintag där etanolen redan hunnit förbrännas i kroppen.

I obduktionsärenden är det ofta möjligt att undersöka förekomsten av etanol även i glaskroppsvätska. Vid förtäring av alkohol fördelas etanolen till alla kroppsvätskor, inklusive glaskroppsvätskan, men risken för artefaktmässig bildning av etanol genom inverkan av mikroorganismer är mycket liten i glaskroppsvätska [11]. En hög etanolhalt i blod och/eller urin samtidigt som glaskroppsvätskan ger negativt resultat är därför en stark indikation på artefaktmässig bildning av etanol.

Om förekomsten av etanol misstänks bero på artefaktmässig bildning är det lämpligt att undersöka om proven innehåller glukos samt att genomföra en förnyad etanolanalys. Om etanolhalten stigit efter lagring vid rumstemperatur bekräftar detta en pågående jäsningsprocess, men det är förstås även möjligt att all glukos i provet redan hunnit omvandlas till etanol före ankomsten till laboratoriet.

5-HTOL-markören viktig vid rättsmedicinska undersökningar

Vid etanolförbränningen påverkas nedbrytningsmönstret av serotonin (5-hydroxitryptamin), varvid utsöndringen i urinen av huvudmetaboliten 5-hydroxiindolättiksyra (5-HIAA)

sjunker samtidigt som 5-hydroxitryptofol (5-HTOL) ökar i motsvarande omfattning (Figur 2). Normalt metaboliseras mindre än 1 procent av allt serotonin till 5-HTOL medan denna metabolit kan utgöra 50 procent eller ännu mer efter ett större alkoholintag. Denna förskjutning i utsöndringsmönstret för 5-HTOL och 5-HIAA kvarstår i upp till 10–15 timmar efter det att etanolen inte längre kan påvisas med ett vanligt blod- eller utandningsprov [12], och analys av 5-HTOL i urin har härigenom kommit att utnyttjas kliniskt som en mycket känslig markör för att påvisa ett enskilt alkoholintag (»bakrusmarkör») [13, 14]. Genom att uttrycka 5-HTOL som en kvot mot 5-HIAA (referensvärde <15 nmol/μmol) i stället för kreatinin eliminerar risken för falskt positiva provsvar orsakade av intag av födoämnen med hög serotoninhalt (t ex bananer, ananas och valnötter) [15] eller påverkan av antidepressiva läkemedel (SSRI, MAOI).

5-HTOL-markören har även visat sig ha betydelsefulla rättsmedicinska tillämpningar (Tabell I), eftersom den kan utnyttjas för att skilja mellan etanol som härrör från alkoholförtäring och den som bildats i kroppen efter döden eller i provröret efter provtagningen [16, 17]. I ett laboratorieförsök där uriner kontaminerades med *Candida albicans* och glukos förblev 5-HTOL/5-HIAA-kvoten oförändrad under flera dygns lagring i rumstemperatur, trots att mycket stora mängder etanol (>3 promille) producerades [18]. Detta förklaras av att förändringen i kvoten inte beror på förekomsten av etanol i sig utan på interaktionen mellan etanol- och serotoninmetabolismen i kroppen. En hög etanolkoncentration i urinen samtidigt som 5-HTOL/5-HIAA-kvoten är normal är följaktligen ett mycket säkert tecken på artefaktmässig bildning av etanol, medan en förhöjd kvot alltid uppkommer efter alkoholförtäring. 5-HTOL och 5-HIAA är båda relativt stabila i urinen, så-

väl vid framskriden förruttnelsepåverkan som när prov lagrats under ogynnsamma förhållanden [18].

Nedan följer ett antal fallbeskrivningar som utgör typexempel på hur 5-HTOL-markören har varit betydelsefull som kompletterande bevismaterial i rättsmedicinska undersökningar. Exemplet är tagna från ett 25-tal utredningar under de senaste åren, där det bedömts vara viktigt att utreda ursprunget till förekomsten av etanol i proven. Etanol analyserades med gaskromatografisk rutinmetod medan 5-HTOL och 5-HIAA bestämdes med GC-MS respektive HPLC.

Fallbeskrivningar som typexempel

Fall 1 – Rattfylleriärende: Etanolkoncentrationen uppmättes till 0,81 promille i urinprovet medan ingen etanol kunde påvisas (detektionsgräns 0,01 promille) i blodprovet. Denna skillnad i alkoholkoncentration mellan urin och blod är onormalt stor, vilket gjorde att man ville undersöka om etanolen hade bildats i urinprovet efter provtagningen. Noteras bör att blodprovet togs först 1 timme efter urinprovet.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinprovet var kraftigt förhöjd (236 nmol/μmol; referensvärde <15), vilket bekräftade att provlämnaren hade konsumerat större mängder alkohol någon gång under dygnet före provtagningen, men att etanolen redan hade hunnit förbrännas i kroppen innan blodprovet togs.

Fall 2 – Rattfylleriärende: Etanolkoncentrationen uppmättes till 0,90 promille i blodprovet och 1,55 promille i urinprov A. I urinprov B som togs 1 timme senare var dock etanolhalten endast 0,03 promille. Denna kraftiga sänkning kan inte förklaras enbart med etanolförbränning (normalt 0,15–0,20 promille per timme), varför det i stället misstänktes att B-provet hade späts ut avsiktligt. Detta antagande styrktes dessutom av provets mycket låga kreatininhalt (1,1 mmol/l).

5-HTOL/5-HIAA-kvoten, som är oberoende av utspädning, var kraftigt förhöjd i båda urinproven (1 219 respektive 925 nmol/μmol), vilket bekräftade att provlämnaren hade druckit stora mängder alkohol någon gång före provtagningen. Dessutom styrkte analysresultatet att B-provet hade manipulerats genom avsiktlig utspädning med t ex vatten.

Fall 3 – Kriminalvårdsärende: Etanolkoncentrationen i ett urinprov som tagits från en intern efter avslutad permission uppmättes till 2,60 promille. Urinen var även positiv för glukos, vilket, tillsammans med att provröret saknade fluorid tillsats, gjorde att artefaktmässig bildning av etanol inte kunde uteslutas.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinprovet var kraftigt förhöjd (1 532 nmol/μmol), vilket bekräftade att provlämnaren hade druckit stora mängder alkohol någon gång före provtagningen.

Fall 4 – Våldtäktsoffer: Etanolkoncentrationen uppmättes till 0,82 promille i urinprovet medan någon etanol inte kunde påvisas i blodprovet. Detta, tillsammans med att offret var diabetiker och urinprovet positivt för glukos samt att provtagningsröret saknade fluorid tillsats [10], gjorde att artefaktmässig bildning av etanol i urinprovet kunde misstänkas. Offret förnekade dessutom bestämt all förtäring av alkohol vid tidpunkten för övergreppet.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinen var normal (6 nmol/μmol), vilket bekräftade att förekomsten av etanol i urinprovet berodde på artefaktmässig bildning efter provtagningen och inte på att offret druckit alkohol. Vid förnyad etanolanalys efter tre månaders förvaring vid 4 °C hade etanolhalten i urinprovet dessutom stigit till 5,5 promille, vilket bekräftade en pågående jäsningsprocess.

Fall 5 – Trafikolycka med dödlig utgång: Etanolkoncentrationen uppmättes till 0,21 promille i urinprovet och 0,33 pro-

mille i lårblod. Etanol kunde dock inte påvisas i glaskroppsvätskan, vilket talade för artefaktmässig bildning av etanol i kroppen efter dödsögonblicket. I samband med försöket att rädda personens liv erhöll denne omfattande medicinsk behandling.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinprovet var normal (4 nmol/μmol), vilket bekräftade att förekomsten av etanol berodde på artefaktmässig bildning och inte på att dödsoffret druckit alkohol före dödsögonblicket.

Fall 6 – Drunkningsolycka: Etanolkoncentrationen uppmättes till 0,05 promille i urinprovet och 0,13 promille i blodprovet. Etanol kunde dock inte påvisas i glaskroppsvätskan, vilket talade för artefaktmässig bildning av etanol i kroppen efter dödsögonblicket. Analysresultatet ifrågasattes dessutom starkt av släktingar till offret, eftersom denne var känd för att av religiösa skäl aldrig dricka alkohol.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinprovet var normal (5 nmol/μmol), vilket bekräftade att förekomsten av etanol berodde på artefaktmässig bildning och inte på att dödsoffret druckit alkohol före dödsögonblicket.

Fall 7 – Självmordsärende: Etanolkoncentrationen uppmättes till 1,35 promille i urinprovet men endast 0,09 promille i blodet. Skillnaden i alkoholkoncentration mellan urin och blod var här onormalt stor, vilket gjorde att artefaktmässig bildning av etanol i urinen inte kunde uteslutas.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten var kraftigt förhöjd (663 nmol/μmol) i urinprovet, vilket bekräftade att dödsoffret hade konsumerat större mängder alkohol någon gång före dödsögonblicket. Den stora skillnaden i etanolhalt mellan urin och blod talade i stället för att etanolen hunnit förbrännas i kroppen och att den urin som ansamlats i blåsan avspeglade etanolhalten i blodet långt tidigare.

Fall 8 – Självmordsärende: Etanolkoncentrationen uppmättes till 2,5 promille i urinprovet medan ingen etanol kunde påvisas i blod eller glaskroppsvätska. Urinen var dessutom positiv för glukos, vilket gjorde att artefaktmässig bildning av etanol kunde misstänkas.

5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urinen var normal (8 nmol/μmol), vilket bekräftade att förekomsten av etanol i urinprovet berodde på artefaktmässig bildning mellan tidpunkten för döden och obduktionen.

Sammanfattning

Sammantaget visar dessa exempel att bestämning av 5-HTOL/5-HIAA-kvoten i urin har flera betydelsefulla tillämpningar inom det rättsmedicinska området. Markören kan utnyttjas för att skilja mellan etanol som härrör från alkoholförtäring och den som bildats i kroppen efter döden (postmortal bildning) eller i provröret efter provtagningen genom inverkan av mikroorganismer.

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Referenser

1. Jones AW. Top ten defence challenges among drinking drivers in Sweden. *Med Sci Law* 1991;31:229-38.
2. Jones AW, Andersson R, Sakshaug J, Mørland J. Possible formation of ethanol in postmortem blood specimens after antemortem treatment with mannitol. *J Anal Toxicol* 1991;15:157-8.
3. Saady JJ, Poklis A, Dalton HP. Production of urinary ethanol after sample collection. *J Forensic Sci* 1993;38:1467-71.
4. Corry JE. A review. Possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *J Appl Bacteriol* 1978;44:1-56.

ANNONS

ANNONS

5. Alexander W. Postmortem urinary alcohol is unreliable in diabetes. *BMJ* 1998;317:206.
6. Gilliland MG, Bost RO. Alcohol in decomposed bodies: postmortem synthesis and distribution. *J Forensic Sci* 1993;38:1266-74.
7. Levine B, Smith ML, Smialek JE, Caplan YH. Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol. *J Forensic Sci* 1993;38:663-7.
8. Dick GL, Stone HM. Alcohol loss arising from microbial contamination of drivers' blood specimens. *Forensic Sci Int* 1987;34:17-27.
9. Jones AW, Hylén L, Svensson E, Helander A. Storage of specimens at 4°C or addition of sodium fluoride (1%) prevents formation of ethanol in urine inoculated with *Candida albicans*. *J Anal Toxicol* 1999;23:333-6.
10. Jones AW, Eklund A. Missvisande etanolkoncentration i urin från våldtäktsoffer med diabetes. *Läkartidningen* 2000;97:1873.
11. Harper DR. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci Int* 1989;43:37-44.
12. Helander A, Beck O, Jacobsson G, Löwenmo C, Wikström T. Time course of ethanol-induced changes in serotonin metabolism. *Life Sci* 1993;53:847-55.
13. Helander A, Beck O, Jones AW. Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin Chem* 1996;42:618-24.
14. Helander A, von Wachenfeldt J, Hiltunen A, Beck O, Liljeberg P, Borg S. Comparison of urinary 5-hydroxytryptophol, breath ethanol, and self-report for detection of recent alcohol use during outpatient treatment: a study on methadone patients. *Drug Alcohol Depend* 1999;56:33-8.
15. Helander A, Wikström T, Löwenmo C, Jacobsson G, Beck O. Urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 5-hydroxytryptophol after oral loading with serotonin. *Life Sci* 1992;50:1207-13.
16. Helander A, Beck O, Jones AW. Urinary 5-HTOL/5-HIAA as biochemical marker of postmortem ethanol synthesis. *Lancet* 1992;340:1159.
17. O'Neal CL, Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review. *Am J Forensic Med Pathol* 1996;17:8-20.
18. Helander A, Beck O, Jones AW. Distinguishing ingested ethanol from microbial formation by analysis of urinary 5-hydroxytryptophol and 5-hydroxyindoleacetic acid. *J Forensic Sci* 1995;40:95-8.

SUMMARY

Forensic applications of 5-hydroxytryptophol – a marker of acute alcohol consumption

Anders Helander, A Wayne Jones

Läkartidningen 2002;99:3950-4

The concentration of ethanol in blood and urine provides important evidence in criminal and civil litigation when alcohol-related crimes are investigated (e.g., drunk driving). The determination of ethanol in body fluids is a routine procedure at forensic chemistry and toxicology laboratories and when gas chromatographic methods are used accurate and precise results are obtained. However, the risk for artifactual formation of ethanol, especially in postmortem specimens, always needs to be considered. The ratio of 5-HTOL/5-HIAA in urine provides a useful way to distinguish between ethanol produced after death, or generated in vitro after sampling, from the ethanol consumed. This article describes the application of the 5-HTOL/5-HIAA ratio as a biochemical marker for acute alcohol intake in various forensic situations. Examples include suspected drunk drivers, rape victims, and medico-legal autopsies where forensic ethanol analysis is requested.

Correspondence: Anders Helander, Alcohol Laboratory, L7:03, Karolinska Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden

Särtryck Läkartidningen

Kunskaperna om lungcancers biologi har ökat väsentligt på senare år, vilket innebär nya möjligheter för både prevention och behandling. Kombinationen av flera terapeutiska principer innebär bot, eller lindring, för fler patienter.

Sex artiklar ger överblick över möjligheter och begränsningar med dagens terapimetoder. De har nu samlats i ett 36-sidigt häfte som kan beställas med kupongen nedan.

Priset är 50 kronor

Lungcancer



Beställer härmed.....ex
av "Lungcancer"

.....
namn

.....
adress

.....
postnummer

.....
postadress

Insändes till Läkartidningen
Box 5603
114 86 Stockholm

Faxnummer: 08-20 74 35

www.lakartidningen.se
under särtryck, böcker