

Sviluppo e validazione di metodi analitici avanzati per il monitoraggio di biomarcatori dell'abuso alcolico e applicazione su campioni reali di pazienti oncologici

S. Gariglio^{1*}, A. Mattia², M. C. David², M. Massano¹, M. Vincenti¹, A. Salomone¹

¹ Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

² Ministero dell'Interno, Dipartimento della Pubblica Sicurezza, Direzione Centrale di Sanità, Centro di Ricerche e Laboratorio di Tossicologia Forense, Roma, Italy

* Presenting author, sara.gariglio@edu.unito.it

Nel panorama scientifico e legislativo odierno, dove lo studio delle abitudini di consumo di alcol di un individuo si fa sempre più importante, è cruciale disporre di marker diretti, sensibili e a lungo termine per la valutazione del consumo di alcol del soggetto, possibilmente associati ad un metodo di campionamento semplice e non invasivo. Infatti, soprattutto nell'ambito della visita alcolica, disporre di dati analitici è di grande supporto al personale medico per giungere ad una diagnosi adeguata. In questo contesto si inserisce il presente lavoro, che si propone di sviluppare ed ottimizzare metodi analitici avanzati per la valutazione del consumo di alcol a lungo termine attraverso la quantificazione due diversi marcatori diretti di abuso alcolico, l'etilglucuronato nei capelli ed il fosfatidiletanolo nel sangue, e quindi di comparare le performance diagnostiche dei due marcatori sia separatamente sia combinati applicando i metodi sviluppati su campioni reali. Le applicazioni si aprono infine al campo clinico, con l'utilizzo dei due metodi sviluppati per la valutazione della correlazione tra consumo di alcol e sviluppo di neoplasie delle vie aeree e digestive superiori.

Inizialmente, si è ottimizzato e validato presso i laboratori della Direzione Centrale di Sanità della Polizia di Stato a Roma un metodo di analisi in GC-EI-MS/MS per l'analisi dell'etilglucuronato (EtG) in matrice cheratinica. L'ottimizzazione è stata realizzata attraverso un design sperimentale a tre fattori su due livelli, in cui si è valutato l'effetto di ogni fattore preso singolarmente ed in combinazione con gli altri [1]. Questa valutazione ha portato a concludere che la tipologia di disgregazione della matrice e le modalità di estrazione sono fortemente correlate tra loro, mostrando che un'estrazione più blanda, a 50°C in sonicatore per due ore, è sufficiente ad ottenere il massimo recupero quando la disgregazione è stata fatta con il mulino a palle, mentre quando è stata fatta manualmente con le forbici un'estrazione per tutta la notte a 60°C è necessaria. La disgregazione con mulino a palle risulta comunque essere la migliore indipendentemente dalla tipologia di estrazione, ed è quindi da preferirsi alla polverizzazione manuale. Le conclusioni tratte sono in accordo con le linee guida della Society of Hair Testing [2] e con la maggior parte della letteratura precedente sull'argomento [3] [4] [5] [6]. Tuttavia, in questo caso il metodo è stato validato utilizzando la disgregazione manuale, per risolvere problemi di interferenza spettrale che sono emersi per i campioni sminuzzati con il mulino a palle, probabilmente dovuti all'estrazione di altre componenti del capello.

Il metodo ottenuto, con un limite di rilevabilità (LOD) di 4 pg/mg, un limite di quantificazione (LOQ) di 6 pg/mg ed un range di linearità da 6 a 60 pg/mg, è stato applicato su 59 campioni reali di capelli. I risultati hanno permesso di suddividere i soggetti in quattro gruppi, come mostrato dalla Figura 1:

1. Astinenti e bevitori sporadici: consumo di meno di 5 unità alcoliche a settimana;

2. Bevitori sociali: consumo tra 5 e 15 unità alcoliche alla settimana;
3. Bevitori moderati: consumo tra 15 e 25 unità alcoliche alla settimana;
4. Bevitori forti: consumo di oltre 25 unità alcoliche alla settimana;

Non è stato possibile distinguere gli astinenti dai consumatori sporadici di alcol (< 5 unità alla settimana).

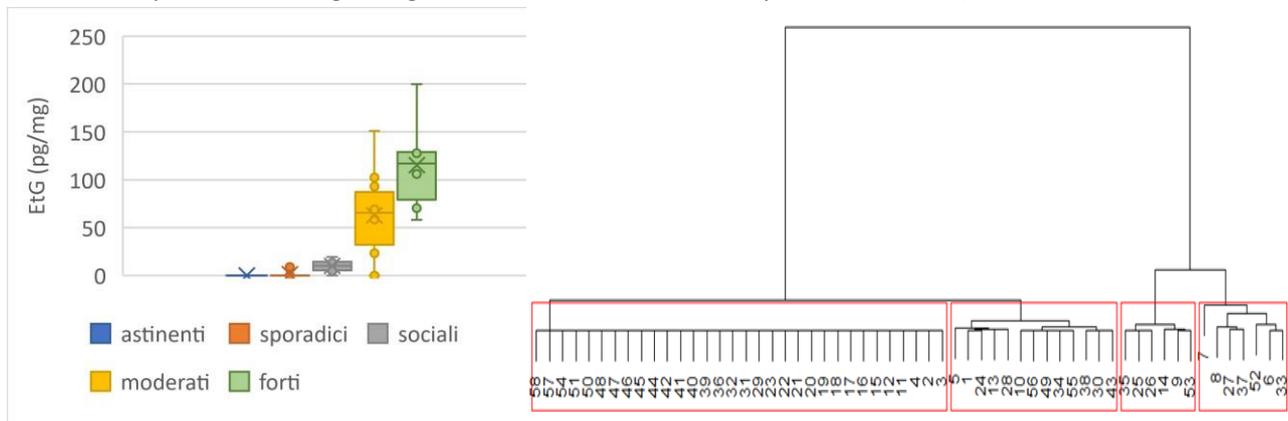


Figura 1 Digramma a scatola e baffi (a sinistra) e dendrogramma risultato dall'analisi dei cluster (a destra) risultanti dall'analisi dei campioni reali per l'EtG. Le classi indicate nel diagramma 1 sono state ricavate attraverso un questionario di autovalutazione compilato dai soggetti.

L'impossibilità di distinguere tra astinenti e bevitori sociali è da ascrivere alle prestazioni in termini di LOQ di 6 pg/mg, maggiore sia del cutoff di astinenza proposto in letteratura (1-2 pg/mg) [7], sia del valore di 5 pg/mg suggerito dalla SoHT [2] come valore non in contraddizione con l'astinenza. È interessante invece la possibilità di distinguere tra bevitori moderati e forti, cosa che è stata fatta con l'utilizzo sia di un diagramma a scatola e baffi sia di un'analisi dei cluster. Questa conclusione potrebbe portare a suggerire l'inserimento di un nuovo intervallo di consumo all'interno dei bevitori cronici di alcol, classificando i soggetti con $20 \text{ pg/mg} < \text{hEtG} < 70 \text{ pg/mg}$ come bevitori cronici non eccessivi di alcol, e i soggetti con $\text{hEtG} > 70 \text{ pg/mg}$ come bevitori eccessivi cronici.

Accanto al più conosciuto EtG, un nuovo biomarcatore diretto di abuso alcolico sta emergendo negli ultimi anni: il fosfatidiletanolo. Questa molecola viene sintetizzata direttamente nel sangue e quindi inglobata nella parete cellulare dei globuli rossi, ed è perciò utilizzata per la valutazione del consumo di alcol a medio e lungo termine [8] [9]. Una delle potenzialità di questo marcatore è che può essere rilevato anche con la tecnica del Dried Blood Spot (DBS) a partire da sangue capillare, fattore che rende appetibile l'analisi per un'applicazione più vasta data la non invasività, la facilità di campionamento, trasporto e conservazione dei campioni. L'utilizzo della tecnica DBS risulta anzi essere migliore dell'analisi diretta del fosfatidiletanolo su sangue intero, dal momento che la deposizione ed essiccazione immediata del campione subito dopo il prelievo permette di evitare la formazione secondaria di fosfatidiletanolo post-prelievo, grazie all'immediata evaporazione dell'alcol eventualmente presente nel sangue [10].

Un metodo di analisi in UHPLC-ESI-MS/MS è stato quindi sviluppato ed ottimizzato per l'analisi di questa molecola a partire da DBS. Successivamente, il metodo è stato applicato su 34 campioni reali provenienti da soggetti volontari. I campionamenti sono stati fatti in parte su sangue capillare ed in parte a partire da sangue venoso precedentemente conservato (per 0-200 giorni) in provetta per sangue intero contenenti EDTA. I risultati ottenuti, sintetizzati in Figura 2, hanno permesso di dividere i soggetti in due gruppi:

1. Astinenti o bevitori deboli: consumo di alcol inferiore a 15 unità alcoliche alla settimana;
2. Bevitori moderati e forti: consumo di alcol superiore a 15 unità alcoliche alla settimana

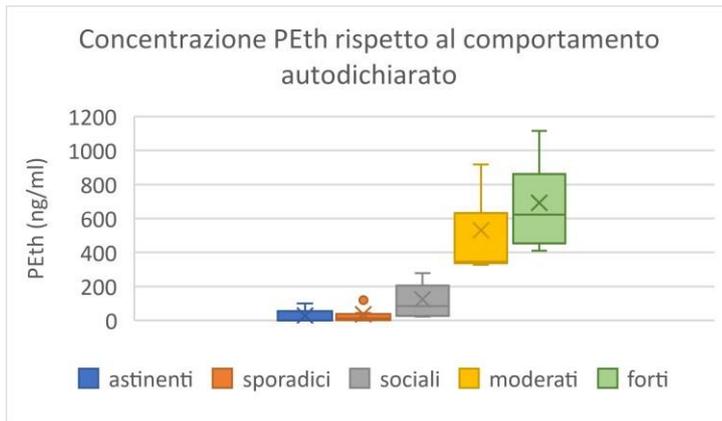


Figura 2: Box and whiskers plot ottenuto dall'analisi del fosfatidiletanolo

da zero, la produzione di fosfatidiletanolo post prelievo è proporzionale alla quantità di alcol presente nel sangue. È quindi possibile concludere che per l'analisi del fosfatidiletanolo sia preferibile l'utilizzo di campioni di sangue capillare, ed in caso di utilizzo di campioni di sangue intero la deposizione su DBS debba avvenire subito dopo il campionamento. Le peggiori performance nella categorizzazione dei soggetti ottenute per questo biomarcatore possono probabilmente essere attribuite anche al fatto che la popolazione utilizzata per lo studio del fosfatidiletanolo su casi reali è stata quasi la metà rispetto a quella per lo studio dell'EtG, e che la prevalenza dei campioni era costituita da astinenti o bevitori sporadici.

Un approfondimento futuro dello studio utilizzando solo campioni di sangue capillare e ampliando la popolazione è auspicabile, per migliorare il confronto con altri metodi per l'analisi del consumo di alcol. È stato comunque possibile individuare a 270 ng/ml un cutoff accettabile per distinguere tra i soggetti che fanno un uso cronico di alcol e quelli che ne fanno un uso saltuario. L'individuazione di un valore soglia che identifichi il consumo ripetuto di alcoli è quanto mai importante nell'analisi del fosfatidiletanolo dal momento che, a differenza di quanto avviene per l'EtG, non esiste ad oggi un cutoff universalmente accettato.

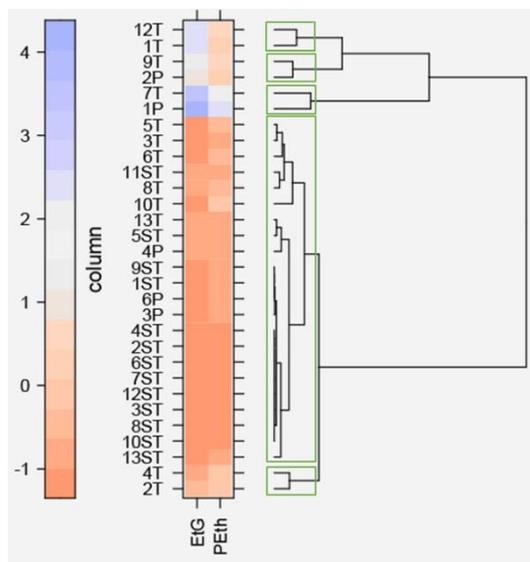


Figura 3: dendrogramma ottenuto dall'analisi dei cluster in due variabili. Colore blu indica un valore alto del marcatore, viceversa il rosso indica un valore inferiore al cutoff. La somiglianza di colore tra i due marcatori indicano la concordanza dei valori forniti.

All'interno del primo gruppo, è possibile distinguere i bevitori astinenti e sporadici (entro le 5 unità alcoliche alla settimana) dai bevitori sociali (tra 5 e 15 unità alcoliche alla settimana), anche se con una bassa confidenza statistica ($0,1 < p < 0,5$).

Dall'analisi dei dati è stato possibile osservare che gli outliers presenti nei gruppi derivano dai soggetti per cui è stato analizzato sangue venoso: come già riportato in letteratura [11], infatti, quando il sangue venoso viene prelevato in condizioni di alcolemia diversa

Il lavoro è quindi proseguito con un'analisi in parallelo di fosfatidiletanolo ed etilglucuronato su 30 soggetti, con lo scopo di valutare se lo studio combinato dei due marcatori abbia un effetto positivo, migliorando la possibilità di distinguere i soggetti in classi fini di consumo alcolico. Nonostante il numero ridotto di soggetti inseriti nello studio e nonostante l'utilizzo anche in questa fase di campioni di sangue sia capillare sia venoso, i risultati sono stati più soddisfacenti di quelli ottenuti con il solo fosfatidiletanolo. Si può quindi ipotizzare che l'utilizzo di sangue venoso sia in effetti un fattore confondente nell'analisi del fosfatidiletanolo, e che unire alle informazioni ottenute da questo marcatore quelle ottenute dall'etilglucuronato permetta di diminuire questo effetto. Infatti, è stato possibile differenziare con buona confidenza statistica tre classi di bevitori, contro le due ottenute con il solo fosfatidiletanolo:

1. Astinenti e bevitori sporadici, ovvero soggetti che consumano fino a 5 unità alcoliche alla settimana;
2. Bevitori sociali, ovvero soggetti che consumano tra 5 e 15 unità alcoliche alla settimana;
3. Bevitori cronici, ovvero soggetti che consumano più di 15 unità alcoliche alla settimana;

Questi risultati, ottenuti sia da un diagramma a scatola e baffi sia da un'analisi dei cluster in due variabili (Figura 3), sono promettenti, e permettono di auspicare che, estendendo lo studio ad un maggior numero di campioni e utilizzando solo sangue capillare per l'analisi del PEth, sia possibile riuscire a suddividere i soggetti correttamente nelle cinque classi previste dallo studio (astinenti, bevitori sporadici, bevitori sociali, bevitori moderati e bevitori forti). Infatti, la miglior sensibilità del fosfatidiletanolo nel distinguere bevitori sporadici ed astinenti, come già precedentemente riportato in letteratura [12], e l'apparente migliore sensibilità dell'EtG nel discriminare tra consumatori cronici non eccessivi e soggetti dipendenti da alcol, potrebbero permettere, combinati in un unico coefficiente numerico, di fornire al clinico un dato di semplice interpretazione e fortemente indicativo del consumo di alcol del soggetto.

La fase finale è consistita nell'applicazione di entrambi i metodi di analisi su campioni di soggetti oncologici affetti da tumori delle vie aeree e digestive superiori (UADT). In questa fase, la tipologia di neoplasia è stata correlata al consumo di alcol, indicato dai valori di EtG e PEth. È stato possibile riscontrare, oltre ad una elevata prevalenza di soggetti di sesso maschile tra gli individui affetti da UADT, una prevalenza di soggetti consumatori forti (EtG > 30 pg/mg, PEth > 270 ng/ml) di alcol tra gli individui affetti da tumore alla lingua. Al contrario, le altre tipologie di tumore sembrano essere indifferenti al consumo di alcol, avendo un'incidenza pari tra consumatori forti e deboli (tumori all'ipofaringe) o un'incidenza maggiore tra i non consumatori (tumori a laringe e orofaringe). Nonostante sia doveroso tenere presente che tutti i soggetti partecipanti allo studio fossero fumatori, fattore che potrebbe rappresentare un importante elemento confondente, è comunque interessante notare che la tipologia di tumore maggiormente legata all'alcol è proprio quella alla lingua, il settore, tra quelli analizzati, con cui l'alcol ha un contatto diretto per un tempo maggiore durante l'ingestione.

Il lavoro dimostra come la combinazione di diversi marcatori di abuso alcolico permetta di ottenere un solo valore con maggior valenza analitica, che oltre essere potenzialmente di aiuto nella diagnosi di abuso alcolico nell'ambito della visita alcolologica può anche essere esteso ad altri campi di applicazione, come quello clinico. Un ampliamento dello studio in questione su un maggior numero di campioni, soprattutto nella fase di comparazione dei biomarcatori, è auspicabile per confermare i risultati ottenuti.

Bibliografia

- [1] D. C. Mountgomery, *Design and Analysis of Experiments - Eight edition*, Wiley, 2013.
- [2] Society of Hair Testing (SoHT), «Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption.,» pp. 1-2, 2019.
- [3] C. Vignali, S. Ortu, C. Stramesi, F. Freni, M. Moretti, L. Tajana, A. Osculati, A. Groppi e L. Morini, «Variability on ethyl glucuronide concentrations in hair depending on sample pretreatment, using a new developed GC-MS/MS method.,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 159, 2018.
- [4] M. Albermann, F. Musshoff, L. Aengenheister e B. Madea, «Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method.,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403, n. 3, pp. 769-776, 2012.

- [5] A. Salomone, M. Baumgartner, T. Lombardo, E. Alladio, D. Di Corcia e M. Vincenti, «Effects of various sample pretreatment procedures on ethyl glucuronide quantification in hair samples: comparison of positivity rates and appraisal of cut-off values,» 2016.
- [6] A. Mueller, H. Jungen, S. Iwersen-Bergmann, L. Raduenz, S. Lezius e H. Andresen-Streichert, «Determination of ethyl glucuronide in human hair samples: a multivariate analysis of the impact of extraction conditions on quantitative results,» *Forensic Sci. Int.*, 2017.
- [7] V. Pirro, D. Di Corcia, F. Seganti, A. Salomone e M. Vincenti, «Determination of ethyl glucuronide levels in hair for the assessment of alcohol abstinence,» *Forensic Science International*, vol. 232, pp. 229-236, 2013.
- [8] N. Hill-Kapturczak, D. Dougherty, J. Roache, T. Karns-Wright, M. Lopez-Cruzan e M. Javors, «Phosphatidylethanol Homologs in Blood as Biomarkers for the Time Frame and Amount of Recent Alcohol Consumption,» in *Neuroscience of Alcohol*, Elsevier, 2019, pp. 567-576.
- [9] N. Kummer, A.-S. Ingels, S. Wille, C. Hanak, P. Verbanck, W. Lambert, N. Samyn e C. Stove, «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,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, n. 3, pp. 825-838, 2016.
- [10] O. Beck, N. Kenan Modén, S. Seferaj, G. Lenk e A. Helander, «Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device.,» *Clinica Chimica Acta*, vol. 479, p. 38–42, 2018.
- [11] A. Schröck, A. Henzi, P. Bütikofer, S. König e W. Weinmann, «Determination of the formation rate of phosphatidylethanol by phospholipase D (PLD) in blood and test of two selective PLD inhibitors.,» *Alcohol*, vol. 73, p. 1–7, 2018.
- [12] P. Bendroth, R. Kronstrand, A. Helander, J. Greby, N. Stephanson e P. Krantz, «Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse.,» *Forensic Science International*, vol. 176, p. 76–81, 2008.