

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BRANKA SVETIC

MAGISTRSKA NALOGA

BIOMEDICINA

LJUBLJANA, 2013

*Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo*



BRANKA SVETIC

**PROUČEVANJE VPLIVA IZBRANIH POLIMORFIZMOV
V GENIH ZA ADH IN HTR1B NA TVEGANJE ZA NASTANEK
SINDROMA ODVISNOSTI OD ALKOHOЛА TER POVEZANOST
POLIMORFIZMOV *ADH* Z OBSTOJEČIMI BIOKEMIČNIMI
KAZALCI ALKOHOLIZMA**

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF SELECTED POLYMORPHISMS
IN GENES FOR ADH AND HTR1B ON THE RISK OF ALCOHOL DEPENDENCE
AND THE RELATIONSHIP OF *ADH* POLYMORPHISMS WITH WELL-
ESTABLISHED BIOCHEMICAL MARKERS FOR ALCOHOLISM

LJUBLJANA, 2013

V okviru magistrske naloge sem meritve biokemičnih analitov opravila v laboratorijih Splošne bolnišnice Jesenice, Psihiatrične bolnišnice Idrija in Zdravstvenega doma Domžale, pod mentorstvom doc. dr. Ivice Avberšek-Lužnik mag. farm., spec. med. biokemije. Izolacijo DNA in genotipizacijo izbranih polimorfizmov pa sem izvedla v laboratoriju Katedre za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo in laboratoriju podjetja Omega d.o.o. pod somentorstvom asist. dr. Irene Prodan-Žitnik mag. farmacije.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Ivice Avberšek Lužnik mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan-Žitnik, mag.farm.

ZAHVALA

Mentoricama, doc. dr. Ivici Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem. in asist. dr. Ireni Prodan-Žitnik mag. farm. se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in pripravljenost vložiti svoj, nemalokrat prosti čas, za pregledovanje besedila in usmerjanje pri pisanku naloge.

Zahvaljujem se spoštovani prof. dr. Janji Marc mag. farm, spec. med. biokem., predstojnici Katedre za klinično biokemijo, da je podprla idejo za mag. nalogo in vsem zaposlenim na Katedri, ki so me prijazno sprejeli in mi pomagali pri laboratorijskem delu.

Moja zahvala gre tudi zdravnicam Heleni Gantar-Štular dr.med., spec. psihiatrije iz PB Begunje, Sandri Tušar dr. med., spec. kirurgije iz SB Jesenice in Emiliji Pirc Ćurić dr. med., spec. MDPŠ za sodelovanje pri zbiranju vzorcev. Brez podpore klinikov naloge ne bi mogli izvesti.

Dr. Nataši Toplak in podjetju Omega d.o.o. se zahvaljujem za tehnično pomoč pri izvedbi genotipizacije izbranih polimorfizmov.

Vodji Medicinsko-kemičnega laboratorija PB Idrija dr. Bojani Križaj spec. med. biokem. hvala, da nam je omogočila izvedbo meritev ELF testa.

Zahvala vsem, ki ste bili pripravljeni podpreti laboratorijsko izvedbo naloge.

Brez podpore družine ne gre. Luka, Blaž, Robert, hvala.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	10
1.1 PRESNOVNA POT ALKOHOLA V TELESU	11
1.2 BIOKEMIJSKI OZNAČEVALCI ZA ODKRIVANJE IN ZDRAVLJENJE ALKOHOLIZMA.....	13
1.2.1 Označevalci kronične odvisnosti od alkohola	14
1.2.1.1 Transferin z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov.....	14
1.2.1.2 Gamaglutamilna transferaza.....	14
1.2.1.3 Transaminaze	15
1.2.1.4 Glutamatna dehidrogenaza	15
1.2.1.5 Povprečni volumen eritrocitov.....	16
1.2.2 Označevalci za spremljanje abstinence in recidivov.....	16
1.2.2.1 Etanol.....	16
1.2.2.2 Etilglukoronid in etilsulfat.....	16
1.2.2.3 Etilni estri maščobnih kislin.....	17
1.2.2.4 Fosfatidiletanol	17
1.2.2.5 Acetaldehid.....	17
1.2.2.6 5-hidroksitriptofol.....	17
1.3 VPLIV PRETIRANEGA UŽIVANJA ALKOHOLA NA JETRA	18
1.3.1 ELF test za oceno stopnje jetrne fibroze	19
1.3.1.1 Hialuronska kislina	20
1.3.1.2 Amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III	20
1.3.1.3 Tkivni inhibitor metaloproteinaze 1	20
1.4 GENETSKI DEJAVNIKI ODDISNOSTI OD ALKOHOLA	21
1.4.1 Polimorfizmi v genih za alkoholno dehidrogenazo.....	21
1.4.2 Polimorfizmi v genu za serotonininski receptor 1B	23
1.4.2.1 Serotonininski sistem	23
1.4.2.2 Serotonininski receptor 1B	24
2 NAMEN DELA.....	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 OPIS PREISKOVANCEV	27
3.2 OPIS VZORCEV	27
3.2.1 Vzorci polne krvi in serum	27
3.3 MERJENJE BIOKEMIČNIH KAZALCEV ALKOHOLIZMA	28
3.3.1 Merjenje povprečnega volumna eritrocitov v polni krvi.....	28
3.3.2 Določanje katalitične aktivnosti AST v serumu.....	29
3.3.3 Določanje katalitične aktivnosti ALT v serumu	30
3.3.4 Določanje katalitične aktivnosti encima GGT v serumu	30
3.4 TEST ZA OCENO JETRNE FIBROZE	31
3.4.1 Določanje koncentracij posameznih parametrov ELF testa	32
3.4.1.1 Določanje koncentracije hialuronske kisline.....	33
3.4.1.2 Določanje koncentracije amino-terminalnega propeptida prokolagena tipa III... ..	33
3.4.1.3 Določanje koncentracije tkivnega inhibitorja metaloproteinaze - 1	34

3.5 ANALIZA DNA	35
3.5.1 Izolacija in kvantifikacija DNA iz polne krvi	35
3.5.2 Določitev alelne diskriminacije s PCR v realnem času.....	36
3.6 STATISTIČNA ANALIZA.....	39
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	41
4.1 MERILA ZA IZBOR PREISKOVANCEV	41
4.2 OCENA JETRNE FUNKCIJE Z BIOKEMIJSKIMI PARAMETRI	43
4.2.1 Merjenje serumskih koncentracij biomarkerjev alkoholizma	43
4.3 OCENA JETRNE FUNKCIJE Z ELF TESTOM	44
4.3.1 Primerjava uveljavljenih označevalcev alkoholizma z ELF testom.....	45
4.4 KORELACIJA MED OZNAČEVALCI ALKOHOLIZMA IN ELF TESTOM	48
4.4.1 Klinična uporabnost ELF testa	50
4.5 IZOLACIJA DNA	51
4.6 REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	51
4.6.1 Genotipozacija polimorfizmov v genih za ADH.....	51
4.6.2 Genotipizacija polimorfizmov v genu za HTR1B.....	54
4.7 ALELNE FREKVENCE PREISKOVANIH POLIMORFIZMOV PRI SLOVENSKI POPULACIJI IN PRIMERJAVA Z OSTALIMI POPULACIJAMI	55
4.7.1 Uporabnost določanja genetskega tveganja za razvoj odvisnosti od alkohola.....	59
5 SKLEPI	60
6 LITERATURA	62

POVZETEK

Prekomerno pitje alkohola je v današnji družbi razširjeno in povezano z negativnimi socialnimi in zdravstvenimi posledicami. Ker kronično uživanje alkohola povzroča okvare vseh organov in organskih sistemov človeškega telesa, je zdravljenje alkoholizma drag zdravstveni problem. Pri odkrivanju, zdravljenju in spremljanju alkoholizma so diagnostično uporabni biokemijski označevalci, ki so pokazatelji patoloških učinkov etanola in njegovih presnovkov. Na razvoj odvisnosti od alkohola pa vplivajo poleg okoljskih tudi genetski dejavniki, ki zvišujejo ali pa znižujejo tveganje za alkoholizem pri posamezniku.

Namen našega dela je bil usmerjen v iskanje povezave med že uveljavljenimi označevalci alkoholizma (AST, ALT, GGT, MCV) in novejšim ELF (Enhanced Liver Fibrosis) testom za odkrivanje in ocenjevanje stopnje jetrne fibroze. Raziskati smo želeli tudi povezavo med alkoholizmom in izbranimi polimorfizmi v genih za alkoholno dehidrogenazo (ADH) in za serotoninski receptor 1B (HTR1B), zato smo določili njihove genotipske in alelnе frekvence pri preiskovancih treh različnih skupin in jih primerjali.

V raziskavo smo vključili 164 preiskovancev: 90 preiskovancev iz ambulante medicine dela, prometa in športa (MDPŠ), 31 preiskovancev z akutno zastrupitvijo z alkoholom (AZA) in 43 bolnikov z diagnozo odvisnosti od alkohola (DOA). Vsem preiskovancem smo z rutinskimi metodami izmerili jetrne encime: AST, ALT, GGT in povprečni volumen eritrocitov (MCV). 39 preiskovancem skupine MDPŠ in 43 bolnikom skupine DOA smo na imunološkem analizatorju Siemens Centaur CP izvedli meritve treh parametrov ELF testa (hialuronske kisline, amino-terminalnega propeptida prokolagena tipa III in tkivnega inhibitorja metaloproteinaze 1). Na izolirani DNA vseh 164 preiskovancev smo določili izbrane polimorfizme: polimorfizem rs1229984 v genu za ADH1B, polimorfizma rs 1693482 in rs698 v genu za ADH1C, polimorfizma rs1800759 in rs1042364 v genu za ADH4 ter polimorfizma rs11568817 in rs130058 v genu za HTR1B.

Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili statistični program SPSS 21.0 za Windows okolje (SPSS, Inc. Chicago, USA). Za ugotavljanje porazdelitve polimorfizmov po Hardy-Weinbergerjevem ravnotežju smo uporabili χ^2 test in Fischer exact test za primerjavo alelnih frekvenc polimorfizmov med preiskovanci DOA in MDPŠ.

Rezultati meritev so pokazali, da so aktivnosti encimov (AST, GGT) in MCV značilno višje pri bolnikih z DOA v primerjavi s preiskovanci MDPŠ in AZA ($p<0,002$). Rezultati

primerjave med izmerjenimi koncentracijami označevalcev alkoholizma in ELF testom so pokazali statistično značilne razlike za vse preiskovane parametre pri kontrolni skupini MDPŠ in pri bolnikih DOA ($p<0,05$). Dokazali smo korelacijo med izmerjenimi katalitičnimi aktivnostmi encimov AST, ALT in GGT in koncentracijami parametrov ELF testa (hialuronsko kislino, amino terminalnim propeptidom prokolagena tipa III, tkivnim inhibitorjem metaloproteinaze 1) ter oceno stopnje jetrne fibroze v skupini DOA.

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da bi bilo potrebno dodatno proučiti in ovrednotiti uporabo ELF testa pri bolnikih z diagnozo odvisnosti od alkohola ob vključitvi v proces zdravljenja in pri spremljanju terapije. Njegova uporabnost se širi na raven zgodnejšega odkrivanja posameznikov s tveganjem za nastanek kronične jetrne bolezni.

Na vzorcu slovenske populacije smo prvi določali prisotnost izbranih polimorfizmov v genih za ADH in HTR1B, ki so kandidatni geni za tveganje nastanka odvisnosti od alkohola. Dokazali smo nizko frekvenco ali odsotnost genotipov (genotip A-A) v genih za ADH1B in ADH4, ki zmanjšujejo tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola. Alelne frekvence za polimorfizma rs1229984 v *ADH1B* ($p<0,009$) in rs1800759 v *ADH4* ($p<0,025$) se statistično značilno razlikujejo med kontrolno skupino MDPŠ in skupino odvisnikov od alkohola. Genotipska frekvenca, ki naj bi povečevala tveganje za pretirano in škodljivo pitje v popolno povezanih polimorfizmih gena za ADH1C (rs1693482/rs698) je pri slovenski populaciji nizka in znaša 13,3% v skupini MDPŠ in 18% pri bolnikih DOA. Dobljene ugotovitve se ujemajo s podatki v študijah na kavkazijski populaciji. Alelna frekvenca za mutiran alel (T alel) v polimorfizmu rs130058 v genu za HTR1B, ki naj bi imel zaščitno vlogo pri tveganju za nastanek odvisnosti od alkohola, je pri slovenski populaciji visoka in prisotna pri preiskovancih MDPŠ z alelno frekvenco 74% in pri bolnikih z DOA z alelno frekvenco 67,4%. V literaturi nismo našli potrditve za ta izsledek in bi ga bilo potrebno potrditi na večjem populacijskem vzorcu. Vpliva polimorfizmov v genih za ADH na stopnjo jetrne fibroze v skupini odvisnikov od alkohola nismo dokazali. Glavno omejitev pri naši raziskavi predstavlja nizko število vključenih preiskovancev.

ABSTRACT

Excessive use of alcohol is highly prevalent in the modern society and it is associated with negative social and health consequences. Since chronic alcohol use damages all organs and organ systems in the human body, the costs of managing alcoholism are high. Biochemical markers that indicate the pathological effects of alcohol and its metabolites are useful in diagnosing, managing and monitoring alcoholism. The development of alcohol dependence is influenced by environmental and genetic factors that render an individual more susceptible to alcoholism.

The aim of our study was to investigate the associations between the well-established biochemical markers of alcoholism (AST, ALT, GGT, MCV) and the more recent ELF (Enhanced Liver Fibrosis) test for detecting the presence and assessing the degree of liver fibrosis. We intended to assess the association between alcoholism and the selected polymorphisms in the alcohol dehydrogenase (*ADH*) and serotonin receptor 1B (*HTR1B*) genes, therefore we determined their genotype and allele frequency in three different groups of Slovene population.

We included 164 individuals in the study: 90 individuals that were recruited from the occupational health (OH) clinic, 31 individuals that were treated for acute intoxication (AI) with alcohol, and 43 individuals with chronic alcohol dependence (AD). The following tests were performed in all participants using routine methods: AST, ALT, GGT, and average volume of erythrocytes (MCV). In 39 individuals recruited from OH clinic and 43 individuals with AD we also determined the three parameters of the ELF test (hyaluronic acid, amino-terminal propeptid of type III procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase 1). DNA was isolated and the following polymorphisms were determined in all 164 participants: polymorphism rs1229984 in *ADH1B* gene, polymorphisms rs 1693482 and rs698 in *ADH1C* gene, polymorphisms rs1800759 and rs 1042364 in *ADH4* gene, polymorphisms rs11568817 and rs130058 in *HTR1B* gene. Statistical package SPSS 21.0 for Windows (SPSS, Inc. Chicago, USA) was used for statistic analysis. To determine the distribution of polymorphisms according to the Hardy-Weinberg equilibrium, we used the χ^2 test. Fischer exact test was used to compare the frequencies of the allele polymorphisms in the participants from OH and individuals with AD.

The biochemical tests showed that the enzyme activities (AST, GGT) and MCV were significantly higher in the individuals with AD compared to the OH and AI groups

($p<0,002$). The results of the comparison between the measured concentrations of markers of alcoholism and ELF test showed statistically significant differences in all biochemical parametres in the OH and AD group ($p<0,05$).

We have established a correlation between the assessed values of catalytic activity of the enzymes AST, ALT, and GGT and the concentrations of the parameters of the ELF test (hyaluronic acid, amino-terminal propeptid of type III procollagen and tissue inhibitor of metaloproteinase 1) and the assessed degree of liver fibrosis in the AD group.

On the basis of these results we conclude that the ELF test should be studied further and its use evaluated in the patients diagnosed with alcohol dependency when starting treatment and during follow-up. It seems to be promising for the use in primary health care for early detection of individuals at risk to develop chronic liver disease.

We were the first to investigate the presence of selected polymorphisms in the ADH and HTRB1 genes that are candidate genes that increase the risk of alcohol dependency in the Slovene population. In the investigated Slovene population sample we showed low frequencies or absence of genotypes (genotype A-A) in ADH1B and ADH4 genes that decrease the risk for alcohol dependence. Allele frequency for polymorphisms rs1229984 in *ADH1B* gene ($p<0,009$) and rs1800759 in *ADH4* gene ($p<0,025$) differed significantly between control group and AD.

The frequency of the genotype for almost complete linkage polymorphisms in *ADH1C* gene (rs1693482/rs698) that is supposed to increase the risk of excessive and harmful alcohol consumption is low in the Slovene population, with 13.3% in the OH group and 18% in the AD group. The observed results are in line with other studies in the Caucasian population.

Allele frequency of the mutant allele (T allele) in one of the polymorphisms in the *HTR1B* gene (rs130058) that is thought to have a protective role, was high in the Slovenian population, with 74% in the OH group and 67.4% in the AD group. We have not found any similar results in the available literature, so these findings need to be replicated. We have not shown any influence of the *ADH* gene polymorphisms on the degree of liver fibrosis in the AD group. The main limitation of our study was the low number of participants.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	adenin	HABP	vezalni protein za hialuronsko kislino
C	citozin	HER	1-hidroksi etil radikal
ADH	alkoholna dehidrogenaza	HIAA	hidroksi-indol-ocetna kislina
αKG	alfa-ketoglutarat	HSC	zvezdaste celice
ALDH	aldehidna dehidrogenaza	5-HT	5-hidroksi triptamin (serotonin)
ALT	alanilna aminotransferaza	5-HTOL	5-hidroksi triptofol
APRI	razmerje aspartatne aminotransferase in trombocitov (AST to platelet index)	HTR1B	hidroksi triptamin receptor 1 B
AS	slovenski alkoholiki	HWD	Hardy-Weinberg disequilibrium (neravovesje)
AST	aspartatna aminotransferaza	HWE	Hardy-Weinberg equilibrium (ravovesje)
AZA	akutna zastrupitev z alkoholom	IFCC	International federation of clinical chemistry
CDT	transferin z zmanjšanim deležem ogljikohidratov	K3EDTA	kalijev etilendiamintetraocetna kislina
CYP2E1	citokrom P450 2E1	LD	linkage disequilibrium
CŽS	centralni živčni sistem	MCV	povprečni volumen eritrocitov
CHC	kronični hepatitis C	MDH	malatna dehidrogenaza
ECM	izvencelični matriks	MDPŠ	medicina dela prometa in športa
ELF	Enhance Liver Fibrosis (stopnja jetrne fibroze)	MEOS	mikrosomalni etanol oksidirajoči sistem
FAEE	etilni estri maščobnih kislin	NAB	brazilski nealkoholiki
FITC	florescein izotiocianat	NAS	slovenski alkoholiki
FRET	Försterjev prenos resonančne energije	NAD(H)	nikotinamid adenin dinukleotid
GABA	gama amino maslena kislina		
GCNA	gama-glutamil-3-karboksi-4-nitranilid		
GGT	gama-glutamilna transferaza		
HA	hialuronska kislina		

NFLD	nealkoholna jetrna bolezen	SNP	single nucleotid polymorphisem
PA	fosfatidna kislina	SOD	superoksid dismutaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo	SZO	svetovna zdravstvena organizacija
PLD	fosfolipaza D	T	timin
P5P	piridoksal-5-fosfat	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PIIINP	amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III	TIMP-1	tkivni inhibitor metaloproteinaze 1
R	reporter	TNF-α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa
ROC	krivulja občutljnosti in specifičnosti (Receiver Operating Characteristic Curve)	5' -UTR	5' -neprevajana regija
ROS	reakтивne kisikove spojine		
Q	dušilec		

1 UVOD

Alkohol (etanol) je najbolj dostopna in najpogosteje zlorabljeni psihoaktivni substanco, ki skozi zgodovino sprembla človeštvo. V zahodni civilizaciji je uživanje alkohola tradicionalno, družbeno sprejemljivo, del kulture druženja in je običajno povezano s praznovanjem (rojstvo, poroka) in drugimi spremembami statusnega položaja. V moderni družbi, ki jo sprembla odtujenost zaradi množične uporabe elektronskih medijev pa pitje alkohola omogoča lažje navezovanje družabnih stikov. Dokazano je tudi, da se pri človeku po zaužitju alkohola najprej pojavijo spremembe v obnašanju, nato pa podaljšajo časi odzivnosti na dražljaje iz okolice.

Prekomerno uživanje alkohola je dejavnik tveganja za pridružene bolezni, poškodbe in nasilje, zato pomembno prispeva k globalnemu bremenu bolezni. Posledice dalj časa trajajočega pitja alkohola so kronične bolezni (ciroza jeter, pankreatitis in rak). Visoko tvegano, epizodno opijanje pa je povezano s kratkoročnimi posledicami, večinoma poškodbami [1]. Podatki za leto 2002 kažejo, da je v Sloveniji alkohol povzročitelj 6,5% vseh smrti in 11,4% vseh izgubljenih zdravih let življenja [2]. Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (SZO) ima Evropa največjo pogostnost smrtnosti, zdravstvenih težav in porabo alkohola na prebivalca na svetu. Podatki SZO kažejo, da se Slovenija po skupni registrirani in neregistrirani porabi alkohola na prebivalca uvršča na peto mesto med državami članicami Evropske unije, za Češko, Madžarsko, Estonijo in Romunijo[1]. V Sloveniji je leta 2007 poraba čistega alkohola na prebivalca, starega več kot 15 let, znašala 11 litrov na leto, v letu 2010 pa naj bi bilo odvisnih od alkohola 10 – 15 odstotkov odraslih prebivalcev Slovenije (podatki Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije), kar je vsekakor zaskrbljujoč podatek. Alkoholizem je družbeno socialni in drag zdravstveni problem zaradi okvar, ki jih povzroča na organih in organskih sistemih človeškega organizma.

V zadnjih dveh desetletjih so postali zelo pomembni preventivni ukrepi, ki so usmerjeni v omejevanje prekomernega uživanja alkohola ter ozaveščanje mlajše populacije o škodljivem vplivu alkohola na zdravje. SZO in Evropska komisija poudarjata, da je lahko učinkovit le celovit pristop, ki vključuje vzgojo in izobraževanje na tem področju, ukrepe za zmanjšanje dostopnosti alkohola ter ukrepe za pomoč tistim, ki so že odvisni od alkohola.

Dokazano je, da okoljski dejavniki močno pospešujejo razvoj alkoholizma pri genetsko predisponiranih osebah, zato je potrebno te osebe namensko odvračati od okolja, ki stimulira uživanje alkohola. Ker genov ne moremo spremiščati, lahko le prilagodimo svoj življenski slog načinu, ki pozitivno vpliva na naše zdravje. Prihajamo v obdobje, v katerem postaja genska analiza diagnostično sredstvo, ki lahko značilno spremeni prevalenco alkoholizma. Pomembna pa je tudi za uvajanje ukrepov, ki ščitijo pred nastankom odvisnosti pri posameznikih.

1.1 PRESNOVNA POT ALKOHOLA V TELESU

Oksidativna pot razgradnje etanola

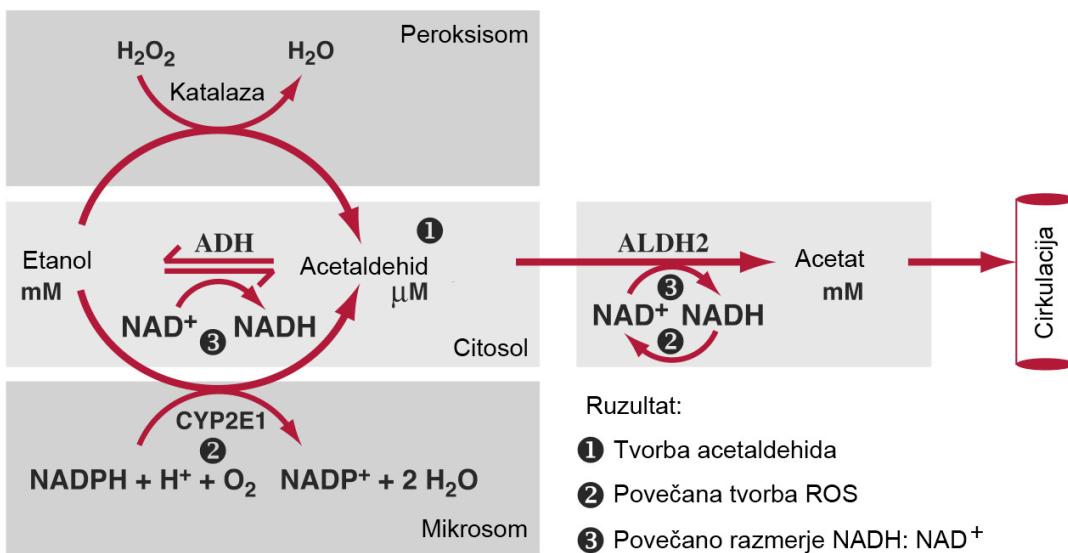
Oksidacija etanola do ocetne kisline poteka v dveh korakih. Prvi korak do acetaldehida, ki je toksičen, poteka po dveh vzporednih poteh, ki ju katalizirata alkoholna dehidrogenaza in mikrosomalni etanol oksidirajoči sistem (MEOS) s citokromom P450. Drugi korak do ocetne kisline poteka le po eni poti in je odvisen od aktivnosti aldehydne dehidrogenaze (slika 1).

Etanol in njegovi presnovki sprožajo v organih in tkivih dodatno nastajanje radikalov. Pri pretvorbi acetaldehida v acetat s pomočjo aldehydne oksidaze in drugih oksidaznih encimov (ksantin oksidaze) nastaja superoksidni radikal ($O^{•2-}$) [3]. Celice odstranjujejo superoksidni radikal tako, da ga s pomočjo superoksid dismutaze (SOD) pretvarjajo v vodikov peroksid (H_2O_2) in kisik. Katalaze v celicah poskrbe, da se H_2O_2 pretvori v vodo in kisik. Pri uživanju večjih količin etanola, v telesu nastaja več acetaldehida in posledično tudi superoksidnega radikala in ko ga katalaze ne zmorejo več dovolj hitro odstranjevati, ta reagira v t.i. Fentonovi reakciji z železovimi in bakrovimi ioni, pri čemer nastane zelo reaktivien hidroksilni radikal [4].

Kronično uživanje večjih količin etanola inducira MEOS s citokromskim encimom CYP2E1, ki presnavlja etanol do acetaldehida ali do 1-hidroksietil radikala (HER) [5]. HER je stabilnejši od hidroksilnega radikala, zato je njegova življenska doba daljša. Nastane tudi, če hidroksilni radikal reagira z etanolom, kar je verjetno takrat, ko prekomerno uživanje alkoholnih pičač nekaj časa traja in so ostale presnovne poti etanola že zasičene. HER v telesu lahko reagira s proteini, nukleinskimi kislinami in s sestavnimi deli membrane. HER je dovolj reaktiv, da lahko odvzame vodikov atom iz nenasičenih alkilnih verig lipidov v membranah in sproži lipidno peroksidacijo. Toksični produkti

lipidne peroksidacije so različni aldehidi, ki kemično reagirajo s proteini in nukleinskimi kislinami. Toksičnost acetaldehyda, ki pretežno nastaja v jetrih se kaže na dva načina:

- reagira z amino skupinami proteinov oz. encimov, kar vpliva na njihovo aktivnost;
- struktura posameznega proteina je lahko spremenjena do take mere, da ga imunski sistem prepozna kot tujek in proti njemu tvori protitelesa.



Slika 1.

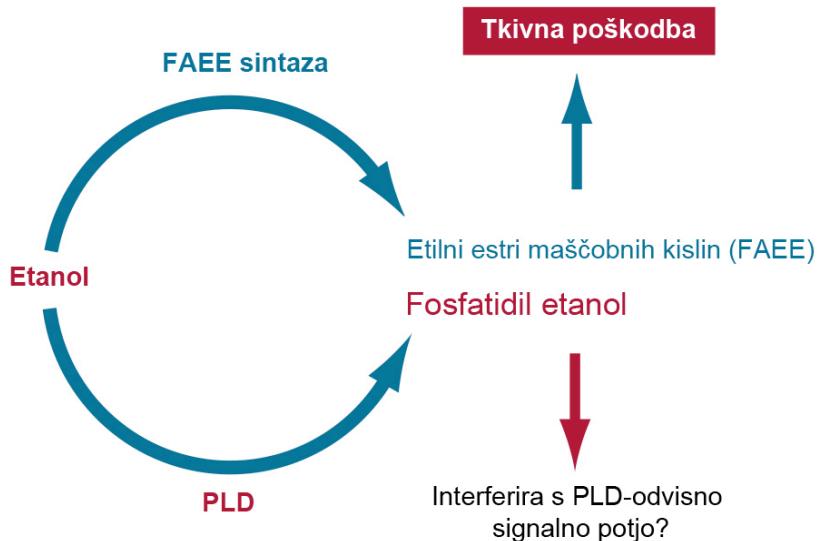
Oksidativne poti presnove etanola (Povzeto po S. Zakhari [6])

Encimi ADH, CYP2E1 in katalaza sodelujejo pri razgradnji etanola do acetaldehyda. Reakcija z ADH vključuje nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), ki se reducira do NADH. Katalaza, ki se nahaja v peroksisomih za oksidacijo etanola potrebuje H₂O₂. Ob zaužitju večjih količin etanola se v mikrosomih inducira CYP2E, v mitohondrijih pa ALDH pretvarja acetaldehid v acetat, pri čemer nastaja NADH in reaktivne kisikove spojine.

Neoksidativna pot razgradnje etanola

Neoksidativna pot razgradnje etanola poteka v manjšem obsegu, nastali presnovki pa so patološki in diagnostično pomembni. Neoksidativno se etanol presnavlja po dveh poteh. Prva pot razgradnje vodi do nastanka etilnega estra maščobnih kislin, druga pa do fosfatidil etanola v katalitični reakciji z encimom fosfolipaza D (PLD). Fiziološka vloga PLD je razgradnja fosfolipidov (predvsem fosfatidil holina), pri čemer nastaja fosfatidna kislina (PA) [7]. Ta pretvorba predstavlja kritičen del celične komunikacije. Reakcija poteka na membranah celic vseh tkiv. Ob prisotnosti velikih količin etanola v telesu je ta pretvorba motena. PLD ima visoko Michaelisovo konstanto za etanol in tako nastane v encimski reakciji fosfatidil etanol. Fosfatidil etanol se slabo presnavlja in se kopiči po daljšem vnosu

velikih količin etanola. Njegova vloga še ni raziskana. Jasno pa je, da njegov nastanek inhibira nastanek PA in s tem moti celično signalizacijo (slika 2).



Slika 2. **Neoksidativna pot presnove etanola** (Povzeto po S. Zakhari [6]) S katalizirano reakcijo s sintazo estrov maščobnih kislin nastajajo etilni estri maščobnih kislin, s pomočjo fosfatidil lipaze pa nastaja fosfatidil etanol.

1.2 BIOKEMIJSKI OZNAČEVALCI ZA ODKRIVANJE IN ZDRAVLJENJE ALKOHOLIZMA

Za odkrivanje in zdravljenje alkoholizma so pomembne neinvazivne metode med katere spada določanje že uveljavljenih in tudi novejših označevalcev alkoholizma. Uporabni so za postavitev diagnoze, za spremljanje učinkovitosti terapije in za kontrolo vzdrževanja abstinence.

Označevalce alkoholizma razdelimo na dve skupini. V prvi so tisti, ki so povezani z dolgoročnimi škodljivimi učinki etanola in njegovih presnovnih produktov. V drugo skupino pa uvrščamo označevalce, s katerimi spremljamo neposredno izpostavljenost alkoholu in so uporabni za diagnozo akutne zastrupitve z etanolom, za spremljanje abstinence oz. recidivov [8]. Večjo diagnostično uporabnost pri spremljanju neposredne izpostavljenosti alkoholu imajo označevalci, katerih koncentracije se spremenijo že pri enkratnem vnosu etanola in ostanejo zvišane še nekaj dni po vnosu.

V vsakodnevni praksi se za odkrivanje in zdravljenje alkoholizma uporabljajo posredni označevalci, ki so pokazatelj dolgoročnih učinkov etanola in njegovih presnovnih produktov. Nobeden izmed njih ni dovolj občutljiv in specifičen za postavitev diagnoze. Občutljivost povečamo s kombinirano uporabo več označevalcev.

1.2.1 Označevalci kronične odvisnosti od alkohola

1.2.1.1 Transferin z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov

Transferin se tvori v jetrih. V telesu služi kot transportni protein za železo in druge oligoelemente. Je glikoprotein, sestavljen iz polipeptidne verige s 697 aminokislinami. V strukturi transferina z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov (CDT) sta dve oligosaharidni verigi, ki se zaključita s sialinsko kislino. V zdravem organizmu je prevladujoča oblika s štirimi sialinskimi molekulami – tetrasialotransferrin. Po daljšem uživanju alkoholnih pijač se prične struktura transferina spremnijati. Nastajati pričnejo mono-, di- in trisialo oblike. Pri odvisnikih se najpogosteje pojavlja disialo oblika. Najverjetnejši vzrok nastanka transferina z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov je inhibicija glikozil transferaze v Golgijevim aparatu, zaradi povečanega vnosa alkohola in/ali acetaldehidnih snovi [9]. Vrednost CDT se večinoma podaja kot delež celotne koncentracije transferina. CDT je najbolj občutljiv pokazatelj zlorabe alkohola. Zaradi visoke specifičnosti (nad 90%) pri diagnostiki odvisnosti od alkohola je uporaben tudi v prisotnosti patoloških stanj v jetrih, ki nimajo izvora v zlorabi alkohola [10]. Slabša je občutljivost tega označevalca, povečamo jo z istočasno uporabo drugih označevalcev alkoholizma (GGT, AST ali MCV) [11].

1.2.1.2 Gamaglutamilna transferaza

Gamaglutamilna transferaza - GGT (EC 2.3.2.2) je membransko vezan encim, ki katalizira prenos γ -glutamilne skupine. GGT je heterodimer z molekulsko težo 85 kDa. Katalitično mesto se nahaja na lažji podenoti. GGT je deloma mikrosomalni encim, katerega tvorbo inducira različna zdravila in strupi (npr. alkohol). Tako povisano katalitično aktivnost encima zasledimo pri dolgotrajnem prekomernem uživanju alkohola, ko je aktiviran MEOS. Ob normalnih pogojih se po tej poti oksidira 10 – 20% etanola [12], pri odvisnikih od alkohola pa se ta delež lahko podvoji [13].

Zvišana aktivnost GGT v serumu je posledica kombinacije indukcije sinteze encima in toksičnega učinka etanola na membrane jetnih celic. V primerih, ko so vrednosti GGT že

patološke, jetrna okvara pa še ni prisotna, gre verjetno samo za indukcijo encima. Občutljivost in specifičnost GGT za zlorabo alkohola se med študijami razlikuje. Večinoma ugotavljajo specifičnost preko 90% in občutljivost do 70%, kar je višje kot pri ostalih encimskih označevalcih [14]. Nekateri raziskovalci navajajo, da so pri normalni populaciji izmerjene patološke vrednosti GGT v 10 – 20% nealkoholnega izvora, kar v 50 – 75% pa je vzrok za zvišanje GGT prekomerno uživanje alkohola [13, 15]. Hiter padec vrednosti po vzpostavljeni abstinenci vsekakor kaže, da gre za zlorabo alkohola. Nepatološke vrednosti GGT pa nikakor ne izključujejo zlorabe alkohola. V kombinaciji s CDT je GGT dokaj zanesljiv pokazatelj prekomernega uživanja alkohola.

1.2.1.3 Transaminaze

Alanilna aminotransferaza - ALT (EC 2.6.1.2.) in aspartatna aminotransferaza - AST (EC 2.6.1.1.) sta transaminazi, ki katalizirata reverzibilno pretvorbo alanina v piruvat oz. aspartata v oksaloacetat in se pogosto uporablja v laboratorijski diagnostiki alkoholizma [16].

ALT je citoplazemski encim z molekularno težo 110 kDa. Je specifičen citoplazemski encim jetrnih celic, ki se v obtoku zviša že ob večji prepustnosti celičnih membran.

AST je citoplazemski in delno tudi mitohondrijski encim (citoplazma -70%, mitohondriji - 30%). Molekulska teža topne, citoplazemske oblike je 93 kDa, mitohondrijske pa 91 kDa. Pri nižji stopnji okvare jetrnih celic v serumu prevladuje citoplazemski encim, pri nekrozi pa se iz poškodovanih celic sprošča tudi mitohondrijska frakcija encima in značilno prispeva k dvigu serumske aktivnosti AST [17].

Pri vseh stopnjah alkoholne jetrne okvare je značilno višja aktivnost AST v primerjavi z ALT. Tako je za odkrivanje zlorabe alkohola diagnostično pomembno razmerje AST/ALT – De Ritisov kvocient, ki odseva intenziteto okvare jetrnih celic in se po vrednosti razlikuje med različnimi vrstami okvare jeter. Pozitivna napovedna vrednost za alkoholno jetrno okvaro pri vrednostih razmerja $AST/ALT > 2$ je 80% [17]. Etanol okvarja mitohondrije, zato se v cirkulacijo sprošča več AST kot ALT.

1.2.1.4 Glutamatna dehidrogenaza

Glutamatna dehidrogenaza - GLDH (EC 1.4.1.3.) je encim, ki sestoji iz dveh polipeptidnih verig z molekulsko težo 50 do 60 kDa. Cink je sestavni del molekule in je pomemben za aktivnost encima. GLDH katalizira pretvorbo L-glutamata v α -ketoglutarat. Je parenhimski encim in se nahaja v mitohondrijih vseh celic, v krvni obtok se sprošča ob nekrozi celic,

vnetni procesi pa na sproščanje GLDH ne vplivajo. Najaktivnejši je encim v jetnih celicah.

Pri diagnostiki odvisnosti od alkohola nekateri avtorji navajajo občutljivost in specifičnost GLDH, ki je primerljiva z ostalimi encimskimi označevalci [18]. Prednost uporabe GLDH naj bi bila predvsem v tem, da aktivnost GLDH po prenehanju uživanja etanola pada hitreje od ostalih encimskih označevalcev alkoholizma.

1.2.1.5 Povprečni volumen eritrocitov

Etanol in njegovi presnovni produkti imajo toksični učinek na razvoj rdeče celične vrste. Pri odvisnikih od alkohola se pogosto pojavlja makrocitoza, ki se diagnostično kaže kot povečan volumen eritrocitov (MCV). Vrednosti so 5-10% nad zgornjo referenčno mejo za MCV [17]. Povišane vrednosti ostanejo še nekaj mesecev po vzpostavitvi abstinence in jih ni mogoče uporabljati za spremeljanje uspešnosti zdravljenja. MCV je diagnostično pomemben kazalec alkoholizma predvsem pri bolnikih, ki imajo normalne vrednosti GGT, sam pa ni dovolj specifičen.

1.2.2 Označevalci za spremeljanje abstinence in recidivov

V to skupino označevalcev spadajo: etanol, etil glukoronid, etilni estri maščobnih kislin, fosfatidiletanol in 5-fosfoenoltriptofol. Na vnos etanola odreagirajo hitro – koncentracije v telesu narastejo in ostanejo povišane še nekaj dni po vnosu alkohola. Zaradi zahtevne metodologije določanja njihovih koncentracij se redkeje uporabljam.

1.2.2.1 Etanol

Neposredno merjenje etanola v krvi in telesnih tekočinah (slina, urin, znoj) ter v izdihanem zraku je uporabno za odkrivanje akutnega zaužitja etanola. Hitre in enostavne so spektrofotometrične metode, ki temeljijo na pretvorbi etanola v acetaldehid. Plinska kromatografija pa omogoča tudi zaznavo drugih alkoholov. Meritev koncentracije etanola v izdihanem zraku se izvaja kot laboratorijsko testiranje ob preiskovancu. Temelji na elektrokemiji ali infrardeči spektrometriji.

1.2.2.2 Etilglukoronid in etilsulfat

Pod 0,5% vnesenega etanola se konjugira s sulfatom ali aktivirano glukuronsko kislino. Pri tem nastaneta etilsulfat in etilglukuronid, ki se izločata z urinom in sta pri večjem vnosu etanola v urinu prisotna do tri dni. Z merjenjem koncentracije etilglukoronida v laseh je

možno ugotavljati prekomeren vnos etanola v obdobju treh mesecev z diagnostično občutljivostjo in specifičnostjo nad 90% [19].

1.2.2.3 *Etilni estri maščobnih kislin*

Razgradnja etanola po neoksidativnih poteh privede do esterifikacije etanola in tvorbe etilnih estrov maščobnih kislin. Merljive koncentracije doseže v krvi, jetrih in možganih. Analiza prisotnosti FAEE v maščobnem tkivu je pomembna pri dokazovanju vinjenosti pred smrtno [9]. FAEEs je v tkivih možno dokazovati še 24 ur po uživanju etanola. FAEEs se odlagajo tudi v laseh, kar razširi časovne okvire določanja. Možnosti lažnih negativnih vrednosti ni, razen v primeru preparatov za nego las, ki so izdelani na osnovi etanola. Vrednosti dobro korelirajo s količino vnesenega etanola. Razpolovna doba je 16 dni, kar je štirikrat več kot za alkohol [20].

1.2.2.4 *Fosfatidiletanol*

Normalno fosfolipaza D s katalitičnim delovanjem na fosfolipide, predvsem fosfatidilholin, tvori fosfatidno kislino, v prisotnosti etanola pa fosfatidiletanol. Razpolovna doba je 4 dni, merljive vrednosti se nahajajo samo v eritrocitih. Diagnostično pomembne vrednosti lahko nastanejo po nekajdnevnom pitju več kot 50 g etanola [21].

1.2.2.5 *Acetaldehid*

Acetaldehid v telesu tvori spojine z beljakovinami v različnih tkivih, plazmi in eritrocitih. V eritrocitih se veže na hemoglobin kot analog ogljikovega dioksida. Koncentracije prostega acetaldehyda v plazmi in eritrocitih se po treh urah normalizirajo, koncentracije acetaldehyda, ki je vezan na hemoglobin pa ostanejo zvišane še približno mesec dni [9]. Na hemoglobin vezani acetaldehid je pokazatelj nedavnega uživanja etanola.

Spojine acetaldehyda s proteini sprožijo tudi imunski odgovor. Specifična IgA protitelesa proti tem spojinam so ob uživanju etanola prisotna v zvišanih koncentracijah [14]. Koncentracija protiteles je povezana s količino vnesenega alkohola in je specifičen ter občutljiv označevalec škodljive rabe alkohola.

1.2.2.6 *5-hidroksitriptofol*

5-hidroksitriptofol (5-HTOL) je manj pomemben vmesni produkt pri razgradnji serotoninina do 5-hidroksiindolocetne kisline (5-HIAA). Uživanje alkohola spremeni razmerje 5-HTOL/ 5-HIAA v urinu, saj povzroči značilno zvečanje tvorbe 5-HTOL, ki ostane v urinu prisoten vsaj še en dan po vnosu etanola. Do premika v presnovi privede verjetno zvišanje

razmerja NADH/NAD⁺ zaradi prisotnosti etanola in acetaldehyda, ki inhibirata ALDH [9]. 5-hidroksitriptofol je uporaben za dokazovanje nedavnega pitja in vzdrževanja abstinence. Občutljivost in specifičnost določanja predvsem pri ugotavljanju ponovitve bolezni je še predmet raziskav. Nastajanje 5-HTOL je povečano tudi pri karcinoidnih tumorjih ter okoliščinah, ki vplivajo na nivo serotoninina (prehrana, zdravila) [22].

1.3 VPLIV PRETIRANEGA UŽIVANJA ALKOHOLA NA JETRA

Bolezni jeter so najpogosteji kazalnik izpostavljenosti dolgotrajnemu in prekomernemu uživanju alkohola. Do poškodb hepatocitov pride zaradi toksičnega vpliva acetaldehyda, ki povzroča oksidativni stres, spremenjeno presnovo maščobnih kislin in spremenjeno delovanje imunskega sistema. Vse to vodi do kopičenja proteinov, vode in maščob v hepatocitih, posledično pa do nekroze in jetrne fibroze [23].

Fibroza je nespecifičen odgovor na poškodbo, ki povzroči tvorbo zunajceličnega matriksa (ECM). ECM predstavlja skupino makromolekul, kamor prištevamo kolagen, nekolagenske glikoproteine, rastne faktorje, glikozaminoglikane, proteoglikane in proteine matriksa [24].

V fibrotičnem jetrnem tkivu so prisotne kvalitativne in kvantitativne spremembe ECM. Vsebnost kolagena naraste za 3 do 10 krat, na račun povečanja kolagenov tipa I in III (tvorijo fibrile), povečanja kolagenov tipa IV in VI (ne tvorijo fibril), glikozaminoglikanov, glikanov in glikoproteinov. Zaradi toksičnega učinka alkohola postane črevesna bariera bolj propustna za endotoksin. Endotoksin v portalni krvi spodbudi Kupfferjeve celice k izločanju tumor nekrotizirajočega faktorja alfa (TNF-alfa), ki aktivira vnetne citokine in spodbudi zvezdaste celice v Dissejevih prostorih. Aktivirane zvezdaste celice začnejo tvoriti kolagen in sprožijo nastanek fibroze [25].

Zunajcelični matriks predstavlja aktivno tkivo, ki je v dinamičnem procesu remodelacije. Prav zaradi te dinamike fibroza lahko vodi do napredovalnega patološkega stanja – ciroze, ali pa je v začetni stopnji potencialno reverzibilni proces [26, 27]. Ocena fibroze pri jetrni bolezni ima pomembno vlogo in vrednost pri postavitvi diagnoze, napovedi bolezni, terapevtskih odločitvah in predvsem spremeljanju poteka bolezni.

Igelna biopsija je referenčna metoda za diagnosticiranje in oceno stopnje jetrne fibroze. Metoda je zahtevna, napake pri vzorčenju so pogoste. Podatki kažejo, da operater v 30% zgreši napredovalo bolezen zaradi nepravilnega vzorčenja [28, 29]. Metoda zahteva zadostno oz. predpisano velikost vzorca, nefragmentiran vzorec, dobro tehniko priprave

histološkega preparata in brezhibno barvanje vezivnega tkiva v preparatu [30]. Nadalje jetrna biopsija predstavlja statično sliko jetrnega ustroja, v praksi pa se je pokazala potreba po oceni dinamičnega bolezenskega procesa.

Zaradi invazivnosti metode in spremljajočih omejitev večina raziskovalcev proučuje diagnostično uporabnost biokemičnih označevalcev jetrne fibrose. Od idealnega markerja jetrne fibrose pričakujemo:

- visoko specifičnost,
- neinvazivni odvzem vzorca,
- enostavno merjenje v rutinski uporabi,
- merljivost z občutljivo, ponovljivo in hitro metodo,
- visoko korelacijo z obsegom fibrose, aktivnostjo depozitov in količino matriksa,
- možnost spremeljanja napredovanja ali zmanjševanja fibrose z ali brez terapije.

Serumski marker naj bi tako razlikoval med nefibrotičnim in fibrotičnim stanjem jeter, ne da bi bila potrebna biopsija. Serumske označevalce jetrne fibrose nekateri znanstveniki delijo na direktne označevalce, ki neposredno odsevajo biološke procese fibrose, fibrogenezo in fibrolizo. V drugo skupino prištevajo indirektne označevalce, ki naj bi korelirali s fibrozo, ne odražajo pa patoloških procesov, ki vodijo v fibrozo. Ti markerji so v prejšnjem poglavju opisani encimi AST, ALT, razmerje AST/ALT, trombociti in protrombinski čas [31].

1.3.1 ELF test za oceno stopnje jetrne fibrose

ELF (enhanced liver fibrosis) test predstavlja kombinacijo direktnih markerjev fibrose, ki tvorijo algoritem, s katerim je mogoče oceniti prisotnost in stopnjo fibrose. Test vključuje tri kazalce: hialuronsko kislino (HA), amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III (PIIINP) in tkivni inhibitor metaloproteinaze 1 (TIMP-1). HA in PIIINP sta markerja nastajanja depozitov matriksa – fibrogeneze, TIMP-1 pa predstavlja razgradnjo matriksa – fibrolizo.

Nadomestni markerji za jetrno fibrozo, med katere spada ELF test, naj bi služili kot začetni, presejalni testi za izključitev jetrne biopsije pri posameznih bolnikih, v povezavi z začetno biopsijo za spremeljanje poteka bolezni ali pa za spremeljanje stanja posameznika ob terapiji oz. spremembi življenskega stila.

Številne študije so potrdile, da je ELF test primeren za prognozo jetrne fibroze pri kroničnih jetrnih boleznih in ga potrdile kot nadomestni test za jetrno biopsijo [32-34]. Test bi lahko bil uporaben za zgodnje odkrivanje jetrne okvare, ko jetrna biopsija še ni indicirana. Po ugotovitvah Parkesove in sodelavcev [35] bi bilo potrebno proučiti njegovo primernost za ugotavljanje tveganja za razvoj kronične jetrne bolezni pri bolnikih, ki imajo patološke vrednosti jetrnih testov.

1.3.1.1 Hialuronska kislina

Hialuronska kislina (HA) je glikozaminoglikan, ki je komponenta izvenceličnega matriksa in nastaja v jetrnih zvezdastih celicah (HSC). V normalnih fizioloških pogojih so epitelijске celice jetrnih sinusoidov mesto za privzem in razgradnjo HA. HA je linearen polimer, zgrajen iz ponavljajočih se disaharidnih enot, z molekulske težo 10^4 - 10^7 Da [36]. Serumske koncentracije HA niso povezane samo s stopnjo jetrne fibroze in se večajo tudi pri vnetnih jetrnih procesih z nekrozo. Raziskovalci navajajo mejno vrednost HA $85 \mu\text{g/L}$ s 64,5% občutljivostjo in 91,2% specifičnostjo za ločevanje bolnikov, ki imajo blago fibrozo oz. nimajo fibroze. Pri bolnikih z napredujočo fibrozo se pri HA $110 \mu\text{g/L}$ občutljivost še poveča [36]. HA je uporabno diagnostično orodje za oceno stopnje fibroze pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C [36].

1.3.1.2 Amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III

Intersticijski kolageni (tip I do III) se sintetizirajo v obliki večjih molekul, prokolagenov, ki vsebujejo dodaten prekurzorski peptidni podaljšek na N- in C-terminalnem delu molekule. Med pretvorbo prokolagena v kolagen se tak peptid odcepi s pomočjo specifičnih proteinaz. Pretvorba je nujna za nastanek različnih tipov kolagenskih fibril. Predvidevajo, da nastali odcepljeni peptid lahko deluje kot povratni regulator za sintezo kolagena [37].

Amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III (PIIINP) je najintenzivnejši preiskovani serumski označevalec in je predlagan kot kazalnik za napredovanje jetrno fibrozo pri kronični jetrni bolezni. PIIINP je N-terminalni, odcepljeni del prokolagena tipa III, ki se sintetizira v procesu jetrne fibrogeneze v zvezdastih HSC [36].

1.3.1.3 Tkivni inhibitor metaloproteinaze 1

Tkvni inhibitor metaloproteinaze 1 (TIMP-1) je glikoprotein, ki se izraža v različnih tkivih. Je naravni inhibitor metaloproteinaz v matriksu (MMP), ki so skupina peptidaz

vpletenih v razgradnjo izvenceličnega matriksa in jih delimo v pet skupin. Pri kronični jetrni bolezni so preiskovane MMP2 ali kolagenaze, membranska tipa metaloproteinaza-1 in -2, ki aktivirata latentne peptidaze MMP2, TIMP-1 in TIMP-2. Dokazano je, da serumske koncentracije TIMP-1 pozitivno korelirajo s stopnjo fibroze in izrazito narastejo pri napredovani stopnji fibroze, ne pa pri zmerni fibrozi [38].

1.4 GENETSKI DEJAVNIKI ODVISNOSTI OD ALKOHOLA

Novejši pristop k diagnostiki odvisnosti od alkohola predstavlja preučevanje genetskih dejavnikov tveganja za nastanek zasvojenosti. V zadnjem desetletju se je povečalo število raziskav, ki poskušajo razjasniti mehanizme delovanja encimov ter prenašalnih in receptorskih molekul pri razvoju odvisnosti od alkohola. Najbolj raziskana je vloga genov, ki kodirajo encime za presnovo alkohola. Različne študije kažejo, da je vnos alkohola med drugim povezan tudi z encimsko aktivnostjo ADH [39]. Večja aktivnost ADH pospešuje razgradnjo alkohola do acetaldehida, njegovo kopiranje pa povzroča pri posamezniku slabo počutje (zardevanje, glavobol, vrtoglavico, slabost, povečano temperaturo, zaskrbljenost) in s tem odklonilen odnos do alkohola. Ti odklonilni učinki acetaldehida pri posamezniku omejijo vnos alkohola in hipotetično zmanjšajo tveganje za nastanek odvisnosti [40]. Polimorfizmi v genih, ki kodirajo encime za presnovo alkohola, lahko vplivajo na aktivnost teh encimov in s tem na tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola. Posebno področje predstavlja vpliv pretiranega in škodljivega pitja alkohola na serotonininski sistem, ki ima pomembno vlogo pri želji po pitju alkohola in nastanku odvisnosti. 5-hidroksitriptaminski receptor 1B (HTR1B) je dokazano povezan z zlorabo drog, vključno z alkoholom [41].

1.4.1 Polimorfizmi v genih za alkoholno dehidrogenazo

Alkoholna dehidrogenaza (ADH) je dimerna molekula, prisotna v različnih izoformah. Do sedaj je bilo odkritih sedem genov, ki kodirajo te izoforme z različnimi katalitičnimi aktivnostmi. Ekspresija ADH gena je značilna za različna tkiva. Intenziteta presnove alkohola v posameznih organih in tkivih se razlikuje [42].

Vseh sedem genov za ADH se nahaja skupaj na kromosому 4q21-24. Predstavljajo kandidatne gene za razvoj odvisnosti od alkohola [43, 44]. Po strukturni podobnosti in katalitičnih značilnostih razvrščamo gene za ADH po novi nomenklaturi v pet razredov. V razred I spadajo geni za ADH1A, 1B in 1C, v razred II gen za ADH4 in v razred III gen za ADH5, v razredu IV je gen za ADH7, v razredu V pa gen za ADH6 [6]. Večina ADH

genov se v največji meri izraža v jetrih, z izjemo *ADH7*, ki je lociran v zgornjem delu prebavnega trakta. *ADH5* je edini izoencim ADH, ki so ga našli v možganih [45]. *ADH6* katalizira presnovo različnih alkoholov (npr. retinola) in je manj učinkovit pri presnovi etanola [45].

V literaturi prevladujejo podatki za polimorfizme v genih razreda I (predvsem v *ADH1B* in *ADH1C*) in razreda II (*ADH4*). Ti encimi so aktivni predvsem v jetrih in so ključni v presnovi alkohola.

ADH1A, *ADH1B* in *ADH1C* predstavljajo okoli 70% celotne oksidacijske kapacitete za etanol [46]. Izoencimi ADH so naključne dimerne kombinacije proteinskih podenot α , β in γ in predstavljajo homo- ali heterodimerne oblike encimov ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\gamma$), ter imajo v 94% identično sekvenco. Kot posledica polimorfizmov v genih za *ADH1B* in *ADH1C* nastanejo podenote - β_1 , β_2 , β_3 in γ_1 , γ_2 , z različno katalitično aktivnostjo [47]. Znani so funkcionalni polimorfizmi v genih razreda I: *ADH1B*2* (Arg48His, rs 1229984); *ADH1B*3* (Arg370Cys, rs2066702) in povezana *ADH1C*2* polimorfizma (Arg272Gln; rs1693482; Ile350Val rs698), ki izkazujejo vpliv na tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola pri različnih etničnih skupinah, predvsem pri vzhodno azijski populaciji [48]. Encima, ki ju kodirata gena *ADH1B*2* in *ADH1B*3* imata 40 in 30-krat višjo aktivnost od encima, ki ga kodira *ADH1B*1*. Encim kodiran z *ADH1C*2* (Gln272Val350) ima manjšo aktivnost v primerjavi z bolj pogostim encimom, ki ga kodira *ADH1C*1*, (Arg272Ile350) [45]. *ADH1C*1* je v močnem vezalnem nesorazmerju z *ADH1B*2* [49]. Večja aktivnost encimov kodiranih z *ADH1B*2*, *ADH1B*3* in *ADH1C*1* vodi v hitrejšo pretvorbo etanola v acetaldehid in pri pivcih povzroča močno obrazno rdečino, slabo počutje in s tem odklonilen odnos do uživanja alkohola [48]. *ADH1B*2* se kaže kot zaščitni alel proti pretiranemu uživanju alkohola in odvisnosti, predvsem v vzhodno-azijski populaciji, kjer je alelna frekvenca visoka [50]. Vedno več pa je študij, ki dokazujejo zaščitno vlogo polimorfizma Arg48His (*ADH1B*2*, rs1229984) tudi pri ostalih populacijah, čeprav je genotipska frekvenca bistveno nižja [51]. V študiji na madžarski populaciji so dokazali, da sta polimorfizma *ADH1B*2* in divji tip *ADH1C* (*ADH1C*1*) povezana z manjšo nevarnostjo za razvoj kronične jetrne bolezni in da sta polimorfizma rs1693482/rs698 (haplotip Gln272Val350) povezana z večjim tveganjem za prekomerno pitje alkohola [52]. Na populaciji Špancev, Francozov, Nemcev in Poljakov pa so dokazali, da je alelna frekvenca *ADH1B*2* med nealkoholiki statistično značilno višja, pri *ADH1C*1* pa razlika med alkoholiki in nealkoholiki ni statistično značilna [53].

ADH4 prispeva 30% k jetrni oksidacijski sposobnosti za etanol [46, 54]. Edenberg je v študiji [55] genotipiziral 110 SNP v vseh sedmih genih za ADH in analiziral njihovo povezanost z odvisnostjo od alkohola v družinah z več člani, odvisnimi od alkohola. Dokazal je, da so razlike v genotipih za ADH4 povezane z alkoholizmom. Naslednja študija je povezana z odvisnostjo od alkohola in drog (kokaina in opioidov) [56]. V študiji so analizirali sedem SNP *ADH4* pri Evro- in Afro-američanh v kontrolni skupini in pri bolnikih. Rezultati niso pokazali pomembnih razlik v alelnih in haplotipskih frekvencah med kontrolami in bolniki, pokazali pa so razlike v genotipskih frekvencah in zelo značilno Hardy –Weinbergovo neravnovesje (Hardy-Weinberg disequilibrium - HWD) med bolniki Evro-ameriškega porekla za večino preiskovanih polimorfizmov. Največja stopnja HWD je bila določena za polimorfizma rs1800759 in rs1042364. Rezultati študije nakazujejo vpletenost polimorfizmov *ADH4* oz. genotipov *ADH4* k nagnjenosti za razvoj odvisnosti od alkohola. V veliki nemško - poljski multicentrični študiji [57] iz l. 2010, na klinično dobro opredeljenih odvisnikih od alkohola in zdravi kontrolni skupini, je bila porazdelitev polimorfizmov rs1800759 in rs1042364 v HWE za obe skupini preiskovancev, z minimalnim presežkom heterozigotov. Dokazali so močno vezalno nesorazmerje za preiskovana polimorfizma pri obeh skupinah preiskovancev, kar potrjuje izsledke študije [56], da polimorfizma rs1800759 in rs1042364 pripadata enemu haplotipskemu bloku. V študiji so dokazali da imata polimorfizma rs1800759 in rs1042364 in A-A in C-G haplotipa statistično pomembno povezavo z odvisnostjo od alkohola. A-A haplotip ima potencialno zaščitni vpliv na tveganje za razvoj odvisnosti od alkohola.

1.4.2 Polimorfizmi v genu za serotoninski receptor 1B

1.4.2.1 Serotoninski sistem

Serotonin ali 5-hidroksitriptofan ima v telesu različne fiziološke vloge. Je nevrotransmiter in regulator funkcije gladkomoviščnih celic v kardiovaskularnem in gastrointestinalnem sistemu ter regulator funkcije trombocitov. Serotonin najdemo v centralnem in perifernem živčnem sistemu in ima pomembno vlogo pri mišljenju, dojemanju, razpoloženju, uravnavanju apetita in drugih funkcijah, ki jih opravlja CŽS. Ker serotonin ne more prehajati skozi krvno-možgansko pregrado, se sintetizira v možganih iz esencialne amino kisline L-triptofan. Sinteza je dvostopenjska. Tryptfan-hidroksilaza pretvori L-triptofan v L-5-hidroksitriptofan, tega pa dekarboksilaza L-aromatskih aminokislin v serotonin (5-

HT). Sinteza poteka v jedrih rafe (raphe nuclei), ki ležijo v srednjih možganih in podaljšani hrbtnenjači.

Serotoninski sistem je povezan z vnosom, zlorabo in odvisnostjo od alkohola [58]. V literaturi je opisano, da serotonin z negativno povratno zanko regulira vnos alkohola. Tako je ob povečani funkciji serotonina vnos alkohola manjši in ob zmanjšani funkciji serotoninina postane vnos alkohola večji [59]. Nefunkcionalnost serotoninskega sistema pogosto nastopi pri zlorabi ali odvisnosti od alkohola [60].

Spremembe v sproščanju serotoninina so ključni dejavnik pri aktivaciji serotoninskih receptorjev v možganskem sistemu za nagrajevanje, med katerimi so tudi receptorji HTR1B.

1.4.2.2 Serotoninski receptor 1B

Serotoninski receptor 1B (HTR1B) je transmembranski protein, sestavljen iz sedmih domen, s tremi znotrajceličnimi in tremi zunajceličnimi zankami z aminskim koncem, usmerjenim v znotrajcelični prostor. Na zunajceličnem delu proteina je vezalno mesto iz osmih aminokislin, kamor se vežejo specifični ligandi. Znotrajcelične domene proteina imajo mesta za vezavo z inhibitornim proteinom G_i, ki deluje kot sekundarni poročevalec in vodi do zmanjšane aktivnosti adenilat ciklaze [41].

HTR1B deluje kot receptor in avtoreceptor v živčnih celicah v področju korteksa, hipotalamusa in bazalnih ganglijev [61]. HTR1B ima pomembno vlogo pri sproščanju nekaterih živčnih prenašalcev (gama glutaminske kisline, glutamata in dopamina), ki regulirajo vnos alkohola in je tako povezan z vedenjskim vzorcem ob tveganem pitju alkohola [62]. Polimorfizmi v genu za HTR1B so povezani z alkoholizmom [63], zato ga prištevajo k potencialnim kandidatnim genom za nagnjenost h alkoholizmu.

Gen za HTR1B se nahaja v področju 6q14.3 – q16.3, je brez intronov in kodira 390 aminokislin dolg polipeptid [64]. Lappalainen in sodelavci [63] so proučevali vlogo polimorfizma rs6296 pri nagnjenosti k odvisnosti od alkohola z asocialnimi vedenjskimi motnjami in izbruhi eksplozivnega vedenja in odkrili, da je frekvenca C alela pri rs6296 povezana z asocialnim alkoholizmom pri Fincih. Rezultati študije so bili potrjeni tudi na populaciji ameriških Indijancev. Študija *HTR1B* na preiskovancih z različnimi psihopatologijami, tudi z zgodovino samomorilnosti, pa ni pokazala povezave med polimorfizmom rs6296 in odvisnostjo od alkohola, je pa pokazala na obduksijskih vzorcih človeških možganov, da ima receptor s C aleлом manjšo vezalno sposobnost od

maksimalne [65]. Sun in sodelavci so med preučevanimi polimorfizmi identificirali pri polimorfizmu rs130058 statistično višjo frekvenco T alela pri taivanski populaciji odvisnikov v primerjavi s kontrolno skupino [61].

V študiji na populaciji Brazilcev z evropskim poreklom (odvisnikih od alkohola in kontrolni skupini) so proučevali 4 polimorfizme v genu za HTR1B (rs11568817, rs130058, rs 6296, rs13212041), ki kažejo povezavo z odvisnostjo od alkohola [66]. Poročajo o kompleksni regulaciji gena z dvema funkcionalnima polimorfizmoma rs11568817 in rs130058 v promotorski regiji, ki sta v vezalnem nesorazmerju. Rezultat študije je pokazal, da je polimorfizem rs11568817 povezan z odvisnostjo od alkohola.

2 NAMEN DELA

Za odkrivanje in zdravljenje alkoholizma so pomembne neinvazivne metode, med katere spada določanje že uveljavljenih (AST, ALT, GGT, MCV, CDT) označevalcev alkoholizma. Bolezni jeter so najpogosteji kazalnik izpostavljenosti dolgotrajnemu in prekomernemu uživanju alkohola. Referenčna metoda za odkrivanje stopnje jetrne fibroze in nekroze hepatocitov je še vedno biopsija jeter. ELF (Enhanced Liver Fibrosis) test je novejši, diagnostično uporaben, neinvaziven test za oceno prisotnosti in/ali stopnje jetrne fibroze.

Vzroki za nastanek odvisnosti od alkohola so lahko tudi genetski. Kandidatni geni za tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola so predvsem tisti, ki kodirajo encime vpletene v razgradnjo alkohola v telesu. Pri slovenski populaciji polimorfizmi v genih za ADH še niso bili raziskani. Pomembno vlogo pri vnosu in zlorabi alkohola pa imajo tudi polimorfizmi gena za serotonininski receptor 1B (HTR1B).

Zaradi navedenih dejstev želimo v naši raziskavi:

- poiskati morebitno povezavo med že uveljavljenimi označevalci alkoholizma (MCV, AST, ALT, GGT) in novejšim ELF testom za odkrivanje in ocenjevanje stopnje jetrne fibroze,
- pri slovenski populaciji določiti prisotnost izbranih polimorfizmov v genih za ADH in HTR1B,
- določiti genotipsko in alelno frekvenco polimorfizmov pri preiskovancih kontrolne skupine in priskovancih z diagnozo odvisnosti od alkohola,
- raziskati povezave med posameznimi polimorfizmi in razvojem alkoholizma ter
- primerjati dobljene rezultate s podatki iz literature.

Na osnovi pregledane literature smo v nalogu vključili polimorfizme genov, ki kodirajo encime razreda ADH I in II in so najpogosteje proučevani kot kandidatni geni za tveganje za razvoj odvisnosti od alkohola pri Kavkazijcih. V razredu I smo izbrali polimorfizem rs1229984 v genu za ADH1B in polimorfizma rs 1693482 in rs698 v genu za ADH1C. V razredu II smo se odločili za polimorfizma rs1800759 in rs 1042364 v genu za ADH4. V genu za HTR1B smo izbrali polimorfizma rs11568817 in rs130058, ki v raziskavah izkazujeta povezanost z nastankom odvisnosti od alkohola.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 164 preiskovancev, ki so bili razdeljeni v tri skupine: kontrolno skupino, skupino bolnikov z diagnozo alkoholizma in skupino preiskovancev z akutno zastrupitvijo z alkoholom. V kontrolni skupini je bilo 90 preiskovancev (54 moških, 36 žensk, povprečna starost 39 ± 10 let). To skupino so sestavljali naključni preiskovanci na obdobnem zdravstvenem pregledu v ambulanti Medicine dela, prometa in športa (MDPŠ) v Zdravstvenem domu Domžale, ki so privolili v sodelovanje in izpolnili anketni vprašalnik. Izpolnjen anketni vprašalnik so oddali v za ta namen pripravljeno skrinjico in s tem smo zagotovili popolno anonimnost pridobljenih podatkov. V drugo skupino je bilo vključenih 43 preiskovancev (33 moških, 10 žensk, povprečna starost 46 ± 11 let), ki so se zdravili zaradi odvisnosti od alkohola v Psihiatrični bolnišnici Begunje. V tretjo skupino smo uvrstili 31 preiskovancev (13 moških, 18 žensk, povprečna starost 52 ± 18 let), ki so zaradi enkratnega alkoholnega opoja poiskali pomoč v Urgentni ambulanti Splošne bolnišnice Jesenice.

Za raziskavo smo pridobili dovoljenje etične komisije, ki deluje v Splošni bolnišnici Jesenice. Preiskovanci so podpisali obrazec za prostovoljno vključitev v raziskavo. Vsi vzorci, s katerimi smo rokovali, so bili dvojno šifrirani, s čimer je bila zagotovljena dodatna tajnost podatkov.

3.2 OPIS VZORCEV

Preiskovancem kontrolne skupine in skupine bolnikov z alkoholizmom smo venozni odvzem krvi opravili na tešče, med 7 in 10.00 uro in s tem zagotovili konstantne pogoje odvzema. Uporabili smo biološki material, ki je ostal po opravljenih rutinskih laboratorijskih testih za posameznega preiskovanca, zahtevanih s strani specialista v ambulanti MDPŠ oz psihiatra pri bolnikih Psihiatrične bolnišnice Begunje. Preiskovancem tretje skupine so bili vzorci krvi odvzeti ob sprejemu v Kirurško ambulanto Splošne bolnišnice Jesenice. Sprejem teh preiskovancev v bolnišnico je bil povezan s slabim počutjem ali poškodbo po zaužitju prekomerne količine alkohola.

3.2.1 Vzorci polne krvi in serumata

Za odvzem krvi smo uporabili epruvete proizvajalca Greiner Bio-One z dodatkom K₃EDTA kot antikoagulanta za hematološke preiskave (MCV) in epruvete z aktivatorjem

koagulacije ter ločevalnim gelom za določanje biokemijskih parametrov v serumu (AST, ALT, GGT, ELF). Preiskovancem, ki so v študijo vstopili po pregledu v ambulanti MDPŠ, smo kri odvzeli v Diagnostičnem laboratoriju zdravstvenega doma Domžale. Preiskovancem, ki so se zdravili zaradi odvisnosti od alkohola je bila kri odvzeta v Psihiatrični bolnišnici Begunje po rutinskem psihiatričnem pregledu. Preiskovance z zastrupitvijo z alkoholom je sprejel dežurni specialist v Splošni bolnišnici Jesenice. Odvzeti so jim bili vzorci krvi za osnovne hematološke in biokemične preiskave, neuporabljeni volumen vzorcev krvi smo uporabili za raziskavo. Venozno kri v epruvetah brez aditivov smo pustili koagulirati, nato smo jo centrifugirali 10 minut pri 1500 x g, pri temperaturi 21°C. Serume za oceno jetrne fibroze (ELF test) smo do analize hranili na -20°C. Prav tako smo na -20°C shranili kri z dodatkom antikoagulanta K₃EDTA, namenjeno za izolacijo DNA.

3.3 MERJENJE BIOKEMIČNIH KAZALCEV ALKOHOLIZMA

Izmerili smo koncentracije sledečih parametrov: povprečni volumen eritrocitov v polni krvi in katalitično aktivnost encimov AST, ALT, GGT v serumu. Analize smo opravili na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice in Diagnostičnem laboratoriju Zdravstvenega doma Domžale.

3.3.1 Merjenje povprečnega volumna eritrocitov v polni krvi

Princip metode

MCV smo merili na hematolškem analizatorju z impedančno metodo in metodo sisanja svetlobnega žarka. Pri impedančni metodi potujejo eritrociti skozi majhno odprtino ob kateri sta nameščeni elektrodi, ki beležita nenadno spremembo upornosti pri prehodu celice skozi odprtino in jo spremenita v električni signal. Amplituda signala je proporcionalna volumnu celice. Pri tehnologiji sisanja svetlobe pa je na vzorec, ki potuje v hidrodinamskem toku skozi odprtino, usmerjena laserska ali halogenska svetloba. Svetlobo, ki se razprši na vsaki posamezni celici zazna fotodetektor, ki generira električni impulz, katerega amplituda je proporcionalna volumnu celice. Rezultati so podani v femtolitrih ($1 \text{ fL} = 10^{-15} \text{ L}$). Referenčne vrednosti za odrasle so: 81 – 94 fL.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Hematološka analizatorja (ADVIA 2120, Siemens in ABX Pentra 80, Horiba Diagnostic) uporabljata diluent, s katerim pripravita suspenzijo vzorca, za določitev števila in volumna eritrocitov. Diluent je izotonična raztopina, ki ohranja obliko in volumen celice.

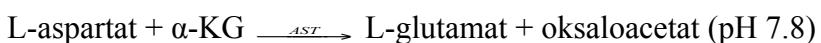
Lastnosti analiznega postopka

Koeficient variacije je znašal znotraj serije 1,2%, med serijami pa 1,8%.

3.3.2 Določanje katalitične aktivnosti AST v serumu

Princip metode

AST katalizira prenos L-aspartata na α -ketoglutarat (α -KG). Pri tem nastaneta L-glutamat in oksaloacetat. Malat dehidrogenaza (MDH) reducira oksaloacetat do malata ob sočasni oksidaciji reducirane nikotinamid-adenin dinukleotida (NADH) v NAD⁺. Spremembu absorbance pri prehodu NADH v NAD⁺ je proporcionalna katalitični aktivnosti AST in jo merimo bikromatsko pri valovnih dolžinah 340 in 700 nm. Po priporočeni IFCC metodi za AST (EC 2.6.1.1.) pri 37°C je obvezen dodatek piridoksalfosfata za aktivacijo apoencima.



Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Merjenje smo izvedli na analizatorju Dimension Xpand Plus z reagentom Dimension AST Flex® reagent cartridge po navodilih proizvajalca Siemens.

Lastnosti analiznega postopka

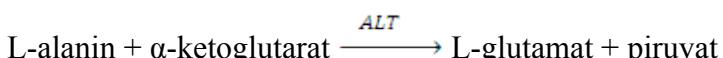
Proizvajalec reagenta za določanje AST v serumu zagotavlja sledečo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 0 – 16,7 $\mu\text{kat/L}$.
- Analitična občutljivost: 0,083 $\mu\text{kat/L}$.
- Natančnost metode: koeficient variacije v seriji za koncentracijo 0,76 $\mu\text{kat/L}$ je 2,7% in med serijami 5,2%.
- Interference: hemoliza lažno zviša rezultate meritev AST.
- Referenčne vrednosti: ženske 0 – 0,52 $\mu\text{kat/L}$, moški 0 – 0,58 $\mu\text{kat/L}$

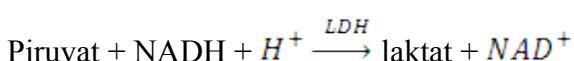
3.3.3 Določanje katalitične aktivnosti ALT v serumu

Princip metode

ALT katalizira prenos L-alanina na α -ketoglutarat (α -KG). Pri tem nastaneta L-glutamat in piruvat. Indikatorska reakcija je redukcija piruvata do laktata, ki jo katalizira laktat dehidrogenaza (LDH) ob sočasni oksidaciji nikotinamid-adenin dinukleotida (NADH) do NAD⁺. Sprememba absorbance, merjene pri 340 in 700 nm, je proporcionalna aktivnosti ALT. Princip priporočene metode po IFCC za ALT (EC2.6.1.2) pri 37°C:



P5P, tris, Ph 7,4



Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Merjenje smo izvedli na analizatorju Dimension Xpand Plus z reagentom Dimension ALT Flex® reagent cartridge po navodilih proizvajalca Siemens.

Lastnosti analiznega postopka

Proizvajalec reagenta za določanje ALT v serumu zagotavlja naslednjo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 0 – 16,7 $\mu\text{kat/L}$.
- Natančnost metode: koeficient variacije v seriji za koncentracijo 0,57 $\mu\text{kat/L}$ je 5,0 % in med serijami 7,7%.
- Interference: hemoliza (0,62 mmol/L in več) in lipemija (6,62 mmol/L in več) vpliva na rezultate.
- Orientacijske referenčne vrednosti: ženske 0 – 0,56 $\mu\text{kat/L}$, moški 0 – 0,74 $\mu\text{kat/L}$.

3.3.4 Določanje katalitične aktivnosti encima GGT v serumu

Princip metode

GGT katalizira prenos glutamilne skupine iz γ -glutamil-3-karboksi-4-nitranilida (GCNA) na glicilglicin in s tem sprosti 5-amino-2-nitrobenzoat, ki absorbira svetlobo pri 405 nm. Ta sprememba je proporcionalna aktivnosti γ -glutamil transferaze, ki jo merimo bikromatsko pri 405 in 600 nm.

Princip reakcije priporočene metode po IFCC za GGT (EC 2.3.2.2.) pri 37°C:



Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Meritve smo izvedli na analizatorju Dimension Xpand Plus z reagentom Dimension GGT Flex® reagent cartridge po navodilih proizvajalca Siemens.

Lastnosti analiznega postopka

Proizvajalec reagenta za določanje GGT v serumu zagotavlja naslednjo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 0 – 13,3 µkat/L
- Analitična občutljivost: 0,12 µkat/L
- Natančnost metode: koeficient variacije v seriji za koncentracijo 0,52 µkat/L je 3,3% in med serijami 4,2%.
- Interference: vrednost trigliceridov nad 2,29 mmol/L zniža vrednosti GGT.
- Referenčne vrednosti: ženske 0 - 0,63 µkat/L, moški 0 – 0,92 µkat/L.

3.4 TEST ZA OCENO JETRNE FIBROZE

ADVIA Centaur® Enhanced Liver Fibrosis – ELF test je in vitro diagnostični, multivariantni test, ki omogoča enovito oceno prisotnosti oz. napredovanja jetrne fibroze pri bolnikih z znaki kronične jetrne bolezni. Ocena temelji na matematični enačbi, ki povezuje logaritme izmerjenih serumskih koncentracij treh parametrov – hialuronske kisline (HA), amino-terminalnega propeptida prokolagena tipa III (PIIINP) in tkivnega inhibitorja metaloproteinaze 1 (TIMP-1) in jo poda analizator sam. Enačba je sledeča:

$$\text{Ocena ELF} = 2,494 + 0,846 \ln(c_{\text{HA}}) + 0,735 \ln(c_{\text{PIIINP}}) + 0,391 \ln(c_{\text{TIMP-1}})$$

Koncentracija vseh parametrov je izražena v µg/L.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Merilni postopek smo izvedli na analizatorju ADVIA Centaur CP v Medicinsko-kemičnem laboratoriju Psihatrične bolnišnice Idrija s programsko opremo 6.0 po navodilih proizvajalca.

Lastnosti analiznega postopka

- Ocena ELF je numerična vrednost brez enot - izračun.
- Interpretacija izračuna stopnje jetrne fibroze - ELF:

izračun ELF	stopnja jetrne fibroze (ELF)	stopnja jetrne fibroze (Ishak lestvica)
< 7,7	nič do blaga	0 - 2
> 7,7 - < 9,8	zmerna	3 - 4
> 9,8	huda	5 - 6

- Pričakovane vrednosti so bile postavljene glede na stopnjo jetrne fibroze, ovrednoteno po Ishak lestvici na jetrnih biopsijah 921 bolnikov (starost med 18 in 75 let), kjer so preučevali kronično jetrno bolezen različnih etiologij. Vzorci so bili razdeljeni na tri skupine, glede na stopnjo jetrne fibroze po Ishak lestvici. Nič do blaga fibroza odgovarja stopnji 0 – 2 po Ishak lestvici, zmerna fibroza stopnji 3 – 4 in huda fibroza stopnji 5 – 6.
- Z uporabo deskriptivne statistike za tri skupine bolnikov so določili dve mejni vrednosti – nizko in visoko. Nizka mejna vrednost ločuje stopnjo jetrne fibroze določeno po Ishak lestvici med 0 – 2 od stopnje 3 do 6 z občutljivostjo 88,6% in specifičnostjo 34,6%. Visoka mejna vrednost loči stopnje od 0 – 4 od stopenj 5 in 6 po Ishak lestvici z občutljivostjo 65,4% in specifičnostjo 89,7%
- Natančnost metode: koeficient variacije v seriji za oceno ELF 8,95 znaša 0,35% in med serijami 0,45%.
- Interference: hemoliza zniža koncentracijo PIIINP, če uporabljammo ADVIA Centaur PIIINP test.

3.4.1 Določanje koncentracij posameznih parametrov ELF testa

Za določanje parametrov ELF testa na analiznem sistemu ADVIA Centaur se uporablja imunokemična metoda, ki za kvantitativno določanje analita uporablja reakcijo antigen - protitelo.

Pri t.i. sendvič principu se vezalno protitelo, označeno z akridinijevim estrom, ki je direktni kemiluminiscentni označevalec, veže na antigen iz preiskovanega vzorca. V drugi stopnji dodana protitelesa, vezana na paramagnetne delce tvorijo komplekse. Nevezane

delce odstranimo s spiranjem, po dodatku kislega in bazičnega reagenta pa sprožimo kemiluminiscentno reakcijo. Emitirana svetloba je direktno proporcionalna koncentraciji merjenega analita.

3.4.1.1 Določanje koncentracije hialuronske kisline

Princip metode

ADVIA Centaur test za določanje koncentracije HA v serumu je avtomatiziran imuno-kemični “sendvič test” s kemiluminiscentno detekcijo. V reakcijski raztopini je protein za vezavo HA (hyaluronic acid binding protein – HABP) iz vzorca in za detekcijo.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Meritve smo izvedli na analizatorju ADVIA Centaur CP kot del testa za oceno jetrne fibroze - ELF test po navodilih proizvajalca (Siemens).

Lastnosti analiznega postopka

Proizvajalec reagenta za določanje HA v serumu zagotavlja naslednjo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 1,6 – 1000 µg/L.
- Analitična občutljivost testa je 1,6 µg/L.
- Analitična specifičnost: metoda je specifična za HA. Križna reaktivnost z ostalimi glikozaminoglikani je nižja od 0,001%.
- Linearost: metoda je linear na znotraj merilnega območja 1,6 – 1000 µg/L z 10 % odstopanjem.
- Natančnost metode: za celotno analitično območje je koeficient variacije znotraj serije do 5,6 % in med serijami do 3,2 %.
- Referenčne vrednosti niso podane, ker se koncentracija HA podaja kot del ocene jetrne fibroze z ELF testom.

3.4.1.2 Določanje koncentracije amino-terminalnega propeptida prokolagena tipa III

ADVIA Centaur PIIINP test je avtomatiziran imunokemični “sendvič test”, ki temelji na direktni kemiluminiscentni tehnologiji. Primarna anti-PIIINP mišja monoklonska protitelesa so označena z akridinijevim estrom, sekundarna anti-PIIINP protitelesa pa z biotinom. Trdno fazo predstavljajo s streptavidinom prevlečeni paramagnetni delci. Po

stopenjski reakciji nastane kompleks, ki oddaja kemiluminiscentni signal, ki je direktno sorazmeren aktivnosti PIIINP.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Meritve smo izvedli na analizatorju ADVIA Centaur CP kot del testa za oceno jetrne fibroze - ELF test po navodilih proizvajalca (Siemens).

Lastnosti analiznega postopka

Proizvajalec reagenta za določanje PIIINP v serumu zagotavlja naslednjo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 0,5 – 150 µg/L.
- Analitična občutljivost testa je 0,5 µg/L.
- Analitična specifičnost: metoda je specifična za amino-terminalni propeptid kolagena tipa III. Križna reaktivnost z ostalimi kolageni je nižja od 0,05%.
- Linearnost: metoda je linearna znotraj merilnega območja 0,5 – 150 µg/L z 10 % odstopanjem, kar pomeni 0,6 µg/L.
- Natančnost metode: za celotno analitično območje je koeficient variacije znotraj serije do 5,0% in med serijami do največ 5,4%.
- Interference: hemoliza lažno zniža rezultate.
- Referenčne vrednosti niso podane, ker se koncentracija PIIINP uporablja kot del izračunane ocene jetrne fibroze z ELF testom.

3.4.1.3 Določanje koncentracije tkivnega inhibitorja metaloproteinaze - 1

TIMP-1 smo določali z imunoanalizno tehniko na sistemu ADVIA Centaur s kemiluminiscentno tehnologijo. Metoda temelji na uporabi primarnih in sekundarnih mišjih monoklonskih protiteles, ki se vežejo na TIMP-1. Primarno anti TIMP-1 protitelo je označeno z akridinijevim estrom, sekundarno pa je konjugirano s fluorokromom FITC (fluorescein isothiocyanate). Trdna faza vsebuje anti-FITC protitelesa kovalentno vezana na paramagnetne delce. Aktivnost TIMP-1 v vzorcu je direktno sorazmerna kemoluminiscentnemu signalu.

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Meritve za določitev aktivnosti TIMP-1 smo izvedli na analizatorju ADVIA Centaur CP kot del testa za oceno jetrne fibroze - ELF test po navodilih proizvajalca (Siemens).

Lastnosti analiznega postopka

Proizvajalec reagenta za določanje TIMP-1 v serumu zagotavlja naslednjo kakovost rezultatov:

- Merilno območje: 3,5 – 1300 µg/L.
- Analitična občutljivost testa je 3,5 µg/L.
- Analitična specifičnost: metoda je specifična za TIMP-1. Križna reaktivnost z ostalimi je nižja od 0,05%.
- Linearnost: metoda je linearna znotraj merilnega območja 0,3 – 1300 µg/L z 10% odstopanjem, kar pomeni 0,5 µg/L.
- Natančnost metode: za celotno analitično območje je koeficient variacije znotraj serije do 2,5% in med serijami do 5,7%.
- Referenčne vrednosti niso podane, ker se koncentracija TIMP-1 podaja kot del ocene jetrne fiboze z ELF testom.

3.5 ANALIZA DNA

3.5.1 Izolacija in kvantifikacija DNA iz polne krvi

Genomsko DNA smo izolirali iz levkocitov venske krvi v laboratoriju Katedre za klinično kemijo na Fakulteti za farmacijo. Vzorce krvi odvzete z antikoagulantom K₃EDTA smo odmrznili v vodni kopeli pri temperaturi 37°C in dobro premešali ob previdnem obračanju vsake epruvete. Za izolacijo smo uporabili reagenčni komplet firme Roche za velike volumne (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood). Izhodiščni volumen vzorca za analizo je bil 2 ml polne krvi. Temu volumnu smo prilagodili volumne ostalih reagentov po priporočilu proizvajalca. Prav tako smo sledili navodilom proizvajalca pri izolaciji DNA.

Princip metode

Izolacija s komercialnim reagenčnim kompletom zajema pet stopenj.

- Razgradnjo celične membrane eritrocitov z dodatkom pufra za lizo celič.
- Sledita razgradnja jedrnih membran levkocitov in sproščanje DNA v supernatant.
- Po dodatku reagenta za obarjanje smo oborili celične proteine in zmes centrifugirali na 12000 x g.
- Genomsko DNA v supernatantu smo precipitirali z dodatkom 100% etanola.

- Po centrifugiraju (875 x g, 10 min) smo oborjeno DNA sprali s 70% hladnim etanolom, ponovno centrifugirali 5 min in posušili na zraku.
- Osušeno DNA smo raztopili v 200 µl 1x TE pufra (10 mM tris in 1 mM EDTA) pH 8,8 s 30 minutno inkubacijo pri 65°C. Vzorce DNA smo hranili do analize na +4°C

Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo določili na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, ZDA), kjer za meritev zadošča že 1,5µl vzorca. Koncentracijo DNA smo izmerili pri valovni dolžini 260 nm in hkrati odčitali še razmerje absorbanc pri 260/280 nm.

3.5.2 Določitev alelne diskriminacije s PCR v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času je nadgradnja konvencionalne PCR metode. Metoda je natančna, hitra in poleg pomnoževanja želenega odseka DNA nudi tudi sočasno merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Merimo lahko samo specifičen produkt oz. morebitno prisotne nespecifične produkte.

S PCR v realnem času lahko enostavno detektiramo znane polimorfizme, kar imenujemo alelna diskriminacija. Reakcija poteka pod univerzalnimi pogoji, neodvisno od preučevanih polimorfizmov. Tako lahko hkrati v instrumentu, na eni ploščici določamo prisotnost več polimorfizmov. Zaporedni koraki reakcije in število ciklov, ki smo jih uporabili za določanje prisotnosti izbranih polimorfizmov, so prikazani v preglednici I.

Preglednica I. Reakcijski pogoji za PCR v realnem času

Začetna denaturacija	95 °C	10 min		
Denaturacija	92 °C	15s	45 X	
Prileganje in podaljševanje	60 °C	1 min		št. ciklov

Princip testa

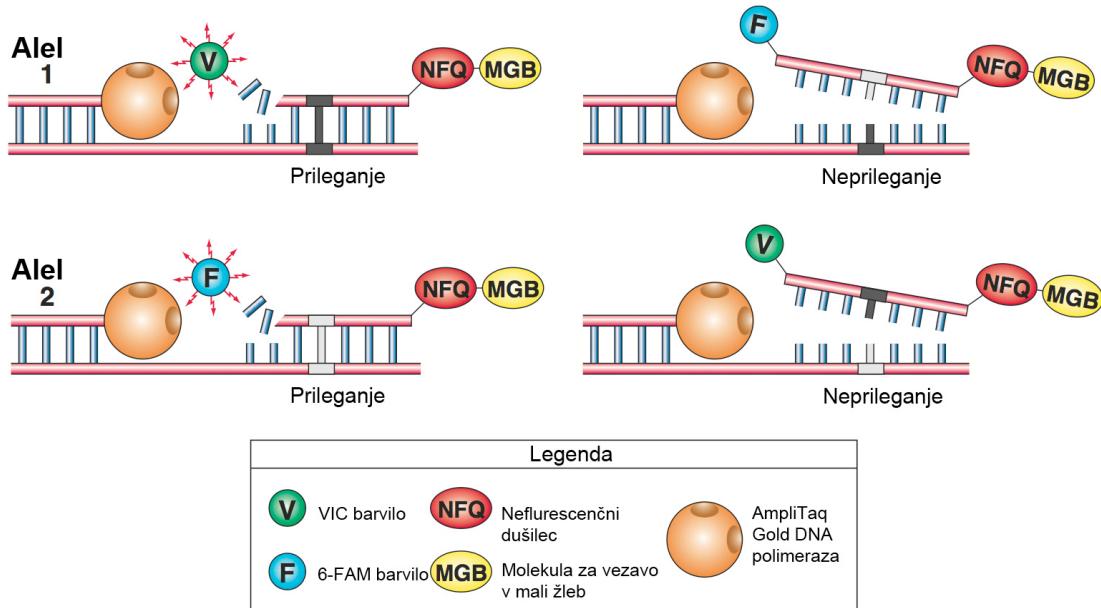
S pomočjo alelne diskriminacije smo preverjali prisotnost petih polimorfizmov posameznih nukleotidov (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) v genu za ADH in dveh polimorfizmov posameznih nukleotidov v genu za HTR1B.

Podatki za preiskovane SNP so zbrani v preglednici II.

Preglednica II. Pregled preiskovanih polimorfizmov za *ADH* in *HTR1B*.

Delovna oznaka	Gen Kromosomska in genska lokacija	Oznaka za polimorfizem	spremembra	divji tip/ mutacija
SNP 1	ADH4 (razred II) 4q23b 3' UTR	rs1042364	G-159A	G/A
SNP 2	ADH1B (razred I) 4q23b ekson 3	rs1229984	Arg48His	G/A
SNP 3	ADH1C (razred I) 4q23b ekson 8	rs698	Ile350Val	A/G
SNP 4	ADH1C (razred I) 4q23b ekson 6	rs1693482	Arg272Gln	C/T
SNP 5	ADH4 (razred II) 4q23b promotor	rs1800759	A-75C	A/C
SNP 6	HTR1B 6q14.1b promotor	rs11568817	T-261G	T/G
SNP 7	HTR1B 6q14.1b promotor	rs130058	A-161T	A/T

Za genotipizacijo SNP sta potrebni dve specifični (v našem primeru hibridizacijski) sondi, ki prepoznotata določeno nukleotidno zaporedje na matrični DNA - vsaka po en alel (nespremenjen ali spremenjen) in se nanj vežeta. Sonda je označena z dvema barvilkoma. Na 5' koncu DNA je vezano barvilo, ki emitira fluorescenco in ga imenujemo poročevalno barvilo (reporter-R) in na 3' koncu DNA je vezan dušilec (quencher – Q), ki prestreza – duši fluorescenco poročevalnega barvila s t.i. Försterjevim prenosom resonančne energije (FRET). Med potekom verižne reakcije s polimerazo povzroči 5' endonukleazna aktivnost Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraze hidrolizo vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in s tem je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenza tako poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR. Uporabljata se dve TaqMan® sondi. Sonda za detekcijo nemutiranega alela ima na 5' koncu vezano barvilo VIC®, sonda za mutiran gen pa ima na 5' koncu vezano barvilo FAM™. V primeru alelne diskriminacije, stopnji prileganja in podaljševanja potekata pri temperaturi 60°C.



Slika 4. **Potek alelne diskriminacije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času**
(Povzeto po Applied Biosystem [67])

Uporabljeni reagenti in analizni postopek

Analizo alelne diskriminacije smo izvedli v podjetju Omega d.o.o. z reagenti Applied Biosystem® (Foster City, California) in na analizatorju Applied Biosystem 7500 Fast po navodilih proizvajalca.

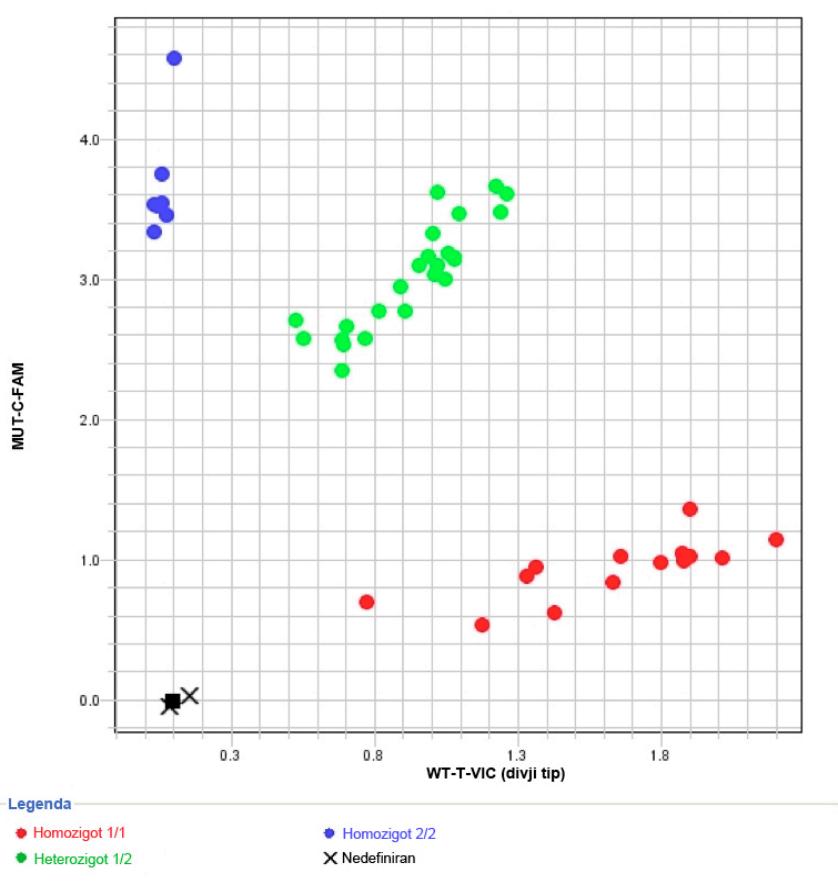
Lastnosti analiznega postopka

Za alelno diskriminacijo znanih polimorfizmov smo uporabili že pripravljene reagenčne komplete.

- 2X Universal PCR Master Mix, ki je vseboval AmpliTaq® Gold DNA-polimerazo, dNTP-je z dUTP, interno referenco in reakcijski pufer, v koncentraciji 2X.
- 20X, Drug Metabolism Genotyping assay Mix, kar je predstavljal mešanico dveh specifičnih sond, označenih z VIC® in FAM™ fluorescentnima barviloma in dveh neoznačenih začetnih oligonukleotidov 20X koncentracije za določanje polimorfizmov *ADH*. Koncentracija posameznega začetnega oligonukleotida (smernega in protismernega) je bila 18 µM in posamezne sonde 8 µM.
- 40X, SNP Genotyping assay Mix je bila mešanica prav tako dveh specifičnih, označenih sond in dveh neoznačenih začetnih oligonukleotidov 40X koncentracije za določanje polimorfizmov *HTR1B*. Tudi v tem primeru je bila koncentracija posameznega začetnega oligonukleotida 18 µM in posamezne sonde 8 µM.

- Genomsko DNA smo pripravili v koncentraciji med 3 in 20 µg/L, za kar smo uporabili ultra čisto vodo.

V ploščico s 96 luknjicami smo pipetirali komponente reakcijske mešanice. Skupni volumen reakcije je bil 5 µl. En preiskovani vzorec genomske DNA smo testirali na prisotnost sedmih polimorfizmov (pet polimorfizmov *ADH* in dva polimorfizma *HTR1B*), za kar smo porabili 10,5 µl DNA v priporočenem koncentracijskem območju. Diagram alelne porazdelitve za polimorfizem sr11568817 v *HTR1B* prikazuje slika 5.



Slika 5. Diagram alelne porazdelitve na analizatorju Applied Biosystem 7500 Fast
(Povzeto po Applied Biosystem [67])

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate biokemičnih meritev smo izrazili kot povprečno vrednost s standardno deviacijo ($\bar{x} \pm SD$) in kot mediano z območjem (min – max) pri parametrih, katerih porazdelitev ni bila normalna. Porazdelitev rezultatov posameznega biokemičnega kazalca smo testirali s Kolmogorov - Smirnovim testom. Za statistično obdelavo smo uporabili Kruskal-Wallisov

test in Spearmanovo korelacijo. Meja statistične značilnosti (p) je bila pod 0,05. Uporabili smo statistični program SPSS 21.0 za Windows okolje (SPSS, Inc. Chicago, USA). Za ugotavljanje porazdelitve polimorfizmov po Hardy-Weinbergovem ravnotežju smo uporabili χ^2 test, dostopen na spletni strani [68]. Za primerjavo alelnih frekvenc polimorfizmov med bolniki z diagnozo odvisnosti od alkohola in kontrolno skupino, smo uporabili Fischer exact test, dostopen na spletni strani [69]. Fischer exact test smo uporabili tudi pri ugotavljanju vpliva preiskovanih polimorfizmov v genih ADH na stopnjo jetrne fibroze v skupini odvisnikov od alkohola.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 MERILA ZA IZBOR PREISKOVANCEV

Biokemijske kazalce alkoholizma (MCV, AST, ALT in GGT) smo izmerili 164 preiskovancem, ki so bili razdeljeni v tri skupine: kontrolno skupino, skupino preiskovancev z akutno zastrupitvijo z alkoholom in skupino bolnikov z diagnozo odvisnosti od alkohola.

Kontrolno skupino je sestavljalo 90 preiskovancev, ki so prišli na pregled v ambulanto medicine dela, prometa in športa (MDPŠ). Ta skupina nam je služila kot vzorec slovenske populacije. Preiskovanci so prostovoljno izpolnili anketni vprašalnik, iz katerega smo dobili podatke o spolu, starosti, izobrazbi, morebitnih boleznih in pivskih navadah posameznika in družine. V tej skupini smo pričakovali v večini primerov vrednosti označevalcev alkoholizma znotraj referenčnega območja.

V drugi skupini je bilo 31 preiskovancev in so predstavljali skupino akutne zastrupitve z alkoholom (AZA). Domnevali smo, da je ta skupina po vrednostih za označevalce odvisnosti od alkohola najbolj heterogena. Do zastrupitve z alkoholom bi teoretično lahko prišlo pri osebi, ki je nevajena pitja alkohola in je to zanjo izjemen dogodek, ali pri osebi, ki tvegano oz. škodljivo pije.

V tretjo skupino smo uvrstili 43 preiskovancev, ki so se zdravili zaradi diagnoze odvisnosti od alkohola (DOA) in predstavljajo našo ciljno skupino. Pričakovali smo normalne ali pa povisane vrednosti označevalcev alkoholizma, skladno s posameznikovo časovno vključenostjo v proces zdravljenja in abstinenčno dobo. Osnovni demografski podatki so podani v preglednici III.

Preglednica III. **Osnovne značilnosti preiskovancev**

	MDPŠ	AZA	DOA	Vsi
štvelo (N)	90	31	43	164
starost (leta)	39 (± 10)	52 (± 18)	46 (± 11)	43 (± 13)
spol (m/z)	54/36	13/18	33/10	100/64

MDPŠ - preiskovanci medicine dela, prometa in športa; AZA – preiskovanci z akutno zastrupitvijo z alkoholom; DOA – bolniki s diagnozo odvisnosti od alkohola, N - štvelo

Preiskovancem vseh treh skupin smo izmerili štiri označevalce alkoholizma (GGT, AST, ALT in MCV), trije med njimi so encimi, ki so hkrati tudi kazalci prizadetosti jetrne funkcije različnega izvora. Nov pristop pri oceni stopnje jetrne fibroze je ELF test. Raziskave so pokazale, da ELF test lahko nadomesti zlati standard – jetrno punkcijo v primerih, ko je ta kontraindicirana [32, 34, 35]. Bolniki z diagnozo odvisnosti od alkohola so heterogena skupina, ki predstavlja veliko breme v zdravstvenemu sistemu. V nekaterih državah že razmišljajo, da bi ELF test lahko predstavljal diagnostično uporabno rešitev tudi pri bolnikih z diagnozo odvisnosti od alkohola [70]. V ta namen smo ELF test izmerili vsem preiskovancem z DOA in 39 preiskovancem iz skupine MDPŠ. Iz skupine MDPŠ smo izbrali 39 preiskovancev (25 moških, 14 žensk, povprečna starost 38 ± 10 let), ki niso jemali zdravil, saj bi lahko imeli prisotne okvare jeter zaradi terapije. Med skupinama smo v vrednostih ELF testa pričakovali statistično značilno razliko.

Vsem preiskovancem ($N=164$) smo iz izolirane genomske DNA določili genotipe za izbrane polimorfizme na genih za ADH, ki so kandidatni geni za razvoj odvisnosti od alkohola pri Kavkazijcih [45, 53]. Izbrali smo dva polimorfizma v genu, ki kodira ADH1C (rs698 in rs1693482), dva polimorfizma v genu za ADH4 (rs 1042364 in 1800759) in polimorfizem 1229984 v genu za ADH1B. Glede na odkrite polimorfizme genov pri nekaterih evropskih populacijah (Nemci, Poljaki, Madžari, Irci, Švedi) in Evro-američanih smo pričakovali pojavljanje teh polimorfizmov tudi znotraj slovenske populacije in statistično značilno razliko v alelnih frekvencah nekaterih izbranih polimorfizmov med skupinama MDPŠ in DOA.

V literaturi je opisano, da so zlorabe različnih prepovedanih substanc (alkohol, droge) povezane z motnjami razpoloženja kot sta agresivno in kompulzivno vedenje ter samomorilnost. Te motnje so povezane z disfunkcijo možganskega serotoninskega sistema, v katerem ima pomembno vlogo tudi serotoninski receptor 1B [66]. Na osnovi podatkov iz literature smo izbrali dva polimorfizma na genu za serotoninski receptor 1B (rs11568817, rs130058) in določili njuno pojavnost pri vseh preiskovancih, razdeljenih v skupine MDPŠ, AZA in DOA.

4.2 OCENA JETRNE FUNKCIJE Z BIOKEMIJSKIMI PARAMETRI

Jetra so organ, ki je pri zlorabi in/ali odvisnosti od alkohola najbolj prizadet. Med standardne biokemijske teste za odkrivanje uživanja alkohola spadajo aktivnosti encimov AST, ALT in GGT. Njihovo diagnostično občutljivost zvečamo z uporabo kombinacij dveh ali več označevalcev.

Poleg jetrnih encimov med osnovne označevalce kroničnega alkoholizma prištevamo tudi MCV, saj imajo alkohol (etanol) in njegovi presnovni produkti škodljive učinke na razvoj celic rdeče vrste. Posledica dolgotrajnega pitja alkohola je makrocitoza.

4.2.1 Merjenje serumskih koncentracij biomarkerjev alkoholizma

Merjenje serumskih koncentracij že uveljavljenih označevalcev alkoholizma nam je služilo kot izhodišče za primerjavo z rezultati ELF testa za oceno jetrne funkcije in proučevanje pogostnosti polimorfizmov v genih za ADH. V preglednici IV so prikazane izmerjene vrednosti označevalcev alkoholizma pri preiskovancih različnih skupin. Biokemični kazalci preiskovancev DOA se statistično razlikujejo od skupin MDPŠ in AZA. Statistično značilne razlike so pri AST, GGT in MCV ($p<0,002$), medtem ko se aktivnost ALT med skupinami razlikuje le na meji statistične značilnosti ($p=0,052$). Iz dobljenih podatkov smo potrdili našo domnevo, da se skupina preiskovancev AZA ne razlikuje od kontrolne skupine preiskovancev. Primerjava med vsemi tremi skupinami pa potrjuje statistično pomembno razliko pri izmerjenih vrednostih AST, GGT in MCV.

Preglednica IV. Izmerjene vrednosti osnovnih označevalcev alkoholizma

	MDPŠ N=90	AZA N=31	DOA N=43	p
MCV (fl)	$91,9 \pm 4,2$	$90,9 \pm 5,7$	$95,3 \pm 7,3$	0,001
AST (µkat/L)	0,30 (0,17 – 0,93)	0,33 (0,20 – 1,95)	0,42 (0,22 – 1,50)	0,002
ALT (µkat/L)	0,41 (0,16 – 2,51)	0,34 (0,17 – 3,36)	0,56 (0,24 – 4,22)	0,052
GGT (µkat/L)	0,37 (0,19 – 4,75)	0,34 (0,10 – 5,52)	0,92 (0,20 - 16,16)	< 0,001

MDPŠ - preiskovanci medicine dela, prometa in športa; AZA – preiskovanci z akutno zastrupitvijo z alkoholom; DOA – bolnki z diagnozo odvisnosti od alkohola; N - število

4.3 OCENA JETRNE FUNKCIJE Z ELF TESTOM

Fibroza je nespecifičen odgovor jetrnega tkiva na poškodbo, ki povzroči tvorbo značilnega izvenceličnega matriksa. Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test sodi med novejše, neinvazivne biokemične laboratorijske teste za ovrednotenje jetrne fibroze. Rezultat testa vključuje kombinacijo izmerjenih serumskih koncentracij hialuronske kisline, N-terminalnega propeptida prokolagena tipa III in tkivnega inhibitorja metaloproteinaze 1. V literaturi je opisan kot primeren test za napoved jetrne fibroze pri kronični jetrni bolezni nealkoholnega izvora in predstavlja nadomestno metodo za histološki pregled jetrne biopsije, ki je kljub nekaterim izkazanim pomankljivostim pri ocenjevanju, referenčna metoda za določanje stopnje jetrne fibroze v večini primerov [34]. Jetrna biopsija je invazivna metoda, ki jo spremlja v 0,5 % pojavnost hudih zapletov pri posegu. Točnost pri ovrednotenju jetrne fibroze je omejena s heterogenostjo vzorčenja in je vezana na subjektivno oceno patologa pri pregledu bioptičnega materiala. Metoda je draga, vezana na dobro izšolanega in izkušenega patologa, dostopnost metode je omejena na ciljano populacijo bolnikov, ki imajo v večini primerov napredovano stopnjo jetrne fibroze [34].

Kronična jetrna bolezen je prav tako kot ostale kronične bolezni v svoji začetni stopnji neprepoznavna in se začne z njeno obravnavo pogosto na stopnji, ko je že napredovana, s tem so možnosti zdravljenja manjše in praviloma dražje. Fibroza je napredajoč proces in vodi v cirozo, zato je njeno zgodnje odkrivanje, ko je proces še reverzibilen, zelo pomembno. Ocena jetrne fibroze nudi več informacij, poleg diagnostične in prognostične vrednosti ima pomembno vlogo pri terapevtskih odločitvah in spremljanju zdravljenja.

Pri oblikovanju naše naloge nas je vodilo prepričanje, da je potrebno zgodnje odkrivanje kronične jetrne bolezni, ne glede na njen izvor, tudi pri bolnikih z DOA. V literaturi so opisane strategije, kako zmanjšati stroške obravnave bolnikov z diagnozo odvisnosti od alkohola prav z uporabo neinvazivnih označevalcev jetrne fibroze [70]. Ideja o vključitvi testa za oceno napredovane jetrne fibroze v študijo se je porodila v fazi, ko je študija že potekala, zato sta skupini, kjer smo merili ELF test majhni in vnaprej nenačrtovani. V skupini MDPŠ smo za meritev ELF testa izbrali 39 preiskovancev (25 moških in 14 žensk), po že opisanih merilih. Naš namen je vključitev ELF testa v obravnavo bolnika na primarni ravni zdravljenja, ko specialist družinske medicine presodi, da obstaja indikacija za testiranje in je morebitna prisotnost jetrne bolezni majhna.

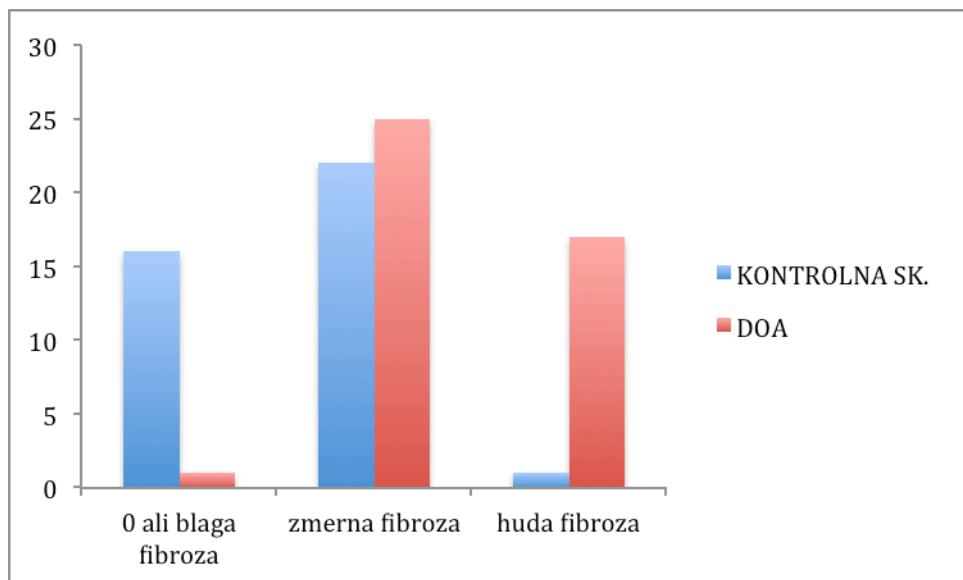
4.3.1 Primerjava izmerjenih označevalcev alkoholizma z ELF testom

Primerjava izmerjenih koncentracij označevalcev odvisnosti od alkohola in treh parametrov ELF testa (HA, PIIINP, TIMP-1) med podskupino MDPŠ in skupino DOA kaže statistično pomembne razlike pri vseh parametrih, razen pri ALT, kjer je katalitična aktivnost na meji statistično pomembne razlike ($p=0,062$). Rezultati so skladni z razlago, da se ALT, ki je citoplazemski encim, iz hepatocitov sprošča lahko že ob manjši prepustnosti membran hepatocitov, za povečanje serumskih koncentracij AST in GGT pa so poškodbe hepatocitov večje. Rezultati so zbrani v preglednici V. Do enakih ugotovitev smo prišli že pri primerjavi izmerjenih koncentracij za označevalce alkoholizma med vsemi tremi skupinami preiskovancev.

Med podskupino MDPŠ in skupino DOA smo primerjali tudi izračunano vrednost za ELF, ki predstavlja oceno za stopnjo jetrne fibroze. V kontrolni skupini (podskupini MDPŠ) smo pričakovali vrednosti ELF, ki opredeljujejo stanje brez prisotnosti fibroze in pri preiskovancih z DOA prisotnost zmerne ali celo hude fibroze. Rezultati so nas delno presenetili. Vrednosti za oceno jetrne fibroze se med skupinama statistično značilno razlikujeta ($P<0.001$), vendar sta obe znotraj območja zmerne fibroze. V podskupini MDPŠ je vrednost mediane ELF testa 7,99 (6,99 - 10,18), v skupini DOA pa 9,47 (6,98 - 14,73). Graf 1 prikazuje pogostnost posamezne stopnje jetrne fibroze pri preiskovancih v kontrolni skupini (podskupina MDPŠ, ki vključuje 39 preiskovancev) in skupini DOA (43 preiskovancev). Zmerno fibrozo določeno z ELF testom predstavljajo vrednosti med 7,7 in 9,8. Tako se mediana v podskupini MDPŠ približuje spodnji mejni vrednosti za zmerno fibrozo in v skupini DOA zgornji mejni vrednosti. V podskupini MDPŠ so posamezniki z ELF vrednostjo več kot 9,8, ki opredeljuje hudo jetrno fibrozo. Preiskovanci kontrolne skupine pri meritvah ELF testa so izhajali iz skupine MDPŠ in smo jih obravnavali kot zdravo populacijo. Skupina je bila majhna in izbrana na podlagi podatkov iz izpolnjenega vprašalnika. Za bolj realno in uporabno opredelitev ELF testa pri tej skupini preiskovancev bi potrebovali dodatne anamnestične in klinične podatke. V skupino smo tako zajeli tudi preiskovance, ki so imeli zvišane vrednosti za preiskovane encime in MCV. Med temi preiskovanci so lahko tudi posamezniki, ki tvegano uživajo alkohol ali pa imajo prisotno poškodbo jetrnega tkiva zaradi drugih vzrokov.

V skupini DOA s preiskovanci, ki se zdravijo zaradi odvisnosti od alkohola so vrednosti ELF testa med posamezniki prav tako močno razlikujejo. Visoke vrednosti lahko pomenijo

pozno vključenost v proces zdravljenja, ko je že bila povzročena ireverzibilna poškodba jetrnega tkiva. Nižje vrednosti pa vključenost v zdravljenje v času, ko poškodba jetrnega tkiva še ni napredovala in so bile spremembe še reverzibilne. Za podrobnejšo opredelitev ELF testa bi potrebovali več podatkov o preiskovancih, kot so podatek o začetku zdravljenja oz. trajanju abstinence, dobi odvisnosti od alkohola pred vstopom v program zdravljenja.



Graf 1. **Pojavnost različnih stopenj fibroze** v kontrolni skupini (KS) in pri bolnikih z diagnozo odvisnosti od alkohola (DOA). Stopnja jeterne fibroze je določena z ELF testom. Blago fibrozo (ELF: $< 7,7$) ima 16 preiskovancev kontrolne skupine in 1 preiskovanec skupine DOA, zmerno fibrozo (ELF: $> 7,7 - < 9,8$) ima 22 preiskovancev kontrolne skupine in 25 preiskovancev DOA. Huda fibroza (ELF: $> 9,8$) je prisotna pri 17 preiskovancih DOA in samo pri 1 preiskovancu kontrolne skupine.

Preglednica V. Primerjava biomarkerjev alkoholizma in ELF testa

parameter skupina; n; P	MCV (fl)	AST µkat/L	ALT µkat/L	GGT µkat/L	HA µg/L	PIINP µg/L	TIMP-1 µg/L	ELF /
MDPŠ (n = 39)	93 (80 – 103)	0,31 (0,17 – 0,97)	0,42 (0,16 – 1,45)	0,37 0,20 – 4,50	11,36 (3,06 – 86,53)	6,13 (3,06 – 11,40)	175,90 (117,2 – 861,7)	7,99 (6,99 – 10,18)
DOA (n = 43)	95,4 (74,3 – 123,6)	0,42 (0,22 – 1,50)	0,56 (0,24 – 4,22)	0,92 0,20 – 16,6	54,30 (5,46 – 3321,33)	7,92 (4,25 – 49,01)	244 149,9 – 618,0	9,47 (6,98 – 14,73)
p	0,038	< 0,001	< 0,062	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

MDPŠ - skupina medicine dela, prometa in športa; DOA - diagnoza odvisnosti od alkohola, n - število

4.4 KORELACIJA MED OZNAČEVALCI ALKOHOLIZMA IN ELF TESTOM

Objavljenih je več študij, kjer so določali ELF test pri odkrivanju jetrne fibroze in ga primerjali z jetrnimi testi v rutinski uporabi in jetrno biopsijo [32, 71, 72]. Glavno vprašanje je bilo, ali vključitev specifičnih biooznačevalcev izvenceličnega matriksa doprinese k boljši diagnostiki jetrne fibroze v primerjavi z že uveljavljenimi označevalci. V večini primerov so zajeli paciente z nealkoholno zamaščenostjo jeter (NAFLD) in hepatatitisom C in B. NAFLD vključuje širok spekter bolezni, kot so steatoza, nealkoholni steatohepatitis in fibroza, ki prehaja v cirozo. Bolezen je v velikem porastu in globalno predstavlja večji del jetrnih obolenj. Vzrok je vedno večja prevalenca debelosti in diabetesa tipa 2, ki sta posledici metabolnega sindroma. Validacija ELF testa na bolnikih z NAFLD je pokazala, da je vključitev testa k obstoječim biokemičnim preiskavam (glukoza na tešče, HDL, AST, GGT, trombociti, albumin) izboljšala diagnostiko za odkrivanje jetrne fibroze. Diagnostično točnost ocene jetrne fibroze z ELF testom, uveljavljenimi označevalci in kombinacijo obeh so primerjali z ROC krivuljami (Receiver Operating Characteristic), napovednimi vrednostmi in kliničnim modelom uporabnosti. Površina pod krivuljo je bila pri ELF testu 90 % za prepoznavanje hude jetrne fibroze, 82 % za zmerno fibrozo in 76 % za določanje stanja brez prisotnosti fibroze. Kombinacija ELF testa in biokemičnih kazalcev pa je njegovo diagnostično uporabnost še dodatno izboljšala [32]. Klinični model v isti študiji je pokazal, da bi se lahko v več kot 80 % izognili jetrni punkciji za potrditev fibroze.

V raziskavi na bolnikih s kroničnim hepatitisom C (CHC) so primerjali ELF test z že uveljavljenim razmerjem AST/trombociti (AST to platelet ratio index – APRI) pri ugotavljanju stopnje kronične jetrne bolezni [35]. Vsi bolniki so imeli opravljen histološki pregled jetrne biopsije, ovrednoten po Ishak-ovi lestvici. Napovedna vrednost za jetrno cirozo je znašala 86 % za APRI, 91 % za ELF test.

V naši nalogi smo na podlagi rezultatov omenjenih študij želeli pri preiskovancih z diagnozo odvisnosti od alkohola oceniti korelacijo med uveljavljenimi označevalci alkoholizma (AST, ALT, GGT in MCV), posameznimi parametri ELF testa (HA, PIIINP in TIMP-1) in ELF izračunom za stopnjo jetrne fibroze. Rezultati so prikazani v preglednici VI.

Uporabili smo Spearmanov koreacijski test za neparametrično porazdelitev spremenljivk. V skupini DOA, AST značilno korelira s HA, PIIINP in ELF ($p < 0,01$), s TIMP-1 pa nekoliko šibkeje, vendar značilno ($p < 0,05$). GGT značilno korelira z vsemi tremi parametri in ELF ($p < 0,01$). ALT korelira samo s TIMP-1 in ELF ($p < 0,05$).

V pregledani in navedeni literaturi nismo zasledili korelacije med uveljavljenimi kazalci alkoholizma in ELF testom. Kot standard za določitev stopnje jetrne fibroze je bila vedno uporabljena jetrna biopsija, s katero so primerjali biokemične kazalce alkoholizma in ELF test za oceno fibroze.

Dobljenih rezultatov v skupini DOA kažejo na dobro korelacijo encimov, ki določajo poškodbo jetrnega tkiva z direktnimi markerji fibroze. Zvišana aktivnost AST, ki se sprošča iz citoplazme in mitohondrijev okvarjenih hepatocitov, kaže na njihovo bolj obsežno in globoko poškodbo. V primeru nizke stopnje okvare jetrnih celic se v krvni obtok sprosti citoplazemska frakcija encima in šele pri težjih jetrnih nekrozah se iz poškodovanih hepatocitov sporošča tudi mitohondrijska frakcija encima, ki značilno prispeva k dvigu serumske aktivnosti AST. Sklepamo, da je zaradi navedenega korelacija AST z izmerjenimi markerji fibroze visoka. ALT se v serum sprošča že ob majhni poškodbi jetrnega tkiva oz. spremembenosti prepustnosti membrane hepatocitov, zato slabše korelira z direktnimi markerji fibroze.

Aktivnost GGT, ki je deloma mikrosomalni encim, je pri alkoholikih v serumu zvišana zaradi indukcije sinteze encima in hkrati poškodbe celične membrane hepatocitov, ki je posledica toksičnega učinka etanola. Ugotovitve pojasnjujejo visoko korelacijo GGT z markerji fibroze.

Preglednica VI. Korelacija med biomarkerji alkoholizma in ELF testom v skupini DAO.

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
MCV	0,241	0,021	0,126	0,200
AST	0,532**	0,491**	0,351*	0,524**
ALT	0,291	0,292	0,342*	0,306*
GGT	0,620**	0,517**	0,517**	0,632**

* $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; DOA – skupina preiskovancev s sindromom odvisnosti od alkohola

Korelacija med označevalci alkoholizma in ELF testom v podskupini MDPŠ je prikazana v preglednici VII. V podskupini MDPŠ-kontrolni skupini, MCV in AST korelirata statistično značilno s HA ($p<0,05$). HA se sprošča v serum iz jetrnih celic že ob vnetnih procesih in zvišane serumske koncentracije ne pomenijo vedno fibroze. GGT korelira negativno z izračunano vrednostjo ELF ($p<0,05$). Menimo, da indukcija sinteze encima ni prisotna in da je sproščanje GGT, ki je vezan na membrano hepatocita, povezano s hujšimi poškodbami jetrnega tkiva, ki jih v kontrolni skupini nismo zaznali. Korelacije MCV s HA nismo uspeli pojasniti.

Preglednica VII. **Korelacija med označevalci alkoholizma in ELF testom v podskupini MDPŠ.**

	HA	PIIINP	TIMP-1	ELF
MCV	0,327*	-0,044	- 0,122	0,311
AST	0,339*	- 0,109	0,024	0,248
ALT	0,045	- 0,010	0,000	- 0,008
GGT	- 0,312	0,013	- 0,039	- 0,377*

* $p < 0,05$

4.4.1 Klinična uporabnost ELF testa

Vloga ELF testa pri ločevanju bolnikov brez jetrne fibroze in bolnikov pri katerih je stopnja jetrne fibroze že napredovala, je danes predmet številnih raziskav [33, 34]. Študija na bolnikih s kronično jetrno bolezni različnih etiologij je pokazala, da ELF test lahko napove klinični izid bolezni enako dobro kot biopsija in lahko služi kot uporabno prognostično orodje v klinični praksi [35].

Iz rezultatov naše raziskave sklepamo, da bi bilo smiselno dodatno proučiti učinkovitost uporabe ELF testa pri bolnikih z diagnozo odvisnosti od alkohola. Določitev bi bila smiselna ob pričetku zdravljenja in med samim potekom zdravljenja. Zaradi pomanjkanja podatkov o diagnostični uporabnosti ELF testa pri alkoholikih in še nekaterih drugih skupinah bolnikov, bi bilo potrebno preveriti predvsem mejne vrednosti za določitev posamezne stopnje fibroze. Tudi v naši študiji smo populacijo alkoholikov primerjali na priporočene mejne vrednosti bolnikov z jetrno okvaro nealkoholnega izvora.

Z dobljenimi rezultati pri kontrolni podskupini preiskovancev MDPŠ smo potrdili ugotovite Parkesove in sod. [35], da bi bilo potrebno oceniti diagnostično uporabnost ELF

testa pri obravnavi bolnikov na primarni ravni, še posebej tistih, ki alkohol pogosto in prekomerno uživajo. ELF test bi lahko predstavljal uporaben, cenejši, neinvaziven test v primerjavi z biopsijo jeter.

4.5 IZOLACIJA DNA

DNA nam je uspelo izolirati iz vseh vzorcev krvi, kakovost oz. koncentracija izolirane DNA je bila zelo različna. Koncentracije DNA so se gibale od 2 ng/ μ l do 350 ng/ μ l. Razlog za heterogenost je lahko povezana z vzorčenjem ali pa fazoobarjanja proteinov v postopku izolacije. Povprečna izmerjena koncentracija DNA je bila 100 ng/ μ l. Za nadaljnjo analizo DNA je priporočeno razmerje absorbanc 260/280, ki podaja čistost vzorca 1,74, česar nismo dosegli pri vseh vzorcih.

4.6 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati genotipizacije preiskovancev za izbrane polimorfizme (glej preglednico II v poglavju Preiskovanci in metode) v genih za ADH in HTR1B.

4.6.1 Genotipozacija polimorfizmov v genih za ADH

V literaturi smo poiskali kandidatne gene za razvoj odvisnosti od alkohola, ki se pojavljajo pri posameznih populacijah v evropskem prostoru [53]. Za razliko od Azijcev, kjer so polimorfizmi, povezani z alkoholizmom, prisotni v genih za ADH in ALDH, je za Kavkazijce značilno, da se do sedaj proučevani polimorfizmi bolj pogosto in statistično značilno pojavljajo v genih za ADH. Polimorfizem v genu za ALDH (*ALDH2*2*), ki je značilen za vzhodno azijsko populacijo in kodira neaktivni encim, v ne-vzhodno azijski populaciji, še ni bil odkrit. [45, 73, 74]. Proučevali smo pet polimorfizmov v genih za ADH in ugotavliali njihovo genotipsko frekvenco. Rezultati so zbrani v preglednici VIII.

Porazdelitev genotipov je bila za vse preiskovane polimorfizme, razen polimorfizma rs1800759 v genu za ADH4 (SNP 5) pri skupinah MDPŠ in AZA, v HWE. HWE določa, da genotip in alelna frekvenca v populaciji ostaneta nespremenjena (v ravnotežju) iz generacije v generacijo, dokler ne pride do vpliva, ki povzroči spremenjeno porazdelitev. Tak vpliv lahko predstavljajo mutacije, migracije, nenaključno parjenje, naravna selekcija. V literaturi smo zasledili HWD za isti polimorfizem rs1800759 - SNP 5 in polimorfizem rs1042364 – SNP 1 (oba v genu za ADH4) pri Evro-američanah in Afro-američanah v

kontrolni skupini in skupini odvisnikov od alkohola in drog [56]. Tudi v študiji na Brazilcih evropskega in afriškega izvora je bil tako pri kontrolni skupini, kot skupini odvisnikov izražen močan HWD z velikim presežkom heterozigotov, pri polimorfizmih rs1800759 in rs1042364 [75]. Naši rezultati se ujemajo z rezultati tujih raziskav v polimorfizmu rs1800759 pri kontrolni skupini. Odklon od HWE v določeni populaciji bi lahko bila napaka pri genotipizaciji, kar pa je malo verjetno glede na dejstvo, da so podatki med študijami skladni, razen če je napaka posledica obstoja visoko homolognih regij v genomu [76]. Do HWD lahko pride tudi zaradi nizkega števila preiskovancev. To bi lahko veljalo za našo raziskavo in študijo na brazilski populaciji, v študiji [56] na Evro- in Afro-američanh pa je bilo število preiskovancev bistveno večje. Ko smo združili preiskovance skupine MDPŠ in skupine z DOA, je bila ta populacija v HWE na meji statistične značilnosti ($p = 0,07$).

Genotipska frekvenca A-A (mutirani homozigoti) za polimorfizem rs1042364 je v vseh treh skupinah preiskovancev nizka, od 9 do 13%. Za polimorfizem rs1800759 je genotipska frekvenca A-A (nemutirani homozigoti) prav tako nizka, od 11 do 18 %. Iz tega sledi, da je pri slovenski populaciji haplotipska frekvenca A-A, ki ima zaščitno vlogo pri tveganju za nastanek odvisnosti od alkohola, nizka. Dobljeni rezultati so primerljivi z rezultati multicentrične študije na nemških in poljskih preiskovancih [57].

V preglednici VIII, kjer so zbrane genotipske frekvence za posamezne polimorfizme vidimo, da homozigoti za polimorfizem rs1229984 (SNP 2) v genu za ADH1B niso prisotni v preiskovanih skupinah AZA in DOA. Pri skupini MDPŠ pa je polimorfizem prisoten z genotipsko frekvenco 1%. Podatki se ujemajo s študijami na Kavkazjskih preiskovancih [51, 53]. Opisan polimorfizem je v veliki meri prisoten pri Azijski populaciji in predstavlja zaščitno vlogo tega polimorfizma pri nastanku odvisnosti od alkohola [51]. Pri slovenski populaciji polimorfizem rs1229984, ki predstavlja zaščito pred odvisnostjo od alkohola, ni prisoten.

Sivo obarvano polje v preglednici VIII predstavlja polimorfizma rs698 (SNP 3) in rs1693482 (SNP 4) v genu za ADH1C, ki sta v popolnem vezalnem nesorazmerju (linkage disequilibrium - LD). LD opredeljuje kombinacijo alelov, ki je v populaciji bolj ali pa manj pogosta kot bi pričakovali pri običajni formaciji haplotipov, ki izhaja iz njihove frekvence. Genotipska frekvenca (mutirani homozigoti) za polimorfizma rs1693482/rs698, (Gln272Val350) ki izkazuje vpliv na tveganje za prekomerno in problematično pitje alkohola [52] je nizka in se ne razlikuje med skupinama. To sta povezana polimorfizma,

dedujeta se haplotipsko in je njuna genotipska frekvenca v kontrolni skupini (MDPŠ) pri slovenski populaciji 13,3 % in pri odvisnikih od alkohola 18,6 %.

Preglednica VIII Porazdelitev genotipov za izbrane polimorfizme v genih za ADH in HWE

ADH	MDPŠ n = 90			AZA n = 31			DOA n = 43		
	N	f ₀	HWE p	N	f ₀	HWE p	N	f ₀	HWE p
SNP 1									
GG	37	0,410		12	0,390		21	0,488	
GA	45	0,500	0,272	15	0,480	0,877	18	0,449	0,960
AA	8	0,090		4	0,130		4	0,093	
SNP 2									
GG	74	0,882		27	0,871		42	0,977	
GA	15	0,167	0,808	4	0,129	0,701	1	0,023	0,938
AA	1	0,011		0	0		0	0	
SNP 3									
AA	37	0,411		14	0,452		13	0,302	
AG	41	0,455	0,904	13	0,419	0,723	22	0,512	0,807
GG	12	0,133		4	0,129		8	0,186	
SNP 4									
CC	38	0,422		14	0,452		13	0,302	
CT	41	0,455	0,991	13	0,419	0,722	22	0,512	0,807
TT	11	0,122		4	0,129		8	0,186	
SNP 5									
AA	17	0,189		4	0,129		5	0,117	
AC	56	0,622	0,020*	18	0,581	0,284	20	0,465	0,876
CC	17	0,189		9	0,290		18	0,419	

MDPŠ - skupina medicine dela, prometa in športa; AZA - akutna zstrupitev z alkoholom;

DAO - diagnoza odvisnosti od alkohola; f₀ - genotipska frekvenca; N - število

SNP 1 - rs1042364 ADH4 (G/A), SNP 2 - rs1229984 ADH1B (G/A), SNP 3 - rs698 ADH1C (A/G)

SNP 4 - rs1693482 ADH1C (C/T), SNP 5 - rs1800759 ADH4 (A/C)

HWE - Hardy-Weinberger equilibrium (p>0,05), * - HWD (p < 0,05)

4.6.2 Genotipizacija polimorfizmov v genu za HTR1B

Študije o vlogi serotoninskega sistema, predvsem HTR1B pri zlorabi alkohola so nasprotuječe [61, 65]. Leta 2012 je bil objavljen članek, v katerem so opisali statistično značilno povezavo med funkcionalno varianto gena rs11568817 v promotorski regiji in zlorabo alkohola pri brazilskih alkoholikih evropskega porekla v primerjavi s kontrolno skupino [66]. Dokazali so tudi kompleksno ravnotežno regulacijo s strani dveh funkcionalnih različic, rs 115568817 in rs130058, v promotorskem delu gena, ki sta v vezalnem nesorazmerju. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da preverimo prisotnost opisanih polimorfizmov v treh preiskovanih skupinah. Rezultati genotipskih frekvenc so zbrani v preglednici IX. Preiskovana polimorfizma sta v HWE.

Preglednica IX. Porazdelitev genotipov za polimorfizma v genu za HTR1B in HWE

5- HT1B	MDPŠ n = 90			AZA n = 31			DOA n = 43		
	N	f ₀	HWE	N	f ₀	HWE	N	f ₀	HWE
SNP 6									
TT	30	0,333		10	0,323		11	0,256	
TG	46	0,511	0,598	14	0,452	0,623	24	0,558	0,425
GG	14	0,155		7	0,226		8	0,186	
SNP 7									
AA	4	0,040		3	0,097		4	0,093	
AT	39	0,433	0,243	9	0,290	0,245	20	0,465	0,698
TT	47	0,522		19	0,613		19	0,442	

MDPŠ - skupina medicine dela, prometa in športa; AZA - akutna zastrupitev z alkoholom; DOA - diagnoza odvisnosti od alkohola; f₀ - genotipska frekvenca; N, n - število
 SNP 6 – rs11568817 HTR1B (T/G), SNP 7 – rs130058 HTR1B (A/T),
 HWE - Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0,05$)

Genotipske frekvence v skupini DOA za polimorfizem SNP 6 (rs11568817) so primerljive z objavljenimi genotipskimi frekvencami alkoholikov v študiji [66]. V skupinah MDPŠ in AZA pa so genotipske frekvence za homozigote T-T in G-G obratne kot v omenjeni študiji in tako primerljive s skupino DOA.

Pri SNP 7 (rs130058) je v vseh treh preiskovanih skupinah zelo nizka frekvenca za nemutiran genotip, kar je nasprotno ugotovitvam študije [66]. V skupini MDPŠ je manjša od 5% in v skupinah AZA in SOA manjša od 10%, kar ustreza genotipski frekvenci za mutirane homozigote v omenjeni študiji. Rezultati primerjave slovenske populacije alkoholikov in kontrolne skupine MDPŠ z brazilsimi alkoholiki evropskega porekla in kontrolno skupino za polimorfizem rs130058 so zbrani v preglednici X.

Preglednica X. Primerjava genotipskih frekvenc za SNP -7 med Slovenci in Brazilci evropskega porekla

polimorfizem	n 90	NAS (f ₀)	n 237	NAB (f ₀)	n 43	AS (f ₀)	n 136	AB (f ₀)
rs 130058 (SNP-7)								
genotip								
AA	4	0,040	120	0,506	4	0,093	67	0,523
AT	39	0,433	96	0,405	20	0,465	53	0,414
TT	47	0,522	21	0,089	19	0,442	8	0,063

NAS – slovenski nealkoholiki, NAB – brazilski nealkoholiki evropskega porekla, AS – slovenski alkoholiki, AB – brazilski alkoholiki evropskega porekla, n – število

4.7 AELNE FREKVENCE PREISKOVANIH POLIMORFIZMOV PRI SLOVENSKI POPULACIJI IN PRIMERJAVA Z OSTALIMI POPULACIJAMI

V nadaljevanju so predstavljene alelne frekvence pri posameznih polimorfizmih. Rezultati so zbrani v tabelah po preiskovanih genih (ADH1B, ADH1C, ADH4 in HTR1B). Primerjali smo skupino DOA s kontrolno skupino MDPŠ. Rezultati so predstavljeni v predlednicah XI, XIII, XIV in XV.

Preglednica XI. Primerjava alelnih frekvenc preiskovanega polimorfizma v genu za ADH1B pri kontrolni skupini MDPŠ in skupini DOA.

Gen Polimorfizem	Alel	MDPŠ (n)	DOA (n)	P
ADH1B rs1229984	G	163	85	0,009
	A	17	1	

MDPŠ – skupina medicine dela, prometa in športa; DOA – skupina z diagnozo odvisnosti od alkohola, n - število

Alelni frekvenci v polimorfizmu rs1229984 v genu za ADH1B se statistično značilno razlikujeta med kontrolno skupino MDPŠ in skupino DOA.

Kot smo ugotovili že pri genotipski frekvenci se dobljeni rezultati ujemajo z rezultati pri ostalih evropskih populacijah, Špancih, Francozih, Nemcih, Švedih in Poljakih, kar je pokazala študija [53]. Vendar pa se rezultati znotraj slovenske populacije razlikujejo od rezultatov pridobljenih na ostalih evropskih populacijah. Pri Slovencih se alelna frekvencia za polimorfizem rs1229984 pomembno razlikuje med nealkoholiki in alkoholiki, medtem ko pri ostalih navedenih populacijah statistično pomembne razlike med alkoholiki in nealkoholiki ni. Statistično pomembna razlika nastane le v primeru, ko vse opisane populacije združimo in razdelimo v skupini alkoholikov in nealkoholikov [53]. Podatki so zbrani v primerjalni preglednici XII.

Preglednica XII. Primerjava alelnih frekvenc za polimorfizem rs1229984 med slovensko populacijo in nekaterimi evropskimi populacjami.

skupina	populacija	alel		P (NA proti N)
		G	A	
NA	Slovenci (MDPŠ, Domžale)	0,905	0,094	0,0090
	Španci (Tarragona)	0,939	0,061	0,1443
	Francozi (Bordeaux)	0,987	0,013	1
	Nemci (Heidelberg)	0,966	0,034	0,0842
	Švedi (Stockholm)	0,962	0,038	0,0921
	Poljaki (Krakow)	0,980	0,020	0,3716
	VSI, razen Slovenci	0,962	0,038	0,0016
A	Slovenci (DOA, PB Begunje)	0,977	0,023	
	Španci (Tarragona)	0,969	0,031	
	Francozi (Bordeaux)	0,987	0,013	
	Nemci (Heidelberg)	0,994	0,060	
	Švedi (Stockholm)	1,000	0	
	Poljaki (Krakow)	0,992	0,080	
	VSI, razen Slovenci	0,987	0,013	

NA – nealkoholiki, A - alkoholiki

Preglednica XIII. Primerjava alelnih frekvenc v preiskovanih polimorfizmih v genu za ADH1C pri kontrolni skupini MDPŠ in skupini DOA.

Gen Polimorfizem	Alel	MDPŠ (n)	DOA (n)	p
<i>ADH1C</i> rs698	A	115	48	0,206
	G	65	38	
<i>ADH1C</i> rs1693482	C	117	48	0,149
	T	63	38	

MDPŠ – skupina medicine dela, prometa in športa; DOA – skupina z diagnozo ovisnosti od alkohola

Polimorfizma v genu za ADH1C ne kažeta statistično značilne razlike alelnih frekvenc med kontrolno skupino MDPŠ in skupino DOA. Alelni frekvenci za mutirana alela sta v območju med 30 in 50 %, kot je opisano v študijah pri Kavkazijcih [53], [55], [77].

V študiji na madžarski populaciji [52], kjer so preiskovali posamezne in kombinirane vplive polimorfizmov rs1229984 in rs1693482/rs698 na alkoholizem in kronično jetrno bolezen so z multivariantno analizo ugotovili, da se pri homozigotih za povezana polimorfizma v genu za ADH1C, haplotip G-T (Gln272/Val350) poveča tveganje za pretirano in problematično uživanje alkohola. V isti študiji pa so dokazali tudi, da ima kombinacija divjega tipa *ADH1C*, haplotip A - C (Arg272/Ile350) in alela 48His v *ADH1B* zaščitno vlogo pri nastanku kronične jetrne bolezni. V naši študiji smo prav tako žeeli ugotoviti, ali obstaja statistično značilna povezava med opisanimi polimorfizmi in oceno jetrne fibroze (ELF testom) pri skupini z diagnozo odvisnosti od alkohola. Uporabili smo Fischer exact test. Ugotovili smo, da ne obstaja statistično značilna povezava med preiskovanimi polimorfizmi v *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH4* in oceno jetrne fibroze.

Preglednica XIV. Primerjava alelnih frekvenc v preiskovanih polimorfizmih v genu za *ADH4* pri kontrolni skupini MDPŠ in skupini DOA.

Gen Polimorfizem	Alel	MDPŠ (n)	DOA (n)	p
<i>ADH4</i> rs1042364	G	158	60	0,507
	A	48	26	
<i>ADH4</i> rs1800759	A	90	30	0,025
	C	90	56	

MDPŠ – skupina medicine dela, prometa in športa; DOA – skupina z diagnozo odvisnosti od alkohola.

Ugotovili smo statistično značilno razliko med alelnimi frekvencami kontrolne skupine MDPŠ in skupine DOA pri polimorfizmu rs1800759 v genu za ADH4.

V študiji [75] se genotipske frekvence polimorfizmov rs1042364 in rs1800759 pri kavkazijskih in afriških Brazilcih statistično značilno razlikujejo med bolniki z alkoholno odvisnostjo in kontrolno skupino. Naši rezultati se s študijo ujemajo samo pri polimorfizmu rs1800759.

Edenberg je v študiji l. 1999 [78] postavil hipotezo, da ima alel A v polimorfizmu 1800759 zaščitno vlogo pred nastankom odvisnosti od alkohola, tako kot aleli v genih za

ADH1B in ADH1C z večjo katalitično hitrostjo. V naši raziskavi imajo odvisniki od alkohola alelno frekvenco za A alel 35 % (kontrolna skupina MDPŠ 50 %), kar kaže na večje tveganje za razvoj odvisnosti.

Preglednica XV. Primerjava alelnih frekvenc preiskovanih polimorfizmov v genu za serotoniniski receptor HTR1B pri kontrolni skupini MDPŠ in skupini DOA.

Gen Polimorfizem	Alel	MDPŠ (n)	DOA (n)	p
<i>HTR1B</i> rs11568817	T G	106 74	46 40	0,405
<i>HTR1B</i> rs130058	A T	47 133	28 58	0,308

MDPŠ – skupina medicine dela, prometa in športa; DOA – skupina z diagnozo odvisnosti od alkohola;
n - število

Preiskovana polimorfizma *HTR1B* (rs11568817 in rs130058) ne kažeta statistično značilne razlike alelnih frekvenc med skupinama.

V študiji [66] je prvič opisana povezava odvisnosti od alkohola z G aleлом pri polimorfizmu rs11568817 ($p<0,001$). G alel je povezan z večjo aktivnostjo (vezalno sposobnostjo) receptorja. Po tej hipotezi različica receptorja z večjo aktivnostjo posredno poveča aktivnost dopamina v mezolimbičnem nagrajevalnem sistemu preko inhibicije GABA. Pri naši skupini odvisnikov od alkohola sta alela T in G v polimorfizmu rs11568817 prisotna z enakovrednima frekvencama.

Pri slovenskih odvisnikih od alkohola je T alel v polimorfizmu rs130058 v primerjavi s študijo pri brazilskeh preiskovancih evropskih korenin [66] prisoten z 2,5 krat večjo alelno frekvenco, kar bi bilo potrebno potrditi na večjem številu vzorcev in dodatno proučiti njegov morebiten vpliv na nastanek odvisnosti od alkohola. Podobno razmerje v primerjavi s kontrolno skupino v brazilski študiji smo določili tudi v skupini MDPŠ. Ker sta polimorfizma v vezalnem nesorazmerju, v haplotipu G – T, T alel po podatkih iz študije [79] izniči efekt G alela in vrača receptorju prvotno aktivnost ter s tem regulatorno vpliva na izražanje gena. Iz opisanega lahko sklepamo, da ima v slovenski populaciji prisotnost alela T z visoko alelno frekvenco v polimorfizmu rs130058 zaščitni vpliv na tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola.

4.7.1 Uporabnost določanja genetskega tveganja za razvoj odvisnosti od alkohola

Genetsko testiranje za napoved tveganja nagnjenosti in/ali nastanka različnih bolezni je danes diagnostična stvarnost. Menimo, da bi bilo potrebno nadaljevati z iskanjem kandidatnih genov za nastanek odvisnosti od alkohola na slovenski populaciji, predvsem na večjem in bolj podrobno opredeljenem vzorcu preiskovancev. Ugotovitve naše raziskave bi lahko služile kot izhodišče za nadalnje delo na tem področju.

Potrebno pa je poudariti, da je alkoholizem večplasten pojav, kjer se prepletajo družbeno – socialno – ekonomski vidiki s posameznikovim genetskim ustrojem, kar otežuje enoznačno napoved tveganja za razvoj bolezni. V zadnjem času je verjetno prav socialna in družbeno ekomska kriza pripomogla k ponovni razmahnitvi pojavnosti odvisnosti od alkohola.

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili:

- V skupini odvisnikov od alkohola smo izmerili statistično značilno višje vrednosti za uveljavljene označevalce alkoholizma.
- Primerjava izmerjenih koncentracij biokemičnih označevalcev alkoholizma in ELF testa med kontrolno skupino in skupino preiskovancev z diagnozo odvisnosti od alkohola kaže statistično značilne razlike za vse preiskovane parametre.
- Izmerje katalitične aktivnosti jetrnih encimov GGT in AST v skupini preiskovancev z diagnozo odvisnosti od alkohola statistično značilno korelirajo s koncentracijami HA, PIIINP, TIMP-1 in oceno jetrne fibroze.
- Genotipske frekvence preiskovanih polimorfizmov v *ADH* in *HTR1B* so v HWE, razen polimorfizma rs1800759 v *ADH4*, ki kaže v kontrolni skupini preiskovancev HWD z velikim presežkom heterozigotov.
- Genotip A-A v SNP rs1042364 in genotip A-A v SNP rs1800759 v *ADH4*, ki imata zaščitno vlogo pri tveganju za nastanek odvisnosti od alkohola, sta pri Slovencih (v kontrolni skupini MDPŠ in skupini DOA) prisotna z nizko genotipsko frekvenco in primerljiva s tujimi raziskavami.
- Alelni frekvenci za polimorfizem rs1800759 se statistično značilno razlikujeta med kontrolno skupino in skupino odvisnikov od alkohola ($p<0,025$). V skupini DOA je alel A prisoten s 35% frekvenco (v skupini MDPŠ s 50% frekvenco), kar kaže na večjo ogroženost za razvoj odvisnosti od alkohola.
- V skupini odvisnikov od alkohola ni homozigotov za polimorfizem His48 (rs1229984) v *ADH1B*, ki predstavlja zaščitni polimorfizem pred tveganjem za razvoj odvisnosti od alkohola. V kontrolni skupini je genotipska frekvanca 1%, kar velja tudi za ostale evropske populacije.
- Alelni frekvenci za polimorfizem rs1229984 se statistično značilno razlikujeta med skupino MDPŠ in skupino odvisnikov od alkohola ($p<0,009$).
- Mutirana genotipa v polimorfizmih rs1693482/rs698 (Gln727Ile350), ki nakazujeta vpliv na pretirano in tvegano uživanje alkohola sta v preiskovanih skupinah MDPŠ in DOA prisotna z nizko genotipsko frekvenco. Alelne frekvence za oba polimorfizma se med skupinama MDPŠ in DOA statistično značilno ne razlikujejo in so primerljive z ostalimi kavkajskimi populacijami.

- Statistično značilne povezave med preiskovanimi polimorfizmi v *ADH* in *ELF* testom oz. stopnjo jetrne fibroze v skupini DOA nismo dokazali.
- Genotipske frekvence za polimorfizem rs11568817 v *HTR1B* so pri skupini DOA primerljive z rezultati študije na brazilski populaciji evropskih korenin. Alelne frekvence se med skupinama MDPŠ in DOA ne razlikujejo.
- Frekvenca homozigotov za nemutiran genotip polimorfizma rs130058 v *HTR1B* je v skupinah DOA in MDPŠ enaka frekvenci homozigotov za mutiran genotip v zgoraj omenjeni študiji.
- Alel T v polimorfizmu rs130058 v *HTR1B*, ki ima zaščitno vlogo pri tveganju za nastanek odvisnosti od alkohola je v skupini odvisnikov od alkohola in kontrolni skupini MDPŠ prisoten z visoko alelno frekvenco 67 in 74 % in predstavlja pri slovenski populaciji zaščito pred tveganjem za razvoj odvisnosti od alkohola.

Iz rezultatov meritev ELF testa sklepamo, da bi bilo smiselno dodatno ovrednotiti uporabo tega testa pri bolnikih z DOA ob vključitvi v program zdravljenja in pri spremljanju terapije. ELF test bi lahko uporabili tudi v primarnem zdravstvu za zgodnejše odkrivanje in spremljanje posameznikov, ki izkazujejo visoko tveganje za razvoj kronične jetrne bolezni.

Pri slovenski populaciji smo prvi določali prisotnost polimorfizmov na kandidatnih genih *ADH* in *HTR1B* za tveganje nastanka odvisnosti od alkohola. Rezultati so pokazali, da pri slovenski populaciji niso prisotni, oz. imajo nizko frekvenco genotipi v polimorfizmih *ADH1B* in *ADH4*, ki zmanjšujejo tveganje za nastanek odvisnosti od alkohola. Alela v genu za *ADH1C*, ki povečujejo tveganje za pretirano in škodljivo pitje alkohola imata pri Slovencih alelni frekvenci, ki sta primerljivi z ostalimi kavkazijskimi populacijami. V polimorfizmu rs130058 v promotorski regiji *HTR1B* je alel T, ki regulatorno vpliva na izražanje gena, v slovenski populaciji prisoten z visoko alelno frekvenco in lahko pomeni zaščitno vlogo pri tveganju za nastanek odvisnosti od alkohola, kar bi bilo potrebno dodatno potrditi.

6 LITERATURA

1. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J: Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet* 2009, 373(9682):2223-2233.
2. Kovše K, Tomšič S, Mihevc Ponikvar B, Nadrag P: Alcohol related harm in Slovenia. *Slovenian Medical Journal* 2011, 81(2).
3. Pečar S: Radikali v metabolizmu etanola in posledice. *Sindrom odvisnosti od alkohola - diagnostični in terapevtski vidiki* 1010, Zbornik prispevkov z recenzijo, Bled 13. oktober 2010:22 - 30.
4. Santiard D, Ribièrē C, Nordmann R, Hollee-Levin C: Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: A γ radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 19(1):121-127.
5. Diaz Gomez M, Castro G, Delgado de Layno A, Costantini M, Castro J: Cytochrome P450 reductase-mediated anaerobic biotransformation of ethanol to 1-hydroxyethyl-free radicals and acetaldehyde. *Toxicology* 2000, 154(1):113-122.
6. Zakhari S: Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 2006, 29(4):245.
7. Laposata M: Assessment of ethanol intake. Current tests and new assays on the horizon. *American journal of clinical pathology* 1999, 112(4):443.
8. Jerin A: Biokemijski označevalci za diagnostiko in spremljanje alkoholizma. *Sindrom odvisnosti od alkohola - diagnoatični in terapevtski vidiki, Zbornik prispevkov z recenzijo, Bled oktober 2010* 2010:157 - 166.
9. Kravos M, Križaj B: Laboratorijska diagnostika sindroma odvisnosti od alkohola. *Diagnosticiranje odvisnosti od alkohola na različnih nivojih zdravstva, PBI monografija, oktober 2005* 2005:49 - 69.
10. Schellenberg F, Mouray H: [Carbohydrate deficient transferrin: what's new 20 years later?]. In: *Annales de biologie clinique: 2000*; 2000: 298.
11. Kravos M, Malešič I: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) As a marker of alcoholdependency. *Slovenian Medical Journal* 2008, 77(3).
12. Malešič I: Pregl M. Nekatere laboratorijske možnosti odkrivanja alkoholikov. *Zdrav Vestn* 1992, 61:119-122.

13. Rosalki SB, Rau D: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 1972, 39(1):41-47.
14. Hietala J, Koivisto H, Latvala J, Anttila P, Niemelä O: IgAs Against Acetaldehyde-Modified Red Cell Protein as a Marker of Ethanol Consumption in Male Alcoholic Subjects, Moderate Drinkers, and Abstainers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2006, 30(10):1693-1698.
15. Davidson R, Hamilton P: High mean red cell volume: its incidence and significance in routine haematology. *Journal of clinical pathology* 1978, 31(5):493-498.
16. Burtis CA, Ashwood ER: Tietz textbook of clinical chemistry: Amer Assn for Clinical Chemistry; 1994, 788 -797
17. Thomas L, Whicher JT, Andert SE: Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results: TH-books; 1998, 55 - 65.
18. Kravos M, Malešič I: Glutamate dehydrogenase as a marker of alcohol dependence. *Alcohol and alcoholism* 2010, 45(1):39-44.
19. Morini L, Politi L, Polettini A: Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction* 2009, 104(6):915-920.
20. Auwärter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater H, Diefenbacher A: Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clinical chemistry* 2001, 47(12):2114-2123.
21. Varga A, Hansson P, Johnson G, Alling C: Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clinica Chimica Acta* 2000, 299(1):141-150.
22. Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, Wurst FM, Luley C, Schmidt-Gayk H: Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2005, 29(5):781-787.
23. Potočnik N: Vpliv alkohola na fiziološke procese. *Sindrom odvisnosti od alkohola - diagnoatični in terapevtski vidiki, Zbornik prispevkov z recenzijo, Bled oktober 2010* 2010:96 - 104.
24. Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(4):2247-2250.

25. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M, Andoljšek D, Jamšek M, Kotnik V, Kveder R, Lindič J: Interna medicina: Littera picta; 2011, 659 -663.
26. Bonis P, Friedman SL, Kaplan MM: Is liver fibrosis reversible? *The New England journal of medicine* 2001, 344(6):452.
27. Arthur MJ: Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002, 122(5):1525-1528.
28. Bedossa P, Dargere D, Paradis V: Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003, 38(6):1449-1457.
29. Guido M, Rugge M: Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. In: *Seminars in liver disease: 2004*: Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.; 2004: 89-97.
30. Desmet V: Milestones in liver disease: scoring chronic hepatitis. *J Hepatol* 2003, 38(4):382-386.
31. Grigorescu M: Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2006, 15(2):149.
32. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, Kaye P, Burt AD, Ryder SD, Aithal GP: Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008, 47(2):455-460.
33. Trépo E, Potthoff A, Pradat P, Bakshi R, Young B, Lagier R, Moreno C, Verset L, Cross R, Degré D: Role of a cirrhosis risk score for the early prediction of fibrosis progression in hepatitis C patients with minimal liver disease. *Journal of hepatology* 2011, 55(1):38-44.
34. Guéchot J, Trocmé C, Renversez J-C, Sturm N, Zarski J-P: Independent validation of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score in the ANRS HC EP 23 Fibrostar cohort of patients with chronic hepatitis C. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012, 50(4):693-699.
35. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J, Lombard M, Alexander G, Ramage J, Dusheiko G: Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut* 2010, 59(9):1245-1251.

36. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J: Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clinical chemistry* 1996, 42(4):558-563.
37. Niemelä O, Risteli L, Parkkinen J, Risteli J: Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochemical Journal* 1985, 232(1):145.
38. Walsh KM, Timms P, Campbell S, Norman R, Macsween M, Morris AJ: Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1 and-2 (TIMP-1 and TIMP-2) as Noninvasive Markers of Liver Disease in Chronic Hepatitis C Comparison Using ROC Analysis. *Digestive diseases and sciences* 1999, 44(3):624-630.
39. Luo X, Kranzler HR, Zuo L, Yang B-z, Lappalainen J, Gelernter J: ADH4 gene variation is associated with alcohol and drug dependence: results from family controlled and population-structured association studies. *Pharmacogenetics and genomics* 2005, 15(11):755-768.
40. Hasin D, Aharonovich E, Liu X, Mamman Z, Matseoane K, Carr L, Li T-K: Alcohol and ADH2 in Israel: Ashkenazis, Sephardics, and recent Russian immigrants. *American Journal of Psychiatry* 2002, 159(8):1432-1434.
41. Sari Y: Role of 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT1B) receptors in the regulation of ethanol intake in rodents. *Journal of Psychopharmacology* 2013, 27(1):3-12.
42. Edenberg HJ: Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2000, 64:295-341.
43. Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, Bennett PH, Goldman D: Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an american indian population. *American journal of medical genetics* 1998, 81(3):216-221.
44. Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K: Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *American journal of medical genetics* 1998, 81(3):207-215.

45. Liu J, Zhou Z, Hodgkinson CA, Yuan Q, Shen PH, Mulligan CJ, Wang A, Gray RR, Roy A, Virkkunen M: Haplotype-Based Study of the Association of Alcohol-Metabolizing Genes With Alcohol Dependence in Four Independent Populations. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2011, 35(2):304-316.
46. Lee S-L, Höög J-O, Yin S-J: Functionality of allelic variations in human alcohol dehydrogenase gene family: assessment of a functional window for protection against alcoholism. *Pharmacogenetics and Genomics* 2004, 14(11):725-732.
47. Holford NH: Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clinical pharmacokinetics* 1987, 13(5):273-292.
48. Osier M, Pakstis AJ, Kidd JR, Lee J-F, Yin S-J, Ko H-C, Edenberg HJ, Lu R-B, Kidd KK: Linkage Disequilibrium at the< i> ADH2</i> and< i> ADH3</i> Loci and Risk of Alcoholism. *The American Journal of Human Genetics* 1999, 64(4):1147-1157.
49. Choi IG, Son HG, Yang BH, Kim SH, Lee JS, Chai YG, Son BK, Kee BS, Park BL, Kim LH: Scanning of genetic effects of alcohol metabolism gene (ADH1B and ADH1C) polymorphisms on the risk of alcoholism. *Human mutation* 2005, 26(3):224-234.
50. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M: Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. In: *PROCEEDINGS-NUTRITION SOCIETY OF LONDON: 2004*: Cambridge Univ Press; 2004: 49-63.
51. Li D, Zhao H, Gelernter J: Strong Association of the Alcohol Dehydrogenase 1B Gene (< i> ADH1B</i>) with Alcohol Dependence and Alcohol-Induced Medical Diseases. *Biological psychiatry* 2011, 70(6):504-512.
52. Tóth R, Fiatal S, Petrovski B, McKee M, Ádány R: Combined effect of ADH1B RS1229984, RS2066702 and ADH1C RS1693482/RS698 alleles on alcoholism and chronic liver diseases. *Disease markers* 2011, 31(5):267-277.
53. Borras E, Coutelle C, Rosell A, Fernández-Muixí F, Broch M, Crosas B, Hjelmqvist L, Lorenzo A, GUTIERREZ C, Santos M: Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: TheADH2* 2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3. *Hepatology* 2000, 31(4):984-989.

54. McLeod HL, Ameyaw MM: Ethnicity and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies* 2002;489-514.
55. Edenberg HJ, Xuei X, Chen H-J, Tian H, Wetherill LF, Dick DM, Almasy L, Bierut L, Bucholz KK, Goate A: Association of alcohol dehydrogenase genes with alcohol dependence: a comprehensive analysis. *Human molecular genetics* 2006, 15(9):1539-1549.
56. Luo X, Kranzler HR, Zuo L, Lappalainen J, Yang B-z, Gelernter J: ADH4 gene variation is associated with alcohol dependence and drug dependence in European Americans: results from HWD tests and case-control association studies. *Neuropsychopharmacology* 2005, 31(5):1085-1095.
57. Preuss UW, Ridinger M, Rujescu D, Samochowiec J, Fehr C, Wurst FM, Koller G, Bondy B, Wodarz N, Debniak T: Association of ADH4 genetic variants with alcohol dependence risk and related phenotypes: results from a larger multicenter association study. *Addiction biology* 2011, 16(2):323-333.
58. Sari Y, Johnson VR, Weedman JM: Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Progress in molecular biology and translational science* 2011, 98:401.
59. LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C: Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biological psychiatry* 1994, 36(6):395-421.
60. LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C: Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: clinical evidence. *Biological psychiatry* 1994, 36(5):326-337.
61. Sun H-FS, Chang Y-T, Fann CS-J, Chang C-J, Chen Y-H, Hsu Y-P, Yu W-Y, Cheng AT-A: Association study of novel human serotonin 5-HT_{1B} polymorphisms with alcohol dependence in taiwanese han. *Biological psychiatry* 2002, 51(11):896-901.
62. Sari Y: Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2004, 28(6):565-582.
63. Lappalainen J, Long JC, Eggert M, Ozaki N, Robin RW, Brown GL, Naukkarinen H, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D: Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations. *Archives of General Psychiatry* 1998, 55(11):989.

64. Herman AI, Balogh KN: Polymorphisms of the serotonin transporter and receptor genes: susceptibility to substance abuse. *Substance abuse and rehabilitation* 2012, 3(1):49.
65. Huang Y-y, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ: Relationship of Psychopathology to the Human Serotonin_{1B} Genotype and Receptor Binding Kinetics in Postmortem Brain Tissue. *Neuropsychopharmacology* 1999, 21(2):238-246.
66. Contini V, Bertuzzi GP, Polina ER, Hunemeier T, Hendler EM, Hutz MH, Bau CH: A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug and alcohol dependence* 2012, 122(1):100-104.
67. TagMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protokol; 2010 Applied Biosystem
68. <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court lab - HW calculator.xls>
69. <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>.
70. Stevenson M, Lloyd-Jones M, Morgan M, Wong R: Non-invasive diagnostic assessment tools for the detection of liver fibrosis in patients with suspected alcohol-related liver disease: a systematic review and economic evaluation. 2012.
71. Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N: Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clinical chemistry* 2007, 53(10):1792-1799.
72. Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C: Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC gastroenterology* 2010, 10(1):103.
73. Macgregor S, Lind PA, Bucholz KK, Hansell NK, Madden PA, Richter MM, Montgomery GW, Martin NG, Heath AC, Whitfield JB: Associations of ADH and ALDH2 gene variation with self report alcohol reactions, consumption and dependence: an integrated analysis. *Human molecular genetics* 2009, 18(3):580-593.
74. Cichoz-Lach H, Partycka J, Nesina I, Celinski K, Slomka M, Wojcierowski J: Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene polymorphism in alcohol liver cirrhosis and alcohol chronic pancreatitis among Polish individuals. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2007, 42(4):493-498.

75. Guindalini C, Scivoletto S, Ferreira RG, Breen G, Zilberman M, Peluso MA, Zatz M: Association of genetic variants in alcohol dehydrogenase 4 with alcohol dependence in Brazilian patients. *American Journal of Psychiatry* 2005, 162(5):1005-1007.
76. Sen S, Burmeister M: Hardy-Weinberg analysis of a large set of published association studies reveals genotyping error and a deficit of heterozygotes across multiple loci. *Hum Genomics* 2008, 3(1):36-52.
77. Edenberg HJ: The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 2007, 30(1):5.
78. Edenberg HJ, Jerome RE, Li M: Polymorphism of the human alcohol dehydrogenase 4 (ADH4) promoter affects gene expression. *Pharmacogenetics and Genomics* 1999, 9(1):25-30.
79. Duan J, Sanders A, Vander Molen J, Martinolich L, Mowry B, Levinson D, Crowe R, Silverman J, Gejman P: Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Molecular psychiatry* 2003, 8(11):901-910.