



VILNIAUS UNIVERSITETO
MEDICINOS FAKULTETO
ŽMOGAUS IR MEDICININĖS GENETIKOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

***GENOMINIŲ VEIKSNIŲ, SUSIJUSIŲ SU ALKOHOLIO VARTOJIMU, ĮVAIROVĖ IR
PAPLITIMAS LIETUVOS POPULIACIJOJE***

Magistrantas

KAROLIS BARONAS

(parašas)

Darbo vadovas

PROF. HABIL. DR. VAIDUTIS KUČINSKAS

(parašas)

Darbo konsultantas

DOKT. AIDAS PRANCULIS

(parašas)

VU MF Žmogaus ir medicininės
genetikos katedros vedėjas

prof. (HP) dr. ALGIRDAS UTKUS

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data

Registracijos Nr.

Vilnius, 2017

Tvirtinu, jog darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota ir paruošta naudojant literatūros sąrašę pateiktus informacinius šaltinius bei savo tyrimų duomenis.

Darbo autoriaus Karolis Baronas

(parašas)

Darbo vadovas akad. prof. habil.dr. Vaidutis Kučinskas

(parašas)

Darbo konsultantas dokt. Aidas Pranculis

(parašas)

TURINYS

TURINYS	3
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	5
1 ĮVADAS	6
2 LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
2.1 Alkoholio metabolizme dalyvaujantys fermentai bei jų pakitimai darantys įtaką AVS ..	7
2.2 Alkoholio vartojimo sutrikimai bei priežastys.....	9
2.3 Aplinkos veiksniai, darantys įtaką alkoholio vartojimui.....	10
2.4 Genų raiška gyvūnų ir ląstelių modeliuose	11
2.5 Alkoholio vartojimo pasekmės nervų sistemai ir tai lemiantys genetiniai veiksniai	12
3 TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	13
3.1 Tyrimo strategija	13
3.2 Tiriamųjų imtis.....	14
3.3 Kandidatinių genų ir VNV pasirinkimas.....	16
3.4 Viso genomo plataus masto genotipavimo duomenų bioinformacinė analizė.....	17
3.4.1 VNP–LGH genotipavimo metodas bei pirminių duomenų analizė.....	17
3.4.2 Statistinei duomenų analizei naudotų įrankių apžvalga.....	18
3.5 rs1229984, rs698, rs2238151 VNV žymenų genotipavimas	19
3.5.1 DNR Išskyrimas.....	20
3.5.2 Polimerazės grandininė reakcija	20
3.5.3 PGR produkto fermentinis valymas.....	22
3.5.4 Sekoskaitos PGR.....	23
3.5.5 Sekoskaitos PGR produkto valymas druskų išsodinimo metodu	25
3.5.6 Kapiliarinė elektroforezė ir pirminė duomenų analizė	26
4 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	26
4.1 VNP–LGH genotipavimo duomenų, genotipų ir alelių dažnių, palyginimas	26
4.1.1 Alelių dažnių palyginimas tarp vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių	27

4.1.2	Alelių dažnių palyginimas tarp retai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių	28
4.1.3	Genotipų dažnių palyginimas tarp vartojančių ir retai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių	29
4.1.4	Alelių dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių.....	29
4.1.5	Genotipų dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių.....	30
4.1.6	Alelių dažnių palyginimas tarp kažkada vartojusių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių.....	30
4.1.7	Genotipų dažnių palyginimas tarp kažkada vartojusių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių.....	31
4.1.8	Alelių dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir retai vartojančių bei kažkada vartojusių alkoholi grupių.....	31
4.1.9	Genotipų dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi grupės ir retai vartojančių bei kažkada vartojusių alkoholi grupių.....	33
4.1.10	Tarppopuliacinis palyginimas.....	33
4.1.11	Viso genomo asociacijos tyrimas	36
4.2	Genominių ir aplinkos veiksnių duomenų analizė.....	37
4.2.1	Genominių veiksnių analizė.....	37
4.2.2	Aplinkos veiksnių analizė.....	39
4.3	Gautų rezultatų verifikacija.....	41
5	IŠVADOS	41
6	SANTRAUKA.....	42
7	SUMMARY.....	43
8	LITERATŪROS SĄRAŠAS	44
9	PRIEDAI.....	53

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AIK – Akaike informacinis kriterijus

AVS – alkoholio vartojimo sutrikimas

BDT – *angl. BigDye® Terminator v1.1*

CEU – Šiaurės ir vakarų Europos išeiivių gyvenančių Jutos valstijoje JAV populiacija

ddH₂O – didejonizuotas vanduo

ddNTP – dideoksiribonukleotidas

dNMP – deoksiribonukleozido mono–fosfatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksiribonukleozido tri–fosfatas

EXO I – egzozonukleazė I

FIN – Suomijoje gyvenančių suomių populiacija

LITGEN – „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ projektas

MAF – retojo alelio dažnis

MOR – μ opioidinis receptorių

nt – nukleotidas

NTS – netransliuojamas geno regionas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PI – pasikliautinas intervalas

PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacijos

RNR – ribonukleorūgštis

SAP – šarminė krevėčių fosfatazė (*angl. Shrimp Alkaline Phosphatase*)

ŠS – šansų santykis

TSI – Italijos Toskanos regiono gyventojų populiacija

UV – ultravioletinė spinduliuotė

VGAT – viso genomo asociacijos tyrimas

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

VNP–LGH – vieno nukleotido polimorfizmais paremta lyginamoji genomo hibridizacija

VNV – vieno nukleotido variantas

VU MF ŽMGK – Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

1 ĮVADAS

Darbo aktualumas. 2014 metų Pasaulio Sveikatos Organizacijos (toliau trumpiniu PSO) duomenimis, apytiksliai 3,3 milijono mirčių (5,9 proc. visų mirčių) 2012 metais buvo susijusių su alkoholio vartojimu. Daugiau nei pusę šių mirčių sudarė: širdies ir kraujagyslių sistemos ligos, diabetas, įvairaus tipo vėžiniai susirgimai bei virškinamojo trakto sistemos ligos (55).

PSO duomenimis, 2010 metais, vienam asmeniui tenkantis grynojo alkoholio suvartojimo kiekis buvo apytiksliai lygus 6,2 grynojo alkoholio litrų per metus. Tuo tarpu, Lietuvoje vienam asmeniui tenkantis grynojo alkoholio suvartojimo kiekis buvo 15,4 suvartotų litrų, o 2012 metų duomenimis – 16,9 suvartotų litrų tenkančių vienam asmeniui. Pagal šią statistiką, Lietuva – daugiausiai grynojo alkoholio suvartojanti šalis, aukštas pajamas gaunančių šalių grupėje. 2010 metų duomenimis, apytiksliai 50,4 proc. vyrų ir 24,3 proc. moterų, 30 dienų laikotarpyje, epizodiškai suvartodavo didelį kiekį alkoholinių gėrimų (55). Pateikti duomenys rodo didelę problemos mastą bei tendencingai kylantį alkoholio suvartojimo kiekį.

Kita labai opi Lietuvos problema – savižudybės, kurios, literatūros duomenimis, gali būti susijusios su alkoholio vartojimo sutrikimais (toliau trumpiniu AVS) (52). Tyrimo metu, priklausomybė nuo alkoholio pasireiškė 43 proc. aukų (n = 229), o AVS buvo dažnesni vyrų grupėje (39 proc.), nei moterų (26 proc.) (31). Kito tyrimo metu, apklausus 20 000 pilnamečių respondentų, paaiškėjo, kad 37 proc. asmenų, turinčių alkoholio priklausomybę ar AVS, buvo anksčiau diagnozuotas psichikos sutrikimas. Be to, 22 proc. respondentų, kuriems buvo nustatytas psichikos sutrikimas, buvo priklausomi ar nevaldomai vartojo alkoholį (59). Apibendrinus literatūros duomenis mokslininkai parodė, kad sergamumas psichikos ligomis yra dažnas reiškinys tarp asmenų, kuriems nustatytas vienas iš AVS (8).

AVS etiologija – daugiaveiksnė. Genetiniai žymenys asocijuoti su AVS pasiskirstę genų srityse, kurie atsakingi už alkoholio metabolizmą, neuromediatorių receptorių veiklą ar juos sudarančių vienetų funkciją. Pastebėta, kad už šias funkcijas atsakingų baltymų aktyvumo pakitimai lemia atsiradusią priklausomybę nuo alkoholio ar kitus psichologinius sutrikimus.

Praktinė tyrimo reikšmė. Labai svarbu ištirti naujus ir patikrinti senus genominius bei aplinkos veiksnius darančius įtaką AVS. Išsiaiškinus naujas genetinių veiksnių asociacijas būtų padėtas svarbus pagrindas tolimesniems tokio pobūdžio tyrimams. Taip pat, atrastos asociacijos galėtų būti vienos iš sudėtinių dalių, paaiškinančių kompleksinės etiologijos AVS.

Darbo tikslas – Nustatyti naujus su alkoholio vartojimo dinamika siejamus genominius veiksnius bei įvertinti žinomų su AVS siejamų genominių veiksnių paplitimą ir ypatumus Lietuvos populiacijoje.

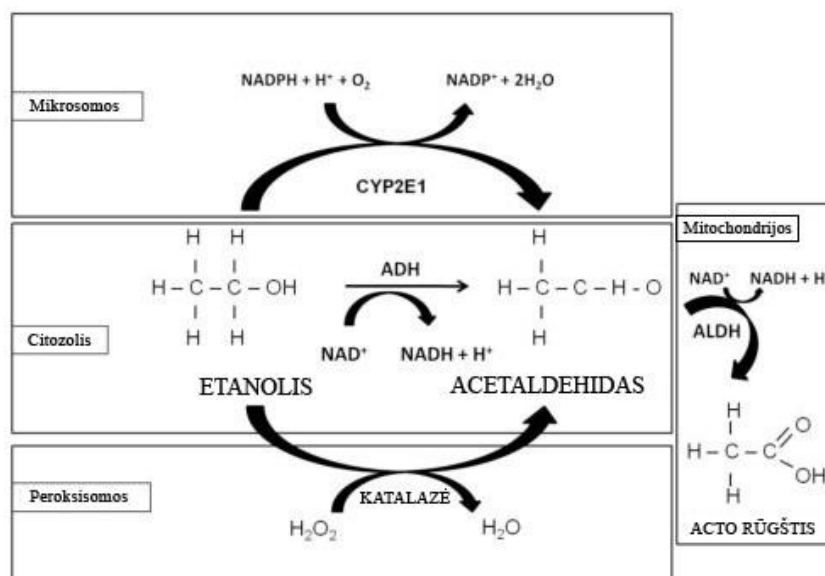
Darbo uždaviniai:

1. Atlikti duomenų bazių ir literatūros analizę bei pasirinkti kandidatines genų sritis bei vieno nukleotido variantus (toliau trumpiniu VNV) jose galimai asocijuotus su AVS;
2. Atliktus viso genomo plataus masto genotipavimo duomenų kokybės kontrolę ir bioinformacinę analizę nustatyti naujus genominius veiksnius turinčius įtakos AVS Lietuvos populiacijoje.
3. Atlikus tiriamosios imties genotipavimą pagal pasirinktus, su AVS siejamus VNV, palyginti jų alelių bei genotipų dažnių pasiskirstymą tarp pagal alkoholio vartojimą skirtingų Lietuvos populiacijos grupių.
4. Nustatyti ir įvertinti su AVS siejamų VNV alelių ir genotipų dažnių pasiskirstymo skirtumus tarp Lietuvos ir kitų Europinės kilmės populiacijų.

2 LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Alkoholio metabolizme dalyvaujantys fermentai bei jų pakitimai darantys įtaką AVS

Alkoholio metabolizme dalyvauja fermentai (1 pav.), kurių efektyvumas audiniuose skirtingas: vienu atveju, didesnis kepenyse, o kitu atveju – smegenų dangaluose. Pagrindiniai fermentai atsakingi už alkoholiniuose gėrimuose esančio etanolio metabolizmą yra alkoholio dehidrogenazė (*ADH*) ir aldehido dehidrogenazė (*ALDH*). Etanolis, dalyvaujant *ADH* fermentui, yra metabolizuojamas į acetaldehidą, kuris, dalyvaujant *ALDH* fermentui, verčiamas į acetato junginį (81). Acetato junginys per eilę biocheminių reakcijų gali būti verčiamas į acetil-Kofermentą A. Aktyvi acetil-KoA forma gali dalyvauti energijos gamybos procese, kuris vyksta Krebso cikle, arba būti verčiama į riebiąsias rūgštis ir dalyvauti energijos kaupimo procesuose (50). Vartojant alkoholinius gėrimus, dėl sulėtėjusio acetaldehido katabolizmo greičio ir padidėjusios acetaldehido koncentracijos, gali atsirasti nepageidaujamos organizmo reakcijos: odos paraudimas, pykinimas (81).



1 paveikslas. Alkoholio metabolizme dalyvaujantys fermentai (47)

Žmogaus genome iš viso yra septyni ADH fermentus koduojantys genai bei trys ALDH fermentus koduojantys genai (35). Kepenų audinyje veiks *ADH1B*2* ir *ALDH*2* genų aleliai, tyrimų duomenimis, daro įtaką etanolio metabolizmui ir rizikai susirgti alkoholizmu ar kitu AVS (9).

*ADH1B*2* geno alelis turi rs1229984 VNV. Pakitęs fermentas geba oksiduoti etanolį beveik 80 proc. greičiau nei laukinio tipo fermentas (14). L. J. Bierut ir kolegų publikacijoje tirti 2298 nuo alkoholio priklausomi ir 3334 kontroliniai asmenys. Pastebėta, kad *ADH1B*2* alelį turintys asmenys turėjo statistiškai reikšmingai mažesnę tikimybę susirgti alkoholizmu: šansų santykis (ŠS) = 0,34 (95 proc. PI 0,24–0,48, $p = 6.6 \cdot 10^{-10}$) (3).

Kitas *ADH1B* geno variantas – *ADH1B*3* (rs2066702), taip pat, asocijuotas su sumažėjusia tikimybe susirgti alkoholizmu (14, 17). Alelio daroma įtaka jaučiama tose populiacijose, kur jo dažnis yra didesnis, pvz. Afrikos šalių populiacijose (17).

Manoma, kad *ADH* geno alelių sąlygota mažesnė tikimybė susirgti alkoholizmu, susijusi su pasikeitusiomis fermento savybėmis. *ADH1B*2* ir *ADH1B*3* alelių koduojantys baltymai geba greičiau oksiduoti etanolį nei laukinio tipo – *ADH1B* baltymas (63). Greitesnė oksidacija lemia susikaupusį acetaldehido kiekį, kuris organizmui sukelia nemalonias šalutines reakcijas. Dėl šios priežasties, asmenys turintys ne laukinio tipo *ADH1B* geno alelius, linkę rečiau vartoti alkoholį, ypač dideliais kiekiais (73, 4, 3).

Li ir kolegų atliktame tyrime, kuriame buvo sugrupuoti Azijos, Europos, Afrikos ir Amerikos populiacijų duomenys, pastebėta, kad *ADH1C* geno alelį *ADH1C*1* (rs698) turintys asmenys turi mažesnę tikimybę būti priklausomiems nuo alkoholio ar susirgti kita nuo alkoholio vartojimo priklausomu sutrikimu (41). Be to, *ADH1C*1* alelį turintis fermentas, beveik 70 proc.

greičiau skaido etanolį į acetaldehidą nei laukinio tipo fermentas. Literatūroje minima, kad šis geno variantas turi įtakos AVS patogenezėje (1, 49).

ALDH genų šeimoje, didžiausia įtaką daro *ALDH2*2* alelis, kuris rodo didžiausią asociaciją su sumažėjusia priklausomybe nuo alkoholio (42). Luczak ir kolegų atliktame metaanalizės tyrime, kuriame tirti azijiečių mėginiai, pastebėta, kad asmenys turintys *ALDH2*2* alelį turi keturis – penkis kartus mažesnę alkoholio priklausomybės riziką (ŠS = 0,22, 95 proc. PI 0,16 – 0,30). Turint du *ALDH2*2* alelius, rizika sumažėja aštuonis – devynis kartus (ŠS = 0,12, 95 proc. PI 0,06 – 0,24) (44).

Manoma, kad dėl padidėjusios acetaldehido koncentracijos, asmenys turintys *ALDH2*2*, jaučia stipresnį alkoholio poveikį. Tokie asmenys, pavartoję alkoholio, patiria įvairius nemalonius pojūčius – karščio išpylimą, svaigimą, galvos skausmą. Palyginus su homozigotinį pagal *ALDH2*1* alelį turinčius asmenis (alkoholio koncentracija kraujyje tarp grupių nesiskiria) ir asmenis, turinčius heterozigotinį genotipą, jaučia panašius organizmo pojūčius, prie kurių prisideda – padidėjęs pulsas, hormonų lygio svyravimai, psichomotorinių funkcijų sumažėjimas. Asmenys, turintys homozigotinį genotipą pagal *ALDH2*2*, jaučia dar stipresnius neigiamus organizmo pojūčius (74).

Kitas svarbus VNV – rs2238151. Šis variantas nėra plačiai tirtas ir dažnai sutinkamas literatūroje, tačiau Hakenewerth A.M. atliktas tyrimas parodė šio VNV asociaciją su AVS. Kitos autorių publikacijos negalėjo patvirtinti šios asociacijos, dėl tyrimuose naudotų skirtingų tiriamųjų imčių. (26, 46, 12).

Skirtingai nuo kepenyse veiklių fermentų, tikslų etanolio metabolizmą smegenyse labai sunku nustatyti (68). Pasitelkiant pelės modelį, tyrėjai parodė, kad smegenyse etanolį metabolizuoja du fermentai: tai katalazė (CAT) ir citochromas P450 (CYP2E1), kurie atitinkamai oksidacijos būdu inaktyvina 60 – 70 proc. ir 20 proc. etanolio (82, 32). Ilgas alkoholio vartojimas gali indukuoti CYP2E1 fermentą, o jo veikla daro įtaką neurotoksiniam smegenų atsakui į etanolį (dėl atsiradusio laisvųjų radikalų poveikio). Tokiu pat būdu aktyvinamas ir CAT fermentas (28), tačiau šis fermentas pasižymi ir laisvųjų radikalų nukenksminimo funkcija (21). Todėl, CAT fermentą koduojančiame gene esanti pakaita (c.-262C>T) galimai daro įtaką ne tik susirgti AVS, bet ir šio susirgimo pasireiškimo stiprumui (56).

2.2 Alkoholio vartojimo sutrikimai bei priežastys

Žinoma nemažai AVS, o alkoholio vartojimas gali pažeisti beveik visus organizmo audinius. Norint pradėti sėkmingą gydymą, reikia kiek galima anksčiau diagnozuoti AVS, taip užkertant kelią priklausomybei nuo alkoholio ar dauginių audinių pažeidimų (53). Alkoholizmas

nėra specifinė liga, tačiau įeina į psichiatrinių ir narkotinių medžiagų vartojimo sutrikimų grupę. Alkoholizmo pasireiškimas – vis pasikartojantys besaikio alkoholio vartojimo epizodai ir tai lydintys psichiatriniai sutrikimai (57). Priklausomybė nuo alkoholio yra labai kompleksiškas, daugiaveiksnis sutrikimas(7). Atliktais molekuliniais genetiniais tyrimais buvo parodyta, kad alkoholio priklausomybės pasireiškimas siejamas su tam tikromis genų sritimis (66, 60)

AVS genetinį efektą paaiškina dvynių, įvaikinimo bei sibsų tyrimų studijos, kurių metu aiškinta tiesioginė genetinių veiksnių įtaka AVS. Įrodyta, kad asmenų sergančių alkoholizmu giminaičiai turi keturis kartus didesnę riziką susirgti alkoholizmu. Taip pat, identiški dvyniai turi didesnę riziką susirgti alkoholizmu palyginus su ne homozigotiniais dvyniais ar sibsais. Toliau pastebėta, kad AVS turinčių tėvų įvaikinti vaikai turi, tokią pat, keturis kartus didesnę riziką susirgti, kaip ir tokių tėvų auginami vaikai (48). Meta–analizės metu, kurios tiriamoji grupė buvo sudaryta iš 9897 monozygotinių ir dizigotinių dvynių porų, nustatyta, kad alkoholizmo paveldimumas siekia 50 – 60 proc. (22).

Mokslininkai išskiria tris dideles veiksnių, lemiančių priklausomybę nuo alkoholio, grupes (78): pirmoji – tam tikri asmenybės bruožai (impulsyvumas, neišdildomų pojūčių siekimas) gali turėti įtakos individo pasirinkimui vartoti daugiau alkoholio. Taip padidindamas riziką tapti nuo jo priklausomu; antroji – apsprendžiančių alkoholio metabolizmą genų variantai, kurie asocijuoti su padidėjusia rizika tapti priklausomam nuo alkoholio. Genų variantai turi įtakos pasikeitusiam fermentiniam aktyvumui ir dėl to kylančioms pasekmėms; trečioji – genų (neuromediatorių receptorių, signaliniuose keliuose dalyvaujančius baltymus koduojantys genai) dalyvaujančių neurobiologiniuose keliuose pokyčiai, dėl kurių gali atsirasti neurologiniai sutrikimai. Jie gali lemti nekontroliuojamą alkoholinių gėrimų vartojimą. Klasifikaciją iš dalies atspindi ir keli genetinių tyrimų projektai, kurių metu, alkoholio priklausomybę turinčių asmenų grupėje, atrasta vieno nukleotido polimorfizmų (toliau trumpiniu VNP) asociacija su alkoholio metabolizmo ir neurobiologinių kelių pakitimais. Projektų rengėjų teigimu, jie gali turėti didelę įtaką priklausomybės išsivystymui (62, 50).

2.3 Aplinkos veiksniai, darantys įtaką alkoholio vartojimui

Tirdami jaunuolių elgesį Bremener ir kolegės pastebėjo, kad brendimo laikotarpiu, šeimos daroma įtaka mažėja, o bendraamžių grupių įtaka didėja (54). Jaunuolių grupės linkusios užsiimti rizikingais veiksmais, pvz. rūkymu, alkoholio ir (arba) narkotikų vartojimu. Todėl jaunuoliams dalyvaujant tokiose grupėse padidėja rizika tai išbandyti patiems (20). Bendraamžių grupių pripažinimas – svarbus socialinis veiksnys, susijęs su savivertės pakilimu ar socialine kompetencija. Todėl jaunuolis turintis išgeriančių draugų greičiausiai pats vartos alkoholį (25).

Taip pat pastebėta, kad turint vyresnių draugų, kurių vartojimo įpročiai blogėja (pradedama gerti dažniau, didesniais kiekiais), padidėja rizika išgerti didesnius kiekius alkoholio nei įprastai (54). Todėl, tėvų įsitraukimas į jaunuolio socialinį gyvenimą labai svarbus, reguliuojantis alkoholio vartojimą, veiksny (76). Pastebėta, kad veiksniai susiję su alkoholio vartojimu, vartojimo dažnumu ir vartojamo kiekio padidėjimu daro didesnę įtaką, kai asmenys neturi tėvų priežiūros, matomasi su dažnai apsvaigusiu nuo alkoholio giminaičiu ar pažįstamu, kur lengvai pasiekiamas alkoholis bei sudaromas teigiamas alkoholio vartojimo vaizdas (54).

2.4 Genų raiška gyvūnų ir ląstelių modeliuose

Mikrogardelėmis paremtas genų raiškos metodas sėkmingai pritaikytas dviem tyrimams, kurių tikslas buvo išsiaiškinti etanolio poveikį neuronų ląstelių kultūroms. Tyrimais nustatyta, kad etanolis turėjo įtakos tam tikrų genų raiškai SH-SY5Y neuroblastomos ląstelių kultūrose. Indukuoti genai buvo susiję su noradrenalino sinteze bei jo metabolizmu (70) Vienas iš jų – dopamino-beta-hidroksilazė. Fermento, kuris reikalingas dopamino konversijai į noradrenaliną, raiška buvo reikšmingai padidėjusi. Tyrimais parodyta, kad noradrenalino sistema turi įtakos nuo etanolio priklausomiems poelgiams. Pvz. lokali noradrenalino infuzija į žiurkės pogumburį padidino etanolio poreikį ir vartojimą (33), tuo tarpu, pelės su „išjungtu“ dopamino-beta-hidroksilazės genu rodė sumažėjusį poreikį etanoliumi (75).

Pastebėta, kad proteinkinazės A, mitogenų aktyvuotos proteinkinazės, kazeinkinazės II inhibitoriai slopina ne tik etanolio indukuotą dopamin-beta-hidroksilazės geno raišką, bet ir eilę kitų atsako į etanolį genų. Tyrimai su SH-SY5Y ląstelėmis rodo, kaip etanolis veikia neuronus, jų tinklus, kokiuose biocheminiuose keliose dalyvauja (29)

Liudvig ir kolegų atliktuose tyrimuose su žiurkėmis pastebėta, kad smegenų dalis – hipokampus labai svarbus etanolio tolerancijos vystymuisi (45). Šios smegenų dalies tyrimus su išvestomis alkoholi noriai vartojančiomis ir alkoholio vengiančiomis žiurkėmis atliko Edenberg ir komanda (16). Nustatyta apie 130 genų raiškos skirtumų tarp skirtingų žiurkių linijų. Tirti genai atsakingi už ląstelių augimą, baltymų transportą, genų raiškos reguliavimą, metabolinius kelius, ląstelės signalų perdavimą bei sinapsines funkcijas. Manoma, kad šie genai gali turėti įtakos susidaryti etanolio tolerancijai šių žiurkių linijose.

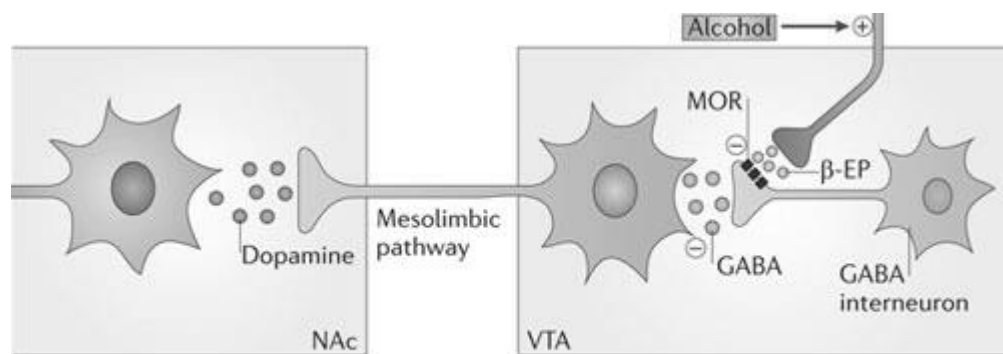
Worst ir kolegų, genų raiškos tyrimu, nustatė genų raiškos skirtumus, priekinėje žiurkių smegenų žievėje, tarp skirtingų žiurkių linijų (vartojančių alkoholi, linkusių vartoti alkoholi, nelinkusių vartoti alkoholi bei nevartojančių žiurkių linijų). Genai, kurių raiška buvo pakitusi, atsakingi už neuromediatorių paleidimo funkciją bei vezikulių susijungimą. Dėl tokių raiškos skirtumų sutriko normali neuromediatorių atliekama funkcija šiose žiurkių linijose (77).

2.5 Alkoholio vartojimo pasekmės nervų sistemai ir tai lemiantys genetiniai veiksniai

Etanolis laisvai pereina hematoencefalinį barjerą, todėl alkoholio vartojimas gali turėti trumpalaikių ir (arba) ilgalaikių pasekmių žmogaus nervų sistemai. Ūmios būklės pasekmė – jaudinimas ir slopinimas, o ilgalaikės pasekmės susideda iš tolerancijos didėjimo ir priklausomybės atsiradimo (50). Ilgas alkoholio vartojimas gali sukelti sunkių kognityvinių ar atminties sutrikimų. Etanolis sąveikauja su smegenyse esančiais receptoriais, taip trukdydamas tarpneuroninių signalų perdavimui ir slopindamas jaudinamąjį nervinį kelią (51). Literatūroje minima, kad etanolis daro įtaką pagrindiniams tarpneuroniniams ryšiams, kuriuose dalyvauja dopamino, serotonino ir gama amino sviesto rūgšties slopinanti sistema (2 pav.). O šiose sistemose dalyvaujančių fermentų genetiniai pakitimai gali lemti priklausomybę nuo alkoholio (5, 80, 15, 11).

Gabe H. ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, kad cholinerginio nikotino receptoriaus sudėtinį vienetą koduojančio geno (*CHRNA3*) VNP rs149775276 yra asocijuotas su padidėjusia kokaino bei alkoholio priklausomybės rizika (27). Dawei Li ir kolegų atliktame meta analizės tyrime rasta stipri asociacija tarp Gama-aminobutyriinės rūgšties receptoriaus $\alpha 2$ vieneto (*GABRA2*) geno VNP rs567926, rs279858 ir priklausomybės nuo alkoholio fenotipo ($P = 9 \times 10^{-6}$ ŠS = 1.27 (PI 95% 1.15, 1.4) ir $P = 4 \times 10^{-5}$ ŠS = 1.21 (PI 95% 1.1, 1.32)). Autoriai teigia, kad smegenų dangaluose aktyvus *GABRA2* genas prisideda prie priklausomybės nuo alkoholio patogenezės (40). Serotonino receptoriaus genuose esantys VNP taip pat turi didelę įtaką priklausomybių susidarymui. Pavyzdžiui, Literatūroje minimų *HTR3B* geno VNP – rs3758987, rs3782025 ar rs1176744, asociacija parodyta su įvairaus laipsnio AVS (13, 18). 5-HT receptorių koduojančiame baltyme esantis rs1176744 VNP atsakingas už pailgintą receptoriaus atsaką į serotoniną laiką, sumažintą desensibilizaciją ir deaktivaciją bei padidėjusį vidutinį receptoriaus veikimo laiką (38).

Joanne Voisey ir kolegų atliktame tyrime nagrinėtas katechol-O-metiltransferazę koduojantis genas (*COMT*). Tyrimas atskleidė rs4680 ir rs165774 VNP galimai daromą įtaką šizofrenijos bei priklausomybės nuo alkoholio patogenezėje. VNP pakeičia fermento aktyvumą ir dėl sutrikusios neuromediatorių apykaitos (dopamino deaktivacijos) galimai sukelia priklausomybę (72). Taylor A. ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, kad 5 VNP (rs2585458, rs11774146, rs11995227, rs7832576 ir rs930470) asocijuoti su priklausomybės nuo alkoholio fenotipu kaukaziečių grupėje. VNP nustatyti *DPYSL2* gene, kuris koduoja dihidropirimidinazės 2 fermentą, kurio raiška stebima neuronų audiniuose. Įvairios šio geno pakaitos susijusios su psichiatriniais sutrikimais – pavyzdžiui Alzheimerio liga ar šizofrenija (69)



Nature Reviews | Neuroscience

2 pav. Alkoholio – dopamino kaskada. Alkoholis veikdamas MOR slopina GABA interneuronus. Tuo metu kaskados gale išsiskiria dopaminas. (30)

3 TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

3.1 Tyrimo strategija

Tyrimą sudaro dvi pagrindinės dalys. Pirmoji dalis susideda iš projekto „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ (toliau trumpiniu *LITGEN*) (Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-05-329-79, 2011–05–03) metu atlikto viso genomo plataus masto genotipavimo duomenų bioinformacinės duomenų analizės (4 pav.). Antrąją tyrimo dalį sudaro *Sanger* sekoskaitos metodu atliktas genotipavimas bei gautų duomenų statistinė analizė (5 pav.).

Viso genomo plataus masto genotipavimo metodas pasirenkamas, kai norima gauti kuo daugiau informacijos iš viso genomo. Lusto gamyboje pasirenkami VNP, kurie išsidėstę po visą genomą ir dažnai turi sankibos grupėje kitus nepanaudotus luste VNP žymenis. Tokiu būdu, dar labiau praplečiamas gautos informacijos kiekis. Kita svarbi priežastis – tokio tipo tyrimai puikiai tinka daugiaveiksnių sutrikimų kandidatiniams genų sritims bei jose esančių VNP paieškai, nes atliekant viso genomo asociacijos tyrimus nesivadovaujama jokia išankstine hipoteze. Taip sulyginus atvejo ir kontrolines grupes ieškoma statistiškai reikšmingos asociacijos su fenotipu ir visus VNP žymenis esančius luste.

Sanger sekoskaitos metodas naudotas patikrinti jau žinomų ir luste nesančių VNP žymenų patikrinimui tiriamojame grupėje.

Magistrinio darbo metu naudotos dvi tiriamųjų imtys – taip praplečiama tiriamųjų imtis, nes ne visi asmenys buvo genotipuoti pirmojoje tyrimo dalyje. Plačiau apie tiriamųjų imtis skaitykite 5.2 skyrelyje.

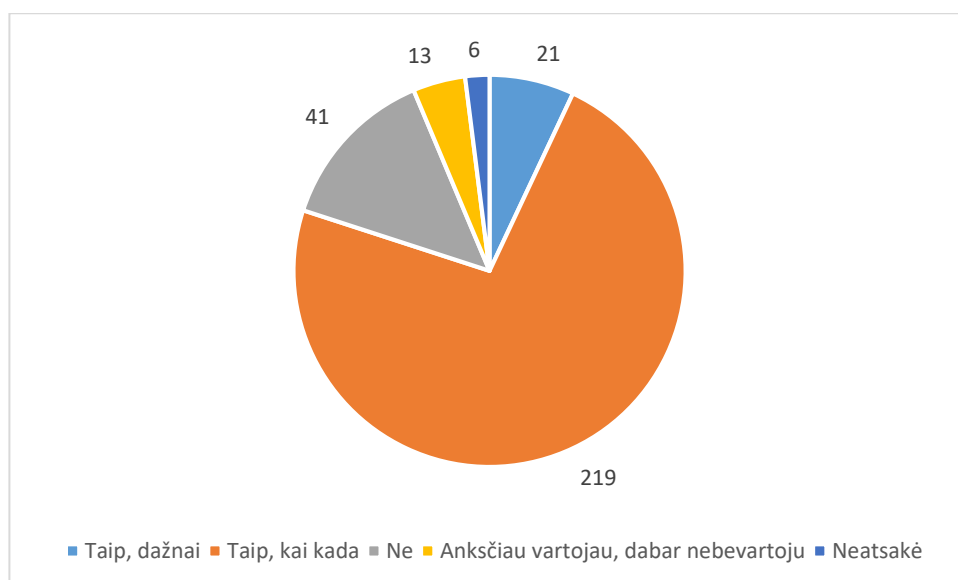
3.2 Tiriamųjų imtis

Atliekant magistrinį darbą buvo pasirinktos dvi skirtingos tiriamųjų imtys. Pirmoji tiriamųjų imtis buvo nustatyta iš anksto ir naudota *LITGEN* projekto metu atliekant plataus masto genotipavimo tyrimą naudojant VNP–LGH metodą. Tuo tarpu, antroji tiriamųjų imtis, genotipuota *Sanger* metodu, buvo pasirinkta atsižvelgiant tik į *LITGEN* projekto klausimyną. Taip bandyta praplėsti atvejo ir kontrolės grupes, nes ne visi dominantys tiriamieji buvo genotipuoti VNP–LGH metodu.

Pirmoji tiriamųjų imtis, naudota bioinformacinei duomenų analizei. Tiriamųjų imtis sudaryta iš 300 pilnamečių asmenų dalyvavusių *LITGEN* projekte ir atsakiusių į projekto klausimyno – „Gyventojų mitybos ir fizinio aktyvumo apklausos anketa“ klausimą: „Ar vartojate alkoholinius gėrimus?“. Imtį sudaro 152 vyrai (amžius $49,45 \pm 9,07$ metai) ir 148 moterys (amžius $49,53 \pm 9,14$ metai). Jie suskirstyti į atskiras tiriamųjų grupes, pagal tai, kaip atsakė į pateiktą klausimą, kurio galimi atsakymai buvo: „Taip, dažnai“, „Taip, kai kada“, „Ne“ ir „Anksčiau vartojau, dabar nebevartuju“ (1 lentelė). Asmenų atsakiusių į *LITGEN* projekto klausimyno klausimą „Ar vartojate alkoholinius gėrimus?“ pasiskirstymas pateiktas skritulinėje diagramoje (3 pav.).

1 lentelė. Bioinformacinei analizei sudarytos tiriamųjų grupės pagal klausimo „Ar vartojate alkoholinius gėrimus?“ atsakymus. Lentelėje skaičiais išreikštas asmenų skaičius.

Grupės pavadinimas	Atvejo grupė	Kontrolinė grupė	Viso
Vartojantys alkoholį – nevartojantys alkoholio	253	41	294
Dažnai vartojantys alkoholį– nevartojantys alkoholio	21	41	62
Retai vartojantys alkoholį – nevartojantys alkoholio	219	41	260
Kažkada vartojusieji alkoholį – nevartojantys alkoholio	13	41	54
Dažnai vartojantys alkoholį– retai vartojantys alkoholį	21	219	240
Dažnai vartojantys alkoholį– kažkada vartojusieji alkoholį	21	13	34



3 pav. Klausimo "Ar vartojate alkoholinius gėrimus?" atsakymų pasiskirstymas tiriamojoje grupėje.

Pasirinkus α klaidos lygį 0,05, pasikliautinumo lygį (1- α), populiacijos dydį, kurioje renkama tiriamųjų imtis (2971900 Lietuvos gyventojų skaičius 2013 metų duomenimis) bei atsakymų pasiskirstymą (25 proc.), minimali tyrimo imtis turėjo būti ne mažesnė kaip 289 asmenys (apskaičiuota pagal: <http://www.raosoft.com/samplesize.html>).

Antroji tiriamųjų imtis. Antrajai tyrimo daliai pasirinktą tiriamųjų imtį sudarė 144 pilnamečiai asmenys dalyvavę *LITGEN* projekte, kurio metu atsakė į klausimą: „Ar vartojate alkoholinius gėrimus?“. Kontrolinę grupę sudarė 101 asmuo. Jie į minėtą klausimą atsakė „Ne“. Tuo tarpu, atvejo grupę sudarė 43 asmenys, kurie į klausimą atsakė: „Taip, dažnai“. Asmenys atsakė į klausimą: „Taip, kai kada“ ir „Anksčiau vartojau, dabar nebevarčiau“ į tiriamųjų imtį nebuvo įtraukti. Tiriamosios imties aprašomosios statistikos duomenys pateikti 22 lentelė. Tiriamosios imties aprašomosios statistikos duomenys. lentelėje.

2 lentelė. Tiriamosios imties aprašomosios statistikos duomenys.

Parametras	Kontrolinė grupė (N = 101)	Atvejo grupė (N = 43)	Viso (N = 144)
Lytis (asmenų sk.)			
Moteriška	78	7	85
Vyriška	23	3	59
Amžius (metais)			
Grupės	53,38 ± 12,26	48 ± 9,66	51,77 ± 11,77

2 lentelės tęsinys.

Parametras	Kontrolinė grupė (N = 101)	Atvejo grupė (N = 43)	Viso (N=144)
Moterų	53,32 ± 12,10	45,57 ± 7,57	52,68 ± 11,95
Vyrų	53,57 ± 13,06	48,47 ± 10,04	50,46 ± 11,48
Rūkantys (asmenų sk.)			
Taip	9	24	33
Ne	88	13	101
Neatsakė	4	6	10
Išsilavinimas (asmenų sk.)			
Pradinis	3	1	4
Spec. vidurinis	46	21	67
Vidurinis	26	8	34
Aukštasis	22	11	33
Neatsakė	4	2	6
Alkoholio vartojimas			
Dažnai vartojamas	0	43	43
Nevartojama visai	101	0	101

3.3 Kandidatinių genų ir VNV pasirinkimas

Pasitelkus laisvai prieinamas duomenų bazes (*Pubmed, DisGeNet, PharmGKB, Ensembl*) ir atlikus literatūros apžvalgą pasirinktos kandidatines genų sritys. Genuose esančios pakaitos minimos kaip galimos alkoholizmo, padidėjusio ar sumažėjusio polinkio vartoti alkoholį bei priklausomybės nuo kitų narkotinių medžiagų priežastys. Kandidatiniai genai gali būti suskirstyti į tris grupes:

- Už alkoholio metabolizmo procesus atsakingi genai (*ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7, ALDH1A1, ALDH2, CYP2E1*);
- Už neuromediatorių receptorių veiklą atsakingi genai (*CHRNA3, CHRNA5, GABRA2, OPRM1, HTR2A, HTR3B*);
- Už signaliniame kelyje dalyvaujančių baltymų sintezę atsakingi genai (*NALCN, COMT, DPYSL2, GAD2, SLC6A4, ANKK1, NPY*).

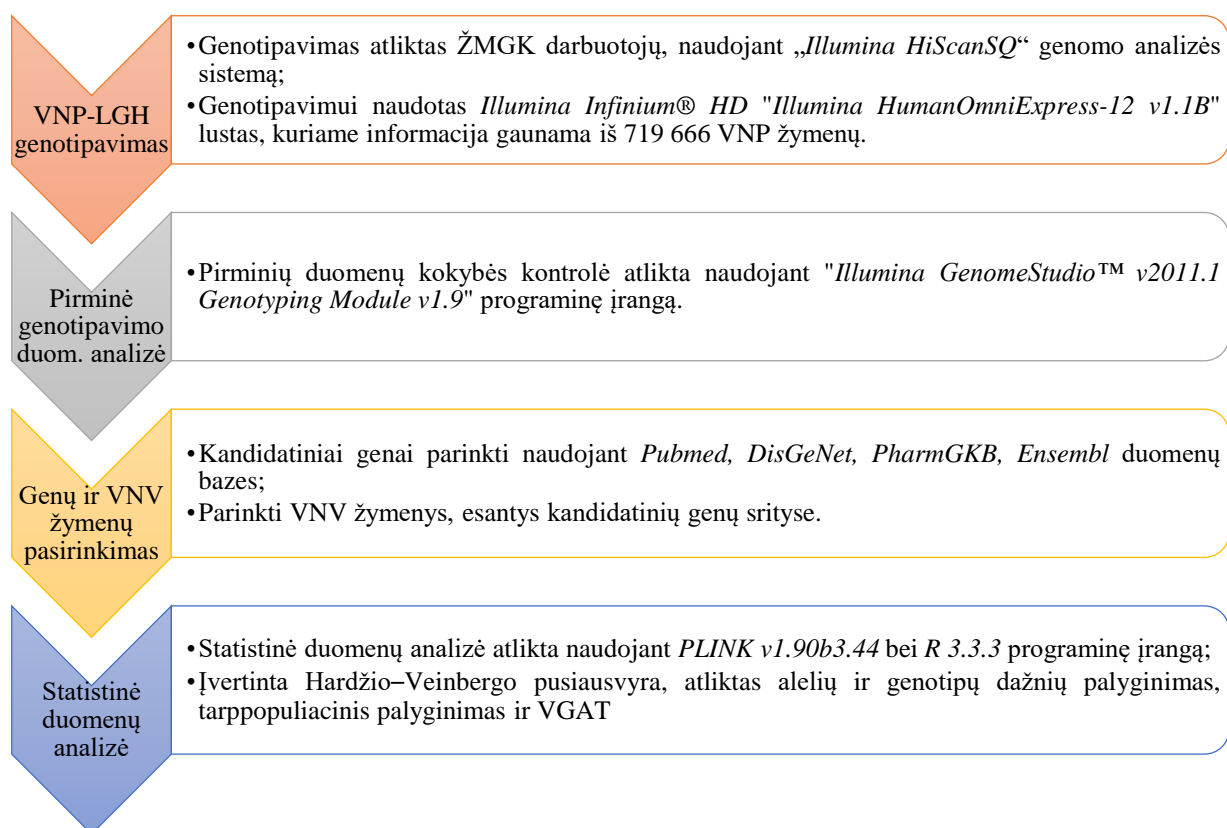
Bioinformacinė duomenų analizė (alelių bei genotipų dažnių, tarpopuliacinė analizė) atlikta pagal 98 VNV žymenis esančius kandidatinių genų srityse ir hipotetiškai daro tiesioginę

įtaką koduojamų baltymų aktyvumui. Didesnį VNV žymenų skaičių apriboją *LITGEN* projekto metu naudoto VNP lusto galimybės.

Tiriamosios imties genotipavimui, Sanger sekoskaitos metodu, naudoti žymenys:

- *ADH1B* – rs1229984 (NM_000668.5:c.143A>G, NP_000659.2:p.His48Arg);
- *ADH1C* – rs698 (NM_000669.4:c.1048A>G, NP_000660.1:p.Ile350Val);
- *ALDH2* – rs2238151 (NM_000690.3:c.114+6933T>C).

3.4 Viso genomo plataus masto genotipavimo duomenų bioinformacinė analizė



4 pav. Pirmosios darbo dalies – bioinformacinės viso genomo skanavimo duomenų analizės darbo schema

3.4.1 VNP–LGH genotipavimo metodas bei pirminių duomenų analizė

LITGEN projekto metu, genotipavimo duomenys gauti naudojant „*Illumina HiScanSQ*“ genomo analizės sistemą (gamintojas *Illumina Inc.*, JAV) ir *Illumina Infinium® HD "Illumina HumanOmniExpress-12 v1.1B"* tipo VNP lustus. Šiais lustais galima gauti informaciją apie visame genome pasiskirsčiusius 719 666 VNP.

Lustai susideda iš mikrošulinėlių, kurie atsitiktinai yra užpildyti dalelėmis. Ant šių dalelių yra unikalios oligonukleotidų sekos, prie kurių vėliau hibridizuojasi genomine deoksiribonukleorūgštis (toliau trumpiniu DNR) (67). Genotipavimo procesas prasideda nuo

tiriamosios DNR amplifikacijos bei fragmentacijos fermentiniu būdu. Po to DNR yra precipituojama ir resuspenduojama, o lustas yra paruošiamas hibridizacijai. Hibridizacijos metu DNR fragmentai yra prilygiuojami prie labai specifinių oligonukleotidų esančių ant lusto mikrodalelių. Kiekviena mikrodalelė atspindi abu alelius, kurie būdingi specifinei genomo vietai. Po hibridizacijos oligonukleotidas yra fermentiškai pailginamas ir „nudažomas“ viena iš dviejų spalvų (64, 19). Skenavimo metu matuojamas šių dviejų dažų intensyvumas ir taip tiriamajam priskiriamas atitinkamas genotipas. Pirminių duomenų analizė bei kokybės kontrolė vykdyta *Illumina GenomeStudio™ v2011.1 Genotyping Module v1.9* programine įranga bei Guo Y. ir kolegų sukurtomis gairėmis. (24)

3.4.2 Statistinei duomenų analizei naudotų įrankių apžvalga

Pirminių genotipavimo duomenų kokybės kontrolė vykdyta pagal pasirinktus kriterijus – *Call rate* > 0,98 ir *GenTrain score* > 0,7. *Call rate* – tai kokybės kontrolės įvertis, kuris parodo žymens genotipavimo efektyvumą. Jis parodo kokiai daliai, išreikšta procentais, mėginių priskirtas specifinio žymens genotipas (71). *GenTrain score* – kitas kokybės kontrolės įvertis, kuris parodo duomenų klasterizavimo algoritmo efektyvumą. Įvertis parodo, kaip gerai nuskanuoti žymens priskiriami vienam iš genotipų (36). Tolimesnė statistinė duomenų analizė vykdyta viso genomo analizės programine įranga *PLINK v1.90b3.44 64-bit (2016-11-17)* (<https://www.cog-genomics.org/plink2>)

PLINK programinės įrangos duomenų laikmenos sugeneruotos komandine eilute: *plink --file *Direktorija*\LITGEN_ALKO --out *Direktorija*\LITGEN_ALKO*

Pasirinktų VNV atranka pagal MAF atliktas komandine eilute: *plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --maf 0.01 --write-snpList --out *Direktorija*\SNPListMAF001*

Likusiems VNV patikrinta Hardžio – Veinbergo pusiausvyra komandine eilute: *plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --remove *Direktorija*\IDlist.txt --extract *Direktorija*\SNPListMAF001.txt --hardy --freq --out *Direktorija*\Final*

Alelių dažnių palyginimui tarp VNV žymenų ir grupių atlikta komandine eilute: *plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --remove *Direktorija*\IDlist.txt --extract *Direktorija*\SNPListMAF001.txt --pheno *Direktorija*\PhenoGeriaNigeria.phenotype --assoc --out *Direktorija*\AssociacijaGeriaNigeria*

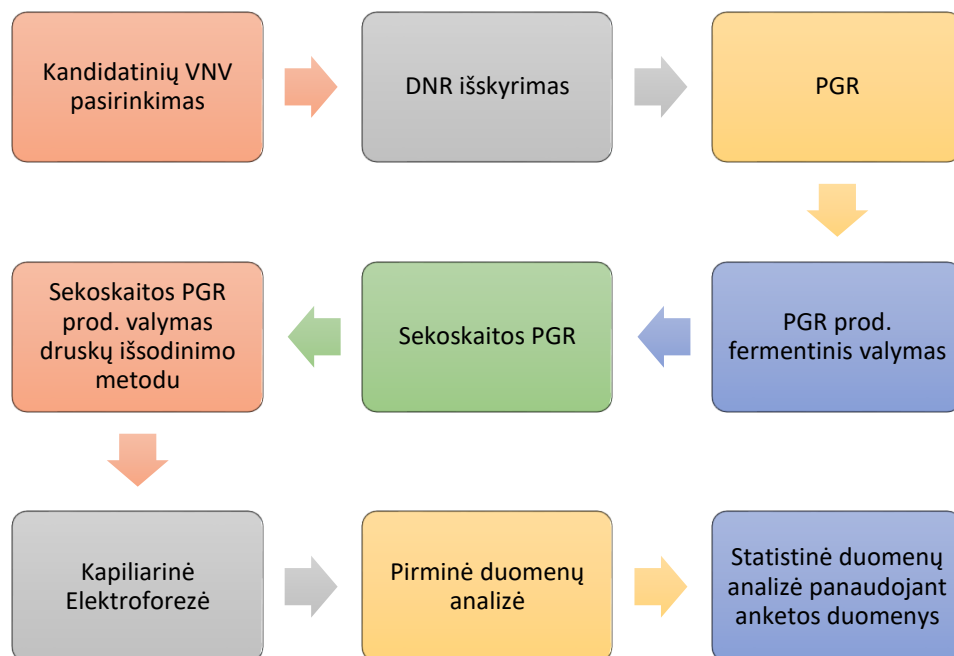
Genotipų dažnių palyginimui tarp VNV žymenų ir grupių atlikta komandine eilute: *plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --remove *Direktorija*\IDlist.txt --extract *Direktorija*\SNPListMAF001.txt --pheno *Direktorija*\PhenoGeriaNigeria.phenotype --model --out *Direktorija*\PhenoGeriaNigeriaMODEL*

Genotipų dažnių, kurių bent pagal vieną genotipą skaičius <5, palyginimui tarp VNV žymenų ir grupių atlikta komandinė eilutė: `plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --remove *Direktorija*\IDlist.txt --extract *Direktorija*\SNPlistMAF001.txt --pheno *Direktorija*\PhenoGeriaNegeria.phenotype --model fisher --out *Direktorija*\PhenoGeriaNegeriaMODEL_FISHER`

Viso genomo asociacijos analizė atlikta komandinė eilutė: `plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --remove *Direktorija*\IDlist.txt --extract *Direktorija*\SNPvisi.txt --pheno *Direktorija*\PhenoGeriaNegeria.phenotype --assoc --adjust --out *Direktorija*\AsociacijaGeriaNegeria`

Norint įvertinti gautų statistiškai reikšmingų VNV žymenų sankibą (neatsitiktinė alelių asociacija tarp skirtingų genomo vietų, kurios paveldimos kartu. Taip gaunama informacija apie abi genetines sritis, žinant informaciją tik apie vieną) su kitų genų VNV naudota komandinė eilutė: `plink --bfile *Direktorija*\LITGEN_ALKO --r2 --ld-snp *rsNumeris* --ld-snp-list *Direktorija*\SNPlistMAF001.txt --out *Direktorija*\LDrs1058332`. VNV žymenys priskiriami sankibos grupei kai $r^2 > 0.8$.

3.5 rs1229984, rs698, rs2238151 VNV žymenų genotipavimas



5 pav. Antrosios darbo dalies – laboratorinės praktinės užduoties darbo schema.

3.5.1 DNR Išskyrimas

Tiriamųjų imties DNR buvo išskirta VU MF ŽMGK darbuotojų *LITGEN* projekto metu. Naudoti du metodai – fenolio chloroformo išskyrimo būdas bei automatizuota DNR išskyrimo sistema – TECAN Freedom EVO®200 (gamintojas *Tecan Group Ltd.*, Šveicarija).

DNR koncentracijai bei švarumui pamatuoti naudotas NanoDrop® 1000 spektrofotometras (gamintojas Thermo Fisher Scientific, JAV). Procedūros atliktos remiantis VU MF ŽMGK naudojamais protokolais.

3.5.2 Polimerazės grandininė reakcija

PGR – metodas, kuriuo tikslingai pagausinami pageidaujami DNR fragmentai. Tai ciklinė reakcija, kurios metu, keičiant temperatūrą vyksta matricinės DNR denatūracija, pradmenų prisijungimas bei jų pratęsimas. Norint gauti specifinį DNR fragmentą – būtina optimizuoti PGR sąlygas bei sukurti specifiskai besijungiančius prie matricinės DNR pradmenis. Pradmenys, šiam tyrimo etapui, sukurti *Primer3* programa (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) ir pavaizduoti 3 lentelėje.

3 lentelė. Tyrimui sukurtų VNV žymenų pradmenų sąrašas.

VNV žymens numeris	I pradmuo (5' → 3')	II pradmuo (5' → 3')	PGR produkto ilgis
rs1229984	ACCACACGTGTTCCCTGAG	GGGATTAGTAGCAAAACCCTC A	291 nt
rs698	GCAATGGAAAACCAAGGCACT	CAGTCTGGAATGCAGCACTTT	381 nt
rs2238151	TTTGTGCTCCAGAAGTGAGGT	TCCCGAACCAAGACTAACCC	328 nt

PGR metodo atlikimo tvarka:

1. Darbas atliekamas vertikaloje traukos spintoje, kuri sterilizuojama UV pagalba. Traukos spintos paviršius dezinfekuojamas 70 proc. etanolium.
2. Reakcijos mišinys maišomas steriliame 1,5 ml mėgintuvėlyje. Reakcijai reikalingi reagentai bei jų kiekiai nurodyti 4 lentelėje. Paruoštas mišinys supurtomas, nucentrifuguojamas ir išpilstomas po 14,4 µl į 0,2 ml talpos mėgintuvėlius.

4 lentelė. PGR mišinio komponentai ir jų kiekiai reikalingi vienai reakcijai.

Reagentai	Kiekis vienai reakcijai
ddH ₂ O	5,7 µl

4 lentelės tęsinys

Reagentai	Kiekis vienai reakcijai
PCR Master Mix (2X) (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	7,5 µl
I pradmuo	0,6 µl
II pradmuo	0,6 µl
Matricinė DNR	0,6 µl
Viso:	15 µl

- Į paruoštus 0,2 ml mėgintuvėlius su reakcijos mišiniu įpilama po 0,6 µl genominės DNR matricos tirpalo (pageidautina tirpalo koncentracija 50 ng/µl). Taip pat, vienas 0,2 ml mėgintuvėlis paliekamas kaip neigiama kontrolė – reikalinga patikrinti reagentų užterštumą.
- Paruošti mėgintuvėliai supurtomi, nucentrifuguojami ir įdedami į *Eppendorf Mastercycler pro vapo.protect* (*Eppendorf AG, Vokietija*) termociklerį. PGR vykdoma pagal iš anksto optimizuotą programą, kurios žingsniai nurodyti 5 lentelėje.

5 lentelė. PGR programos parametrai.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
94 °C	3:00	1
94 °C	0:30	30
60 °C	0:30	
72 °C	0:30	
72 °C	10:00	1
4 °C	∞	-

3.5.2.1 PGR produkto tikrinimas agarozės gelyje

PGR metu pagausinti DNR fragmentai turi būti patikrinti elektroforezės metodu agarozės gelyje. Šis būdas puikiai atvaizduoja PGR reakcijos mišinyje esančius specifinius ir (arba) nespecifinius DNR fragmentus, kokybiškai įvertina jų kiekį, švarumą. PGR metodu norimi gauti fragmentai neviršija 400 nt dydžio, todėl fragmentų frakcionavimui naudotas dviejų procentų koncentracijos agarozės gelis.

Elektroforezės metodo atlikimo tvarka:

1. Pasiruošiama darbo aplinka bei įranga. Nuvalomas darbo stalas, horizontali elektroforezės vonelė *MIDICELL® PRIMO EC330 (E-C Apparatus Corp., JAV)* nulygsvarinama bei sudedama gelio paruošimo forma (ją sudaro paruošimo vonelė ir šukutės).
2. Paruošti dviejų procentų elektroforezės geliui naudojama vienas gramas agarozės miltelių bei 50 ml TBE buferio. Tirpalas kaitinamas elektromagnetinių bangų krosnelėje, kol tirpale esanti agarozė pilnai ištirps. Tirpalas atvėsina iki 60 °C temperatūros. Į tirpalą įlašinama 1 µl etidžio bromido (*Carl Roth GmbH + Co.KG, Vokietija*) tirpalo (10 mg/ml) ir supilamas į gelio paruošimo formą.
3. Sustingus agarozės geliui, iš jo ištraukiamos šukutės. Gelis panardinamas į horizontalę elektroforezės vonelę, taip, kad jis būtų pilnai apsemtas 1X TBE buferiu (*Thermo Fisher Scientific, Lietuva*).
4. Prieš įleidžiant mėginius į agarozės gelyje susiformavusius šulinėlius, jie turi būti sumaišyti su įleidimo dažu. 1,2 µl PGR produkto sumaišoma su 0,6 µl 3X įleidimo dažu (bromfenolio mėlis, *Thermo Fisher Scientific, Lietuva*). Mišinys perkeliamas į agarozės gelio šulinėlius
5. Į agarozės gelį, taip pat, įleidžiama 1,2 µl molekulinio ilgio standarto (100 bp, *Thermo Fisher Scientific, Lietuva*), pagal kurį galima nustatyti gauto DNR fragmento ilgį.
6. Uždengus elektroforezės vonelės dangtį, aparatas įjungiamas į srovės šaltinį. Elektroforezė vykdoma 20 minučių 120 V įtampoje.
7. Pasibaigus elektroforezei, gelis fotografuojamas UVT-28 ME (Herolab GmbH, Vokietija) transiluminatoriuje, jį apšvietus UV spinduliais. Gautas rezultatas interpretuojamas naudojant kompiuterinę vizualizacijos programą – *EasyWin 32*.

3.5.3 PGR produkto fermentinis valymas

Sekoskaitos PGR metodas jautrus mėginio užteršimui. Todėl, norint išvengti reakcijos inhibicijos naudojamas papildomas fermentinio valymo žingsnis. Fermentai naudojami reakcijoje yra:

- Egzonukleazė I (*angl. EXO I*) – tai fermentas, kuriam veikiant PGR reakcijos mišinyje, yra degraduojami viengrandžiai DNR fragmentai (3' → 5' kryptimi) laipsniškai atlaisvinant deoksiribonukleozido mono–fosfatą (dNMP);
- Šarminė krevečių fosfatazė (*angl. SAP*) – tai termolabilus fermentas, kuris pašalina mišinyje esančių DNR, ribonukleorūgščių (RNR), deoksiribonukleozido tri–fosfatų (dNTP), dNMP ir baltymų 5'–fosfatą ir juos inaktivuoja.

Fermentiškai išvalytas PGR reakcijos mišinys gali būti naudojamas sekoskaitos PGR žingsnyje.

PGR produkto fermentinio valymo metodo atlikimo tvarka:

1. Paruošiama darbo aplinka ir reagentai. Nuvalomas darbinis paviršius, reagentai supurtomi ir nucentrifuguojami.
2. Į 0,5 ml mėgintuvėlį paruošiamas fermentinio valymo mišinys, kurį sudaro 6 lentelėje nurodyti reagentai ir jų kiekiai. Paruoštas mišinys supurtomas ir nucentrifuguojamas.

6 lentelė. PGR produkto fermentinio valymo mišinio komponentai ir kiekiai reikalingi vienai reakcijai

Reagentai	Kiekis vienai reakcijai
TE buferis (1X)	1,8 µl
SAP – <i>Thermo Fisher Scientific</i>	0,14 µl
EXO I – <i>Thermo Fisher Scientific</i>	0,06 µl
PGR produktas	5 µl
Viso:	7 µl

3. Paruoštas mišinys supilstomas po 2 µl į 0,2 ml mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai gerai supurtomi, nucentrifuguojami ir įdedami į *Eppendorf Mastercycler pro vapo.protect* (*Eppendorf AG, Vokietija*) termociklerį. Pasirenkama programa, kurios parametrai nurodyti 7 lentelėje.

7 lentelė. PGR produkto fermentinio valymo programos parametrai.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
37 °C	40:00	x1
80 °C	20:00	x1
4 °C	∞	

3.5.4 Sekoskaitos PGR

1977 metais S. Fred Sanger sukurtas DNR grandinės nustatymo metodas tapo auksiniu standartu. Šis metodas vadinamas grandinės terminacijos arba dideoksi metodu (61). Grandinės terminacijos metodas remiasi cheminėmis DNR grandinės monomerų – dNTP savybėmis. ddNTP

prie trečiojo anglies atomo trūksta hidroksilo grupės, be kurios negalima pratęsti DNR grandinės, t.y. nesusidaro fosfodiesterinė jungtis su kito dNTP 5' fosfato grupe (10).

Sekoskaitos mišinyje esantys dNTP ir ddNTP, sekoskaitos PGR metu, stochastiškai ir konkurencingai jungiasi prie vienviengrandės šabloninės DNR grandinės. Kadangi, dNTP yra žymiai daugiau, gaunami įvairaus ilgio DNR fragmentai (Pradmuo+1nt*n). Visų fragmentų visuma įgalina nustatyti norimo DNR fragmento seką vieno nukleotido tikslumu.

Sekoskaitos PGR metodo atlikimo tvarka:

1. Pasiruošiama darbo aplinka ir reagentai. Nuvalomas darbinis paviršius, reagentai supurtomi ir nucentrifuguojami.
2. Į 0,5 ml mėgintuvėlį paruošiamas sekoskaitos PGR mišinys, kurį sudaro 8 lentelėje nurodyti reagentai ir jų kiekiai. Paruoštas mišinys supurtomas ir nucentrifuguojamas.

8 lentelė. Sekoskaitos PGR mišinio komponentai ir kiekiai reikalingi vienai reakcijai.

Reagentai	Kiekis vienai reakcijai
ddH ₂ O	3,2 μl
BDT 5X Sekoskaitos buferis – <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1,4 μl
BDT Paruoštas reakcijos mišinys – <i>Thermo Fisher Scientific</i>	0,2 μl
I arba II pradmuo	0,2 μl
Išvalyto PGR produkto	2 μl
Viso:	7 μl

3. Į 0,2 ml mėgintuvėlį įpilama po 5 μl reakcijos mišinio bei 2 μl fermentiniu būdu išvalyto PGR produkto.
4. Mėgintuvėliai supurtomi, nucentrifuguojami ir įdedami į *Eppendorf Mastercycler pro vapo.protect* (*Eppendorf AG, Vokietija*) termociklerį. Pasirenkama programa, kurios parametrai nurodyti 9 lentelėje.

9 lentelė. Sekoskaitos PGR programos parametrai.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
96 °C	1:00	x1
96 °C	0:11	x25
52 °C	0:11	
60 °C	4:00	

9 lentelės tęsinys.

Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
4 °C	∞	

3.5.5 Sekoskaitos PGR produkto valymas druskų išsodinimo metodu

Mišinyje, po sekoskaitos PGR, lieka nepanaudotų reagentų (dNTP, ddNTP, pradmenų), kurie gali trukdyti kapiliarinės elektroforezės metu. Todėl mišinys turi būti papildomai valomas druskų išsodinimo metodu. Kur su etanolio faze pašalinami minėti likę reagentai.

Sekoskaitos PGR produkto valymo druskų išsodinimo metodu atlikimo tvarka:

1. Pasiruošiama darbo aplinka ir reagentai. Nuvalomas darbinis paviršius, reagentai supurtomi ir nucentrifuguojami.
2. Į 1,5 ml mėgintuvėlį paruošiamas valymo mišinys, kurio sudėtis ir kiekis nurodyti 10 lentelėje.

10 lentelė. Sekoskaitos PGR produkto valymo mišinio komponentai ir kiekiai reikalingi vienai reakcijai.

Reagentai	Kiekis vienai reakcijai
ddH ₂ O	14,5 µl
Etanolis (96 proc.)	62,5 µl
Natrio Acetato tirpalas	3 µl
Viso:	80 µl

3. Į 0,5 ml mėgintuvėlius įpilama po 80 µl valymo mišinio bei 7 µl sekoskaitos PGR produkto. Mėgintuvėliai supurtomi ir inkubuojami tamsoje 10 minučių.
4. Praėjus nustatytam laikui mėgintuvėliai yra centrifuguojami 5 minutes 13 000 aps./min greičiu. Pasibaigus centrifugavimui, mėgintuvėliai yra dekantuojami.
5. Į dekantuosius mėgintuvėlius įpilama 300 µl 70 proc. etanolio. Po to, mėgintuvėliai purtomi 1 minutę.
6. Supurtyti mėgintuvėliai perkeliama į centrifugą ir yra centrifuguojami 5 minutes 13 000 aps./min greičiu. Pasibaigus centrifugavimui, mėgintuvėliai yra dekantuojami.
7. Dekantuoti mėgintuvėliai perdedami 37 °C šildytuvą.
8. Išdžiūvę mėginiai užpilami 8 µl Hi-Di™ formamido ir perkeliama į kapiliarinei elektroforezei pritaikytą 96 šulinėlių plokštelę. Plokštelė uždengiama septa.

9. Plokštelė centrifuguojama 1 minutę 2000 aps./min greičiu. Pasibaigus centrifugavimo laikui, plokštelė yra paruošta ir gali būti analizuojama.

3.5.6 Kapiliarinė elektroforezė ir pirminė duomenų analizė

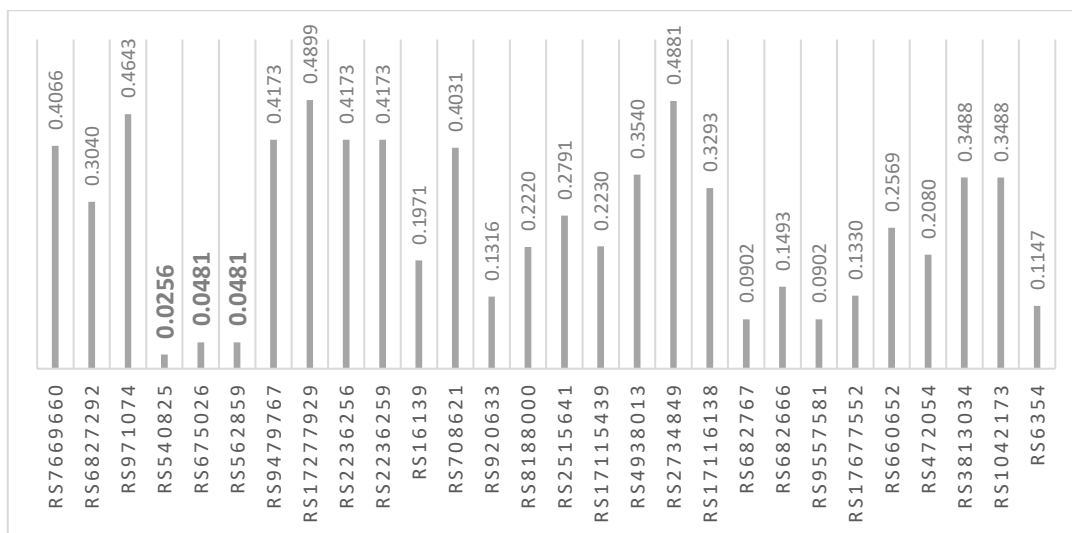
Kapiliarinės elektroforezės metodo ir pirminių duomenų apdorojimo tvarka:

1. Paruošta sekoskaitos plokštelė su mėginiais įdedama į *3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, JAV)* genomo analizatorių ir atliekama kapiliarinė elektroforezė.
2. Pirminė duomenų analizė atliekama naudojantis *Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems™, JAV)* programine įranga. Gauta sekvenograma analizuojama laisvai prieinama programa – *Chromas Lite 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd., Australia)*. Gauti duomenys lyginami su referentine genomo seka *BLAST* (pasiekama internete adresu: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) programa. Genomo sekos pokyčiai identifikuojami naudojant *Ensembl* duomenų bazę (pasiekama internete adresu: <http://www.ensembl.org/index.html>).

4 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1 VNP–LGH genotipavimo duomenų, genotipų ir alelių dažnių, palyginimas

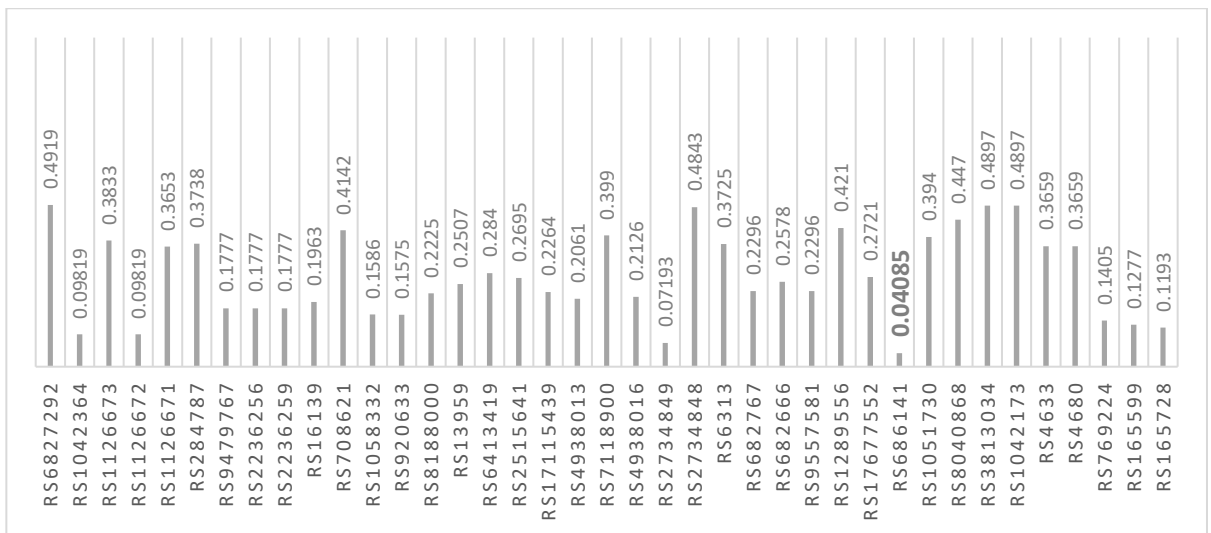
Visi pasirinkti kandidatiniai VNV atitiko keliamus kokybės reikalavimus (*Call rate* > 0,98 ir *GenTrain score* > 0,7). Tolimesnė duomenų analizė atlikta su 65 (1 Priedas) iš 98 polimorfniais žymenimis, kurių *MAF* > 0,01. Iš jų trys žymenys neatitiko Hardžio–Vainbergo dėsnio, todėl jie tolimesnėje duomenų analizėje naudojami nebuvo (6 Pav.).



6 pav. Hardžio–Veinbergo dėsnio patikrinimo rezultatas. Žymenys, kurių analizės p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.

4.1.1 Alelių dažnių palyginimas tarp vartojančių alkoholį ir nevartojančių alkoholio grupių

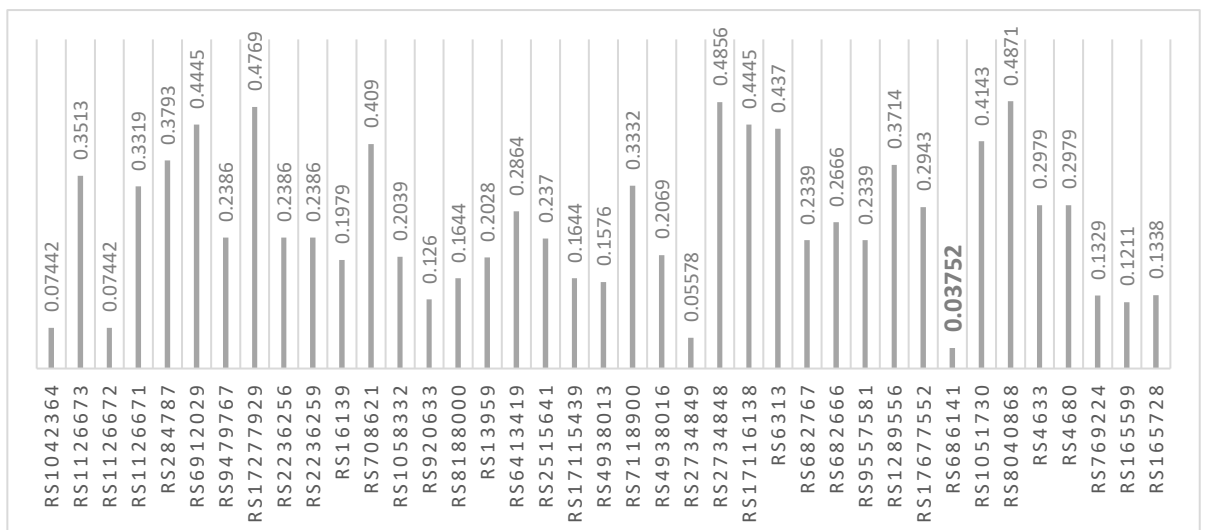
Alelių dažnių palyginimo rezultatas pavaizduotas 7 paveiksle. Pagal vieną iš VNV žymenų – rs686141 (NC_000013.11:g.101083724A>G, NP_443099.1:p.Leu1190=) rastas statistiškai reikšmingas alelių dažnių skirtumas tarp grupių (referentinio alelio dažnis = 0,2681, alternatyvaus alelio dažnis = 0.378, $\chi^2 = 4,182$, $p = 0,0408$). Žymens ŠS – 0,6028 (95 proc. PI 0,3698—0,9825). Statistiškai reikšminga VNV sinoniminė pakaita aptinkama *NALCN* gene, koduojančiame neselektyvų natrio jonų kanalo baltymą. Jis atsakingas už druskų jonų sukeltą neuroninį laidumą (43). Literatūroje šis VNV bei kiti VNV esantys sankibos grupėje su žymeniu nėra minimas AVS kontekste.



7 pav. Alelių dažnių palyginimas tarp vartojančių ir nevartojančių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenis, ordinačių ašyje nurodytos χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenis, kurių alelių dažnių palyginimo p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.

4.1.2 Alelių dažnių palyginimas tarp retai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

To paties VNV, rs686141, žymens statistiškai reikšmingas alelių dažnių skirtumas, taip pat, pastebėtas tarp retai vartojančių bei nevartojančių alkoholio grupės (referentinio alelio dažnis = 0,2651, alternatyvaus alelio dažnis = 0,378, $\chi^2 = 4,327$, $p = 0,0375$, ŠS = 0,5935 su 95 proc. PI 0,3618—0,9737) (8 Pav.).



8 pav. Alelių dažnių palyginimas tarp retai vartojančių ir nevartojančių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenis, ordinačių ašyje nurodytos

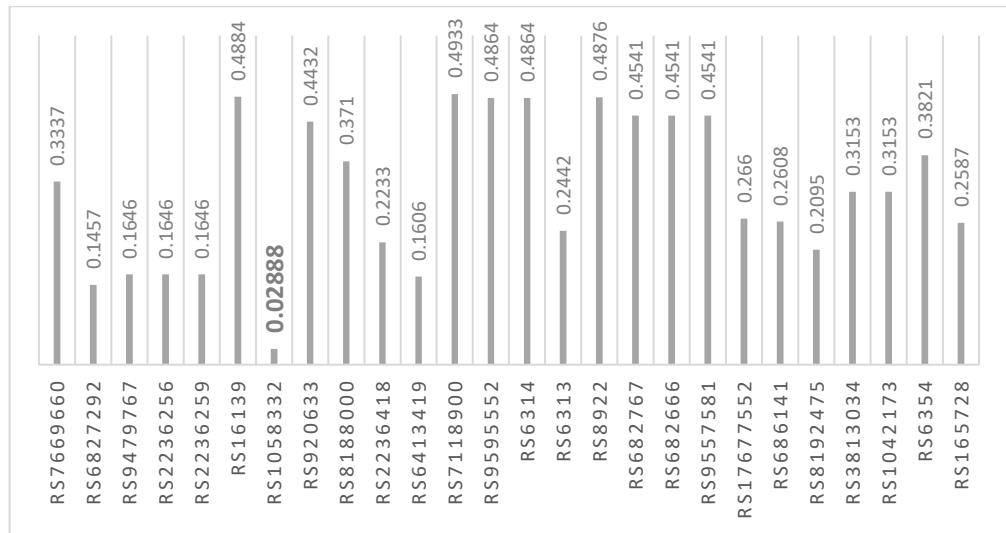
χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenys, kurių alelių dažnių palyginimo p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.

4.1.3 Genotipų dažnių palyginimas tarp vartojančių ir retai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

Palyginus genotipų dažnius tarp minėtų grupių gautas statistiškai reikšmingai besiskiriantis VNV – rs6354 (NM_001045.5:c.-185C>A) (Atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 9/72/172, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas = 5/7/29, $\chi^2 = 7,269$ $p = 0,02639$ ir kitos imties: atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 9/63/147, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas = 5/7/29, $\chi^2 = 6,013$, $p = 0,04945$). Žymuo randamas *SLC6A4* geno 5' netransliuojamame regione (NTS). Geno koduojamas baltymas atsakingas už serotonino pernašos baltymą. Žymuo literatūroje minimas kaip galimai atsakingas už depresijos vystymąsi. Literatūroje šis VNV nėra minimas AVS kontekste.

4.1.4 Alelių dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

Atlikus alelių dažnių palyginimą tarp grupių, buvo rastas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp vieno VNV – rs1058332 (referentinio alelio dažnis = 0.1667, alternatyvaus alelio dažnis = 0,04878, $\chi^2 = 4.775$, $p = 0,0288$, ŠS = 3,9 su 95 proc. PI 1,072—14,19) (9 pav.). VNV nustatomas *DPYSL2* geno 3' NTS (NM_001197293.2:c.*1071G>A). Genas sudarytas iš 14 egzonų ir koduoja baltymą, atsakingą už sinapsinio signalo perdavimą per sąveiką su kalcio jonų kanalu (pasiekama internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1808>). Literatūroje šis VNV bei kiti VNV esantys sankibos grupėje su žymeniu nėra minimas AVS kontekste.



9 pav. Alelių dažnių palyginimo tarp dažnai vartojančių ir nevartojančių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenys, ordinačių ašyje nurodytos χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenys, kurių Alelių dažnių palyginimo p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.

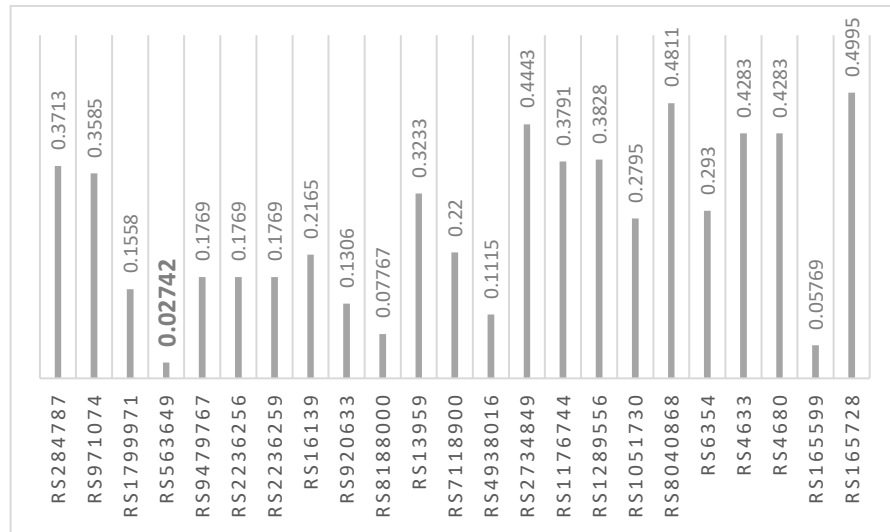
4.1.5 Genotipų dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

Atlikus genotipų dažnių palyginimą tarp grupių, gautas statistiškai reikšmingas rezultatas, kuris sutapo su alelių dažnių palyginimo metu gautu rezultatu – rs1058332 (atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 0/7/14, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas 0/4/37, $p = 0,03416$).

4.1.6 Alelių dažnių palyginimas tarp kažkada vartojusių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

10 paveiksle atvaizduotas alelių dažnių palyginimo tarp grupių rezultatas. Statistiškai reikšmingai skyrėsi tik vieno žymens alelių dažniai – rs563649 (NM_000914.4:c.291-2994C>T) (referentinio alelio dažnis = 0,2692, alternatyvaus alelio dažnis = 0,09756, $\chi^2 = 4,864$, $p = 0,0274$, ŠS = 3,408 su 95 proc. PI 1,098—10,58). VNV esantis *OPRM1* gene, kuris sudarytas iš 4 egzonus ir koduoja vieną iš trijų žmogaus organizme esančių opioidinių receptorių – μ opioidinį receptorių (MOR). Organizme MOR veikiamas endogeninių opioidų peptidų ar opioidinių analgetinių agentų (beta endorfinų, enkefalinų). Literatūroje MOR minimas, kaip darantis įtaką priklausomybėms nuo narkotinių medžiagų, tarp jų ir alkoholio, veikiant per dopamino sistemos reguliavimą. 1 introne esantis variantas randamas struktūriškai konservatyvioje vidinėje ribosomos prisijungimo vietoje 5' NTS dalyje. Nukleotido pakaita gali lemti iRNR kiekio pokytį, transliacijos efektyvumą (39)

bei naujų MOR izoformų susidarymą – MOR1K. MOR1K receptoriaus funkcinės savybės gali turėti įtakos priklausomybei nuo alkoholio ar kitų narkotinių medžiagų (30).



10 pav. Alelių dažnių palyginimo tarp kažkada vartojusių ir nevartojančių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenis, ordinačių ašyje nurodytos χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenis, kurių alelių dažnių palyginimo p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.

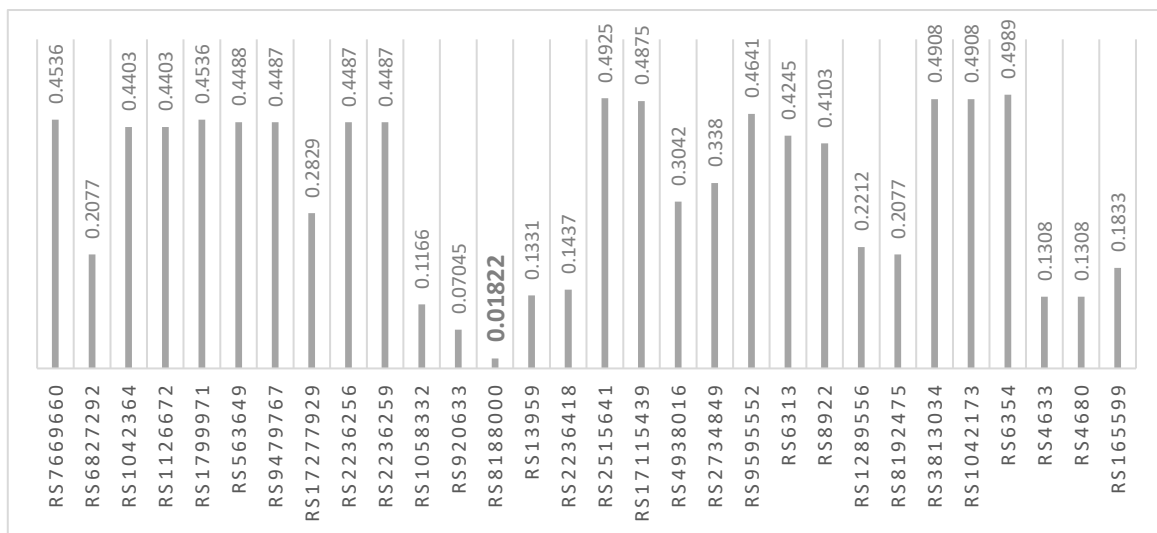
4.1.7 Genotipų dažnių palyginimas tarp kažkada vartojusių alkoholi ir nevartojančių alkoholio grupių

Atlikus genotipų dažnių analizę tarp grupių, gautas statistiškai reikšmingas skirtumas pagal vieną VNV – rs4938016 (NM_178510.1:c.1324G>C, NP_848605.1:p.Gly442Arg) (atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 4/4/5, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas = 1/22/18, $p = 0,0159$). VNV yra keičiantis amino rūgščių variantas, randamas aštuntajame *ANKK1* geno egzone. Bao-Zhu Yang ir kolegų išleistoje publikacijoje VNV minimas kaip susijęs su priklausomybe nuo alkoholio bei kitų narkotinių medžiagų (79).

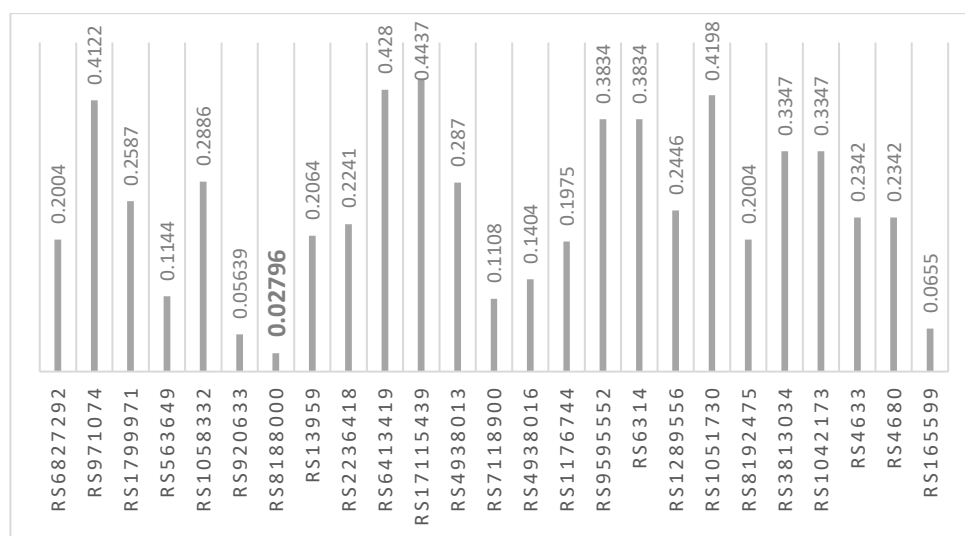
4.1.8 Alelių dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi ir retai vartojančių bei kažkada vartojusių alkoholi grupių

Alelių dažnių palyginimo rezultatas tarp grupių pavaizduotas paveiksluose (11, 12 pav.). Gautas statistiškai reikšmingas VNV alelių dažnių skirtumas (referentinio alelio dažnis = 0,1667, alternatyvaus alelio dažnis = 0,6621, $\chi^2 = 5,575$, $p = 0,0182$, ŠS = 2,821 su 95 proc. PI 1,153—6,901 ir kitų grupių: referentinio alelio dažnis = 0,1667, alternatyvaus alelio dažnis = 0, $\chi^2 = 4,831$,

$p = 0,02796$) – rs8188000 (NM_000689.4:c.*455A>G). VNV yra *ALDH1A1* gene, kuris koduoja aldehido dehidrogenazių šeimai priklausantį baltymą. Fermentas dalyvauja pagrindiniame alkoholio metabolizmo kelyje ir randamas ląstelės citozolyje. 2009 metais išleisto Richard Sherva ir kolegų publikuotame darbe atlikta regresinė analizė norint nustatyti asociaciją ir sąveiką tarp dviejų su alkoholio vartojimu susijusių fenotipų grupių ir 17 alkoholio metabolizme dalyvaujančių genų VNP tiriamojoje grupėje (N = 1588 Europos išeiviai į JAV). Tyrimo rs8188000 variantas statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp grupių (65).



11 pav. Alelių dažnių palyginimo tarp dažnai vartojančių ir retai vartojančių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenys, ordinačių ašyje nurodytos χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenys, kurių alelių dažnių palyginimo p reikšmė $> 0,5$, grafike neatvaizduojami.



12 pav. Alelių dažnių palyginimo tarp dažnai vartojančių ir kažkada vartojusių asmenų grupių pagal pasirinktus žymenis rezultatas. Abscisių ašyje nurodyti VNV žymenys, ordinačių ašyje

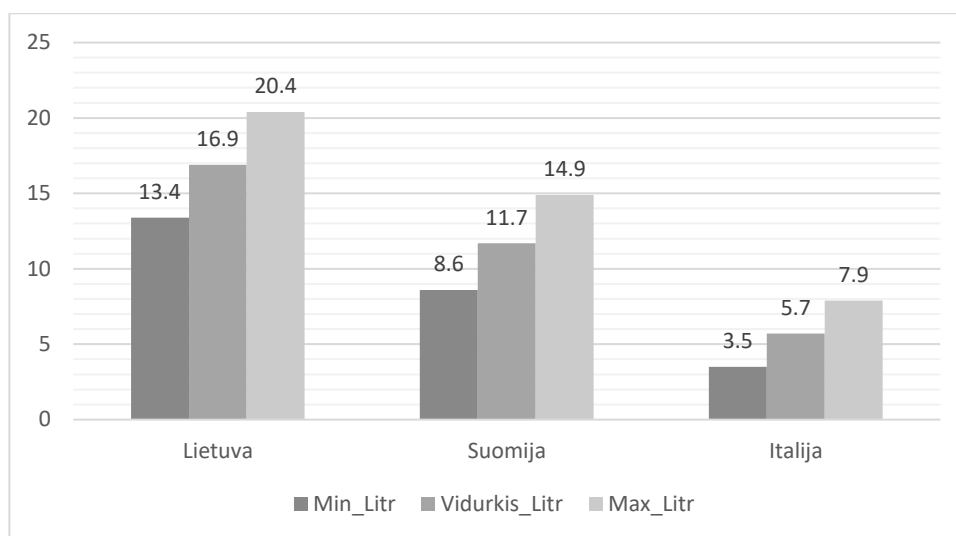
nurodytos χ^2 kriterijaus p reikšmės. Žymenys, kurių alelių dažnių palyginimo p reikšmė > 0,5, grafike neatvaizduojami.

4.1.9 Genotipų dažnių palyginimas tarp dažnai vartojančių alkoholi grupės ir retai vartojančių bei kažkada vartojusių alkoholi grupių

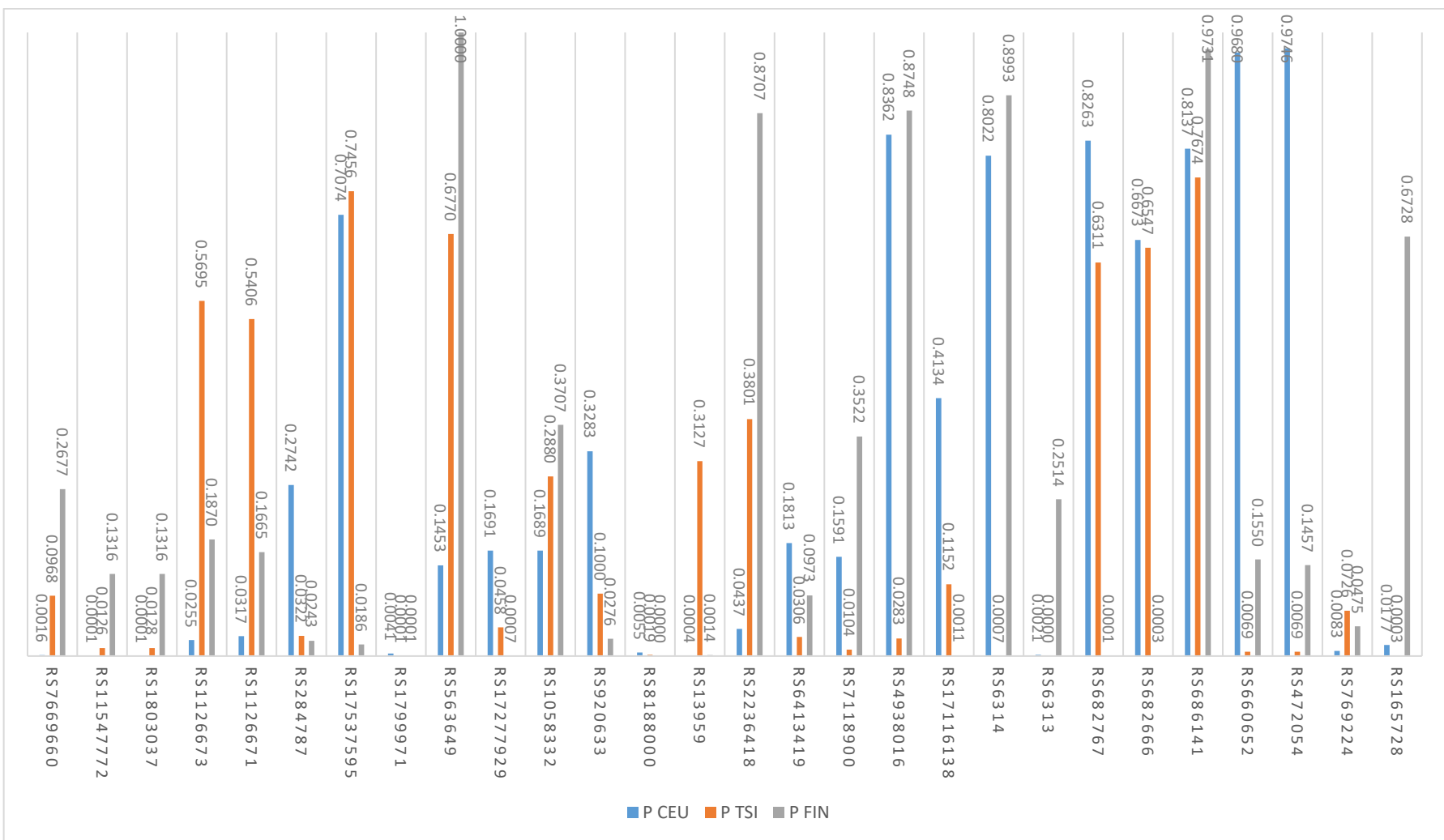
Atlikus genotipų dažnių analizę tarp grupių, gautas statistiškai reikšmingas skirtumas (rs8188000, atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 0/7/14, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas = 2/25/192, p= 0,0309 ir kitos imties: atvejo grupės genotipų pasiskirstymas = 0/7/14, kontrolinės grupės genotipų pasiskirstymas = 0/0/13, p = 0,0286) nesiskiria nuo alelių dažnių analizės rezultato.

4.1.10 Tarppopuliacinis palyginimas

Tarppopuliacinis genotipų dažnių palyginimas pagal pasirinktus kandidatinių genų VNV buvo atliktas tarp Lietuvos ir trijų pasirinktų populiacijų (14 pav.) – CEU (šiaurės ir vakarų Europos išeiviai gyvenantys Jutos valstijoje JAV), TSI (Italijos Toskanos regiono gyventojai), FIN (Suomijoje gyvenantys suomiai). Šios populiacijos pasirinktos dėl to, kad jų duomenys laisvai prieinami duomenų bazėse. CEU populiacija pasirinkta patikrinti skirtumus tarp Lietuvių populiacijos ir dažniausiai literatūroje analizuojamos Europiečių populiacijos. TSI ir FIN populiacijos pasirinktos dėl šių šalių alkoholio vartojimo statistikos (13 pav.), kuri buvo paskelbta Pasaulio Sveikatos Organizacijos (PSO) 2014 metų ataskaitoje (55). Pagal 2012 metų alkoholio vartojimo statistiką Lietuviai suvartojo beveik 1,5 karto daugiau alkoholio nei Suomiai ir 3 kartus daugiau nei Italijos gyventojai. 37 iš 62 VNV žymenų genotipų dažniai statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp populiacijų. VNV, kurių alelių dažnių pasiskirstymas statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp analizuotų Lietuvos populiacijos grupių, rs563649, rs1058332, rs686141, taip pat, statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp minėtų populiacijų. Likusių 25 VNV genotipų dažniai statistiškai reikšmingai skyrėsi bent su viena pasirinkta populiacija. VNV rs8188000 ir rs1799971 genotipų dažniai statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp visų pasirinktų populiacijų.



13 pav. 2014 metais išleistos PSO ataskaitos statistinė dalis atvaizduoja 2012 metais bendrai tarp lyčių suvartoto grynojo alkoholio kiekį litrais bei PI 95 proc..

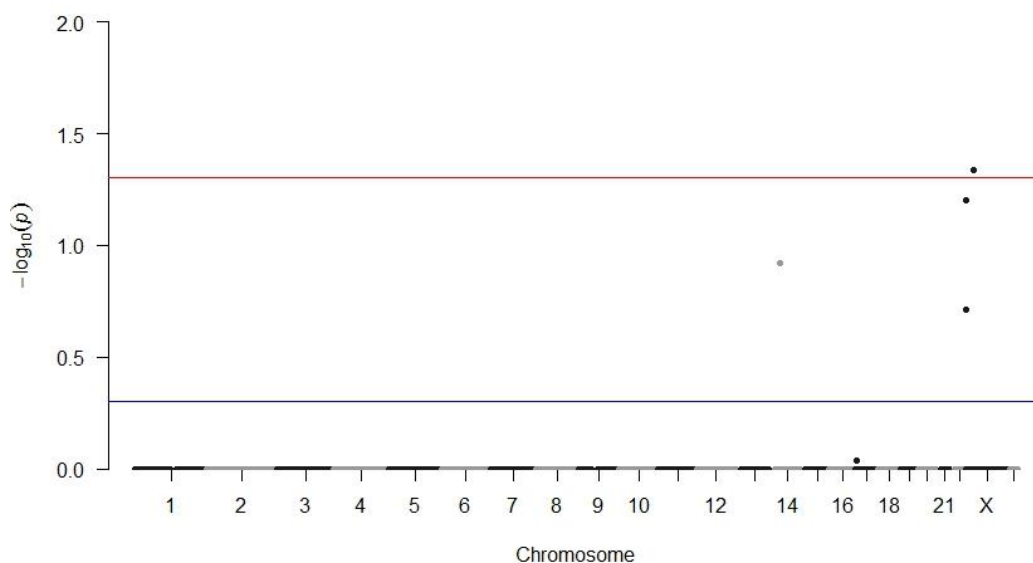


14 pav. Tarppopuliacinio genotipų dažnių palyginimo rezultatas. P CEU – Lietuvos bei CEU populiacijos statistinis palyginimas išreikštas χ^2 kriterijaus p reikšmė. P TSI – Lietuvos bei TSI populiacijos statistinis palyginimas išreikštas χ^2 kriterijaus p reikšmė. P FIN – Lietuvos bei FIN populiacijos statistinis palyginimas išreikštas χ^2 kriterijaus p reikšmė.

4.1.11 Viso genomo asociacijos tyrimas

Viso genomo asociacijos tyrimo (toliau trumpiniu VGAT) tarp save identifikavusių kaip vartojančių ir nevartojančių grupių (N = 294) genotipų dažnių palyginimo rezultatas pavaizduotas paveiksle (15 pav.). VGAT studijų metu analizuojamas žmogaus genomas pagal pasirinktus VNP žymenis. Tyrimo metu, be išankstinės hipotezės apie fenotipinį požymį sukeliančius faktorius, analizuojamos dvi grupės – pasirinktą fenotipą turinčių ir kontrolinė grupės. Analizės metu bandoma atrasti žymenis, kurie statistiškai reikšmingai dažniau nustatomi fenotipą turinčių grupėje. Taip dalis luste esančių VNP bus asocijuoti su fenotipu. Dėl plačių lusto galimybių padengti visą genomą, dažnai tokiais tyrimais tiriama daugiaveiksnių etiologijos sutrikimai, kurių genetiniai veiksniai – populiacijoje dažni genomo polimorfizmai (VNP, MAF > 5%).

Atlikus χ^2 p reikšmių Bonferroni korekciją nebuvo pastebėta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp dažnai vartojančių ir nevartojančių alkoholio grupių, pagal autosominėse chromosomose esančius VNP žymenis. X chromosomoje esantys skirtumai negali būti interpretuojami dėl naudojamos nehomogeniškos pagal lytį imties.



15 pav. Viso genomo asociacijos tyrimo rezultatas atvaizduotas Manhattan tipo grafiku. Viršutinė linija rodo $p < 0,05$, apatinė linija rodo rezultatus su riba $p = 0,5$.

4.2 Genominių ir aplinkos veiksnių duomenų analizė

4.2.1 Genominių veiksnių analizė

Antrosios tyrimo dalies metu pasirinktų VNV daromą įtaką alkoholio vartojimui, buvo atlikti: alelių bei genotipų dažnių palyginimas grupėse. Taip pat, gautiems duomenims buvo pritaikytas logistinės regresijos modelis. Pasirinktiems VNV žymenims atliktas Hardžio – Veinbergo dėsnio patikrinimas (11 lentelė). Populiacija, pagal VNV žymenis, nenukrypsta nuo Hardžio – Veinbergo dėsnio.

11 lentelė. Hardžio – Veinbergo dėsnio patikrinimo, pagal pasirinktus VNV, rezultatas. χ^2 – Pirsono χ^2 kriterijaus reikšmė. P reikšmė – Pirsono χ^2 kriterijaus p reikšmė.

VNV žymuo	Stebimas genotipų pasiskirstymas	Tikėtinas genotipų pasiskirstymas	χ^2	p reikšmė
rs2238151	62/63/18	61,13/64,73/17,13	0,102	0,749
rs1229984	0/5/139	0,04/4,91/139,04	0,045	0,832
rs698	44/67/33	41,71/71,58/30,71	0,590	0,443

4.2.1.1 Pasirinktų VNV alelių dažnių palyginimas

Atlikus alelių dažnių palyginimą tarp dažnai vartojančių bei nevartojančių alkoholio asmenų grupių, gautas rezultatas rodo, kad alelių dažniai grupėse nesiskiria. Rezultatai pateikti 12 lentelėje.

12 lentelė. Pasirinktų VNV alelių dažnių palyginimo tarp save identifikavusių kaip dažnai vartojančių alkoholi (N = 101) ir nevartojančių alkoholio (N = 43) grupių. Alelių dažniai išreikšti taip – Referentinio alelio dažnis grupėje/Alternatyvaus alelio dažnis grupėje. χ^2 – Pirsono χ^2 kriterijaus reikšmė. P reikšmė – Pirsono χ^2 kriterijaus p reikšmė.

VNV žymuo	Dažnai geriančių grupė	Negeriančių grupė	χ^2	p reikšmė
rs2238151	0,5714/0,4286	0,6881/0,3119	0,029	0,8643

12 lentelės tęsinys.

VNV žymuo	Dažnai geriančių grupė	Negeriančių grupė	χ^2	p reikšmė
rs1229984	0,0233/0,9767	0,0149/0,9851	0,002	0,9654
rs698	0,5116/0,4884	0,5495/0,4505	0,003	0,9572

4.2.1.2 Pasirinktų VNV genotipų dažnių palyginimas

Patikrinus genotipų dažnių pasiskirstymą grupėse, taip pat, negauta statistiškai reikšmingų rezultatų. Rezultatai pateikti 13 lentelėje.

13 lentelė. Pasirinktų VNV genotipų dažnių palyginimo tarp save identifikavusių kaip dažnai vartojančių alkoholi (N = 101) ir nevartojančių alkoholio (N = 43) grupių. Genotipų dažniai išreikšti taip – Homozigotinių genotipų pagal referentinę alelį skaičius grupėje/Heterozigotinių skaičius grupėje/Homozigotinių genotipų pagal alternatyvųjį.

VNV žymuo	Dažnai geriančių grupė	Negeriančių grupė	χ^2	p reikšmė
rs2238151	13/22/7	49/41/11	3,832	0,1472
rs1229984	0/2/41	0/3/98	–	0,635*
rs698	10/24/9	34/43/24	2,3109	0,3149

4.2.1.3 Pasirinktų VNV įtakos vertinimas logistinės regresijos modeliu

Vertinant tik genetinių veiksnių įtaką vartoti alkoholi panaudotas logistinės regresijos modelis. Modelyje naudotas VNV žymenų kodavimas pagal adityvųjį modelį, t.y. daroma prielaida, kad kiekvienas alternatyvaus alelio turėjimo faktas padidina daromą genetinę įtaką fenotipui.

Pritaikius prognostinį modelį (logistinės regresijos modelio parametrai: nulinis nuokrypis – 173,15 (142 laisvės laipsniai), paklaidų nuokrypis – 165,94 (137 laisvės laipsniai), Akaike informacinis kriterijus (AIK) – 177,94) gauti rezultatai (14 lentelė) rodo, kad visi parametrai nėra statistiškai reikšmingi modeliui. Tačiau rs698_ADD[T.1] ir rs2238151_ADD[T.1] parametrai artėja prie statistiškai reikšmingo lygmens (atitinkamai p reikšmė = 0,0937 ir 0,0615).

Nors alelių ir genotipų dažniai grupėse statistiškai reikšmingai nesiskiria, o genetinių veiksnių prognostinis modelis nepaaiškina gautų duomenų, tačiau negalime pilnai atmesti nulinės hipotezės ir pasirinktų VNV daromos įtakos.

14 lentelė. Genetinių veiksnių logistinės regresijos modelio rezultatas. P reikšmė –Valdo kriterijaus p reikšmė.

Parametrai	Parametro įvertis	ŠS	PI 95 proc.	P reikšmė
Konstanta	-0,8907	0,41	0,062–2,729	0,3568
rs698_ADD[T.1]	0,8106	2,249	0,871–5,803	0,0937
rs698_ADD[T.2]	0,4209	1,523	0,503–4,616	0,4569
rs1229984_ADD[T.2]	-1,0026	0,367	0,050–2,681	0,3231
rs2238151_ADD[T.1]	0,7813	2,184	0,963–4,953	0,0615
rs2238151_ADD[T.2]	0,8828	2,418	0,766–7,627	0,132

4.2.2 Aplinkos veiksnių analizė

4.2.2.1 Aplinkos veiksnių įtakos vertinimas logistinės regresijos modeliu

Aplinkos veiksnių įtakai įvertinti naudoti *LITGEN* projekto klausimyno fenotipiniai duomenys. Modeliui sudaryti pasirinkti trys parametrai: lytis (vyras, moteris), Išsilavinimas (pradinis, vidurinis, specialusis vidurinis ir aukštasis) bei rūkymas (nerūkiantys ir rūkantys retai/dažnai). Pritaikius prognostinį modelį (logistinės regresijos modelio parametrai: nulinis nuokrypis – 150,182 (127 laisvės laipsniai), paklaidų nuokrypis – 90,267 (122 laisvės laipsniai), AIK – 102,27) gauti rezultatai (15 lentelė) rodo, kad visi parametrai yra statistiškai reikšmingi (išskyrus parametro „išsilavinimas“ kintamuosius – pradinis ir specialusis vidurinis).

Logistinės regresijos modelyje, konstanta nurodo referentinės grupės (šiuo atveju nerūkančių moterų, turinčių aukštąjį išsilavinimą t.y. visi kiti parametrai lygūs 0) tikimybę būti priskirtai prie dažnai vartojančių alkoholi grupės.

Vertinant išsilavinimą, asmenys turintys vidurinį išsilavinimą, turi mažą tikimybę patekti į dažnai vartojančių alkoholi grupę. T.y. pasitelkus modelio rezultatus, galime teigti, kad asmenys turintys vidurinį išsilavinimą padidina savo galimybę vartoti alkoholi 0,14 karto. Tai iš dalies patvirtina Kanazawa S. ir Hellberg J. 2010 metais paskelbto tyrimo išvadas. Jie teigė, kad labiau išsilavinę asmenys dažniau linkę vartoti alkoholi, tabako gaminius, ar kitas narkotines medžiagas (37).

Literatūroje minima, kad moterys yra padidintos rizikos grupėje susirgti alkoholizmu nei vyrai. Moterys, palyginus su vyrais, pasiekia didesnę alkoholio koncentraciją kraujyje. Taip pat, jas labiau veikia alkoholio šalutinis poveikis nei tokį pat alkoholio kiekį išgėrusius vyrus. Tyrėjai

taip pat nurodo, kad moterų vidiniai organai dažniau bei sunkiau paveikiami alkoholio, be to, išgėrusios moterys turi padidėjusią traumų (automobilių avarijos bei smurtas) riziką. Tai siejama su abiejų lyčių skirtumais: metabolizmo, hormoninės veiklos, fiziologinių smegenų skirtumų, genetinių bei aplinkos poveikių skirtumų (34, 58). Tačiau pagal modelio rezultatus, vyriškos lyties atstovai padidina savo riziką vartoti alkoholį 12,28 karto.

Rūkymo sukelta priklausomybė tabako gaminiams, labai panaši į alkoholio priklausomybę. Manoma, kad šie procesai tarpusavyje susiję metaboliniais keliais bei tais pačiais genetiniais ir aplinkos veiksniais. Todėl rūkantis asmuo linkęs vartoti alkoholį ir atvirkščiai (6). Bridget F. Grant ir kolegės pastebėjo, kad priklausomybė nuo nikotino buvo labiausiai paplitusi tarp asmenų su alkoholio ar kitų narkotinių medžiagų priklausomybe (atitinkamai 34,5 proc. ir 52,4 proc.) (23). Pritaikius logistinės regresijos modelį, galime teigti, kad rūkantis asmenys turi 11,55 karto padidėjusią tikimybę vartoti alkoholį, negu nerūkantis.

15 lentelė. Aplinkos veiksnių logistinės regresijos modelio rezultatas. P reikšmė –Valdo kriterijaus p reikšmė.

Parametrai	Parametro įvertis	ŠS	PI 95 proc.	P reikšmė
Konstanta	-2,3891	0,092	0,028–0,301	8,26e-05
Išsilavinimas[Pradinis]	-0,3604	0,698	0,044–11,104	0,7986
Išsilavinimas[Specialusis]	-0,4574	0,633	0,175–2,287	0,4852
Išsilavinimas[Vidurinis]	-2,0343	0,131	0,022–0,783	0,0259
Lytis[Vyras]	2,5079	3,671	3,840–39,273	2,36e-05
Rūkymas[Taip]	2,4465	3,668	3,405–39,162	8,62e-05

4.2.2.2 Aplinkos veiksnių logistinės regresijos modelio tinkamumo įvertinimas

Aplinkos veiksnių logistinės regresijos modelio įvertinimui naudotos Bewick V. ir kolegų pasiūlytos rekomendacijos (2). Jos vertina modelio tinkamumą matuojant jautrumą ir specifiškumą, pagal sudarytą klaidingai/tikrai teigiamų/neigiamų rezultatų lentelę (16 lentelė).

Sudaryto modelio pagalba, 85 atvejai (91,5 proc.), arba alkoholio nevartojantys asmenys buvo priskirti alkoholio nevartojančių grupei, buvo klasifikuoti teisingai, o 8 atvejai (8,6 proc.) neteisingai. Tuo tarpu, 22 atvejai (62,9 proc.), arba alkoholį vartojantys asmenys buvo priskirti alkoholio vartojančių grupei, buvo suklasifikuoti teisingai, o 13 atvejų (37,1 proc.), buvo

klaidingai neigiami. Todėl vidutinis modelio klasifikuojamumas yra 77,2 proc.. Todėl modelio jautrumas yra 62,9 proc., o specifiškumas 91,4 proc..

16 lentelė. Aplinkos veiksnių logistinės regresijos modelio tinkamumo įvertinimas. Lentelėje nurodyti skaitmenys reprezentuoja anketos duomenų bei modelio pateiktos prognozės palyginimą. Skliausteliuose nurodytos procentinė palyginimo išraiška.

	Modelio prognozė	
Alkoholio vartojimas	Ne	Taip
Ne	85 (91,4 proc.)	8 (8,6 proc.)
Taip	13 (37,1 proc.)	22 (62,9 proc.)

4.3 Gautų rezultatų verifikacija

Gautų duomenų verifikacija turėtų būti atlikta didesnėje tiriamųjų imtyje bei naudojant detalesnį klausimyną. Jis padėtų specifiškiau ir detaliau apibrėžti tiriamąją grupę ir išskirstyti tiriamuosius į grupes. Literatūroje, pasirinktų VNV žymenų daromai įtakai įvertinti, naudojamos imtys siekia ne vieną tūkstantį tiriamųjų, tam, kad būtų užtikrinta statistinė galia ir sumažinta klaidos tikimybė (46, 7).

5 IŠVADOS

1. Išnagrinėjus duomenų bazėse publikuojamą literatūrą, pasirinktos 23 genų sritys siejamos su AVS. Pasirinktose genų srityse esantys genai ir atrinkti 98 VNV juose yra svarbūs alkoholio metabolizmo procesams, neuromediatorių receptorių veiklai ir signaliniuose keliuose dalyvaujančių baltymų sintezei.
2. Atlikus viso genomo asociacijos tyrimą, Lietuvos populiacijoje nenustatyta su alkoholio vartojimu asocijuotų genominių žymenų.
3. Atlikus pasirinktų VNV alelių dažnių palyginimą nustatyta, kad:
 - a. rs686141 G, rs1058332 A, rs563649 T aleliai yra statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) dažnesni vartojančių alkoholį, dažnai vartojančių alkoholį ir kažkada vartojusių alkoholį grupėse, palyginus su nevartojančių alkoholio grupe.

- b. rs8188000 alelis A yra statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) retesnis retai vartojančių alkoholi ir kažkada vartojusių alkoholi grupėse, palyginus su dažnai vartojančių alkoholi grupe;
4. Atlikus genotipų dažnių palyginimą pastebėta, kad:
 - a. rs6354 C/C, rs1058332 A/A, rs4938016 G/G genotipai yra statistiškai reikšmingai dažnesni vartojančių alkoholi, dažnai vartojančių alkoholi, kažkada vartojusių alkoholi grupėse, palyginus su nevartojančių alkoholio grupe;
 - b. rs8188000 A/G genotipas statistiškai reikšmingai rečiau ($p < 0,05$) stebimas retai vartojančių alkoholi ir kažkada vartojusių alkoholi grupėje, palyginus su dažnai vartojančių alkoholi grupe
5. Palyginus Lietuvos populiaciją su kitomis Europinės kilmės populiacijomis nustatyta, kad Lietuvos populiacija pagal 65 su alkoholio vartojimu siejamus VNV daugiausia skiriasi nuo TSI populiacijos, o mažiausiai skiriasi nuo FIN populiacijos. Taip pat, Lietuvių populiacijoje rs8188000 A/G ir rs1799971 A/C genotipai dažnesni, palyginus su visomis lygintomis populiacijomis.

6 SANTRAUKA

Alkoholio vartojimo sutrikimai (AVS) – labai opi šiuolaikinė problema, kurios mastai milžiniški ir jaučiami visame pasaulyje. Lietuva – pirmaujanti šalis pasaulyje, pagal suvartotą grynąjį alkoholio kiekį. Dėl alkoholio sukeltų tiesioginių ir netiesioginių padarinių kenčia, ne tik, asmens fizinė, psichologinė bei socialinė sveikata. Tačiau alkoholio pasekmės – globalesnės, kenčia šalies ekonomika, demografija, didėja tiesioginio alkoholio padarinių – smurtinių mirčių, savižudybių, auto katastrofų skaičius. Todėl labai svarbu išsiaiškinti AVS priežastis. Šio darbo tikslas – atrasti naujus genetinius žymenis bei patikrinti jau žinomų žymenų asociaciją susijusia su alkoholio vartojimo dinamika Lietuvos populiacijoje. Tikslui pasiekti naudoti molekulinės genetikos tyrimo metodai – *VNP-LGH* ir *Sanger* sekoskaitos metodai. Tiriamųjų imtis sudaryta iš 300 pilnamečių asmenų dalyvavusių „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ (LITGEN) projekte ir atsakiusių į projekto klausimyno – „Gyventojų mitybos ir fizinio aktyvumo apklausos anketa“ klausimą: „Ar vartojate alkoholinius gėrimus?“. Gautų duomenų bioinformacinė ir statistinė analizė parodė, kad egzistuoja ne tik vidupopuliaciniai skirtumai tarp atvejo ir kontrolės grupių, tačiau egzistuoja ir

tarppopuliaciniai skirtumai (rs8188000 ir rs1799971), kurie galimai daro įtaką alkoholio vartojimo dinamikai. Įvertinus *Sanger* sekoskaitos metu gautus duomenis (atvejo grupė N = 43, kontrolinė grupė N = 101) nepavyko rasti genetinio priežastingumo, tačiau atmesti genetinių veiksnių (rs1229984, rs698, rs2238151) daromą įtaką būtų neteisinga. Logistinės regresijos modeliu atlikta aplinkos veiksnių analizė parodė, kad vartoti dažniau alkoholį turi tikimybę vyriškos lyties atstovai (ŠS = 3,671 (PI 95 proc. 3,840–39,273), p = 2,36e-05) bei rūkantys asmenys (ŠS = 3,668 (PI 95 proc. 3,405–39,162), p = 8,62e-05). Pastebėta, kad vidurinį išsilavinimą turintys asmenys turi mažesnę tikimybę pakliūti į dažnai geriančių grupę (ŠS = 0,131 (PI 95 proc. 0,022–0,783) p = 0,0259). Tyrimo rezultatus reikėtų patikrinti didesnėje imtyje bei naudojant detalesnį klausimyną, kuris leistų specifiškiau parinkti atvejo bei kontrolines grupes.

7 SUMMARY

Alcohol use disorders (AUD) – a tremendous issue in modern society, which affects nearly all the countries in the modern world. Lithuania – a leading country, according to pure alcohol consumption, in the world. An abusive alcohol use directly and indirectly affects persons' physical, psychological and social health. It even reaches a global scale – where its' effects are seen in country's economy, demography, or crime statistics. Therefore, it is important to research the primary cause of AUD. The aim of the thesis – to find new and check known genetic factors which are associated with alcohol use dynamics in Lithuanian population. To archive the goal, molecular genetic methods were used, such as, *SNP–CGH* or *Sanger* sequencing.

Sample consisted of 300 adult Lithuanians, who participated in “Lithuanian population genetic diversity and structure changes, related to the evolution of the most prevalent diseases” (*LITGEN*) project and answered to questionnaire's question – “Do you drink alcoholic beverages?”. *SNP–CGH* generated data analysis showed interpopulational and intrapopulational differences (rs8188000 and rs1799971), between case and control groups, which can affect the dynamics of alcohol use. *Sanger* sequencing generated data (N = 144) analysis failed to show any association with alcohol use dynamics and used genetic markers (rs1229984, rs698, rs2238151), but it would be wrong to reject their effect. To further analyze the effects of environmental factors logistic regression models were used. Fitted model showed that males (OR = 3.671 (CI 95% 3.840–39.273), p = 2,36-05) and smokers (OR = 3,668 (CI 95% 3.405–39.162), p = 8,62-05) are more likely to frequently use alcoholic beverages. Furthermore, it was observed, that people with secondary education has lower probability to frequently use alcohol beverages (OR = 0.131 (CI 95% 0.022–0.783), p = 0.0259).

All the obtained results should be replicated in the study with larger sample size and more detailed questionnaire, which would help to determine more specific case and control groups.

8 LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. AYHAN, Y.;GUREL, S. C.;KARACA, O.;ZOTO, T.;HAYRAN, M.;BABAOGU, M.;YASAR, U.;BOZKURT, A.;DILBAZ, N.;ULUG, B. D. ir DEMIR, B.Association between Adh1c and Aldh2 Polymorphisms and Alcoholism in a Turkish Sample. *Nord J Psychiatry*, 2015, 69, 233-9.

2. BEWICK, V.;CHEEK, L. ir BALL, J.Statistics Review 13: Receiver Operating Characteristic Curves. *Crit Care*, 2004, 8, 508-12.

3. BIERUT, L. J.;GOATE, A. M.;BRESLAU, N.;JOHNSON, E. O.;BERTELSEN, S.;FOX, L.;AGRAWAL, A.;BUCHOLZ, K. K.;GRUCZA, R.;HESSELBROCK, V.;KRAMER, J.;KUPERMAN, S.;NURNBERGER, J.;PORJESZ, B.;SACCONI, N. L.;SCHUCKIT, M.;TISCHFIELD, J.;WANG, J. C.;FOROUD, T.;RICE, J. P. ir EDENBERG, H. J.Adh1b Is Associated with Alcohol Dependence and Alcohol Consumption in Populations of European and African Ancestry. *Mol Psychiatry*, 2012, 17, 445-50.

4. BIRLEY, A. J.;JAMES, M. R.;DICKSON, P. A.;MONTGOMERY, G. W.;HEATH, A. C.;MARTIN, N. G. ir WHITFIELD, J. B.Adh Single Nucleotide Polymorphism Associations with Alcohol Metabolism in Vivo. *Hum Mol Genet*, 2009, 18, 1533-42.

5. BLUM, K.;NOBLE, E. P.;SHERIDAN, P. J.;MONTGOMERY, A.;RITCHIE, T.;JAGADEESWARAN, P.;NOGAMI, H.;BRIGGS, A. H. ir COHN, J. B.Allelic Association of Human Dopamine D2 Receptor Gene in Alcoholism. *JAMA*, 1990, 263, 2055-60.

6. BOBO, J. K. ir HUSTEN, C.Sociocultural Influences on Smoking and Drinking. *Alcohol Res Health*, 2000, 24, 225-32.

7. BUCKLAND, P. R.Genetic Association Studies of Alcoholism--Problems with the Candidate Gene Approach. *Alcohol Alcohol*, 2001, 36, 99-103.

8. BURNS, L. ir TEESSON, M.Alcohol Use Disorders Comorbid with Anxiety, Depression and Drug Use Disorders. Findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well Being. *Drug Alcohol Depend*, 2002, 68, 299-307.

9. CHIANG, C. P.;LAI, C. L.;LEE, S. P.;HSU, W. L.;CHI, Y. C.;GAO, H. W.;YAO, C. T.;CHAU, G. Y. ir YIN, S. J.Ethanol-Metabolizing Activities and Isozyme Protein Contents of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases in Human Liver: Phenotypic Traits of the Adh1b*2 and Aldh2*2 Variant Gene Alleles. *Pharmacogenet Genomics*, 2016.
10. CHIDGEAVADZE, Z. G.;BEABEALASHVILLI, R. S.;ATRAZHEV, A. M.;KUKHANOVA, M. K.;AZHAYEV, A. V. ir KRAYEVSKY, A. A.2',3'-Dideoxy-3' Aminonucleoside 5'-Triphosphates Are the Terminators of DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12, 1671-86.
11. COVAULT, J.;GELERNTER, J.;HESSELBROCK, V.;NELLISSERY, M. ir KRANZLER, H. R.Allelic and Haplotypic Association of Gabra2 with Alcohol Dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 129B, 104-9.
12. DICKSON, P. A.;JAMES, M. R.;HEATH, A. C.;MONTGOMERY, G. W.;MARTIN, N. G.;WHITFIELD, J. B. ir BIRLEY, A. J.Effects of Variation at the Aldh2 Locus on Alcohol Metabolism, Sensitivity, Consumption, and Dependence in Europeans. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2006, 30, 1093-1100.
13. DUCCI, F.;ENOCH, M. A.;YUAN, Q.;SHEN, P. H.;WHITE, K. V.;HODGKINSON, C.;ALBAUGH, B.;VIRKKUNEN, M. ir GOLDMAN, D.Htr3b Is Associated with Alcoholism with Antisocial Behavior and Alpha Eeg Power--an Intermediate Phenotype for Alcoholism and Co-Morbid Behaviors. *Alcohol*, 2009, 43, 73-84.
14. EDENBERG, H. J.The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Res Health*, 2007, 30, 5-13.
15. EDENBERG, H. J.;DICK, D. M.;XUEI, X.;TIAN, H.;ALMASY, L.;BAUER, L. O.;CROWE, R. R.;GOATE, A.;HESSELBROCK, V.;JONES, K.;KWON, J.;LI, T. K.;NURNBERGER, J. I., Jr.;O'CONNOR, S. J.;REICH, T.;RICE, J.;SCHUCKIT, M. A.;PORJESZ, B.;FOROUD, T. ir BEGLEITER, H.Variations in Gabra2, Encoding the Alpha 2 Subunit of the Gaba(a) Receptor, Are Associated with Alcohol Dependence and with Brain Oscillations. *Am J Hum Genet*, 2004, 74, 705-14.
16. EDENBERG, H. J.;STROTHER, W. N.;MCCLINTICK, J. N.;TIAN, H.;STEPHENS, M.;JEROME, R. E.;LUMENG, L.;LI, T. K. ir MCBRIDE, W. J.Gene

Expression in the Hippocampus of Inbred Alcohol-Preferring and -Nonpreferring Rats. *Genes Brain Behav*, 2005, 4, 20-30.

17. EDENBERG, H. J.;XUEI, X.;CHEN, H. J.;TIAN, H.;WETHERILL, L. F.;DICK, D. M.;ALMASY, L.;BIERUT, L.;BUCHOLZ, K. K.;GOATE, A.;HESSELBROCK, V.;KUPERMAN, S.;NURNBERGER, J.;PORJESZ, B.;RICE, J.;SCHUCKIT, M.;TISCHFIELD, J.;BEGLEITER, H. ir FOROUD, T.Association of Alcohol Dehydrogenase Genes with Alcohol Dependence: A Comprehensive Analysis. *Hum Mol Genet*, 2006, 15, 1539-49.

18. ENOCH, M. A.;GORODETSKY, E.;HODGKINSON, C.;ROY, A. ir GOLDMAN, D.Functional Genetic Variants That Increase Synaptic Serotonin and 5-Ht3 Receptor Sensitivity Predict Alcohol and Drug Dependence. *Mol Psychiatry*, 2011, 16, 1139-46.

19. FAN, J. B.;CHEE, M. S. ir GUNDERSON, K. L.Highly Parallel Genomic Assays. *Nat Rev Genet*, 2006, 7, 632-44.

20. GARDNER, M. ir STEINBERG, L.Peer Influence on Risk Taking, Risk Preference, and Risky Decision Making in Adolescence and Adulthood: An Experimental Study. *Dev Psychol*, 2005, 41, 625-35.

21. GEMMA, S.;VICHI, S. ir TESTAI, E.Individual Susceptibility and Alcohol Effects:Biochemical and Genetic Aspects. *Ann Ist Super Sanita*, 2006, 42, 8-16.

22. GOLDMAN, D.;OROSZI, G. ir DUCCI, F.The Genetics of Addictions: Uncovering the Genes. *Nat Rev Genet*, 2005, 6, 521-32.

23. GRANT, B. F.;HASIN, D. S.;CHOU, S. P.;STINSON, F. S. ir DAWSON, D. A.Nicotine Dependence and Psychiatric Disorders in the United States: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*, 2004, 61, 1107-15.

24. GUO, Y.;HE, J.;ZHAO, S.;WU, H.;ZHONG, X.;SHENG, Q.;SAMUELS, D. C.;SHYR, Y. ir LONG, J.Illumina Human Exome Genotyping Array Clustering and Quality Control. *Nat Protoc*, 2014, 9, 2643-62.

25. GUYER, A. E.;CHOATE, V. R.;PINE, D. S. ir NELSON, E. E.Neural Circuitry Underlying Affective Response to Peer Feedback in Adolescence. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 2012, 7, 81-92.

26. HAKENEWERTH, A. M.;MILLIKAN, R. C.;RUSYN, I.;HERRING, A. H.;NORTH, K. E.;BARNHOLTZ-SLOAN, J. S.;FUNKHOUSER, W. F.;WEISSLER, M. C. ir OLSHAN, A. F. Joint Effects of Alcohol Consumption and Polymorphisms in Alcohol and Oxidative Stress Metabolism Genes on Risk of Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20, 2438-49.
27. HALLER, G.;KAPOOR, M.;BUDDE, J.;XUEI, X.;EDENBERG, H.;NURNBERGER, J.;KRAMER, J.;BROOKS, A.;TISCHFIELD, J.;ALMASY, L.;AGRAWAL, A.;BUCHOLZ, K.;RICE, J.;SACCONI, N.;BIERUT, L. ir GOATE, A. Rare Missense Variants in Chrnb3 and Chrna3 Are Associated with Risk of Alcohol and Cocaine Dependence. *Hum Mol Genet*, 2014, 23, 810-9.
28. HAMBY-MASON, R.;CHEN, J. J.;SCHENKER, S.;PEREZ, A. ir HENDERSON, G. I. Catalase Mediates Acetaldehyde Formation from Ethanol in Fetal and Neonatal Rat Brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 1997, 21, 1063-72.
29. HASSAN, S.;DUONG, B.;KIM, K. S. ir MILES, M. F. Pharmacogenomic Analysis of Mechanisms Mediating Ethanol Regulation of Dopamine Beta-Hydroxylase. *J Biol Chem*, 2003, 278, 38860-9.
30. HEILIG, M.;GOLDMAN, D.;BERRETTINI, W. ir O'BRIEN, C. P. Pharmacogenetic Approaches to the Treatment of Alcohol Addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12, 670-84.
31. HENRIKSSON, M. M.;ARO, H. M.;MARTTUNEN, M. J.;HEIKKINEN, M. E.;ISOMETSA, E. T.;KUOPPASALMI, K. I. ir LONNQVIST, J. K. Mental Disorders and Comorbidity in Suicide. *Am J Psychiatry*, 1993, 150, 935-40.
32. HIPOLITO, L.;SANCHEZ, M. J.;POLACHE, A. ir GRANERO, L. Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update. *Curr Drug Metab*, 2007, 8, 716-27.
33. HODGE, C. W.;SLAWECKI, C. J. ir AIKEN, A. S. Norepinephrine and Serotonin Receptors in the Paraventricular Nucleus Interactively Modulate Ethanol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996, 20, 1669-74.
34. HOWELL, K. K. 1999. *Are Women More Vulnerable to Alcohol's Effects?* [Online]. Alcohol Alert: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Available: <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa46.htm> [Accessed 2017-04-20].
35. HURLEY, T. D. ir EDENBERG, H. J. Genes Encoding Enzymes Involved in Ethanol Metabolism. *Alcohol Res*, 2012, 34, 339-44.

36. ILLUMINA. 2008. *Illumina Gencall Data Analysis Software* [Online]. Available: https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_gencall_data_analysis_software.pdf [Accessed].
37. KANAZAWA SATOSHI, H., Josephine E. E. U. Intelligence and Substance Use. *Review of General Psychology*, 2010, 14, 382-396.
38. KRZYWKOWSKI, K.; DAVIES, P. A.; FEINBERG-ZADEK, P. L.; BRAUNER-OSBORNE, H. ir JENSEN, A. A. High-Frequency Htr3b Variant Associated with Major Depression Dramatically Augments the Signaling of the Human 5-Ht3ab Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 722-7.
39. LEVRAN, O.; YUFEROV, V. ir KREEK, M. J. The Genetics of the Opioid System and Specific Drug Addictions. *Hum Genet*, 2012, 131, 823-42.
40. LI, D.; SULOVARI, A.; CHENG, C.; ZHAO, H.; KRANZLER, H. R. ir GELERNTER, J. Association of Gamma-Aminobutyric Acid a Receptor Alpha2 Gene (Gabra2) with Alcohol Use Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39, 907-18.
41. LI, D.; ZHAO, H. ir GELERNTER, J. Further Clarification of the Contribution of the Adh1c Gene to Vulnerability of Alcoholism and Selected Liver Diseases. *Hum Genet*, 2012, 131, 1361-74.
42. LI, T. K. Pharmacogenetics of Responses to Alcohol and Genes That Influence Alcohol Drinking. *J Stud Alcohol*, 2000, 61, 5-12.
43. LU, B.; SU, Y.; DAS, S.; LIU, J.; XIA, J. ir REN, D. The Neuronal Channel Nalcn Contributes Resting Sodium Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm. *Cell*, 2007, 129, 371-83.
44. LUCZAK, S. E.; GLATT, S. J. ir WALL, T. L. Meta-Analyses of Aldh2 and Adh1b with Alcohol Dependence in Asians. *Psychol Bull*, 2006, 132, 607-21.
45. LUDVIG, N.; GEORGE, M. A.; TANG, H. M.; GONZALES, R. A. ir BUNGAY, P. M. Evidence for the Ability of Hippocampal Neurons to Develop Acute Tolerance to Ethanol in Behaving Rats. *Brain Res*, 2001, 900, 252-60.
46. MACGREGOR, S.; LIND, P. A.; BUCHOLZ, K. K.; HANSELL, N. K.; MADDEN, P. A.; RICHTER, M. M.; MONTGOMERY, G. W.; MARTIN, N. G.; HEATH, A. C. ir WHITFIELD, J. B. Associations of Adh and Aldh2 Gene Variation

with Self Report Alcohol Reactions, Consumption and Dependence: An Integrated Analysis. *Hum Mol Genet*, 2009, 18, 580-93.

47. MANZO-AVALOS, S. ir SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7, 4281-304.

48. MAYFIELD, R. D.; HARRIS, R. A. ir SCHUCKIT, M. A. Genetic Factors Influencing Alcohol Dependence. *Br J Pharmacol*, 2008, 154, 275-87.

49. MEYERS, J. L.; SHMULEWITZ, D.; AHARONOVICH, E.; WAXMAN, R.; FRISCH, A.; WEIZMAN, A.; SPIVAK, B.; EDENBERG, H. J.; GELERNTER, J. ir HASIN, D. S. Alcohol-Metabolizing Genes and Alcohol Phenotypes in an Israeli Household Sample. *Alcohol Clin Exp Res*, 2013, 37, 1872-81.

50. MOROZOVA, T. V.; MACKAY, T. F. ir ANHOLT, R. R. Genetics and Genomics of Alcohol Sensitivity. *Mol Genet Genomics*, 2014, 289, 253-69.

51. MUKHERJEE, S. Alcoholism and Its Effects on the Central Nervous System. *Curr Neurovasc Res*, 2013, 10, 256-62.

52. MURPHY, G. E.; WETZEL, R. D.; ROBINS, E. ir MCEVOY, L. Multiple Risk Factors Predict Suicide in Alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*, 1992, 49, 459-63.

53. NIEMELA, O. Biomarker-Based Approaches for Assessing Alcohol Use Disorders. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13, 166.

54. PAMELA BREMNER, J. B., Fay Nunney, Mohammed Ravat, Dr Willm Mistral June 2011. *Young People, Alcohol and Influences* [Online]. Available: <https://www.jrf.org.uk/sites/default/files/jrf/migrated/files/young-people-alcohol-full.pdf> [Accessed].

55. PASAULIO SVEIKATOS ORGANIZACIJA 2014. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014.

56. PLEMENITAS, A.; KASTELIC, M.; PORCELLI, S.; SERRETTI, A.; RUS MAKOVEC, M.; KORES PLESNICAR, B. ir DOLZAN, V. Genetic Variability in Cyp2e1 and Catalase Gene among Currently and Formerly Alcohol-Dependent Male Subjects. *Alcohol Alcohol*, 2015, 50, 140-5.

57. PORJESZ, B.; RANGASWAMY, M.; KAMARAJAN, C.; JONES, K. A.; PADMANABHAPILLAI, A. ir BEGLEITER, H. The Utility of Neurophysiological Markers in the Study of Alcoholism. *Clin Neurophysiol*, 2005, 116, 993-1018.

58. PRESCOTT, C. A. Sex Differences in the Genetic Risk for Alcoholism. *Alcohol Res Health*, 2002, 26, 264-73.
59. REGIER, D. A.; FARMER, M. E.; RAE, D. S.; LOCKE, B. Z.; KEITH, S. J.; JUDD, L. L. ir GOODWIN, F. K. Comorbidity of Mental Disorders with Alcohol and Other Drug Abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (Eca) Study. *JAMA*, 1990, 264, 2511-8.
60. REICH, T.; EDENBERG, H. J.; GOATE, A.; WILLIAMS, J. T.; RICE, J. P.; VAN EERDEWEGH, P.; FOROUD, T.; HESSELBROCK, V.; SCHUCKIT, M. A.; BUCHOLZ, K.; PORJESZ, B.; LI, T. K.; CONNEALLY, P. M.; NURNBERGER, J. I., Jr.; TISCHFIELD, J. A.; CROWE, R. R.; CLONINGER, C. R.; WU, W.; SHEARS, S.; CARR, K.; CROSE, C.; WILLIG, C. ir BEGLEITER, H. Genome-Wide Search for Genes Affecting the Risk for Alcohol Dependence. *Am J Med Genet*, 1998, 81, 207-15.
61. SANGER, F.; NICKLEN, S. ir COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74, 5463-7.
62. SCHUCKIT, M. A. Alcohol-Use Disorders. *Lancet*, 2009, 373, 492-501.
63. SENG, K. Y.; LIMENTA, L. M.; HENG, D. ir LEE, E. J. Population Pharmacokinetics and Pharmacogenetics of Alcohol in Chinese and Indians in Singapore. *J Clin Pharm Ther*, 2013, 38, 141-9.
64. SHEN, R.; FAN, J. B.; CAMPBELL, D.; CHANG, W.; CHEN, J.; DOUCET, D.; YEAKLEY, J.; BIBIKOVA, M.; WICKHAM GARCIA, E.; MCBRIDE, C.; STEEMERS, F.; GARCIA, F.; KERMANI, B. G.; GUNDERSON, K. ir OLIPHANT, A. High-Throughput Snp Genotyping on Universal Bead Arrays. *Mutat Res*, 2005, 573, 70-82.
65. SHERVA, R.; RICE, J. P.; NEUMAN, R. J.; ROCHBERG, N.; SACCONI, N. L. ir BIERUT, L. J. Associations and Interactions between Snps in the Alcohol Metabolizing Genes and Alcoholism Phenotypes in European Americans. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009, 33, 848-57.
66. SOKOLOV, B. P.; JIANG, L.; TRIVEDI, N. S. ir ASTON, C. Transcription Profiling Reveals Mitochondrial, Ubiquitin and Signaling Systems Abnormalities in Postmortem Brains from Subjects with a History of Alcohol Abuse or Dependence. *J Neurosci Res*, 2003, 72, 756-67.

67. SYVANEN, A. C. Accessing Genetic Variation: Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Nat Rev Genet*, 2001, 2, 930-42.
68. TABAKOFF, B. ir HOFFMAN, P. L. The Neurobiology of Alcohol Consumption and Alcoholism: An Integrative History. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 113, 20-37.
69. TAYLOR, A. ir WANG, K. S. Association between Dpysl2 Gene Polymorphisms and Alcohol Dependence in Caucasian Samples. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121, 105-11.
70. THIBAUT, C.; LAI, C.; WILKE, N.; DUONG, B.; OLIVE, M. F.; RAHMAN, S.; DONG, H.; HODGE, C. W.; LOCKHART, D. J. ir MILES, M. F. Expression Profiling of Neural Cells Reveals Specific Patterns of Ethanol-Responsive Gene Expression. *Mol Pharmacol*, 2000, 58, 1593-600.
71. TURNER, S.; ARMSTRONG, L. L.; BRADFORD, Y.; CARLSON, C. S.; CRAWFORD, D. C.; CRENSHAW, A. T.; DE ANDRADE, M.; DOHENY, K. F.; HAINES, J. L.; HAYES, G.; JARVIK, G.; JIANG, L.; KULLO, I. J.; LI, R.; LING, H.; MANOLIO, T. A.; MATSUMOTO, M.; MCCARTY, C. A.; MCDAVID, A. N.; MIREL, D. B.; PASCHALL, J. E.; PUGH, E. W.; RASMUSSEN, L. V.; WILKE, R. A.; ZUVICH, R. L. ir RITCHIE, M. D. Quality Control Procedures for Genome-Wide Association Studies. *Curr Protoc Hum Genet*, 2011, Chapter 1, Unit 19.
72. VOISEY, J.; SWAGELL, C. D.; HUGHES, I. P.; LAW FORD, B. R.; YOUNG, R. M. ir MORRIS, C. P. A Novel Snp in Comt Is Associated with Alcohol Dependence but Not Opiate or Nicotine Dependence: A Case Control Study. *Behav Brain Funct*, 2011, 7, 51.
73. WALL, T. L. Genetic Associations of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase with Alcohol Dependence and Their Mechanisms of Action. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2005, 27, 700-703.
74. WALL, T. L.; LUCZAK, S. E. ir HILLER-STURMHOFEL, S. Biology, Genetics, and Environment: Underlying Factors Influencing Alcohol Metabolism. *Alcohol Res*, 2016, 38, 59-68.
75. WEINSHENKER, D.; RUST, N. C.; MILLER, N. S. ir PALMITER, R. D. Ethanol-Associated Behaviors of Mice Lacking Norepinephrine. *J Neurosci*, 2000, 20, 3157-64.

76. WICHERS, M.;GILLESPIE, N. A. ir KENDLER, K. S.Genetic and Environmental Predictors of Latent Trajectories of Alcohol Use from Adolescence to Adulthood: A Male Twin Study. *Alcohol Clin Exp Res*, 2013, 37, 498-506.
77. WORST, T. J.;TAN, J. C.;ROBERTSON, D. J.;FREEMAN, W. M.;HYYTIA, P.;KIIANMAA, K. ir VRANA, K. E.Transcriptome Analysis of Frontal Cortex in Alcohol-Preferring and Nonpreferring Rats. *J Neurosci Res*, 2005, 80, 529-38.
78. WU, L. S.;LEE, C. S.;WENG, T. Y.;WANG, K. H. ir CHENG, A. T.Association Study of Gene Polymorphisms in Gaba, Serotonin, Dopamine, and Alcohol Metabolism Pathways with Alcohol Dependence in Taiwanese Han Men. *Alcohol Clin Exp Res*, 2016, 40, 284-90.
79. YANG, B. Z.;KRANZLER, H. R.;ZHAO, H.;GRUEN, J. R.;LUO, X. ir GELERNTER, J.Haplotypic Variants in *Drd2*, *Ankk1*, *Ttc12*, and *Ncam1* Are Associated with Comorbid Alcohol and Drug Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008, 32, 2117-27.
80. YOSHIMOTO, K.;MCBRIDE, W. J.;LUMENG, L. ir LI, T. K.Alcohol Stimulates the Release of Dopamine and Serotonin in the Nucleus Accumbens. *Alcohol*, 1992, 9, 17-22.
81. YU, C. M., Jon.Genetics of Substance Use Disorders. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 2016, S1056499316300220--.
82. ZIMATKIN, S. M.;PRONKO, S. P.;VASILIOU, V.;GONZALEZ, F. J. ir DEITRICH, R. A.Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, 30, 1500-5.

9 PRIEDAI

Priedas Nr. 1. VNV žymenys naudoti alelių ir genotipų dažnių palyginime tarp grupių

Chromosoma	VNV
4	rs7669660
4	rs11547772
4	rs6827292
4	rs1803037
4	rs1042364
4	rs1126673
4	rs1126672
4	rs1126671
4	rs284787
4	rs3805331
4	rs971074
4	rs17537595
6	rs6912029
6	rs1799971
6	rs563649
6	rs540825
6	rs675026
6	rs562859
6	rs650245
6	rs9479767
6	rs17277929
6	rs2236256
6	rs2236259
7	rs16139
8	rs708621
8	rs1058332
8	rs920633
8	rs17666
9	rs8188000
9	rs13959
10	rs2236418
10	rs6413419
10	rs2515641

Chromosoma	VNV
11	rs17115439
11	rs4938013
11	rs7118900
11	rs4938016
11	rs2734849
11	rs2734848
11	rs1176744
11	rs17116138
13	rs9595552
13	rs6314
13	rs6314
13	rs6313
13	rs8922
13	rs682767
13	rs682666
13	rs9557581
13	rs1289556
13	rs17677552
13	rs686141
15	rs660652
15	rs472054
15	rs578776
15	rs1051730
15	rs8040868
15	rs8192475
17	rs3813034
17	rs1042173
17	rs6354
22	rs4633
22	rs4680
22	rs769224
22	rs165599
22	rs165728