

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
„Molekularne bioznanosti“

Gordana Nedić Erjavec

Monoaminooksidaza tipa B, katehol-o-metil transferaza,  
dopamin beta-hidroksilaza i dopaminski receptor D4 u  
alkoholizmu i fenotipovima povezanim s alkoholizmom

Doktorski rad predložen Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske  
interdisciplinarnе doktorske studije zbog stjecanja akademskog stupnja  
doktora molekularnih bioznanosti – modul biomedicina

Osijek, 2013.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti u Osijeku.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni  
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

### MONOAMINOOKSIDAZA TIPA B, KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA, DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZA I DOPAMINSKI RECEPTOR D4 U ALKOHOLIZMU I FENOTIPOVIMA POVEZANIM S ALKOHOLIZMOM

Gordana Nedić Erjavec

Rad je izrađen u: Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu  
medicinu Instituta Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Nela Pivac, znanstveni savjetnik

#### Kratki sažetak doktorskog rada:

Alkoholizam je česta i izrazito složena psihijatrijska bolest čija neurobiološka podloga velikim dijelom obuhvaća poremećaje dopaminergičke funkcije na koju bitno utječu dopaminski receptori i metabolički enzimi dopamina. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u frekvenciji genotipova obzirom na polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja u 3. egzonu gena za dopaminski receptor D4 između kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom te povišenu aktivnost trombocitne monoaminooksidaze tipa B (MAO-B) u osoba s alkoholizmom. Polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena katehol-o-metil transferaze bio je povezan sa suicidalnim ponašanjem, pokušajem suicida i početkom prekomjerne uporabe alkohola. Frekvencije genotipova obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* se razlikovala između ženskih ispitanika ovisnih o alkoholu sa i bez pokušaja suicida. Analizom ukupnih plazmatskih proteina pronađeno je 14 različito eksprimiranih proteinskih točaka između suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu.

Doktorski rad sadrži 144 stranice, 24 slike, 21 tablicu i 392 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

**Ključne riječi:** Alkoholizam, fenotipovi povezani s alkoholizmom, katehol-o-metil transferaza, dopamin beta-hidroksilaza, dopaminski receptor D4, monoaminooksiaza tipa B, ukupni proteini iz plazme

Datum obrane: 15. travnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24;  
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Biomedicine and health

**Scientific Field:** Basic clinical sciences

**MONOAMINE OXIDASE TYPE B, CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE, DOPAMINE  
BETA-HYDROXYLASE AND DOPAMINE RECEPTOR D4 IN ALCOHOLISM AND  
ALCOHOL-RELATED PHENOTYPES**

Gordana Nedić Erjavec

**Thesis performed at: Laboratory of Molecular Neuropsychiatry, Division of Molecular  
Medicine, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb**

**Supervisor:** Nela Pivac, PhD, Senior scientist

**Short abstract:**

Alcoholism is common and very complex psychiatric disorder whose neurobiological basis largely encompasses dopaminergic system malfunction with an emphasis on the role of dopamine receptors and dopamine metabolic enzymes. Results of this study showed a significant difference in the frequency of genotypes of the variable number of tandem repeats polymorphism in the third exon of dopamine receptor D4 gene between controls and patients with alcoholism and increased activity of platelet monoamine oxidase type B (MAO-B) in patients with alcoholism. Catechol-o-methyltransferase Val<sup>108/158</sup>Met polymorphism was associated with suicidal behavior, suicide attempt and the beginning of the excessive use of alcohol. Genotype frequencies of the MAO-B 13th intron A/G polymorphism differed between female alcohol dependent subjects with or without suicide attempt. Analysis of total plasma proteins indicated 14 differentially expressed proteins between suicidal and non-suicidal alcoholic patients.

**PhD thesis contains 144 pages, 24 figures, 21 tables and 392 references**

**Original in:** croatian

**Keywords:** Alcoholism, alcohol-related phenotypes, catechol-O-methyltransferase, dopamine beta-hydroxylase, dopamine receptor D4, monoamine oxidase type B, total plasma proteins

**Date of the thesis defense:** April 15th 2013.

**Reviewers:**

**Thesis deposited in:** City and University Library of Osijek, Europska avenija 24; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3

## PREDGOVOR

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ALKOHOLIZAM.....	2
1.1.1. DIJAGNOZA ALKOHOLIZMA.....	2
1.1.2. KLINIČKA SLIKA ALKOHOLIZMA .....	4
1.1.3. ETIOLOGIJA ALKOHOLIZMA.....	4
1.1.4. EPIDEMIOLOGIJA ALKOHOLIZMA.....	5
1.1.5. LIJEČENJE ALKOHOLIZMA .....	6
1.1.6. FENOTIPOVI POVEZANI S ALKOHOLIZMOM.....	7
1.1.7. GENETIKA ALKOHOLIZMA .....	8
1.2 DOPAMINERGIČKI SUSTAV.....	9
1.3. KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA .....	12
1.3.1. TIPOVI KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZE .....	15
1.3.2. POLIMORFIZAM VAL <sup>108/158</sup> MET GENA <i>COMT</i> (rs4680).....	15
1.3.3 KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA I ALKOHOLIZAM.....	17
1.4. DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZA.....	18
1.4.1. POLIMORFIZAM -1021C/T DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZE (rs1611115).....	20
1.4.2. DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZA I ALKOHOLIZAM .....	21
1.5. DOPAMINSKI RECEPTOR D4 (DRD4).....	22
1.5.1. POLIMORFIZAM VARIJABILNOG BROJA PONAVLJANJA U 3. EGZONU GENA ZA DOPAMINSKI RECEPTOR D4 .....	24
1.5.2. DOPAMINSKI RECEPTOR D4 I ALKOHOLIZAM .....	26
1.6. MONOAMINOOKSIDAZA TIPA B (MAO-B).....	26
1.6.1 TIPOVI MONOAMINOOKSIDAZE.....	28
1.6.2. POLIMORFIZAM A/G 13. INTRONA GENA <i>MAO-B</i> (rs 1799836) .....	29
1.6.3. AKTIVNOST TROMBOCITNE MAO-B .....	30
1.6.4. MONOAMINOOKSIDAZA I ALKOHOLIZAM .....	31
2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA .....	33
3. MATERIJAL I METODE.....	35

3.1. ISPITANICI.....	35
3.2. OBRADA UZORAKA KRVI .....	37
3.3. IZDVAJANJE GENOMSKE DNA IZ KRVI METODOM ISOLJAVANJA.....	38
3.4. GENOTIPIZACIJA OBZIROM NA POLIMORFIZME GENA <i>COMT</i> , <i>DBH</i> I <i>MAO-B</i> .....	39
3.5. GENOTIPIZACIJA OBZIROM NA POLIMORFIZAM GENA <i>DRD4</i> .....	42
3.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI TROMBOCITNE MONOAMINOOKSIDAZE TIPA B (MAO-B) .....	45
3.6.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U TROMBOCITIMA .....	46
3.7. ANALIZA UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA ISPITANIKA OVISNIH O ALKOHOLU PODIJELJENIH PREMA POKUŠAJU SUICIDA .....	47
3.7.1. PRIPREMA UZORAKA.....	47
3.7.2. DVODIMENZIONALNA GEL ELEKTROFOREZA .....	48
3.7.3. ANALIZA PROTEINA TEHNIKOM MALDI-TOF/TOF .....	50
3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	52
4. REZULTATI .....	53
4.1. DEMOGRAFSKI PODACI .....	53
4.2. POLIMORFIZAM Val108/158Met (rs4680) GENA ZA KATEHOL-O-METILTRANSFERAZU ( <i>COMT</i> ) .....	56
4.3. POLIMORFIZAM -1021C/T (rs1611115) GENA ZA DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZU ( <i>DBH</i> ) .....	60
4.4. POLIMORFIZAM VARIJABILNOG BROJA PONAVLJANJA U 3. EGZONU GENA ZA DOPAMINSKI RECEPTOR D4 ( <i>DRD4</i> ).....	63
4.5. POLIMORFIZAM A/G (rs1799836) 13. INTRONA GENA ZA MONOAMINOOKSIDAZU TIPA B ( <i>MAO-B</i> ).....	69
4.6. AKTIVNOST MONOAMINOOKSIDAZE TIPA B (MAO-B) U TROMBOCITIMA.....	75
4.7. ANALIZA UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA ISPITANIKA S OVISNOŠĆU O ALKOHOLU PODIJELJENIH PREMA SUICIDALNOM POKUŠAJU .....	80
5. RASPRAVA .....	83
5.1. RAZLIKE U FREKVENCiji GENOTIPOVA I ALELA IZMEĐU KONTROLNIH I ISPITANIKA OVISNIH O ALKOHOLU.....	85
5.2. RAZLIKE U FREKVENCiji GENOTIPOVA I ALELA IZMEĐU ISPITANIKA OVISNIH O AKOHOLU PODIJELJENIH PREMA FENOTIPOVIMA POVEZANIM S ALKOHOLIZMOM.....	88
5.2.1. SIMPTOMI USTEZANJA I DELIRIUM TREMENS .....	88
5.2.2. AGRESIVNO PONAŠANJE .....	89
5.2.3. TEŽINA OVISNOSTI O ALKOHOLU .....	91

5.2.4. KOMORBIDNA DEPRESIJA .....	92
5.2.5. TRENUTNO SUICIDALNO PONAŠANJE I POKUŠAJ SUICIDA TIJEKOM ŽIVOTA .....	93
5.2.6. POČETAK PREKOMJERNE UPORABE ALKOHOLA .....	95
5.3. AKTIVNOST TROMBOCITNE MAO-B .....	96
5.4. ANALIZA UKUPNIH PROTEINA U PLAZMI SUICIDALNIH I NESUICIDALNIH OVISNIKA O ALKOHOLU .....	99
6. ZAKLJUČCI .....	101
7. LITERATURA .....	103
8. SAŽETAK .....	134
9. SUMMARY .....	135
10. POPIS KRATICA .....	136
11. ŽIVOTOPIS .....	138



# 1. UVOD

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2011) zloraba alkohola odgovorna je za gotovo 2,5 milijuna smrti godišnje što je stavlja na čak treće mjesto vodećih uzroka smrti na svjetskoj razini. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2011. godine (Silobrčić Radić i Jelavić, 2011), u Hrvatskoj se na prvom mjestu u skupini hospitalizacija zbog mentalnih poremećaja nalaze hospitalizacije zbog mentalnih poremećaja povezanih s alkoholom (18,8%). Poremećaji povezani s alkoholizmom povezani su s brojnim ozbiljnim socijalnim, ekonomskim i razvojnim pitanjima, uključujući nasilje, zanemarivanje i zlostavljanje djece te izostajanje s radnog mjesta.

Alkoholizam je izrazito složena psihijatrijska bolest s multifaktorijalnom i poligenetskom podlogom. Prema fizičkim i fiziološkim aspektima ovisnosti, dijeli se na veći broj podskupina, a više autora (Cloninger, 1987; von Knorring i sur., 1987; Lesch i Walter, 1996) upravo potiče podjelu alkoholizma prije provođenja kliničkih i bioloških istraživanja.

Obiteljske i studije na blizancima upućuju na zaključak da u podlozi alkoholizma genetika ima bitan udio (Agrawal i Lynskey, 2008; Gelernter i Kranzler, 2009). Budući je alkoholizam izrazito složena bolest, na njega se može gledati kao na klinički ishod brojnih rizičnih čimbenika. Genetički čimbenici koji utječu na sklonost ka alkoholizmu najvjerojatnije mogu biti povezani samo s određenim simptomima (osobnost, kognitivne funkcije) sindroma kojeg predstavlja alkoholizam. Dakle, iako postoji mogućnost postojanja manjeg broja gena koji bi izravno utjecali na razvoj ovisnosti o alkoholu, puno je veća vjerojatnost postojanja gena koji utječu na intermedijarne osobine, odnosno specifične fenotipove, koji onda djeluju na rizik razvoja ovisnosti o alkoholu (Almasy, 2003; Biernacka i sur., 2013). Dopaminergički sustav je odgovoran za nastajanje osjećaja ugone koji potiče pojedinca na izvođenje određenih aktivnosti kao što su uzimanje hrane, sredstava ovisnosti i sličnog (Missale i sur., 1998). Budući

da dopaminergički sustav upravlja središnjim mehanizmima nagrade u mozgu, vrlo je velik njegov utjecaj na razvoj ovisničkog ponašanja uključujući i alkoholizam (Bowirrat i Oscar-Berman, 2005).

## **1.1. ALKOHOLIZAM**

Alkohol je psihoaktivna tvar s depresorskim djelovanjem te, kao takav, pripada skupini sedativa anksiolitika. Kad jednom dospije u organizam, vrlo brzo se apsorbira u gastrointestinalnom traktu te se najvećim dijelom (90 %) metabolizira u jetri, dok se preostali dio bubrezima i respiracijom izlučuje iz organizma (Pawan, 1972). Zbog svog sedativnog djelovanja, alkohol se vrlo često konzumira sa svrhom oslobađanja od depresije i anksioznosti (Spanagel i sur., 1995; Da Silva i sur., 2005). Međutim, dugotrajna konzumacija alkohola može biti i uzrokom depresije, dok apstinencijski sindrom može izazvati pojavu anksioznosti (Regier i sur., 1990). Vrlo često je ovisnost o alkoholu povezana s drugim vrstama ovisnosti, posebice s ovisnošću o nikotinu (Grant i sur., 2004). Alkoholizam podrazumijeva ovisnost o najraširenijoj psihoaktivnoj tvari, alkoholu, čija zloraba je socijalno prihvaćena. Sindrom ovisnosti o alkoholu opisuje se kao skup fizioloških, bihevioralnih i kongnitivnih fenomena u kojima konzumiranje alkohola za pojedinca predstavlja prioritet u odnosu na ostala ponašanja koja bi mu značila veće dobro (APA, 2000).

### **1.1.1. DIJAGNOZA ALKOHOLIZMA**

Dijagnoza alkoholizma se postavlja prema 2 međunarodno prihvaćena kriterija: Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih poremećaja, 4. izdanje (DSM-IV) (APA, 2000) i Međunarodna klasifikacija bolesti, deseta revizija (MKB-10), (WHO, 1990). Dijagnoze obuhvaćene alkoholizmom i navedene u MKB-10 jesu: akutna intoksikacija, zloraba, sindrom ovisnosti, sindrom ustezanja, sindrom ustezanja s delirijem, psihotični poremećaj, sindrom amnezije, rezidualni i psihotični poremećaj s kasnim početkom te drugi i nespecificirani mentalni poremećaji s poremećajima ponašanja. Prema DSM-IV kriterijima, razlikuju se poremećaje uporabe alkohola (zloraba alkohola i ovisnost o alkoholu) te poremećaji izazvani alkoholom (anksiozni poremećaj prilikom intoksikacije/ustezanja, alkoholna intoksikacija, delirij

prilikom intoksikacije/ustezanja, poremećaj raspoloženja prilikom intoksikacije/ustezanja, perzistentna amnezija, perzistentna demencija, psihotički poremećaj s halucinacijama/deluzijama prilikom intoksikacije/ustezanja, seksualne smetnje, poremećaj spavanja, ustezanje i neodređeni poremećaj). Kriteriji za postavljanje dijagnoze ovisnosti o alkoholu prema DSM-IV i MKB-10 kriterijima prikazani su u tablici 1.

Tablica 1: DSM-IV i MKB-10 kriteriji za dijagnosticiranje ovisnosti o alkoholu

<b>DSM-IV</b>	<b>MKB-10</b>
Postojanje tolerancije	Postojanje tolerancije
Simptomi ustezanja ili korištenje alkohola kako bi se izbjeglo ili ublažilo ustezanje	Jaka žudnja ili osjećaj prinude za uzimanjem alkohola
Uzimanje alkohola u većim količinama nego se namjeravalo	Otežana kontrola ponašanja u uzimanju alkohola (početak, završetak ili razina uporabe)
Neuspješni pokušaji prestanka konzumiranja	Fiziološki sindrom ustezanja u fazi prestanka ili smanjenja uzimanja alkohola
Neumjereno vrijeme provedeno vezano za alkohol (uporaba ili oporavak od njegovih učinaka)	Postupno zanemarivanje ostalih zadovoljstava ili interesa zbog uzimanja alkohola
Zbog alkohola oslabljene socijalne i aktivnosti vezane za posao	Nastavljanje s uporabom alkohola i pored postojanja svijesti o neosporno štetnim posljedicama prekomjernoga pijenja poput oštećenja jetre, depresivnih raspoloženja ili oštećenja kognitivnog djelovanja
Neprestano konzumiranje usprkos fizičkim i fiziološkim negativnim posljedicama	

Kako bi se postavila dijagnoza, nužna je prisutnost 3 ili više glavnih simptoma (tolerancija, sindrom ustezanja, trošenje velikog dijela vremena na uporabu alkohola, povratak upotrebi usprkos štetnim tjelesnim i psihosocijalnim posljedicama i ponovljeni bezuspješni pokušaji nadzora uporabe alkohola) navednih u DSM-IV ili MKB-10 kriterijima unazad 12 mjeseci.

Biološki pokazatelji ovisnosti o alkoholu obično se svode na laboratorijske krvne pretrage koje obuhvaćaju mjerenje jetrenih enzima (gama-glutamilttransferaza (GGT), aspartatna aminotrasferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT)), čije vrijednosti su povišene u alkoholizmu (Rosalki, 1984), srednji volumen eritrocita (MCV), koji je također povišen kod osoba ovisnih o alkoholu (Chick i sur., 1981), te ugljikohidratima deficijentni transferin (CDT), čiji udio u serumu raste kod konzumacije alkohola (Conigrave i sur., 2002).

### **1.1.2. KLINIČKA SLIKA ALKOHOLIZMA**

Osobe s kroničnom ovisnošću o alkoholu nose prepoznatljive fizičke značajke poput trajnog crvenila lica i nosa, drhtanja razmaknutih prstiju kod ispruženih ruku, ogrebotina i ožiljaka na koži, koji su posljedica čestih ozljeđivanja u opitom stanju, te izgleda koji bi odgovarao znatno starijoj životnoj dobi. Još je Jellinek (1962) u svojoj klasifikaciji alkoholizma vodio računa o fazama ovisnosti o alkoholu. Tako je osoba na početku u predalkoholnoj fazi u kojoj joj alkohol povremeno omogućuje postizanje olakšanja. Kasnije olakšanje postignuto alkoholom prelazi u trajno te se povećava tolerancija i osoba ulazi u prodromalnu fazu u kojoj su alkoholne intoksikacije prolongirane, ali osoba je još uvijek u stanju suzdržati se od uporabe. Kada nadzor nad uporabom alkohola više nije moguć, osoba ulazi u kritičnu fazu alkoholne toksikomanije i postepeno u bolest alkoholizma koju obilježava ovisnost o alkoholu, prestanak porasta tolerancije i različiti simptomi fizičkog i socijalnog oštećenja. Takva osoba negira ili umanjuje svoje pijenje te za njega nalazi različita opravdanja, osamljuje se, postaje neprijateljski raspoložena prema bližnjima i često gubi radno mjesto. Konačno, ova faza završava izraženom moralnom degradacijom, oštećenjem mišljenja, pojavom alkoholnih psihoza, propadanjem sustava opravdanja i priznanjem poraza što dovodi do prihvaćanja liječenja.

### **1.1.3. ETIOLOGIJA ALKOHOLIZMA**

U posljednjih 20 godina obiteljske studije alkoholizma uglavnom su provodile dvije nepreklapajuće skupine istraživača i to istraživači koji zastupaju psihosocijalno i istraživači koji zastupaju bihevioralno genetičko stajalište. Kod povezivanja obiteljske

anamneze s izgledima razvitka ovisnosti o alkoholizmu, psihosocijalno stajalište uzima u obzir čimbenike obiteljskog okoliša (odnos roditelja i djeteta, obiteljski običaji) koji međudjeluju sa socio-okolišnim čimbenicima (odnos s vršnjacima) kao i čimbenicima individualnih razlika (impulzivno ili antisocijalno ponašanje) (Jacob i Leonard, 1994). S istim ciljem bihevioralni genetičari uzimaju u obzir doprinos genetičkih čimbenika riziku razvoja alkoholizma, a ono što preostane razlikuju kao podijeljene i nepodijeljene sastavne dijelove (Heath i sur., 1996). U konačnici, psihosocijalna istraživanja su dala bogate teorije etiologije alkoholizma i opisala veliki broj ključnih posrednika koji doprinose povećanju rizika, međutim glavni nedostatak ovih istraživanja jest provođenje obiteljskih istraživanja uz zanemarivanje gena koji su podijeljeni u obitelji. Bihevioralno genetičke studije došle su do uvjerljivih zaključaka tvrdeći da genetički čimbenici doprinose 40 do 60 % rizika od razvoja alkoholizma, a preostali čimbenik se jednim dijelom odnosi na čimbenike podijeljenog obiteljskog okoliša (Heath, 1995; Heath i sur., 1997). Naravno, i te studije imaju nedostatke, a jedan od njih je svakako zanemarivanje obiteljskih i ostalih učinaka podijeljenog i nepodijeljenog okoliša, te bi idealno rješenje bilo uzeti u obzir međudjelovanje gena i okoliša.

Etiologija alkoholizma je jednim dijelom još uvijek nerazjašnjena, međutim velika važnost pridaje se genetičkoj teoriji koja se temelji na činjenicama da je rizik od razvitka ovisnosti o alkoholu veći kod osoba koje su u rodu s ovisnikom o alkoholu (Gelernter i Kranzler, 2009) te da jednojajčani blizanac ovisnika o alkoholu češće razvija alkoholizam, nego dvojajčani blizanac ili pak brat ili sestra (Agrawal i Lynskey, 2008).

#### **1.1.4. EPIDEMIOLOGIJA ALKOHOLIZMA**

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2011. godine (Silobrčić Radić i Jelavić, 2011) u razdoblju od 1995. do 2010. godine zabilježen je uzlazni trend broja i stopa hospitalizacija uslijed mentalnih poremećaja povezanih s alkoholom (1995. godine 7461, 2000. godine 7972, 2005. godine 9122, a 2010.

godine 7733 hospitalizacija). Broj hospitalizacija kod muškaraca je značajno veći nego kod žena (5,5 : 1).

Najviša stopa hospitalizacije za oba spola je u dobi od 40 do 59 godina. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2011. Godine (WHO, 2011), uporaba alkohola je treći najveći svjetski rizik od bolesti te je uzrokom 60 vrsta bolesti i ozljeda, a djelomični uzrok još 200 drugih. Gotovo 4 % svih smrti u svijetu povezane su s uporabom alkohola, što je više nego udio smrti izazvanih HIV-om, nasiljem ili tuberkulozom. Oko 6,2 % svih smrti kod muškaraca i 1,1 % kod žena povezane su s uporabom alkohola.

#### **1.1.5. LIJEČENJE ALKOHOLIZMA**

Ovisnik o alkoholu koji u samom početku ima manje tešku ovisnost, bolju početnu socijalnu podršku i stabilniju osobnost, lakše i uspješnije se oporavlja od ovisnosti. Nužno je prihvaćanje strogog tretmana u smislu potpunog suzdržavanja od uporabe alkohola i promjene načina života. Liječenje uključuje i članove obitelji, prijatelje, druge bliske osobe i kolege s posla koji trebaju pružati podršku. Također, liječenje, osim u užem smislu, obuhvaća i liječenje psihičkih i fizičkih komplikacija poput delirium tremensa i ciroze jetre.

Liječenju alkoholizma može se pristupiti s dvije strane, farmakoterapijski i psihoterapijski. Psihoterapija se provodi na više načina. Skupine oformljene kao udruge građana, poznate kao klubovi liječenih alkoholičara, imaju svrhu rehabilitacije i resocijalizacije pacijenata te poticanja promjene načina života. Klub se posjećuje jednom tjedno, često uz prisustvo članova obitelji. Kako bi se umanjila naučena ovisnost o alkoholu, često se primjenjuje motivacijski razgovor koji će učvrstiti odluku prihvaćanja liječenja. Ekonomski prihvatljiviji, ali i pun prednosti, je pristup provođenja grupne psihoterapije kod kojih osoba na tuđem primjeru postaje svjesna svoje ovisnosti, socijalizira se i u sebi sličnima pronalazi podršku.

Lijekovi koji se primjenjuju u liječenju primarnog alkoholizma za cilj imaju djelovanje na neurokemijske sustave mozga u svrhu slabljenja osjećaja nagrade ili ugođe

povezane s uporabom alkohola ili pak povećanja tolerancije na stres ili oboje, što bi u konačnici umanjilo porive uporabe alkohola (Anton, 1995).

Jedan od lijekova je disulfiram, lijek koji izaziva kemijsku internaciju i koji je 1951. godine odobren od strane Američke organizacije za hranu i lijekove (FDA, od eng. Food and drug administration), te se od onda umjereno koristi za suzbijanje ovisnosti o alkoholu (Suh i sur., 2006). Način djelovanja disulfirama na smanjenje uporabe alkohola podrazumijeva inhibiciju enzima aldehid dehidrogenaze koji je nužan za potpunu razgradnju alkohola. Posljedica toga je zaostajanje povišene koncentracije acetaldehida u organizmu što uzrokuje izrazito nelagodne osjećaje kod uporabe alkohola (Suh i sur., 2006).

U primjeni je i lijek naltrekson, antagonist opioidnih receptora, za kojeg je pronađeno da umanjuje želju za alkoholom (Pettinati i sur., 2006). Naltrekson umanjuje alkoholom izazvanu euforiju (O'Malley i sur., 1992) inhibirajući oslobađanje beta endorfina (Volpicelli i sur., 1995).

Osim disulfirama i naltreksona, u uporabi je i akamprosata, agonist glutamatergičkih NMDA (N-metil-D-aspartat) i GABA (gama aminomaslačna kiselina) receptora tipa A (Pierrefiche i sur., 2004). Dakle, djelovanjem akamprosata se pobuđuju inhibicijski receptori i umanjuje se želja za alkoholom (Mason i sur., 2006).

Često pacijenti s alkoholizmom pokazuju komorbidnu depresiju i anksioznost. Takvi pacijenti se tretiraju antidepresivima (Cornelius i sur., 1993), odnosno sedativima (Kranzler i sur., 1995).

#### **1.1.6. FENOTIPOVI POVEZANI S ALKOHOLIZMOM**

Pretpostavlja se da utvrđivanje podskupina alkoholizma omogućuje bolje predviđanje tijeka bolesti kao i primjereniji terapijski pristup. Aspekti ovisnosti o alkoholu ili specifični fenotipovi povezani s alkoholizmom koji se pritom uzimaju u obzir su: ustezanje, agresivno ponašanje, težina ovisnosti o alkoholu, ustezanje s delirium tremensom (DT), komorbidna depresija, suicidalno ponašanje, pokušaj suicida tijekom života te životna dob u kojoj je započela prekomjerna uporaba alkohola.

Sindrom ustezanja se javlja nekoliko sati ili dana nakon prestanka uporabe alkohola i jedan je od pokazatelja sindroma ovisnosti o alkoholu. Ustezanje s DT-om se javlja nakon apsolutnog ili relativnog prekida uzimanja alkohola u teških ovisnika o alkoholu, a susreće se u 1-3 % ovisnika o alkoholu. Zwerling i Rosenbaum (1959) koriste fenotipove agresivno ponašanje i depresiju za podjelu alkoholizma na 5 različitih podskupina. Težina ovisnosti o alkoholu i dob u kojoj osoba započinje s prekomjernom uporabom alkohola su fenotipovi uzeti u obzir pri Cloningerovoj (1987) podjeli alkoholizma na 2 tipa. Lesch i Walter (1996) dijele osobe s ovisnošću o alkoholu na 4 podskupine uzimajući pritom u obzir i suicidalnost.

#### **1.1.7. GENETIKA ALKOHOLIZMA**

Postoji veliki broj gena koji bi mogli biti uključeni u tako složenu patogenezu kao što je patogeneza alkoholizma. Nedavne studije ističu važnost pronalaženja genetičkog učinka na pojedinačne biokemijske puteve kako bi se razumio konačni učinak na fenotip (Wang i sur., 2007; Srinivasan i sur., 2009). Većina dosadašnjih istraživanja odnosi se na pronalaženje povezanosti alkoholizma i gena uključenih u metabolizam alkohola i neurotransmisiju. U tom pogledu najviše su istraženi geni enzima koji razgrađuju alkohol, aldehid dehidrogenaza (ALDH) 2 i alkohol dehidrogenaza (ADH) 1B. Nešto slabije su istraženi serotonergički i GABA-ergički geni.

Većina unesenog alkohola se iz organizma uklanja u jetri razgradnjom pomoću enzima ADH do acetaldehida kojeg onda enzim ALDH razgrađuje do octene kiseline. Promjene u aktivnosti ovih enzima doprinose sklonosti ka ovisnosti o alkoholu. Kod ljudi postoji 7 gena za ADH, smještenih na dužem kraku četvrtog kromosoma, te je na toj skupini gena provedeno nekoliko cjelogenomskih studija povezanosti (GWAS, od eng. genome-wide association studies), uzimajući u obzir rizik razvitka ovisnosti o alkoholu (Long i sur., 1998; Reich i sur., 1998; Foroud i sur., 2000). Izraženiju ulogu u metabolizmu etanola u jetri ima alkohol dehidrogenaza razreda I kodirana genima *ADH1A*, *ADH1B* i *ADH1C*. Beta podjedinica razreda I ADH kodirana je genom *ADH1B* s polimorfizmom odgovornim za postojanje 3 varijante gena, *ADH1B\*1*, *ADH1B\*2* i *ADH1B\*3*, kod kojih su varijante *ADH1B\*2* i *ADH1B\*3* povezane s većom



aktivnošću enzima prilikom razgradnje etanola (Yoshida, 1994) te pokazuju protektivni učinak kod alkoholizma (Thomasson i sur., 1995).

Glavnu ulogu u razgradnji acetaldehida nastalog razgradnjom etanola ima mitohondrijska ALDH2 (Vasiliou i sur., 2000). Polimorfizam zamjene jedne baze u 12. egzonu gena *ALDH2*, koji rezultira zamjenom glutamina lizinom na položaju 504, odgovoran je za promjenu aktivnosti enzima s potpunim gubitkom aktivnosti u slučaju alela s lizinom. Polimorfizam je pronađen samo u populaciji istočne Azije, a nemogućnost metaboliziranja acetaldehida uslijed uporabe alkohola izaziva vrlo bolne učinke (Yoshida, 1992).

Vjeruje se da je serotonergički sustav uključen u nadzor žudnje za alkoholom, a meta analize su pokazale povezanost alkoholizma i polimorfizma 5-HTTLPR (polimorfna regija vezana za gen *5-HTT*) u promotoru gena za serotoninski transporter (5-HTT) (Feinn i sur., 2005). U slučaju ovog polimorfizma, kraći alel se dovodi u vezu s ovisnošću o alkoholu (Feinn i sur., 2005). Neke studiju upućuju na povezanost polimorfizama za serotoninske receptore 2A (HTR2A) i 1B (HTR1B) s nekim podtipovima alkoholizma, ali izgleda da isti polimorfizmi nisu povezani s općim rizikom ovisnosti o alkoholu (Nakamura i sur., 1999; Sanders i sur., 2002).

U genu *GABRA2* koji kodira za alfa 2 podjedinicu inhibicijskog GABA-A receptora, pronađen je polimorfizam zamjene jedne baze (SNP) povezan s povećanim rizikom za razvoj ovisnosti o alkoholu (Edenberg i sur., 2004).

## **1.2 DOPAMINERGIČKI SUSTAV**

Dopamin je kateholaminski neurotransmiter u mozgu sisavaca gdje nadzire mnoštvo procesa, uključujući lokomotorne aktivnosti, kogniciju, emocije, unos hrane i endokrinu regulaciju (Missale i sur., 1998). Na periferiji ima ulogu modulatora kardiovaskularne funkcije, oslobađanja kateholamina, otpuštanja hormona, vaskularnog tonusa, funkcije bubrega i pokretljivosti gastrointestinalnog sustava (Missale i sur., 1998). Dopaminergički sustav ima važnu ulogu u mehanizmima nagrade u mozgu i pokazano je da ne sudjeluje samo u mehanizmima nagrade kad

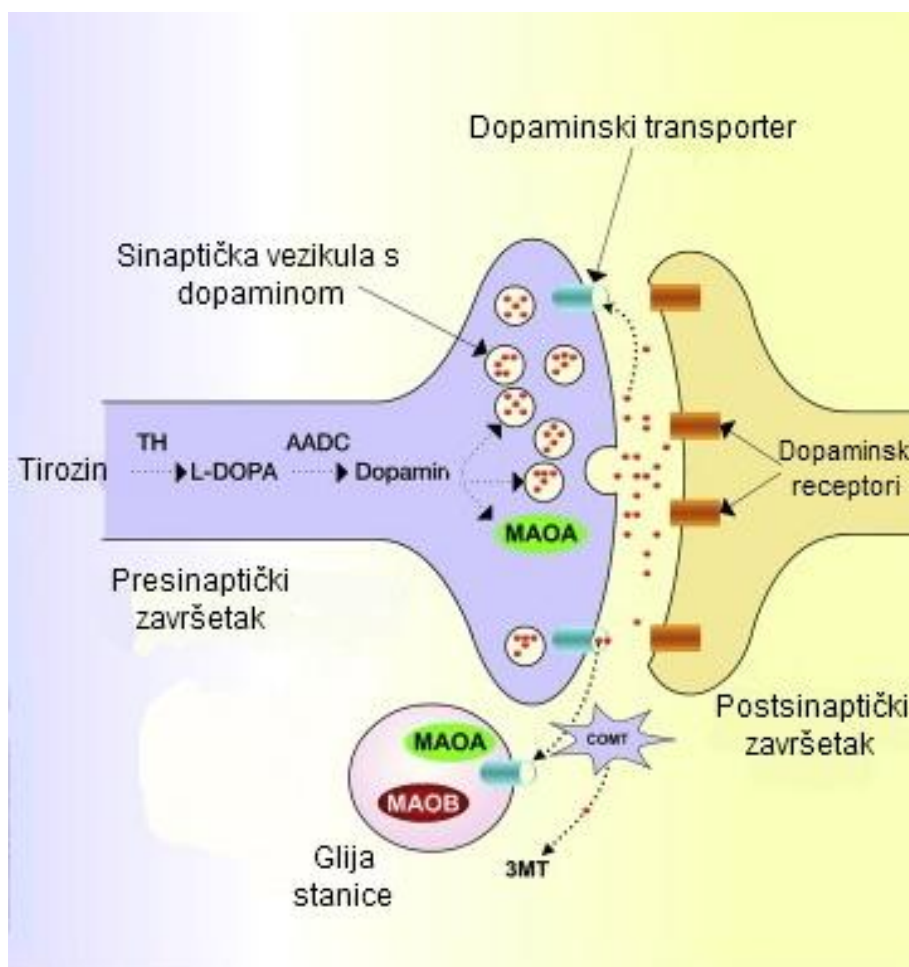
je o lijekovima riječ, već i kad se radi o hrani, stimulaciji mozga te kod seksualnih interakcija (Wise i Rompre, 1989).

Dopaminske skupine neurona (kateholaminske skupine od A8 do A16) su u mozgu raspoređene u mezencefalonu (A8-A10), diencefalonu (A11-A14), preoptičkom području (A15) i u njušnoj lukovici (A16). Najveća skupina je skupina A10 koja obuhvaća dopaminske neurone okupljene u ventralnom tegmentalnom području (VTA). Dopaminski aksoni su raspoređeni u četiri glavna sustava vlakana: mezotelencefalički sustav, periventrikularni sustav, sustav kratkih veza unutar diencefalona te silazni dopaminski aksoni. Mezotelencefalički sustav je najveći i ima dvije komponente. Prva je nigrostrijatalni (mezoistrijatalni) sustav koji je projekcija iz substancija nigra pars kompakta (SNc) u bazalne ganglije. Druga komponenta je mezolimbokortikalni sustav koji je projekcija iz VTA u subkortikalne limbičke strukture, limbičku moždanu koru i ostatak moždane kore (Judaš i Kostović, 1997). Nigrostrijatalna projekcija ima važnu ulogu u inicijaciji pokreta, a mezolimbokortikalna u nagrađivanju te je uključena u razvoj ovisnog ponašanja (Binder i sur., 2008).

Sinteza dopamina (Slika 1) odvija se u tijelu neurona i započinje prevođenjem neesencijalne aminokiseline tirozin u L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) pomoću enzima tirozin-hidroksilaze. Enzim DOPA dekarboksilaza (DDC) katalizira dekarboksilaciju L-3,4-dihidroksifenilalanina do dopamina koji se do trenutka ispuštanja u sinaptičku pukotinu skladišti u vezikulama (Kandel i sur., 2006).

Kod prijenosa podražaja (Slika 1), dopamin se oslobađa u sinaptičku pukotinu i veže se za dopaminski receptor postsinaptičkog neurona (Kandel i sur., 2006) Postoji 5 podtipova dopaminskog receptora (D1 do D5) (Neve i sur., 2004). Kako bi došlo do prekida transmisije (Slika 1), dopamin se iz sinaptičke pukotine uklanja pomoću dopaminskog transportera (DAT) koji je Na/Cl simporterski protein s 12 transmembranskih domena i koji, suprotno koncentracijskom gradijentu, vraća dopamin u presinaptički neuron. Ponovo uneseni dopamin se u neuronu pomoću vezikularnog transportera vraća u vezikule ili ga u citoplazmi razgrađuju 2 tipa enzima monoaminooksidaze (MAO-A i MAO-B) do 3,4-dihidroksifeniloctene kiseline (Slika 1).

Dopamin u citoplazmi ili sinaptičkoj pukotini može biti inaktiviran i enzimom katehol-o-metiltransferazom (COMT) koja ga razgrađuje do 3-metoksitiramina (Slika 1) (Kandel i sur., 2006).

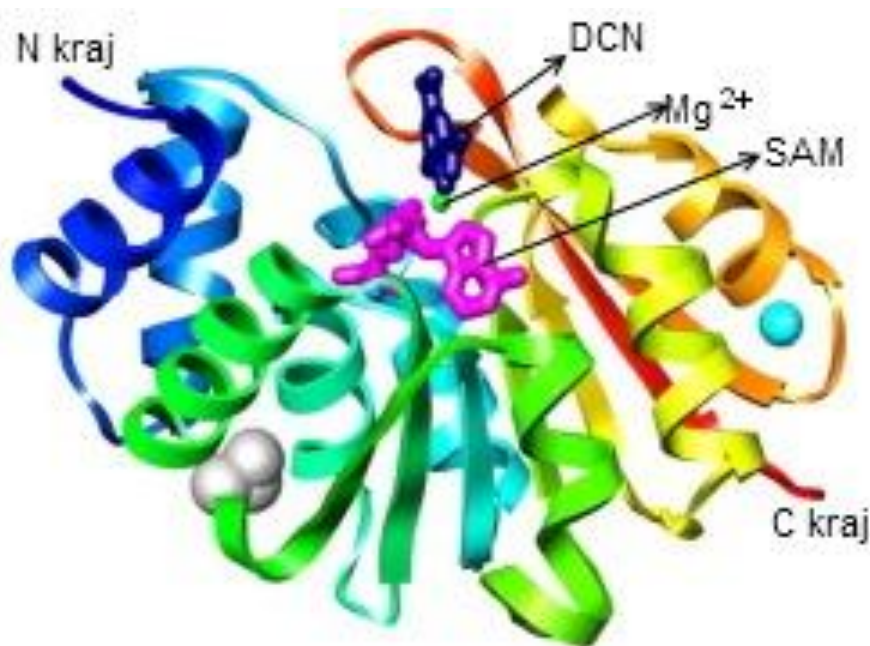


Slika 1. Shematski prikaz dopaminergičke sinapse od sinteze dopamina do prijenosa i prekida podražaja. ADC=DDC; TH=tirozin hidroksilaza. Preuzeto iz (Bainbridge i sur., 2008).

Brojne farmakološke, elektrofiziološke i genetičke studije upućuju na važnu ulogu dopaminergičkog sustava u svojevnoj uporabi alkohola (Koob i sur., 1994; El-Ghundi i sur., 1998; Phillips i sur., 1998). Tako naprimjer uporaba alkohola dovodi do pojačanog oslobađanja dopamina u nukleus akumbensu kod glodavaca (Melendez i sur., 2002; Hungund i sur., 2003), a primjena antagonista dopaminskih receptora mijenja uporabu alkohola u nekim okolnostima (Boyce i Risinger, 2002; D'Souza i sur., 2003).

### 1.3. KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA

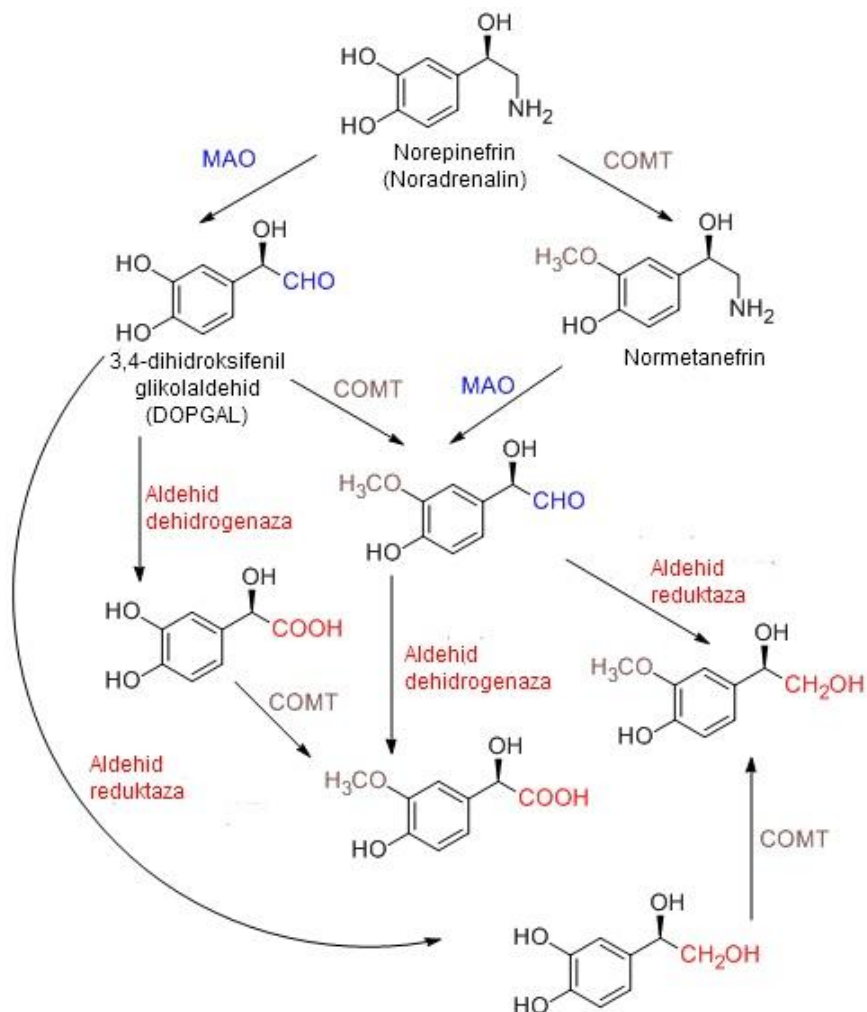
Enzim katehol-o-metiltransferazu (COMT) je 1957. godine otkrio biokemičar Julius Axelrod (Axelrod, 1957). Spada u visoko zastupljene unutarstanične enzime, a uloga mu je kataliziranje prijenosa metilne skupine sa S-adenozilmetionina (SAM) na različite kateholne supstrate, uključujući kateholaminske neurotransmitere i kateholne estrogene (Axelrod i Tomchick, 1958; Mannisto i Kaakkola, 1999; Weinshilboum i sur., 1999). Protein COMT spada u razred I obitelji visoko očuvanih metiltransferaza ovisnih o SAM-u (Cheng i Roberts, 2001; Martin i McMillan, 2002) te njegova struktura odgovara strukturi većine proteina te obitelji. Srž enzima čini 7 aminokiselinskih lanaca raspoređenih u  $\beta$  ploču i umetnutih između 2  $\alpha$  uzvojnice (Slika 2).



Slika 2. Kristalna struktura proteina COMT kod čovjeka. DCN=3,5 dinitrokatehol (inhibitor COMT-a). Preuzeto iz (Rutherford i sur., 2008b)

Plitka pukotina na površini proteina je vezno mjesto za SAM, inhibitore i magnezijeve ione. Magnezijevi ioni se vežu nakon vezanja SAM-a i doprinose ionizaciji hidroksilne skupine. Očuvani motivi u prvoj polovici srži  $\beta$  ploče ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) odgovorni su za interakciju sa SAM-om. Aminokiselinski ostaci okupljeni u tom dijelu proteina

ostvaruju vodikove, van der Waalsove i hidrofobne interakcije sa SAM-om, usmjeravajući SAM tako da je njegova metilna grupa okrenuta prema veznom mjestu supstrata. Vezno mjesto katehola je plitki džep obilježen aminokiselinskim ostacima M40, L198, Y200 i tzv. „ostacima čuvarima”, W38 i P174, koji s inhibitorom ostvaruju van der Waalsove sile i osiguravaju orijentaciju supstrata ispravnu za metilaciju.



Slika 3. Shematski prikaz metaboličkog puta keteholamina na primjeru noradrenalina. Preuzeto sa: <http://pharmaxchange.info/press/>

Glavna ulogu COMT-a u organizmu jest inaktivacija kateholaminergičkih neurotransmitera dopamina, adrenalina i noradrenalina metilacijom (Mannisto i

Kaakkola, 1999). Metabolički put kateholamina prikazan je shematski slikom 3 na primjeru noradrenalina.

U mozgu se COMT nalazi u postsinaptičkim neuronima i glija stanicama (Rivett i sur., 1983; Karhunen i sur., 1995), a izrazito je važan u prefrontalnom korteksu (PFC). Kod prekida prijenosa podržaja nužno je ukloniti dopamin koji je oslobođen u sinaptičku pukotinu za vrijeme prijenosa podražaja. Slobodni dopamin može se ukloniti povratkom dopamina u presinaptički neuron (Trendelenburg, 1990; Mannisto i sur., 1992) te je aktivni unos dopamina dopaminskim transporterom (DAT) najvažniji način prekida prijenosa podržaja u striatumu (Cass i sur., 1993; Giros i sur., 1996; Eisenhofer i sur., 2004). Postoje dijelovi mozga, poput PFC-a, u kojima je DAT slabo zastupljen (Sesack i sur., 1998). Upravo su u PFC-u glavni načini dokidanja prijenosa dopaminergičkog podražaja povratak dopamina u presinaptički neuron noradrenalinskim transporterom (NET) (Carboni i sur., 1990; Tanda i sur., 1997) i razgradnja slobodnog dopamina COMT-om (Matsumoto i sur., 2003). Naime, dokazano je da miševi s izbačenim genom za COMT imaju dva puta duže vrijeme uklanjanja dopamina u PFC-u od miševa divljeg tipa, dok uklanjanje dopamina u striatumu kod istih miševa time nije poremećeno (Yavich i sur., 2007).

Jedan od supstrata COMT-a je i prekursor dopamina L-DOPA (Mannisto i Kaakkola, 1999), čijom metilacijom se dokida sinteza dopamina. Egzogeni L-DOPA ili levodopa se već 30 godina koristi u terapiji Parkinsonove bolesti, karakteristične po propadanju dopaminergičkih neurona (The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006.). Kako bi se nadoknadio nedostatak dopamina u mozgu oboljelih, pacijentima se daje levodopa koja, za razliku od dopamina, prolazi krvno moždanu barijeru te se u mozgu pomoću enzima dopa dekarboksilaze (DDC) prevodi u dopamin. Veći dio levodope ipak zaostaje u serumu te se, kako bi se spriječila hiperdopaminergija, istovremeno primjenjuje i karbidopa, inhibitor enzima DDC (Sedik i sur., 1997). Kako bi se pak očuvala levodopa i produžio učinak djelovanja, primjenjuje se i inhibitor COMT-a, poput entakapona (Schultz i Nissinen, 1989), koji spriječava inaktivaciju levodope metilacijom (The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006.).

### 1.3.1. TIPOVI KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZE

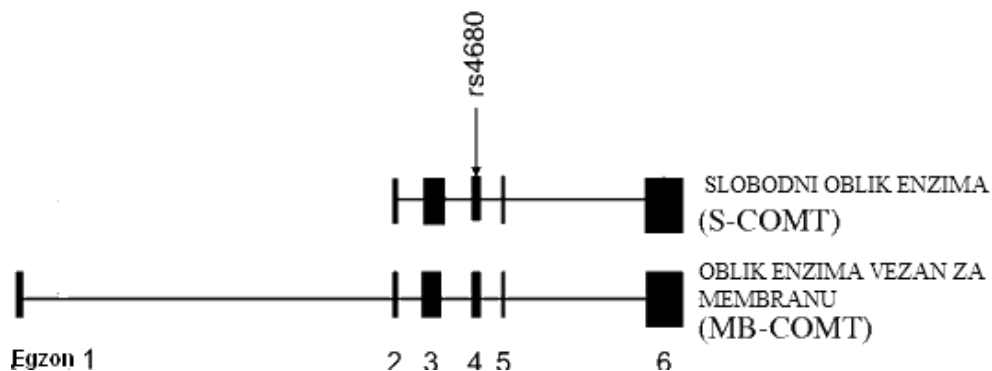
Razlikuje se slobodni, citosolni, oblik proteina (s-COMT) sačinjen od 221 aminokiselinskog ostatka i molekularne mase 24,4 kDa i za membranu vezani oblik proteina (mb-COMT) koji na N kraju ima dodatnih 50 aminokiselina, te mu molekularna masa iznosi 30 kDa (Huh i Friedhoff, 1979; Tenhunen i sur., 1994; Bai i sur., 2007). U većini tkiva kod čovjeka dolazi do ekspresije oba oblika proteina, međutim u 16 ispitivanih regija mozga pronađen je samo duži oblik, mb-COMT (Hong i sur., 1998). Također, u svim tkivima je s-COMT 3 puta zastupljeniji, osim u mozgu gdje mb-COMT ima udio od 70% (Tenhunen i sur., 1994).

Oba oblika enzima kodirana su jednim genom *COMT* smještenim na dužem kraku 22. kromosoma u regiji q11.2 (Grossman i sur., 1992a; Winqvist i sur., 1992). Gen se sastoji od 6 egzona, od kojih su prva dva nekodirajuća, a ekspresija je pod nadzorom dva različita promotora smještena u 3. egzonu (Salminen i sur., 1990; Lundstrom i sur., 1991). Promotor bliži 5' kraju (P2) odgovoran je za sintezu mRNA duge 1,5 kb koja se, zahvaljujući propusnoj translaciji, može prevesti u oba oblika proteina (Tenhunen i sur., 1994). Prepisivanje kraće mRNA (1,3 kb) pod nadzorom je promotora P1 smještenog između startnih kodona za s- i mb-COMT te se djelomično preklapa s kodirajućim slijedom za mb-COMT (Tenhunen i sur., 1994). Početni kodon za mb-COMT nije uključen u ovu mRNA te njezinom translacijom može nastati samo s-COMT (Tenhunen i sur., 1994).

### 1.3.2. POLIMORFIZAM VAL<sup>108/158</sup>MET GENA *COMT* (rs4680)

Aktivnost enzima COMT u organizmu je trojaka i to visoka, srednja i niska (Weinshilboum i Raymond, 1977; Boudikova i sur., 1990; Jeanjean i sur., 1997), a niža aktivnost enzima povezana je i s njegovom termolabilnosti, čak i pri 37°C (Boudikova i sur., 1990). Ukupna aktivnost je pod utjecajem polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* (Lachman i sur., 1996b). Navedeni polimorfizam je polimorfizam zamjene jedne baze (SNP, od eng. single nucleotide polymorphism), adenina u guanin, koji za posljedicu ima zamjenu aminokiseline valin amonikiselinom

metionin na položaju 108 kod s-COMT, odnosno 158 kod mb-COMT (Bertocci i sur., 1991; Lundstrom i sur., 1995; Lachman i sur., 1996b) (Slika 4). Pritom aleli Met i Val imaju kodominantan odnos (Harris i sur., 2005).



Slika 4. Prikaz položaja polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*. Preuzeto iz (Williams i sur., 2007).

Sam polimorfizam nema značajniji učinak na kinetiku enzima (Lotta i sur., 1995; Goodman i sur., 2002; Chen i sur., 2004a). Međutim, oblik proteina s metioninom u polimorfnom mjestu je, u usporedbi s oblikom koji u polimorfnom mjestu nosi valin, termolabilniji (Scanlon i sur., 1979; Spielman i Weinshilbom, 1981; Boudikova i sur., 1990; Grossman i sur., 1992b; Lotta i sur., 1995; Chen i sur., 2004a; Cotton i sur., 2004; Shield i sur., 2004), skloniji inaktivaciji oksidacijom (Cotton i sur., 2004; Li i sur., 2004b; Li i sur., 2005) i denaturaciji guanidin hidrokloridom i zagrijavanjem (Rutherford i sur., 2008a) te ga karakterizira niža razina proteina *in vivo* (Chen i sur., 2004a; Doyle i sur., 2004; Shield i sur., 2004). Prema Rutherfordu i suradnicima (2006) oblik Met se pri 37°C češće nađe u potencijalno deformiranoj konformaciji, nego što je to slučaj s oblikom Val, te je time više skloniji proteolizi. Vežanje SAM-a u aktivno mjesto oblika Met štiti protein i od toplinske inaktivacije (Lotta i sur., 1995) i denaturacije (Rutherford i sur., 2008a). Navedene razlike između dvaju oblika enzima su najvjerojatniji uzrok konačnog fenomena od čak 3 do 4 puta snižene ukupne aktivnosti Met oblika enzima o kojem se izvještava u većem broju znanstvenih radova (Jeanjean i sur., 1997; Russ i sur., 2000; Kia-Keating i sur., 2007).



Polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* dovodi se u vezu s različitim fiziološkim i neuropsihijatrijskim poremećajima. Tako se, naprimjer, alel Met povezuje s povećanim rizikom raka dojke (Dawling i sur., 2001; Yim i sur., 2001; Goodman i sur., 2002; Wedren i sur., 2003), opsesivno kompulzivnim poremećajem (Karayiorgou i sur., 1997; Karayiorgou i sur., 1999), nekim manifestacijama shizofrenije (Lachman i sur., 1996a; Strous i sur., 1997; Lachman i sur., 1998; Nolan i sur., 2000; Strous i sur., 2003; Šagud i sur., 2010), povećanom osjetljivošću na bol (Zubieta i sur., 2003; Diatchenko i sur., 2005) i suicidalnim ponašanjem (Nedić i sur., 2011b). S druge strane, alel Met se dovodi u vezu i s poboljšanim kognitivnim funkcijama prefrontalnog korteksa (Goldberg i sur., 2003; Meyer-Lindenberg i sur., 2005; Nedić i sur., 2011a) te protektivnim učincima kod izvršenja suicida (Pivac i sur., 2011) i pušenja (Nedić i sur., 2010a).

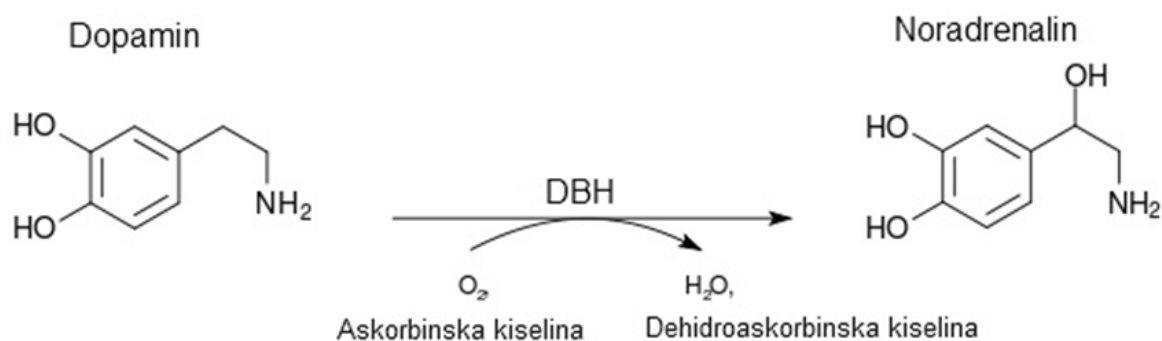
### **1.3.3 KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA I ALKOHOLIZAM**

Postoji sklonost ka vjerovanju da se ovisno ponašanje razvija pod utjecajem dva međuovisna sustava koji djeluju na kogniciju (Bechara, 2005; Wiers i sur., 2007). Reflektivni sustav je sustav pod vlastitim nadzorom vođen svjesnim djelovanjem, a drugi, impulzivni ili reflektivni, je sustav vođen nesvjesnim djelovanjem (Bechara, 2005; Wiers i sur., 2007). Vrlo je vjerojatno da reflektivni sustav odražava neuralne mreže prefrontalnog područja, a reflektivni limbičke i vantralno striatalne puteve (Bechara, 2005). Pretpostavlja se da kapacitet radne memorije, za koju je odgovoran PFC, može ublažiti utjecaj impulzivnih kognitivnih procesa na ispoljavanje žudnje (Hofmann i sur., 2009). Isto načelo primjenjuje se i kod alkoholizma gdje je pronađeno da kod osoba s lošijom izvedbom na testovima radne memorije i inhibicije odgovora, postoji jača povezanost s mjerenjima motivacije za uporabu alkohola (Grenard i sur., 2008; Houben i sur., 2010). S obzirom na važnu ulogu *COMT*-a u metabolizmu dopamina u PFC-u (Bilder i sur., 2004), za pretpostaviti je da je uloga *COMT*-a važna u razvoju ovisnosti o alkoholu. Uzme li se u obzir polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, svakako treba voditi računa o činjenici da se alel Val povezuje s povišenom aktivnošću enzima, a time i sniženom koncentracijom slobodnog prefrontalnog dopamina. Alel Met se povezuje sa sniženom aktivnošću

enzima koja za rezultat ima povišenu koncentraciju tonusnog dopamina (Winterer i Weinberger, 2004). Iz navedenog se može zaključiti da nosioci alela Met imaju bolje rezultate kognitivnih testova koji zahtjevaju kognitivnu stabilnost, a lošije rezultate testova koji zahtjevaju brze kognitivne pomake i konfliktne odluke (Neuhaus i sur., 2009). Alel Met se također povezuje sa smanjenom limbičkom aktivnošću i slabije uspješnim odgovorom na emocionalno pobuđujuće podražaje (Heinz i Smolka, 2006).

#### 1.4. DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZA

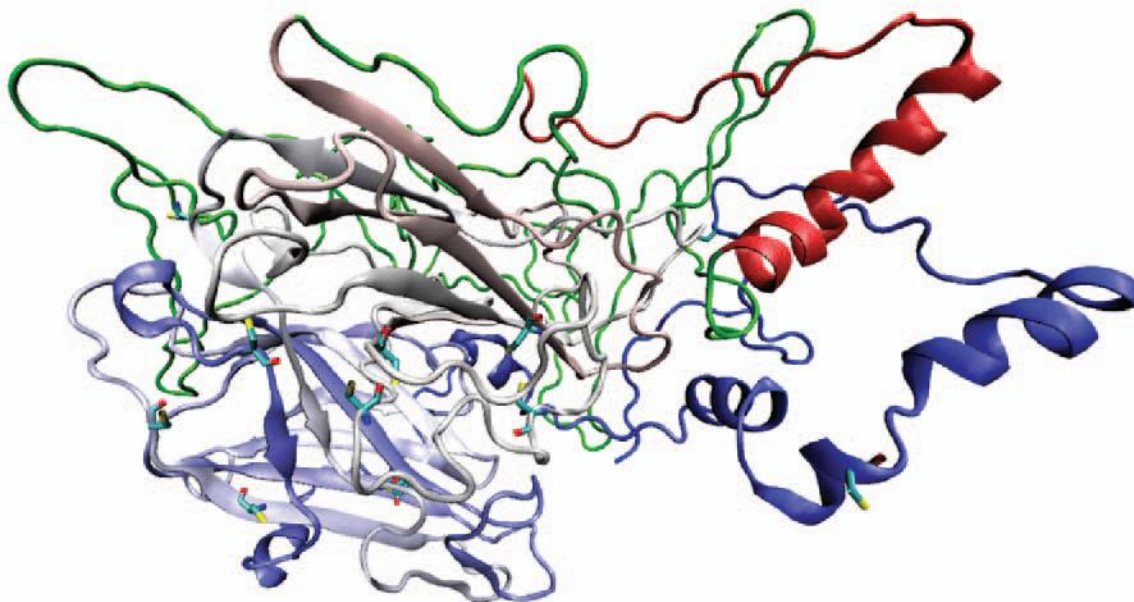
Dopamin beta-hidroksilaza (DBH) (Slika 6) katalizira pretvorbu dopamina u noradrenalin oksidativnom hidroksilacijom (Slika 5) (Tang i sur., 2007) te je sastavni dio kateholaminskog biosintetskog puta, a ujedno i karika koja povezuje dopaminergički i noradrenergički sustav.



Slika 5. Oksidativna hidroksilacija dopamina.

Enzim DBH nalazimo u sinaptičkim vezikulama adrenergičkih i noradrenergičkih neurona središnjeg i perifernog živčanog sustava te u kromafinim stanicama srži nadbubrežne žlijezde (Stewart i Klinman, 1988). Spada u skupinu metaloproteina tipa II i askorbat ovisnih monooksigenaza, a sadrži ukupno osam disulfidnih veza (Robertson i sur., 1994). Aktivni oblik DBH je tetramer molekularne mase 290 kDa (617 aminokiselinskih ostataka) kojeg, vežući se nekovalentnim interakcijama, čine

dva dimera (Stewart i Klinman, 1988). Svoju katalitičku ulogu DBH vrši uz redoks reakciju između askorbata i dva bakrova iona koji pritom prelaze iz  $\text{Cu}^{2+}$  (u stanju mirovanja) u stanje  $\text{Cu}^{+}$  (u pobuđenom stanju) (Blackburn i sur., 1991; Prigge i sur., 2000).



Slika 6. Model ljudske DBH *in silico*. Preuzeto iz (Kapoor i sur., 2011)

U sinaptičkim vezikulama postoje dva oblika DBH, slobodni i oblik vezan za membranu (Belpaire i Laduron, 1968; Winkler i sur., 1970). Slobodna DBH se iz stanice oslobađa egzocitozom (Viveros i sur., 1968; Weinshilboum i sur., 1971) te je stoga DBH mjerljiva i u plazmi i u cerebrospinalnoj tekućini (Goldstein i sur., 2003). Oba oblika enzima imaju sličnu kinetiku (Saxena i Fleming, 1983) te pokazuju sličnu imunoreaktivnost (Slater i sur., 1981) i sastav ugljikohidrata (Fischer-Colbrie i sur., 1982). Glavna razlika između dva oblika DBH je u tome što vezani oblik zadržava hidrofobni signalni slijed (prvih 25 translahiranih aminokiselina), dok ga slobodni ne zadržava (Lamouroux i sur., 1987).

Robertson i sur. (1986) su prvi opisali rijetku kongenitalnu bolest izazvanu nedostatkom DBH karakteriziranu nakupljanjem dopamina i potpunim nedostatkom

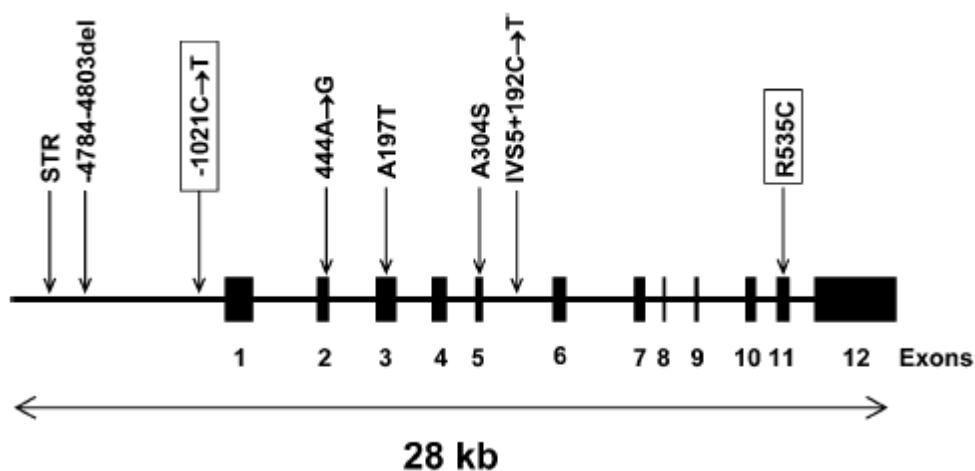
noradrenalina u plazmi. Otkriveno je nekoliko mutacija u genu za DBH koje dovode do aberantne translacije proteina i izazivaju simptome bolesti (Kim i sur., 2011), a upravo je iz težine simptoma (ortostatska hipotenzija, hipotonija skeletnih mišića, hipotermija) (Senard i Rouet, 2006) moguće izvući zaključak o važnosti normalnog djelovanja DBH u organizmu.

#### **1.4.1. POLIMORFIZAM -1021C/T DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZE (rs1611115)**

Gen *DBH* je dugačak 23 kb, ima 12 egzona i nalazi se na dužem kraku devetog kromosoma na položaju 9q34 (Craig i sur., 1988). Aktivnost DBH u plazmi odgovara količini proteina DBH (Weinshilboum i sur., 1973; O'Connor i sur., 1994), prilično je nepromijenjiva tijekom života jedne osobe, a puno manje je pod utjecajem okolišnih (stres i lijekovi), nego genetičkih čimbenika (Weinshilboum i sur., 1975). Aktivnost DBH u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini (CSF) je izrazito nasljedna, čak 90 % u plazmi i 80 % u CSF-u (Oxenstierna i sur., 1986). Zabetian i sur. (2001) su otkrili da je pojava značajno snižene aktivnosti DBH u plazmi povezana s polimorfizmom zamjene jedne baze, citozina u timin, na položaju 1021 bp uzvodno od mjesta početka transkripcije. Opisani polimorfizam izravno utječe na aktivnost DBH u plazmi i to na način da je aktivnost niža kod nosioca alela T, odnosno najniža kod homozigota TT (Zabetian i sur., 2001). U konačnici je polimorfizam -1021C/T gena *DBH* odgovoran za 35 do 52 % varijabilnosti aktivnosti plazmatske DBH kod ljudi (Zabetian i sur., 2001). U genu *DBH* postoji još 11 polimorfizama (Slika 7) za koje je moguće da utječu na aktivnost DBH u plazmi, međutim polimorfizam -1021C/T pokazuje najjaču povezanost (Zabetian i sur., 2003). Budući da je polimorfizam smješten u 5' promotorskoj regiji i zbog činjenice da osobe s niskom aktivnošću imaju nižu koncentraciju enzima DBH, za pretpostaviti je da polimorfizam utječe na uspješnost transkripcije gene *DBH* (Cubells i Zabetian, 2004).

Brojne studije su pokazale da je aktivnost DBH promijenjena u različitim psihijatrijskim poremećajima, ali često se pritom nije uzimao u obzir i polimorfizam -1021 C/T gena *DBH*. Međutim, postoje istraživanja koja uzimaju u obzir i navedeni polimorfizam te se pokazalo da je aktivnost plazmatske DBH značajno snižena kod

ratnih veterana oboljelih od posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP) s genotipom CC u odnosu na ratne veterane istog genotipa i bez PTSP-a (Mustapić i sur., 2007). Također, postoje istraživanja povezanosti polimorfizma -1021 C/T gena *DBH* s nekim neuropsihijatrijskim poremećajima. Jedno od njih je ukazalo na povezanost prisutnosti alela T s Alzheimerovom bolesti (Combarros i sur., 2010).



Slika 7. Polimorfizmi gena za dopamin beta-hidroksilazu. Pruzeto iz (Cubells i Zabetian, 2004)

#### 1.4.2. DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZA I ALKOHOLIZAM

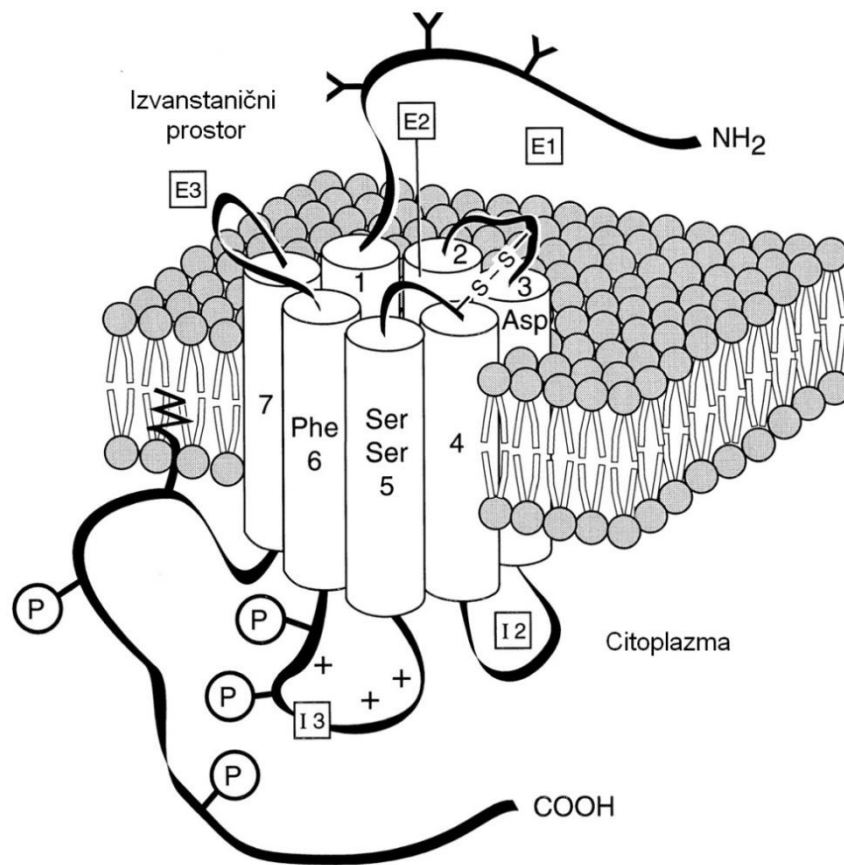
Uz dopaminergički, i noradrenergički sustav ima važnu ulogu u mehanizmima nagrade u mozgu (Ritter i Stein, 1973) te, kad je o ovisnosti o alkoholu riječ, postoje podaci koji ulogu noradrenergičkog stavljaju ispred uloge dopaminergičkog sustava (Amit i Brown, 1982). Postoje istraživanja koja upućuju na značajan doprinos noradrenergičkog sustava na razvoj ovisnosti o alkoholu. Tako je pokazano da akutna primjena etanola mijenja sintezu, pretvorbu i oslobađanje središnjeg noradrenalina (Corrodi i sur., 1966; Karoum i sur., 1976) te aktivnost noradrenergičkih neurona (Pohorecky i Brick, 1988; Verbanck i sur., 1990). Također, suzbijanje

aktivnosti noradrenergičkog sustava, bilo kemijski, bilo korištenjem inhibitora DBH, smanjuje svojevolutnu uporabu alkohola (Brown i sur., 1977). Pronađeno je da miševi s nedostatkom gena za DBH pokazuju smanjen svojevolutni unos etanola (Weinshenker i sur., 2000), što može biti posljedica nedostataka osjećaja nagrade potaknutog etanolom, ali i posljedica povećane osjetljivosti na učinke etanola kao što su pothlađenost i omamljenost (Weinshenker i sur., 2000). Osim toga, aktivacijom adrenergičkih  $\alpha_2$  autoreceptora, koji imaju inhibicijski učinak na adrenergičke neurone, smanjuje se uporaba alkohola, a inhibicijom istih receptora se uporaba alkohola pojačava (Le i sur., 2005). Istraživanja povezanosti alkoholizma i aktivnosti plazmatske DBH pokazala su da je u plazmi osoba ovisnih o alkoholu aktivnost DBH snižena u odnosu na kontrolne ispitanike i to neovisno o polimorfizmu -1021 C/T gena *DBH* (Kohnke i sur., 2002).

### **1.5. DOPAMINSKI RECEPTOR D4 (DRD4)**

Dopaminski receptor tipa 4 (DRD4) je transmembranski protein dug 387 aminokiselina (Van Tol i sur., 1991). Prvi dokaz o postojanju dopaminskih receptora pojavio se 1972. godine u istraživanju koje je pokazalo da dopamin stimulira adenilil ciklazu (Kebabian i Calne, 1979). Dopaminski receptori pripadaju skupini receptora povezanih s proteinom G, eksprimiranih u središnjem živčanom sustavu, s dopaminom kao glavnim ligandom. Postoji 5 tipova dopaminskih receptora (D1 do D5). Oni su raspoređeni u dvije podskupine, a to su receptori nalik D1 receptoru (D1 i D5) i receptori nalik D2 receptoru (D2, D3, D4). Podskupine se razlikuju prema primarnoj sekvenci, farmakološkim karakteristikama te prema načinu prijenosa signala (Neve i sur., 2004). Dopaminski receptori (Slika 8) sadrže 7 transmembranskih domena unutar kojih postoje sličnosti i razlike između dvije podskupine (Civelli i sur., 1993). Na N kraju svakog receptora nalazi se sličan broj aminokiselinskih ostataka i promijenjivi broj N-glikozilacijskih mjesta. Tako D1 i D5 receptori imaju 2, D3 ima 3, a D4 posjeduje 1 potencijalno glikozilacijsko mjesto (Gingrich i Caron, 1993). C kraj proteina je bogat aminokiselinama serin i treonin, oko 7 puta je duži kod grupe D1, a sadrži i cisteinski ostatak koji je očuvan kod svih

receptora vezanih za G protein i za koji se pretpostavlja da ima ulogu u sidrenju citoplazmatskog repa u membrani (Ovchinnikov i sur., 1988; O'Dowd i sur., 1989). Na citoplazmatskoj strani dopaminskih receptora nalaze se 3 citoplazmatske petlje, a dvije podskupine receptora razlikuju se po duljini treće. Tako je ona duža kod D2 nego kod D1 podskupine receptora (Missale i sur., 1998).



Slika 8. Shematski prikaz građe dopaminskih receptora nalik D2 receptoru. Preuzeto iz (Missale i sur., 1998).

Osim toga, razlika između dviju podskupina postoji i u strukturi njihovih gena. Tako geni za receptore D1 i D5 nemaju introna, za razliku od receptora D2, D3 i D4 (Gingrich i Caron, 1993). Svi tipovi dopaminskog receptora spadaju u receptore koji se vežu za G protein što znači da prijenos signala, nakon što se ligand vezao na receptor, započinje aktivacijom G proteina (Kandel i sur., 2006). Dopaminski receptori

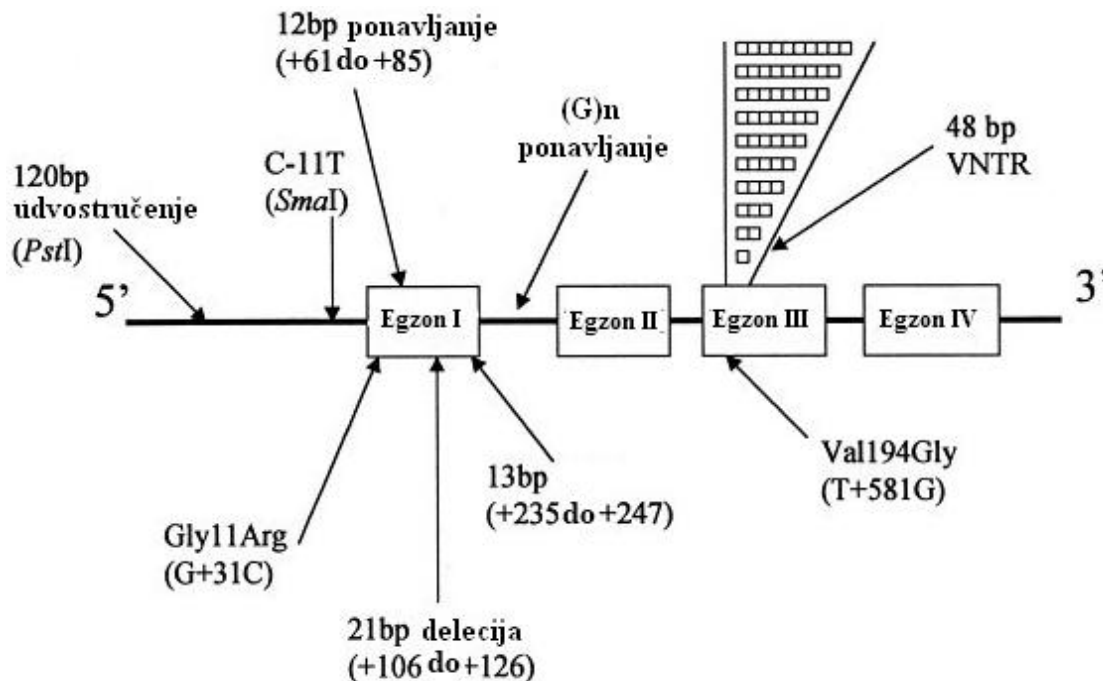
iz skupine nalik D1 receptoru prijenos signala ostvaruju preko proteina G (Gs) koji aktivira adenilil ciklazu, a oni iz skupine nalik D2 receptoru preko proteina G (Gi) koji adenilil ciklazu inhibira (Neve i sur., 2004). Za dopaminski receptor D4 vrijede sva obilježja kao i za ostale dopaminske receptore u skupini nalik receptoru D2.

#### **1.5.1. POLIMORFIZAM VARIJABILNOG BROJA PONAVLJANJA U 3. EGZONU GENA ZA DOPAMINSKI RECEPTOR D4**

Dopaminski receptor tipa 4 (DRD4) je kod ljudi kodiran genom *DRD4* smještenim na dužem kraku jedanaestog kromosoma (regija 11p15.5) (Gelernter i sur., 1992; Petronis i sur., 1993). Takav njegov položaj u telomernoj regiji 11. kromosoma mogao bi biti uzrokom postojanja većeg broja polimorfizama (Slika 9) u 5' regulatornoj regiji, kao i u kodirajućim sekvencama tog gena (Kereszturi i sur., 2006). U kodirajućem dijelu gena, točnije u njegovom trećem egzonu, pronađen je polimorfizam s promijenjivim brojem uzastopnih ponavljanja (eng. variable number of tandem repeats; VNTR) za kojeg se pretpostavlja da bi mogao utjecati na funkciju samog proteina DRD4 (Van Tol i sur., 1991). Gen sadrži 4 egzona i daje različite duljine mRNA ovisno o broju ponavljanja ponavljajuće sekvence u kodirajućem dijelu gena (Van Tol i sur., 1991). Kod ovog polimorfizma ponavljajuća sekvenca je duga 48 bp, a kod ljudi su pronađeni slučajevi s 1 do 10 uzastopnih ponavljanja (Van Tol i sur., 1992; Lichter i sur., 1993; Chang i sur., 1996). Ponavljajuća sekvenca nema uvijek isti slijed nukleotida pa je tako poznato 19 njezinih oblika (Lichter i sur., 1993). Različitim slaganjem tih oblika i broja ponavljanja sekvence od 48 bp nastaje veći broj različitih alela. Tako je do sada otkriveno 29 alela, od kojih su samo neki uobičajeni, tj. zastupljeniji u populaciji, a veći je broj onih alela koji se u populaciji javljaju s manjom učestalošću (Lichter i sur., 1993; Nakatome i sur., 1998). Frekvencija različitih alela razlikuje se između pojedinih populacijskih skupina, ali globalno gledajući, najčešći (64 %) je alel sa 4 ponavljanja (D4.4) za kojim slijedi alel sa 7 ponavljanja (D4.7) s učestalošću od 20 % (Lichter i sur., 1993; Chang i sur., 1996). Regija gena *DRD4* u kojoj postoji VNTR kodira za aminokiseline treće citoplazmatske petlje dopaminskog receptora D4, a upravo je to dio receptora odgovoran za njegovu specifičnost i vezanje s proteinom G (Kazmi i sur., 2000). Pretpostavlja se da opisani VNTR može



utjecati na vezanje dopamina na receptor, na vezu sa sekundarnim glasnikom te na prijenos signala (Van Tol i sur., 1992).



Slika 9. Polimorfizmi gena *DRD4*. Preuzeto iz (Paterson i sur., 1999).

Postoje istraživanja koja dovode u vezu VNTR trećeg egzona gena *DRD4* i različite psihijatrijske poremećaje. Najčešće se ovaj polimorfizam povezuje s poremećajem pažnje s hiperaktivnošću (ADHD) i poremećajima ponašanja kao što su pojačana sklonost ka traženju novotarija (eng. novelty seeking) i rizično ponašanje. Tako je pronađeno da postoji veza između bilo kojeg alela koji nema 4 ponavljanja i ADHD-a (Leung i sur., 2005). Osim toga, Lynn i sur. (2005) su pronašli vezu između alela sa 7 ponavljanja i ADHD-a u odrasloj dobi. Također, postoji studija (Langley i sur., 2004) kojom je pokazano da djeca s ADHD-om, a koja su ujedno nosioci alela sa 7 ponavljanja, pokazuju netočne i impulzivne rezultate neuropsiholoških testova, što se ne može objasniti samo ADHD-om. S druge strane, postoje i rezultati koji negiraju povezanost VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* s ADHD-om (Eisenberg i sur., 2000; Kotler i sur., 2000). Obično se dugi aleli (sa 7 i više ponavljanja) povezuju s

povećanom sklonošću ka traženju novotarija (Benjamin i sur., 1996; Ebstein i sur., 1996), iako postoje i oprečni rezultati (Malhotra i sur., 1996; Gelernter i sur., 1997). Istraživanja rizičnog ponašanja ukazala su na povezanost prisutnosti alela sa 7 ponavljanja s rizičnim ponašanjem kad je o riječ o financijama (Dreber i sur., 2009; Kuhnen i Chiao, 2009).

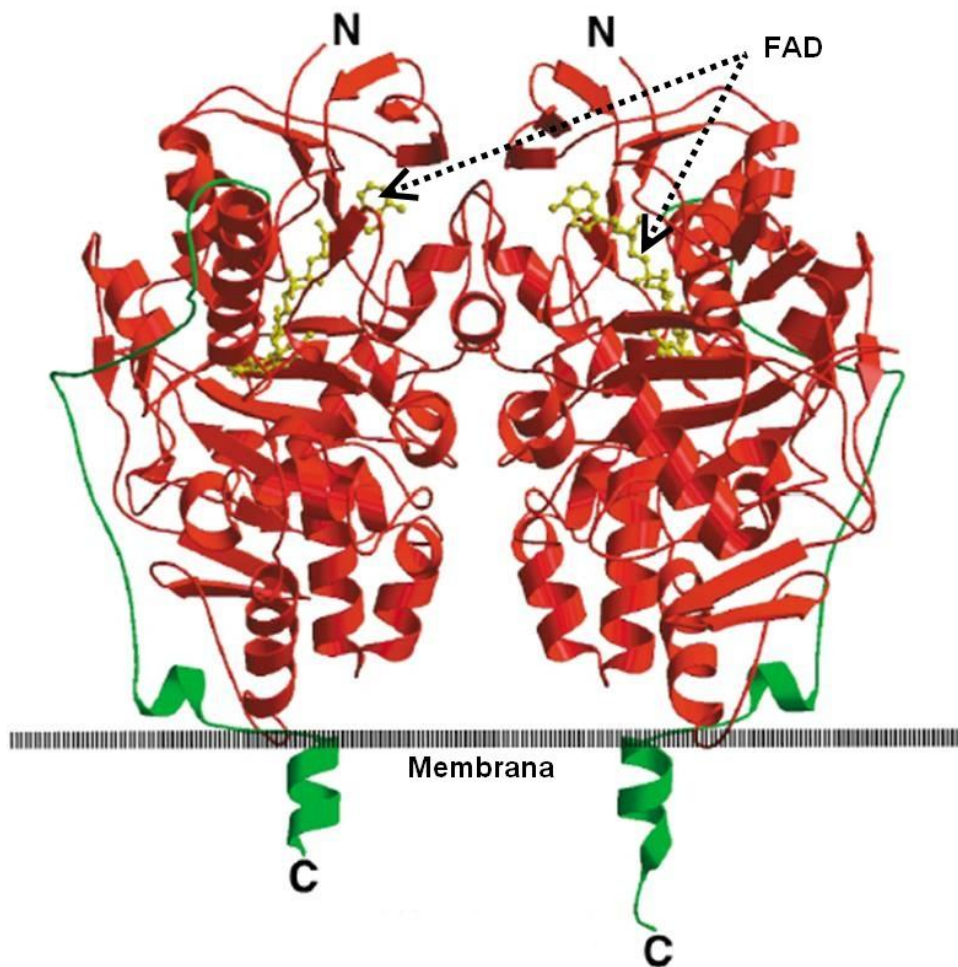
### **1.5.2. DOPAMINSKI RECEPTOR D4 I ALKOHOLIZAM**

Dopaminski receptori, uključujući svih 5 tipova, su izrazito važni za održavanje funkcije dopaminergičkog sustava. Budući da je dopaminergički sustav velikim dijelom uključen u razvoj ovisničkog ponašanja, za pretpostaviti je da DRD4 ima važnu ulogu u nastanku alkoholizma. Kako je već navedeno, VNTR 3. egzona gena *DRD4* se dovodi u vezu s povišenom sklonošću ka traženju novotarija i ADHD-om, a oba poremećaja se smatraju predispozicijom za nastanak ovisnosti o alkoholu (Cloninger, 1987; Biederman i sur., 1998; Maxwell, 2013). Postoje studije koje prisutnost alela s više od 7 ponavljanja dovode u vezu s različitim vrstama ovisnog ponašanja. Tako su Shao i sur. (2006) utvrdili povezanost dugog alela gena *DRD4* s povećanom potrebom za heroinom kod ovisnika o opijatima, a Sobik i sur. (2005) su povezali dugi alel gena *DRD4* s povećanom potrebom za unosom hrane kod osoba s poremećajem prehrane. Također, postoje i studije koje su pokazale da ne postoji povezanost opisanog polimorfizma i nekih drugih ovisnosti, kao što je ovisnost o nikotinu (Babić i sur., 2012). Muramatsu i sur. (1996) su dokazali da je kod osoba ovisnih o alkoholu, u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, zastupljeniji alel s 5 ponavljanja. Također su pronašli da su kod osoba s alkoholizmom i alelom s 5 ponavljanja češće prisutne i druge vrste zlorabe droga.

### **1.6. MONOAMINOOKSIDAZA TIP A (MAO-A)**

Monoaminoooksidaza (MAO) je integralni protein vanjske mitohondrijske membrane (Slika 10), koji svoju ulogu ostvaruje kataliziranjem oksidativne deaminacije različitih neuroaktivnih i vazoaktivnih amina (Bach i sur., 1988). Nalazi se u središnjem živčanom sustavu i u perifernim tkivima, a razlikuju se dva tipa enzima MAO, tip A

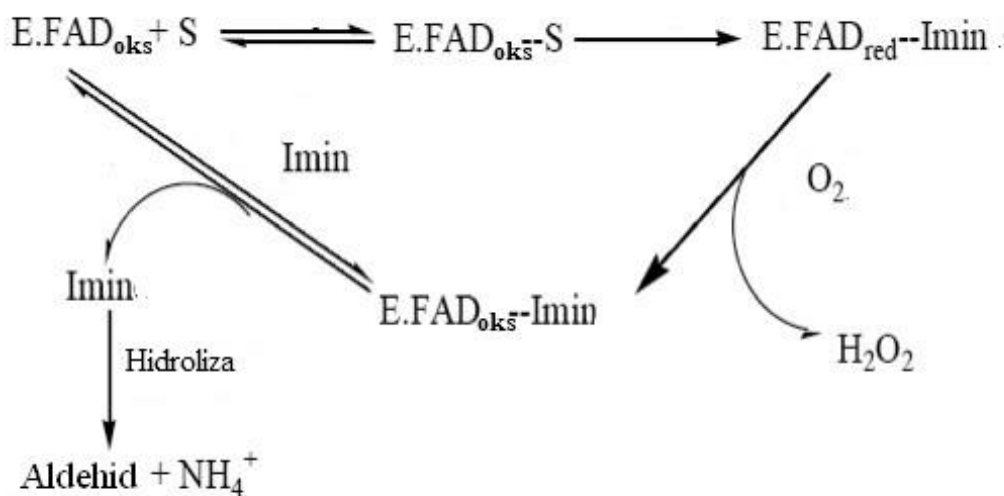
(MAO-A) i tip B (MAO-B) (Bach i sur., 1988). Enzim MAO-B (Slika 10) sadrži 520 aminokiselinskih ostataka koji čine dimer (Binda i sur., 2002), a osim proteinskog dijela posjeduje i koenzim flavin adenin dinukleotid (FAD).



Slika 10. Struktura enzima MAO-B. Preuzeto iz (Binda i sur., 2002).

FAD je kovalentno vezan za sumpor cisteinskog ostatka Cys-39 (Geha i sur., 2002). Svaka podjedinica enzima ima 4 domene (Chen i sur., 1994). Prva domena je N-terminalna domena za koju je karakterističan motiv  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  i za koju se veže ADP. Druga domena je domena koja veže supstrat. U trećoj domeni se nalazi vezno mjesto za FAD. Četvrta domena je C-terminalna domena u kojoj se nalazi transmembranska

$\alpha$  uzvojnica od 39 aminokiselinskih ostataka (Chen i sur., 1994). Reakcija oksidativne deaminacije se odvija u tri stupnja. Prvo dolazi do oksidacije supstrata, koja je popraćena redukcijom FAD-a. Slijedi reoksidacija FAD-a molekularnim kisikom uz nastajanje vodikovog peroksida. Na kraju nastaje imin početnog supstrata koji spontano hidrolizira do aldehida (Slika 11).



Slika 11. Reakcija oksidativne deaminacije. E.FAD=MAO. Preuzeto iz (Binda i sur., 2002).

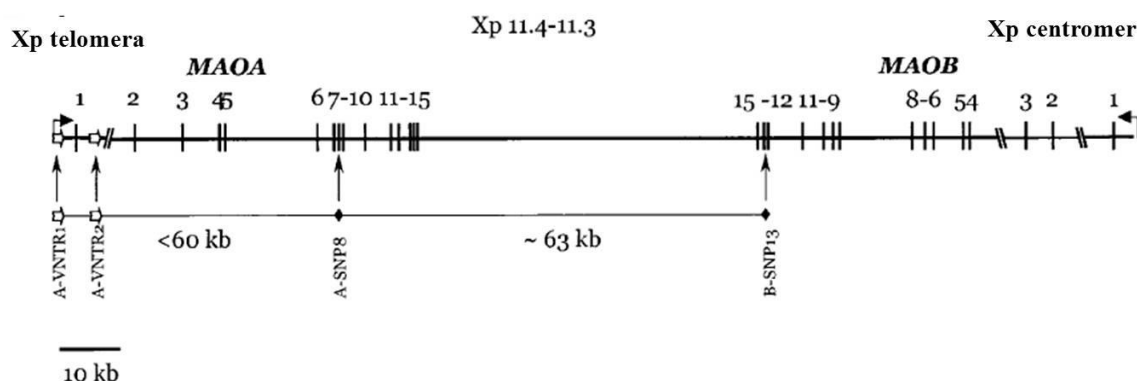
### 1.6.1 TIPOVI MONOAMINOOKSIDAZE

Monoaminooksidaza tipa A je enzim veličine 61 kDa, a monoaminooksidaza tipa B 55 kDa (Escriba i sur., 1994). Osim po veličini, dva tipa enzima razlikuju se i prema supstratima. Glavni supstrati MAO-A su serotonin i noradrenalin, dok su glavni supstrati MAO-B dopamin te velik broj egzogenih amina kao što su feniletilamin i benzilamin (Bach i sur., 1988). Relativni udio MAO-A i MAO-B je specifičan za vrstu i pojedine organe (Fowler i sur., 2002). U mozgu čovjeka je zastupljenija MAO-B, koja se pretežno nalazi u glija stanicama i serotonergičkim neuronima, a MAO-A u kateholaminergičkim neuronima i u manjoj mjeri u glija stanicama (Fowler i sur., 2002). Kod ljudi su MAO-A i MAO-B u većini tkiva koeksprimirani, uz izuzetke poput

placente, u kojoj se uglavnom eksprimira MAO-A (Grimsby i sur., 1990), te trombocita i limfocita u kojima se uglavnom eksprimira MAO-B (Donnelly i Murphy, 1977). Ekspresija enzima MAO se kod čovjeka mijenja tijekom životnih stadija. Tako je u mozgu fetusa zastupljenija MAO-A (Lewinsohn i sur., 1980), dok u mozgu odraslih osoba preteže MAO-B (Garrick i Murphy, 1982). Uzrok tome je dominacija MAO-B u gljiva stanicama koje proliferiraju tijekom cijelog života čovjeka. Prisutnost MAO u trombocitima otkrili su finski znanstvenici 1964. godine (Paasonen i sur., 1964). Trombocitna MAO kod ljudi je isključivo MAO tipa B, a slijed aminokiselina trombocitne MAO-B odgovara slijedu aminokiselina MAO-B u mozgu (Chen i sur., 1993). Postoje male razlike u kinetici trombocitne MAO-B i MAO-B iz mozga, što se objašnjava različitim utjecajem membranskog mikrokoliša (Fowler i sur., 1979).

### 1.6.2. POLIMORFIZAM A/G 13. INTRONA GENA *MAO-B* (rs 1799836)

Dva tipa enzima MAO kodirana su dvama različitim genima smještenim jedan uz drugog na kraćem kraku kromosoma X (regija Xp11.23-11.4) (Grimsby i sur., 1991). Oba gena imaju identično organiziranih 15 egzona i 14 introna, što upućuje na zaključak da su nastali duplikacijom jednog gena (Grimsby i sur., 1991). Poznato je više polimorfizama za oba gena (Slika 12), a najpoznatiji kod *MAO-B* se javlja u ponavljajućoj regiji njezinog 13. introna. To je polimorfizam zamjene jedne baze, adenina u guanin, 36 bp uzvodno od granice 13. introna i 14. egzona (Ho i sur., 1995). Pretpostavlja se da bi, zahvaljujući svom položaju, polimorfizam mogao utjecati na stabilnost i/ili translaciju mRNA MAO-B (Balciuniene i sur., 2002).



Slika 12. Polimorfizmi gena *MAO-A* i *MAO-B*. Preuzeto iz (Balciuniene i sur., 2002).

Neka istraživanja su pokazala da je povišena aktivnost trombocitne MAO-B povezana sa prisutnošću alela G (Garpenstrand i sur., 2000). Suprotno tome, istraživanja MAO-B iz mozga pokazala su sniženu aktivnost enzima u nosioca alela G, pri čemu je razina mRNA gena *MAO-B* ista bez obzira na genotip (Balciuniene i sur., 2002). Zbog činjenice da razina mRNA ostaje ista, a aktivnost se mijenja ovisno o genotipu, pretpostavljeno je da postoji cis-regulatorni element koji je u veznoj neravnoteži s polimorfizmom 13. introna gena za MAO-B i koji utječe na aktivnost enzima (Balciuniene i sur., 2002). Jakubauskiene i sur. (2012) su pokazali da ovaj polimorfizam utječe na postupak izrezivanja introna 13 iz mRNA, s povećanom efikasnošću kod prisutnosti alela A što rezultira uspješnijom ekspresijom. Također, postoje istraživanja koja niječu povezanost genotipa obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* s aktivnošću trombocitne MAO-B (Pivac i sur., 2006; Pivac i sur., 2007). Postoje i literaturni podaci o povezanosti ovog polimorfizma s bolestima u kojima dopaminergički sustav ima vrlo važnu ulogu, kao što je shizofrenija (Gasso i sur., 2008).

### **1.6.3. AKTIVNOST TROMBOCITNE MAO-B**

Na aktivnost trombocitne MAO-B utječu razni čimbenici kao što su spol, dob i pušenje. Pušenje bitno utječe na sniženje aktivnosti enzima (Garpenstrand i sur., 2000; Orelanđ i sur., 2002; Fowler i sur., 2003; Orelanđ, 2004; Costa-Mallen i sur., 2005; Pivac i sur., 2006) te pušači u odnosu na nepušače imaju čak 40% nižu aktivnost MAO-B (Fowler i sur., 1996). Bitan utjecaj na aktivnost ima rasna pripadnost pa se pokazalo da je aktivnost MAO-B niža kod pripadnika bijele, nego crne rase (Groshong i sur., 1978). Također, uočeno je da je kod žena aktivnost trombocitne MAO-B viša nego kod muškaraca (Coccini i sur., 2005; Nenadić Šviglin i sur., 2011) što bi se moglo objasniti činjenicom da se gen *MAO-B* nalazi na kromosomu X te je kod žena prisutan u dvije kopije. Trombocitna MAO-B se često koristi kao lako dostupni periferni pokazatelj različitih poremećaja ponašanja, podložnosti psihijatrijskim poremećajima te neurodegenerativnim bolestima. Osobe s nižom aktivnošću trombocitne MAO-B ostvaruju takve rezultate na testovima značajki

osobnosti koji upućuju na povećanu sklonost ka psihijatrijskim poremećajima (Schalling i sur., 1987). Ratni veterani s PTSP-om imaju znatno povišenu aktivnost trombocitne MAO-B u odnosu na veterane bez PTSP-a (Pivac i sur., 2007). Aktivnost trombocitne MAO-B se dovodi u vezu i sa suicidalnošću pri čemu je ona snižena kod suicidalnih osoba (Roggenbach i sur., 2007b). Također je aktivnost trombocitne MAO-B snižena kod djece s ADHD-om (Nedić i sur., 2010b).

#### **1.6.4. MONOAMINOOKSIDAZA I ALKOHOLIZAM**

Oba tipa monoaminooksidaze, kao dijelovi kateholamineričkog sustava, imaju važnu ulogu u nastanku i razvoju ovisnosti o alkoholu. Još 1979. godine je postavljena tzv. „hipoteza vulnerabilnosti” (Buchsbaum i sur., 1976; Murphy, 1976) kod koje se za sniženu aktivnost trombocitne MAO-B smatra da izaziva povećanu sklonost ka zlorabi droga i društvenoj neprilagođenosti. Istraživanja na miševima su pokazala da miševi s izbačenim genima za MAO-A i MAO-B imaju sniženu tjelesnu masu, izraženije anksiozno ponašanje te povišene razine serotonina, noradrenalina i dopamina u usporedbi s miševima divljeg tipa (Chen i sur., 2004b). Iz navedenog proizlazi da nedostatak funkcije bilo kojeg tipa enzima MAO ima ozbiljne posljedice. Međutim, i pretjerana aktivnost enzima ima negativne posljedice budući da prilikom reakcije oksidativne deaminacije nastaje vodikov peroksid (Slika 11), koji može potaknuti nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) te tako dovesti do oštećenja mitohondrija i apoptoze stanica (Naoi i sur., 2003; Ou i sur., 2010). U promotoru gena *MAO-B* kod ljudi nalaze se 2 skupine preklapajućih veznih mjesta za obitelj transkripcijskih čimbenika Sp/KLF odvojene slijedovima CACCC i TATA kutijom (Zhu i sur., 1992; Wong i sur., 2001). Upravo su to vezna mjesta za protein KLF11 (TIEG2; od eng. Krüppel-like factor, odnosno transforming growth factor-beta early inducible gene 2) koji inače djeluje kao represor spriječavajući transkripciju te rast, razvoj i diferencijaciju stanica (Tachibana i sur., 1997). Kod gena *MAO-B* KLF11 djeluje kao aktivator ekspresije (Ou i sur., 2004). Učinak KLF11 kao aktivatora ekspresije se povećava kad se za njega veže protein gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) (Ou i sur., 2010), a kod štakora sklonih uporabi alkohola je pronađena

povišena razina proteina GAPDH i MAO-B u prefrontalnom korteksu (Ou i sur., 2011). Iz navedenog se može zaključiti da su funkcija MAO-B i ovisnost o alkoholu usko povezani, a uzimajući u obzir i nalaze o utjecaju polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* na uspješnost njegove ekspresije (Jakubauskiene i sur., 2012), nameće se zaključak da MAO-B ima važnu ulogu u alkoholizmu.



## 2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Alkoholizam je izrazito složena i vrlo učestala bolest čija neurobiološka osnova uvelike ovisi o poremećajima dopaminergičkog sustava. Ovo istraživanje pruža bolji uvid u poremećaj funkcije dopaminergičkog sustava u ovisnosti o alkoholu te nudi lako dostupne biomarkere alkoholizma i s alkoholizmom povezanih fenotipova, a sa svrhom postizanja pomaka u prevenciji i individualnom pristupu liječenju alkoholizma kao i drugih oblika ovisnosti.

### Hipoteza

Aktivnost trombocitne monoaminooksidaze tipa B (MAO-B) i distribucija genotipova i alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena za katehol-o-metiltransferazu (COMT), -1021C/T gena za dopamin beta-hidroksilazu (DBH), polimorfizam A/G 13. introna gena za MAO-B i polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja gena za dopaminski receptor D4 (DRD4), razlikuju se između kontrolnih ispitanika i ovisnika o alkoholu te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom. Također, hipoteza je da postoji razlika u ekspresiji ukupnih citoplazmatskih proteina između suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu.

### Opći cilj

Istražiti povezanost alkoholizma i fenotipova povezanih s alkoholizmom s aktivnošću trombocitne MAO-B i polimorfizmima gena za DRD4, COMT, DBH i MAO-B te usporediti ekspresiju ukupnih citoplazmatskih proteina između suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu.

### Specifični ciljevi

- Odrediti distribuciju alela i genotipova obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* u osoba s alkoholizmom i zdravih osoba te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

- Odrediti distribuciju alela i genotipova obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* u osoba s alkoholizmom i zdravih osoba te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
- Odrediti distribuciju alela i genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* u osoba s alkoholizmom i zdravih osoba te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
- Odrediti distribuciju alela i genotipova obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* u osoba s alkoholizmom i zdravih osoba te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
- Odrediti aktivnost trombocitne MAO-B u osoba s alkoholizmom i zdravih osoba te unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
- Odrediti ekspresiju ukupnih citoplazmatskih proteina u suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu.

# 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. ISPITANICI

U istraživanje je bilo uključeno 690 ispitanika oba spola s postavljenom dijagnozom ovisnosti o alkoholu liječenih u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče, Zagreb. Dijagnoza ovisnosti o alkoholu postavljena je temeljem kriterija prema Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 4. izdanje (DSM-IV) (APA, 2000). Kriterij za redovito i prekomjerno pijenje je bilo dnevno konzumiranje najmanje 70 g etanola kroz vremensko razdoblje od najmanje 6 mjeseci.

Za svakog ispitanika je određena prisutnost sljedećih fenotipova povezanih s alkoholizmom: ustezanje (vegetativna hiperaktivnost, tremor ruku, mučnina, anksioznost, depresivnost, psihomotorna agitacija), agresivno ponašanje, težina ovisnosti o alkoholu, ustezanje s delirium tremensom (DT) (tahikardija, znojenje, groznica, tremor, anksioznost, sužena svijest, dezorijentiranost, prisutnost halucinacija i paranoidnih ideja), komorbidna depresija, trenutno (u zadnjih tjedan dana) suicidalno ponašanje, pokušaj suicida tijekom života, životna dob u kojoj je pacijent započeo s prekomjernom uporabom alkohola (prije (rani početak) ili poslije (kasni početak) 25. godine života). Prisutnost fenotipova povezanih s alkoholizmom je određena pomoću:

- a) strukturnog upitnika za anamnezu alkoholizma
- b) Hamiltonove ocjenske ljestvica za depresiju (Hamilton, 1960)
- c) upitnika za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođenog prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju (Brown i sur., 1979)
- d) ljestvice općih kliničkih dojmova (Guy, 1976)

Strukturni upitnik za anamnezu alkoholizma sadrži pitanja koja se odnose na simptome ustezanja i DT-a, životnu dob u kojoj je započela prekomjerna uporaba alkohola, pokušaj suicida tijekom života i javljanje depresije. Javljanje depresije povezano s prekomjernom uporabom alkohola uzimano je u obzir samo ako je

pacijent zbog nje bio bolnički ili ambulantno liječen antidepresivima. Dobiveni podaci su uspoređeni s podacima koje su dali članovi obitelji i podacima iz medicinske dokumentacije.

Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (HDRS, od eng. Hamilton Depression Rating Scale) namijenjena je procjeni ozbiljnosti depresivnih simptoma u razdoblju od zadnjih tjedan dana kod osoba s dijagnosticiranom depresijom. Ispunjava je liječnik psihijatar, a sastoji se od 17 pitanja koja se odnose na sljedeće simptome: depresivno raspoloženje, osjećaj krivnje, samoubilački porivi, smetnje usnivanja, smetnje prosnivanja, jutarnje smetnje spavanja, rad i djelatnost, psihomotorna inhibicija, agitacija, tjeskobnost (psihička), tjeskobnost (tjelesna), gastrointestinalni simptomi, opći tjelesni simptomi, genitalni simptomi, hipohondrijski simptomi, gubitak tjelesne težine i uvid u bolest. Svaka stavka upitnika može nositi najviše 3 ili 5 bodova, ovisno o stavci. Ostvarenih 0 do 7 bodova znači normalno stanje, 8-13 blagu depresiju, 14-18 umjerenu, 19-22 ozbiljnu, a više od 23 boda podrazumijevaju vrlo ozbiljnu depresiju. Stavka 3 na ljestvici HDRS odnosi se na procjenu trenutnog suicidalnog ponašanja pri čemu 0 ostvarenih bodova znači da osoba nije suicidalna, a više od 0 bodova pokazuje suicidalno ponašanje.

Upitnik za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođen prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju ispunjava liječnik psihijatar u razgovoru s pacijentom, a omogućuje izvođenje zaključaka o sljedećim kategorijama ponašanja: problemi s disciplinom u vojsci, problemi s disciplinom na poslu, napadi na druge osobe, uništavanje vlasništva (nekretnine), uhićenje za napadačko ponašanje, uhićenje za druge zločine i zločini koji nisu rezultirali uhićenjem. Pritom se nasilno ponašanje u dobi ispod 15 godina ne uzima u obzir. U svakoj kategoriji nepojavljivanje se boduje s 0, jedan događaj s 1, dva ili više događaja s 2, tri, nekoliko ili česti s 3, a brojni sa 4 boda. Za ispitanike s ukupno 8 i više bodova procjenjuje se da imaju povijest agresivnog ponašanja.

Ljestvica općih kliničkih dojmova (CGI, od eng. Clinical Global Impression) također je namijenjena ispunjavanju od strane liječnika psihijatra te se koristi kao mjera

ozbiljnosti simptoma (CGI-S), odgovora na terapiju (CGI-I) i uspješnosti terapije (CGI-E) kod pacijenata s mentalnim poremećajima. CGI-S je ljestvica koja omogućuje procjenu ozbiljnosti bolesti pacijenta na temelju liječnikovog iskustva s određenom dijagnozom. Pritom se ocjena 1 daje pacijentu koji uopće nije bolestan, 2 granično bolesnom, 3 blago bolesnom, 4 umjereno bolesnom, 5 značajno bolesnom, 6 ozbiljno bolesnom i 7 izrazito bolesnom.

Skupinu kontrolnih ispitanika činilo je 580 zdravih muškaraca i žena čiji uzorci krvi su prikupljeni u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu. Prije samog vađenja krvi, ispitanici su podvrgnuti ispitivanju upitnikom s pitanjima o njihovoj detaljnoj anamnezi te navikama pušenja i uporabe alkohola. Kriteriji isključenja iz studije su bili: trenutno prisutna terapija lijekovima, prisutnost nekog od psihijatrijskih poremećaja u prošlosti ili trenutno, zloraba droga ili alkohola, pokušaj samoubojstva i postojanje psihijatrijskih oboljenja kod članova obitelji što se određuje na temelju pitanja o mentalnom zdravlju roditelja, djedova i baka, braće i sestara te djece ispitanika.

Svim ispitanicima se u detalje objasnila svrha i postupak istraživanja te se uzorkovanje vršilo tek nakon što su ispitanici dobrovoljno potpisali informirani pristanak. Sva istraživanja su se provela uz odobrenje Etičkih povjerenstva Psihijatrijske bolnice Vrapče i Kliničke bolnice Dubrava i uz potpunu suradnju i primjereno razumijevanje sudionika. Istraživanja su bila potpuno usklađena s etičkim standardima postavljenim Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine.

### **3.2. OBRADA UZORAKA KRVI**

Ispitanicima su vađeni uzorci krvi (8 ml) u plastične štrcaljke s 2 ml antikoagulansa ACD (od eng. acid citrat dextrose) na tašte u prijepodnevnim satima ili za vrijeme redovnog pregleda (kontrolni ispitanici) ili nakon perioda trijeznjena (ovisnici o alkoholu). Uzorci su unutar 24 sata dostavljeni u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković gdje su obrađeni serijom centrifugiranja kojom se iz pune krvi prvo izdvaja plazma (3 min na 1100 x g), a zatim iz plazme trombociti (15 min na 5087 x g) koji služe za određivanje

aktivnosti trombocitne monoaminooksidaze tipa B. Plazma, trombociti i preostali dio krvi s leukocitima pohranjeni su na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3. IZDVAJANJE GENOMSKE DNA IZ KRVI METODOM ISOLJAVANJA**

Miller i sur. (1988) su uspostavili metodu izdvajanja genomske DNA na kojoj se temelji metoda korištena za izdvajanje genomske DNA iz uzoraka krvi ispitanika ove studije.

#### **KEMIKALIJE**

- pufer za lizu eritrocita: 10 mM Tris (Sigma Aldrich, SAD), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); pH 7.6
- pufer SE: 75mM NaCl, 25mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 8
- 5 M NaCl
- proteinaza K (20 mg/ml) (TaKaRa, SAD)
- 10% natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, SAD)
- etanol (Kemika, Hrvatska) 96%, 70%
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- pufer TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7.6

#### **POSTUPAK**

Nakon odmrzavanja, uzorak se 20 min miješa na valjkastoj mješalici te se nakon toga iz njega odvoji 300  $\mu\text{l}$  krvi u Eppendorf mikroepruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka) te se doda 900  $\mu\text{l}$  pufera za lizu eritrocita (RCLB, engl. red cell lysis buffer), dobro promiješa vorteks mješalicom i ostavi stajati 10 min na ledu. Nakon toga slijedi postupak centrifugiranja ( $13000 \times g$ , 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) pri čemu lizirani eritrociti ostanu u supernatantu, a netaknuti leukociti se istalože. Supernatant se ukloni, a talog se po potrebi pročišćava resuspendiranjem u RCLB-u (900  $\mu\text{l}$ ) i centrifugiranjem ( $13000 \times g$ , 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Na dovoljno čisti talog dodaje se 300  $\mu\text{l}$  SE pufera i 30  $\mu\text{l}$  10%-tnog SDS-a, lagano se promiješa okretanjem mikroepruvete te se doda još 1,5  $\mu\text{l}$  proteinaze K. Slijedi inkubacija uzoraka u grijaćem bloku 2 sata na  $56^{\circ}\text{C}$  pri čemu

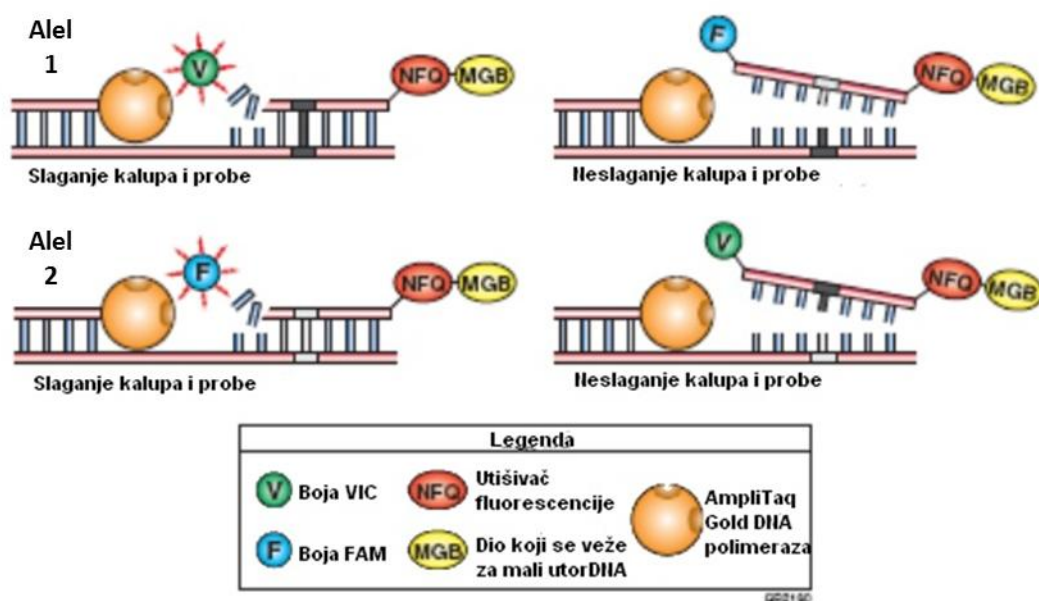
leukociti liziraju. Nakon inkubacije, dodaje se 110 µl 5 mM NaCl i sve skupa promiješa vorteks mješalicom 10 s. Slijedi centrifugiranje (13000 x g, 5 min, sobna temperatura) kojim se DNA dobije u supernatantu, a ostali stanični dijelovi su u talogu. Supernatant se prelije u novu sterilnu Eppendorf mikroeprijetu, dodaju se 2 volumna udjela (≈800 µl) hladnog izopropanola te se lagano promiješa. Pritom dolazi do taloženja DNA te je ona vidljiva u obliku netopivog spleta. Centrifugiranjem 2 min na 13000 x g, talog se spušta na dno mikroeprijetu. Supernatant se odlije, a talog ispire dodatkom 200 µl 75 %-tnog etanola i centrifugiranjem 2 min na 13000 x g pri sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije, mikroeprijetu dodatno posuše prislanjanjem na papir i sušenjem 20 min s otvorenim poklopcem u digestoru. Osušenom talogu se dodaje 100 µl TE pufera te se ostavi preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se DNA u potpunosti otopila. Nakon toga uzorci se mogu pohraniti na +4°C.

### **3.4. GENOTIPIZACIJA OBZIROM NA POLIMORFIZME GENA *COMT*, *DBH* I *MAO-B***

Polimorfizmi Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* (identifikacijski broj u bazi podataka db SNP NCBI: rs4680), -1021C/T gena *DBH* (identifikacijski broj u bazi podataka db SNP NCBI: rs1611115) te polimorfizma G/A 13. introna gena *MAO-B* (identifikacijski broj u bazi podataka db SNP NCBI: rs1799836) su polimorfizmi zamjene jedne baze. Određivanje genotipa obzirom na ove polimorfizme vršeno je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR; od eng polymerase chain reaction) u stvarnom vremenu (real time PCR) korištenjem komercijalno dostupnih kompleta za određivanje polimorfizama jedne baze tvrtke Applied biosystems (SAD) i uređaja „ABI Prism 7000 Sequence Detection System” (Applied Biosystems, SAD).

Metoda, prikazana shematski slikom 13, se temelji na hibridizaciji fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba i njima komplementarnih polimorfničkih mjesta na genomskoj DNA. Svaka od dviju proba u reakcijskoj smjesi je na 5' kraju obilježena jednom fluorescentnom bojom (VIC i FAM) i specifično se veže za slijed koji sadrži 1 promijenjenu bazu. Na 3' kraju obje probe imaju vezan utišivač fluorescencije (NFQ,

od eng. nonfluorescent quencher). Kada je proba vezana za komplementarni slijed na lancu DNA, koji ujedno služi i kao kalup u lančanoj reakciji polimeraze, utišivač i boja se nalaze na takvoj udaljenosti koja omogućuje utišivaču da spriječi fluorescenciju boje. Prilikom produljivanja početnica termostabilna DNA polimeraza pocijepa vezane probe, boja više nije pod utjecajem utišivača te počinje fluorescirati što se bilježi uređajem kao signal. Jačina i vrsta dobivenog signala omogućuje određivanje genotipa. Fluorescencija jedne boje upućuje na homozigotnost jednog alela, a fluorescencija obje boje upućuje na prisutnost oba alela, tj. heterozigotnost.



Slika 13. Shematski prikaz metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (preuzeto od Applied Biosystems, SAD).

Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prilikom genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu prikazani su u tablicama 2 i 3.



Tablica 2. Sastav reakcijske smjese prilikom genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

Sastojak reakcijske smjese	Volumen <sup>1</sup> /μl	
	DBH i MAO-B	COMT
TaqMan univerzalna matična mješavina	12,5	12,5
TaqMan mješavina proba i početnica <sup>2</sup>	0,625	1,25
DNA (1-20 ng) otopljena u vodi	11,25	11,25
Ukupni reakcijski volumen	25	25

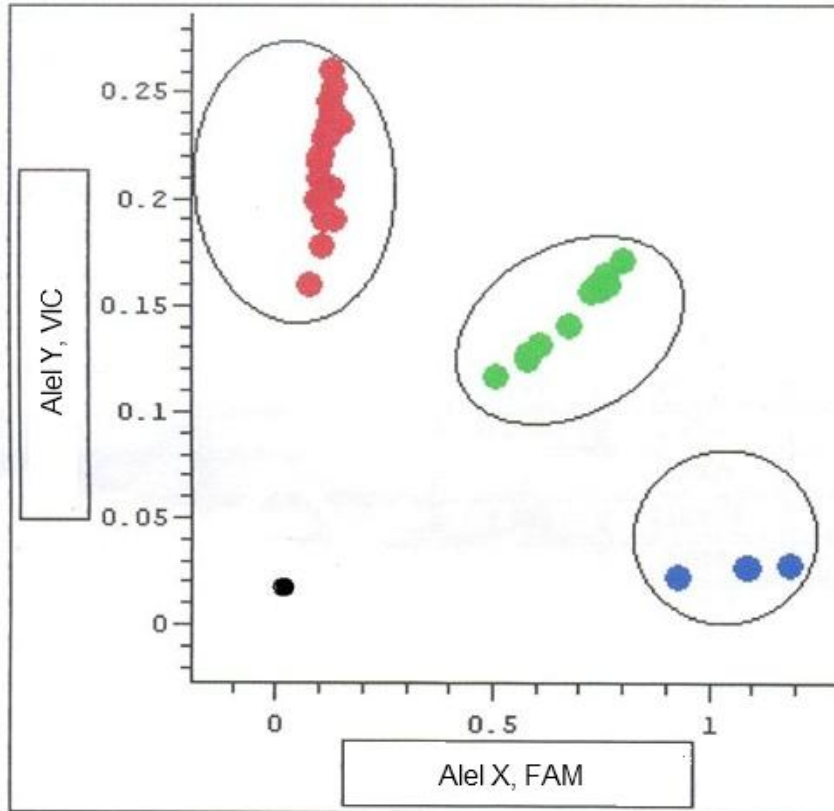
<sup>1</sup>Volumen se prilagođava razmjerno ukupnom volumenu reakcijske smjese

<sup>2</sup>Pristupni broj kod Applied Biosystems: C\_25746809\_50 za rs4680 (COMT), C\_2535786\_10 za rs1611115 (DBH) i C\_8878790\_10 za rs1799836 (MAO-B).

Tablica 3. Uvjeti reakcije prilikom genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

Korak	DBH i MAO-B		COMT	
	Temperatura	Vrijeme	Temperatura	Vrijeme
Početni koraci	95 °C	10 min	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s	92 °C	15 s
Vežanje i produljenje početnica	60 °C	1 min	60 °C	90 s
<i>Broj ciklusa</i>	40		50	

Prije samog početka reakcije umnažanja genomske DNA, uređaj bilježi početnu, a po završetku reakcije, konačnu razinu fluorescencije u reakcijskoj smjesi. Računalni program daje prikaz razine fluorescencije za svaku fluorescentnu boju, a konačan prikaz rezultata uključuje ispis razine fluorescencije za svaku boju te grafički prikaz kao na slici 14.



Slika 14. Grafički prikaz rezultata genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu. Na osima x i y su vrijednosti fluorescencije nastale za vrijeme reakcije. Probe prikazane na osi x obilježene su bojom FAM, a one na osi y bojom VIC. Crveni krugovi označavaju homozigote za jedan, a plavi za drugi alel. Zeleni krugovi označavaju heterozigote kod kojih se javlja podjednaka fluorescencija obiju boja. Crni krug označava negativnu kontrolu kod koje, uslijed nedostatka kalupa, ne dolazi do reakcije.

### 3.5. GENOTIPIZACIJA OBZIROM NA POLIMORFIZAM GENA *DRD4*

Određivanje genotipa obzirom na polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja u 3. egzonu gena *DRD4* provedeno je metodom PCR nakon koje je uslijedilo razdvajanje produkata reakcije elektroforezom na gelu agaroze i vizualizacija DNA pod UV svjetlom.

### KEMIKALIJE ZA PCR

- 5x PCR pufer (Invitrogen, SAD)
- 10  $\mu$ M oligonukleotidne početnice (Sigma Aldrich; SAD)  
5'-AGGACCCTCATGGCCTTG-3'  
5'-GCGACTACGTGGTCTACTCG-3'
- 2,5 mM (svaki) dNTP (Roche, Švicarska)
- 5U/ $\mu$ l Tfi DNA polimeraza (Invitrogen, SAD)

### KEMIKALIJE ZA ELEKTROFOREZU NA GELU AGAROZE

- Agarozna (Sigma Aldrich, SAD)
- 100 bp DNA standard (Invitrogen, SAD)
- 6x pufer za nanošenje (36% glicerol (Kemika, Hrvatska), 0,05% bromfenol modri (Sigma Aldrich, SAD); 0,05% ksilen glikol (Sigma Aldrich, SAD), 30 mM EDTA)
- 1x TAE pufer (10 mM Tris, 5 mM natrij-acetat (Kemika, Hrvatska), 0,5 mM EDTA)
- 10000x Syber safe boja za vizualizaciju DNA (Invitrogen, SAD)

Sastav reakcijske smjese i uvjete reakcije prikazuju tablice 4 i 5.

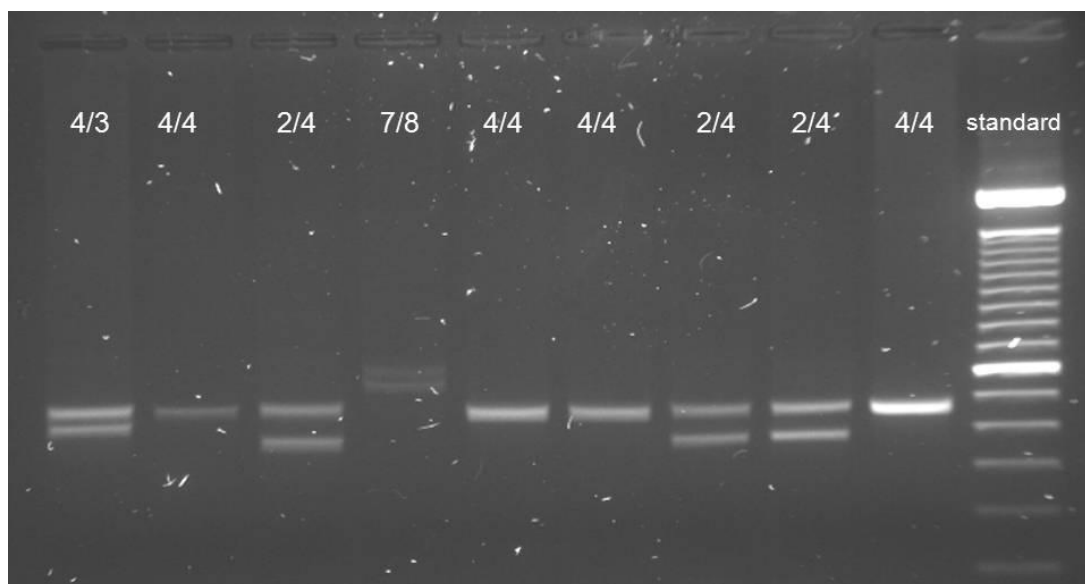
Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju metodom PCR u ukupnom volumenu 15  $\mu$ l

<b>Sastojak reakcijske smjese</b>	<b>Količina</b>
Genomska DNA	150 ng
Uzvodna i nizvodna početnica	0,3 $\mu$ M
dNTP (svaki)	0,2 mM
5x PCR pufer	1x
Tfi DNA polimeraza	1 U

Tablica 5. Uvjeti reakcije kod genotipizacije metodom PCR

Korak	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	94°C	10 min
Denaturacija	94°C	30 s
Vežanje početnica	54°C	30 s
Produljivanje početnica	72°C	1 min
Konačno produljivanje početnica	72°C	10 min
<i>Broj ciklusa</i>	35	

Razdvajanje umnoženih odsječaka DNA vrši se na 2 % agaroznom gelu ukupnog volumena 70 ml. U gel se prije njegova stvrdnjavanja dodaje Syber safe boja do konačne koncentracije 1x. Elektroforeza se odvija pri naponu od 90 V uz trajanje od 45 min. Vizualizacija odsječaka DNA razdvojenih elektroforezom vrši se izlaganjem gela UV svjetlu na transiluminatoru pri čemu je izgled gela prikazan slikom 15.



Slika 15. Gel agaroze kod genotipizacije metodom PCR. Duljina odsječka umnoženog reakcijom ovisi o broju ponavljanja ponavljajuće sekvence u polimorfnom mjestu. U slučaju 2 ponavljanja fragment je dugačak 378 bp. Za svako jedno ponavljanje više, duljina fragmenta raste za 48 bp. Tako su sljedeći najčešći aleli, s 4 i 7 ponavljanja, dugi 474 i 618 bp.

### **3.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI TROMBOCITNE MONOAMINOOKSIDAZE TIP A (MAO-A)**

Početni materijal za određivanje aktivnosti trombocitne MAO-B je talog trombocita dobiven obradom uzoraka pune krvi. Aktivnost se određuje spektrofotometrijski uz kinuramin kao supstrat metodom po Krajl-u (Krajl, 1965).

#### KEMIKALIJE

- 0,736 mM kinuramin (Sigma Aldrich, SAD)
- 2 mM 4-hidroksikinolin (Sigma Aldrich, SAD)
- kiseli fosfatni pufer (0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) (Kemika, Hrvatska)
- lužnati fosfatni pufer (0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) (Kemika, Hrvatska)
- 1 M NaOH (Kemika, Hrvatska)

#### POSTUPAK

Talog trombocita se odmrzne na sobnoj temperaturi te se trombociti razaraju soniciranjem (20 kHz, amplituda  $8 \times 10^{-3}$  mm kroz 60 s). Kod svakog određivanja aktivnosti trombocitne MAO-B potrebni su prazna proba i standardi koji se priređuju u duplikatu. Kako je razgradni produkt kinuramina 4-hidroksikinolin, kao standardi se koriste 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM, 0,562 nM i 0,313 nM vodena otopina 4-hidroksikinolina. Za praznu probu koristi se sonicirani talog trombocita. U staklenu epruvetu se dodaje 100 µl soniciranog taloga trombocita (uzorak i prazna proba) ili po 100 µl standarda svake koncentracije. Tome se dodaje 800 µl (uzorci i prazne probe) odnosno 900 µl (standardi) fosfatnog pufera (kiseli fosfatni pufer kojem je lužnatim fosfatnim puferom pH podešen na 7,4) te se sve izmiješa vorteks miješalicom. Nakon toga se samo u epruvete s uzorcima dodaje 100 µl kinuramina. Epruvete s praznom probom, standardima i uzorcima se stavljaju sat vremena na inkubaciju u vodenu kupelj na 37°C. Nakon inkubacije reakcija razgradnje kinuramina se zaustavlja dodatkom 2 ml hladne 1M otopine NaOH. U epruvete s praznim probama se naknadno dodaje 100 µl kinuramina. Intenzitet fluorescencije u uzorcima,

standardima i praznim probama se mjeri uređajem Varian Cary Eclipse (Agilent technologies, SAD) uz ekscitaciju pri 310 nm i emisiju pri 380 nm. Aktivnost trombocitne MAO-B izračuna se prema fluorescenciji poznatih koncentracija 4-hidroksikinolina u standardima, a izražava se kao količina 4-hidroksikinolina nastalog razgradnjom kinuramina tijekom jednog sata u odnosu na količinu ukupnih proteina u trombocitima. Zato je potrebno provesti i određivanje koncentracije ukupnih proteina u istom uzorku u kojem se određuje i aktivnost trombocitne MAO-B.

### **3.6.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U TROMBOCITIMA**

Koncentracija ukupnih proteina u soniciranom talogu trombocita određuje se metodom prema Lowryu (Lowry i sur., 1951).

#### **KEMIKALIJE**

- 0,1 M HCl (Kemika, Hrvatska)
- 0,5% goveđi serumski albumin (BSA) (Sigma Aldrich, SAD)
- ABC otopina (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika, Hrvatska), 1% CuSO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska), 2% K-Na tartarat (Kemika, Hrvatska))
- reagens Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, SAD)

#### **POSTUPAK**

Određivanje koncentracije proteina se vrši u triplicatu s otopinama BSA (25, 12,5 i 6,25 mg) u 0,1 M HCl kao standardima. Kao prazna proba koristi se 0,1 M HCl. U staklenu epruvetu se dodaje 10 µl soniciranih trombocita i 2 ml ABC otopine te se ostavi stajati 10 min na sobnoj temperaturi. Tome se dodaje 200 µl reagensa folin-Ciocalteu razrijeđenog vodom u omjeru 1:1. Nakon 30 minuta spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija smjese pri valnoj duljini od 700 nm. Prazne probe i standardi prolaze isti postupak kao i uzorci. Iz apsorbancije smjese, a prema apsorbanciji poznatih koncentracija proteina u standardima, izračuna se koncentracija proteina u uzorcima.

### **3.7. ANALIZA UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA ISPITANIKA OVISNIH O ALKOHOLU PODIJELJENIH PREMA POKUŠAJU SUICIDA**

Za potrebe proteomske analize, nužno je istovremeno uzorkovanje onih uzoraka koji zajedno ulaze u postupak analize i koji se pri analizi rezultata međusobno uspoređuju. Tako je uvijek vršeno istodobno uzorkovanje jednog suicidalnog ispitanika (pokušao izvršiti suicid) i jednog nesuicidalnog ispitanika ovisnog o alkoholu. Uzorci su zatim obrađeni kao i svi ostali uzorci (serijom centrifugiranja odvojena je plazma i iz plazme trombociti), ali je plazma bez trombocita, umjesto na -20°C, pohranjena na -80°C.

#### **3.7.1. PRIPREMA UZORAKA**

Kako bi se uklonili (postupak osiromašenja) visoko zastupljeni proteini iz plazme koji ometaju precizniju izolaciju i identifikaciju ostalih plazmatskih proteina, uzorci su kromatografski pročišćeni korištenjem afinitetnih kolonica (Agilent human 14 multiple affinity removal spin cartridge) tvrtke Agilent Technologies (SAD). Pritom se istovremeno vrši odsoljavanje, koncentriranje i razdjeljivanje uzorka. Za dodatno koncentriranje uzoraka korišteni su filteri Microcon YM-10 (Millipore, SAD).

#### KEMIKALIJE

- aceton (Kemika, Hrvatska)
- pufer MM1 (6M urea (Sigma Aldrich, SAD), 4% CHAPS (Sigma Aldrich, SAD), 10 mM Tris, 5 mg/ml D-sorbitol (Sigma Aldrich, SAD))
- pufer A (Agilent Technologies, SAD)

#### POSTUPAK

Kako bi se istaložili proteini iz plazme, 300 µl uzorka pomiješa se s 1200 µl acetona i ostavi preko noći na -20°C. Nakon toga smjesa se centrifugira 10 min na 10800 x g, doda se 300 µl pufera MM1 i ostavi 30 min u termomikseru. Slijedi sonikacija 3 puta po 10 sekundi i centrifugiranje 10 min na sobnoj temperaturi pri 10800 x g. Kod postupka osiromašenja ili deplecije (eng. depletion) 200 µl dobivenog supernatanta

se pomiješa s 2800 µl pufera A. Od toga se na afinitetnu kolonicu nanosi 200 µl smjese, te se prema protokolu koji nalaže Agilent Technologies provodi 15 ciklusa centrifugiranja (2,5 min na 100 x g) i ispiranja kolonice puferom A (400 µl) pri čemu se skupljaju frakcije. Dobivene frakcije se ujedine i uzorak se dalje koncentrira filterima Microcon YM-10 (granična molekularna masa 10 kDa) uz centrifugiranje na sobnoj temperaturi pri 4100 x g do volumena od oko 100 µl. Uzorak, koji sada sadrži samo proteine veće od 10 kDa, odsoljava se tako da se istaloži centrifugiranjem 30 min pri 4100 x g i ispere dva puta puferom MM1. Koncentracija proteina u uzorku određuje se pomoću uređaja NanoDrop 1000 (Thermo scientific, SAD).

### **3.7.2. DVODIMENZIONALNA GEL ELEKTROFOREZA**

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) se koristi za analizu složenih proteinskih smjesa koristeći dvije metode elektroforeze, izoelektrično fokusiranje (IEF) i denaturirajuću elektroforezu u poliakrilamidnom gelu s natrij-dodecilsulfatom (SDS-PAGE). Izoelektrično fokusiranje se izvodi na imobiliziranim nosačima gradijenta pH (IPG, od eng. immobilized pH gradients), pri čemu se proteini razdvajaju na temelju njihove izoelektrične točke. Kad je postupak pripreme uzorka završen, 40 µg ukupnih proteina se nadopuni do 350 µl radnim puferom M1 (7M urea, 2M tiourea (Sigma Aldrich, SAD), 4 % CHAPS) kojem su dodani 1% ditiotreitol (DTT) (Sigma Aldrich, SAD) i inhibitori proteaza (Roche, Švicarska). U otopljeni uzorak dodaje se bromfenol modrilo te se pipetom nanosi na IPG-trake duge 17 cm s gradijentom pH 3-10 (Bio Rad, SAD). Izoelektrično fokusiranje provedeno je na aparatu Protean IEF (Bio Rad, SAD) pri približno 90 000 Vh.

Prije razdvajanja proteina u drugoj dimenziji potrebno je ekvilibrirati IPG-trake inkubacijom od 15 min u puferu za ekvibraciju (50 mM Tris; pH 8,8, 6 M urea, 99.5 % glicerol, 2 % SDS, bromfenol modrilo s 1 % DTT), a zatim 15 minuta u istom tom puferu koji umjesto DTT sadrži 2,5 % jodoacetamid (Sigma Aldrich, SAD).



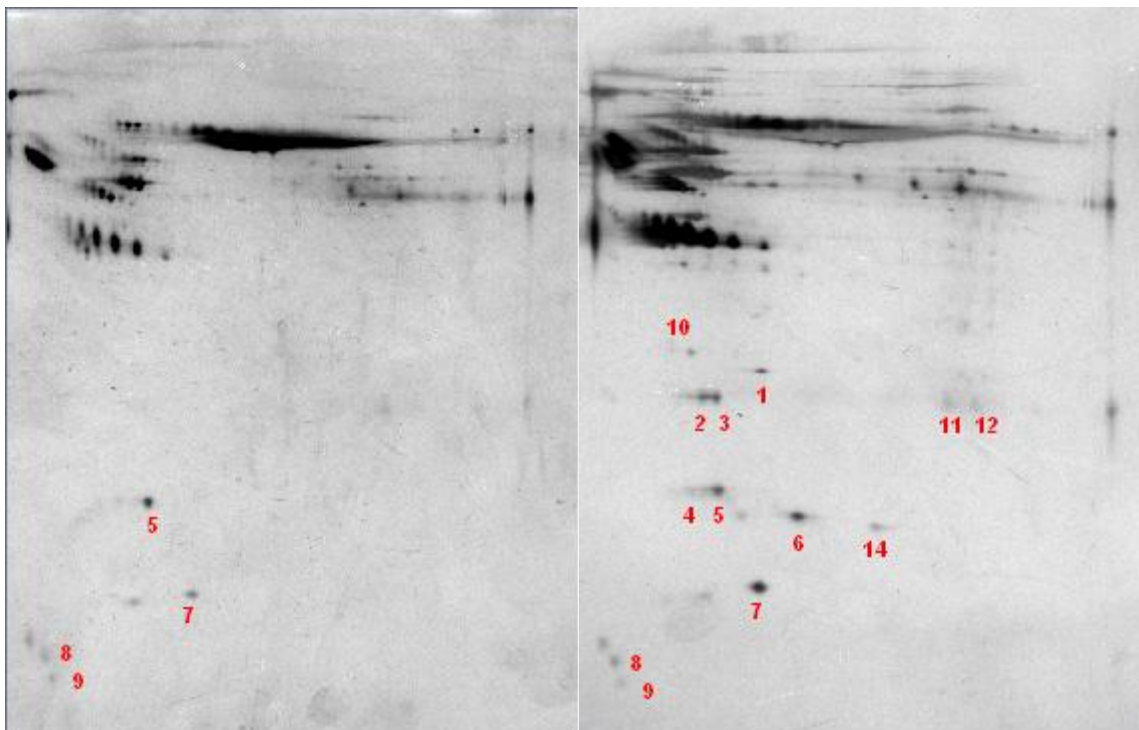
Razdvajanje proteina u drugoj dimenziji (prema molekularnoj masi) postiže se metodom SDS-PAGE. U tu svrhu priprema se 12 % SDS poliakrilamidni gel prema tablici 6.

Tablica 6. Sastav 12 % SDS poliakrilamidnog gela

Akrlamid/bisakrlamid ( 30 %T, 2.67% $C_{bis}$ ) (Sigma Aldrich, SAD)	60 ml
Destilirana voda	50,2 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	37,5 ml
10 % SDS	1,5 ml
10 % amonijev persulfat (Sigma Aldrich, SAD)	750 $\mu$ l
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	75 $\mu$ l
Ukupni volumen	$\approx$ 150 ml

Nakon polimerizacije gela i ekvibracije IPG-traka, IPG-trake se polože do ruba poliakrilamidnog gela između stakla za gelove i to izbjegavajući stvaranje mjehurića zraka između traka i gela. Proteini se zatim razdvajaju u sustavu za okomitu elektroforezu Protean II XL (Bio Rad, SAD).

Za detekciju proteina se SDS poliakrilamidni gel boja srebrom. Postupak započinje inkubacijom gela preko noći u fiksatoru (40 % etanol, 10 % octena kiselina (Kemika, Hrvatska), 50 %  $H_2O$ ). Drugog dana gel se ispiri vodom najmanje 30 min, a onda senzitivira 0,02 % natrijevim tiosulfatom 1 min. Slijedi ispiranje vodom tri puta po 1 min i inkubacija 20 min u hladnoj (4°C) 0,2 % otopini srebrovog nitrata (Kemika, Hrvatska). Gel se ispiri vodom 3 puta po 1 min, a zatim slijedi razvijanje u 3% natrijevom karbonatu (Kemika, Hrvatska) i 0,05 % formaldehidu (Kemika, Hrvatska). Nakon što se gel 1 min ispiri vodom, uranja se na 10 min u 1,5 %  $Na_2EDTA$  te opet ispiri 1 min u vodi.



Slika 16. Primjer izgleda gela nakon 2-DE. Lijevo je gel s uzorkom nesuicidalnog ovisnika o alkoholu, a desno suicidalnog. Brojevi označavaju položaje proteinskih točaka.

Vizualizacija proteinskih točaka vrši se skeniranjem gelova aparatom VersaDoc Imaging System 4000 (Bio-Rad, SAD). Dobivene slike (Slika 16) analiziraju se programom PDQuest SW, verzija 7,0 (Bio Rad, SAD) pri čemu se kao normalizacijska metoda koristi ukupna gustoća na slici gela (engl. total density in gel image) kod koje se zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike, a onda usporedba tih zbrojenih vrijednosti služi kao osnova za normalizaciju.

### 3.7.3. ANALIZA PROTEINA TEHNIKOM MALDI-TOF/TOF

#### PRIPREMA UZORAKA

Odabrane različito eksprimirane proteinske točke se izrezuju iz SDS poliakrilamidnog gela pomoću nastavka za automatsku pipetu i to tako da se vrh nastavka odreže škarama i dobije promjer koji odgovara veličini točke na gelu. Izrezani komadići gela stavljaju se u čiste Eppendorf mikroeprevete od 1,5 ml uz dodatak 100 µl otopine za

odbojavanje (392 mg  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Kemika, Hrvatska), 993 mg  $Na_2S_2O_3$  (Kemika, Hrvatska),  $H_2O$  do 80 ml). Slijedi inkubacija do najviše 5 min uz trešnju od 900 rpm. Kad komadići gela požute, otopina za odbojavanje se ukloni i slijedi ispiranje vodom (3 do 5 puta) dok se u potpunosti ne izgubi žuta boja. Komadići gela se zatim ispiru tri puta s 500  $\mu$ l 50mM otopine  $NH_4HCO_3$  (Kemika, Hrvastka), pH 7,8. Nakon toga se jednom ispiru s 500  $\mu$ l smjese koja u omjeru 1:1 sadrži 50mM  $NH_4HCO_3$  i acetonitril (Kemika, Hrvastka) te jednom sa 100  $\mu$ l acetonitrila. Poslije svakog ispiranja otapalo se uklanja. Komadići gela se osuše u koncentratoru SpeedVac (Eppendorf, Njemačka), doda im se 10  $\mu$ l tripsina (Merck, SAD) koncentracije 10 ng/ml u 25 mM puferu  $NH_4HCO_3$  (pH 7,8) i inkubiraju se preko noći na 37°C. Otopina triptičkih peptida se uklanja i osuši koncentratorom SpeedVac. Peptidi se uklanjaju iz izrezanog gela dodavanjem 10  $\mu$ l otopine 50 % acetonitrila i 5 % trifluoroctene kiseline (Kemika, Hrvatska), soniciraju 30 minuta u vodenoj kupelji i ostave se 15 min na 500 rpm pri sobnoj temperaturi. Ovako dobiveni ekstrakti spajaju se s pripadajućim osušenim otopinama triptičkih peptida te se sve zajedno osuši u koncentratoru SpeedVac. Potom se peptidi resuspendiraju u 10  $\mu$ l 0,1 % trifluoroctene kiseline i pročišćavaju na koloni ZipTipC4 (Millipore, SAD). Peptidi se u konačnici eluiraju pomoću 10  $\mu$ l otopine 80 % acetonitrila i 20 % 0,1 % trifluoroctene kiseline i osuše u koncentratoru SpeedVac. Za resuspendiranje se koristi 5  $\mu$ l otopine sastava: 5 mg/ml  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicinaminske kiseline (CHCA) (Sigma Aldrich, SAD) otopljne u 50 % acetonitrila i 50 % 0,1 % trifluoroctene kiseline. Resuspendirani peptidi se nanose na MALDI pločicu.

Spektri masa dobiveni su spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, SAD) u pozitivnom načinu rada uz korištenje ionskog zrcala kao analizatora. Za svaku proteinsku točku snima se spektar masa pri 1600 hitaca laserom (Nd:YAG, valna duljina 355 nm, puls 3-7 ns, frekvencija 200 Hz) s područjem mjerenja masa od 800 do 4000 Da, fokusom masa 2000 Da i vremenom kašnjenja 500 ns. Za unutarnju kalibraciju masa koriste se pikovi autolize tripsina koji osiguravaju točnost mase unutar 21 ppm od njihovih teoretskih masa. Interpretacijska metoda je podešena tako da se odaberu četiri najintenzivnija signala kao prekursor

za analizu tandemskom spektrometrijom masa (MS/MS) pri čemu su izuzeti signali iona dobiveni autolizom tripsina, matriksa ili akrilamida. MS/MS spektri dobiveni su disocijacijom uzrokovanom kolizijom pri energiji od 1 keV. Za identifikaciju proteina i pretraživanje baze podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information) korišten je program Global Protein Server (GPS) Explorer software verzija 3,6 (Applied Biosystems, SAD), a kao pretraživač Mascot (Matrix Science, UK). Prilikom pretrage baza podataka koriste se kombinirani MS i MS/MS spektri, uz sljedeće parametre pretraživanja: pogreška mjerenja mase peptida  $\pm 21$  ppm, pogreška mjerenja mase fragmenta  $\pm 0,3$  Da, minimalni omjer signala i šuma (S/N) 5, dvije varijabilne modifikacije (oksidacija i karbamidometilacija) i jedno nepotpuno cijepanje po peptidu.

### **3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Statistička obrada rezultata vršena je pomoću statističkog programa Sigma Stat 3,5 (Jandell Scientific Corp., SAD). Frekvencije genotipova i alela između pojedinih skupina uspoređene su  $\chi^2$ -testom koji se također koristio za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Kako bi se provjerilo koji od genotipova najviše doprinosi statističkoj značajnosti, izračunati su standardizirani reziduali. Aktivnost MAO-B i demografski podaci između pojedinih skupina uspoređeni su, ovisno o normalnosti razdiobe podataka, pomoću parametrijskih Studentovog t-testa, jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i Tukeyevog testa te neparametrijskih analiza Kruskal-Wallis ANOVA-e i Mann-Whitney testa. Za provjeru utjecaja spola i pušačkog statusa na aktivnost trombocitne MAO-B korištena je dvostruka ANOVA. Logistička regresija je korištena za utvrđivanje interakcije pojedinih genotipova i njihovog zajedničkog utjecaja na prisutnost alkoholizma. Za usporedbu aktivnosti trombocitne MAO-B između skupina s pojedinim fenotipom povezanim s alkoholizmom korištena je višestruka regresijska analiza. Razina značajnosti  $\alpha$  postavljena je na 0,05, a svi korišteni testovi su bili dvosmjerni.

# 4. REZULTATI

## 4.1. DEMOGRAFSKI PODACI

U ovom istraživanju je sudjelovalo 1270 ispitanika oba spola od čega je 690 ispitanika oboljelih od alkoholizma te 580 zdravih kontrolnih ispitanika. Tablica 7 prikazuje dob ispitivanih skupina. U obje skupine prevladavaju ispitanici muškog spola, s udjelom od 81,3 % u skupini osoba s alkoholizmom, odnosno 90,5 % u skupini zdravih osoba. Ispitanici oboljeli od alkoholizma su značajno ( $U=282863,00$ ;  $p<0.001$ ; Mann-Whitney) stariji od kontrolnih ispitanika. Unutar skupina kontrolnih ( $U=12792,00$ ;  $p=0,164$ ; Mann-Whitney) i ispitanika s alkoholizmom ( $U=32441,00$ ;  $p=0,106$ ; Mann-Whitney) ne postoji značajna razlika u dobi između muških i ženskih ispitanika. Ispitanici oboljeli od alkoholizma podijeljeni su prema prisutnosti sljedećih fenotipova povezanih s alkoholizmom: simptomi ustezanja, agresivno ponašanje, težina ovisnosti o alkoholu, delirium termens, komorbidna depresija, trenutno suicidalno ponašanje, pokušaj suicida i početak prekomjerne uporabe alkohola (Tablica 8). Vrijednosti bodova ostvarenih na korištenim kliničkim ocjenskim ljestvicama prikazuje tablica 9.

Tablica 7. Dob ispitivanih skupina. Dob ispitanika prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija s rasponom godina u zagradama.

Ispitivana skupina	Dob u godinama
Osobe s dijagnozom alkoholizma (N=690)	49,8 $\pm$ 10,2 (23-84)*
Muškarci (N=561)	49,5 $\pm$ 9,9 (23-77)
Žene (N=129)	51,5 $\pm$ 11,4 (23-84)
Kontrolni ispitanici (N=580)	40,3 $\pm$ 12,3 (19-64)
Muškarci (N=525)	40,1 $\pm$ 12,2 (19-64)
Žene (N=55)	42,4 $\pm$ 13,1 (19-63)

\*  $p<0,001$ ; vs. kontrolni ispitanici

Tablica 8. Podjela ispitanika oboljelih od alkoholizma prema specifičnim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

Fenotip povezan s alkoholizmom	Broj ispitanika		
	Muškarci	Žene	
Simptomi ustezanja	Da	136	21
	Ne	425	108
$\chi^2 = 3,35; df=1; p=0,067$			
Agresivno ponašanje	Da	160	15
	Ne	389	108
$\chi^2 = 14,12; df=1; p < 0,001$			
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	120	33
	Teško	435	94
$\chi^2 = 0,89; df=1; p=0,345$			
Delirium tremens	Da	44	3
	Ne	517	126
$\chi^2 = 4,20; df=1; p = 0,040$			
Komorbidna depresija	Da	95	42
	Ne	466	87
$\chi^2 = 15,12; df=1; p < 0,001$			
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	142	41
	Ne	414	87
$\chi^2 = 1,92; df=1; p=0,166$			
Pokušaj suicida	Da	83	34
	Ne	467	93
$\chi^2 = 9,05; df=1; p = 0,003$			
Početak prekomjerne uporabe alkohola	>25. godine	209	24
	<25. godine	341	104
$\chi^2 = 16,22; df=1; p < 0,001$			

Prisutnost jednog od fenotipova ne isključuje prisutnost drugog. Kod jedne osobe se može ispoljavati više različitih fenotipova.

Računanje standradiziranih rezidula (R) je pokazalo da su u skupini osoba oboljelih od alkoholizma manje zastupljene agresivne žene nego agresivni muškarci (R=3,01) (Tablica 8). Također, manje je žena nego muškaraca sa simptomima ustezanja popraćenim delirium tremensom (R=1,95) (Tablica 8). Komorbidna depresija (R=3,24) i pokušaj suicida (R=2,57) su češći kod žena ovisnih o alkoholu nego kod muškaraca (Tablica 8). Kod ovisnika o alkoholu, manje je žena nego muškaraca koji su s prekomjernom uporabom alkohola počeli prije 25. godine života (R=3,01) (Tablica 8).

Tablica 9. Vrijednosti bodova koje su ispitanici s alkoholizmom ostvarili na 3. stavci Hamiltonove ocjenske skale za depresiju (HDRS-3), upitniku za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođenog prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju i ljestvici općih kliničkih dojмова za procjenu ozbiljnosti ovisnosti (CGI-S). Bodovi su iskazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija s rasponom u zagradama.

	<b>Muškarci</b>	<b>Žene</b>
HDRS-3 bodovi	0,6 ± 1,1 (0-4)	0,6 ± 1,1 (0-4)
<i>Mann-Whitney</i>	U= 33942,00; p=0,295	
Brown-Godwin bodovi	5,1 ± 4,3 (0-20)	2,5 ± 3,2 (0-14)
<i>Mann-Whitney</i>	U=50789,50; <b>p&lt;0,001</b>	
CGI-S bodovi	5,3 ± 0,9 (3-7)	5,2 ± 1,0 (3-7)
<i>Mann-Whitney</i>	U= 37364,00; p=0,267	

U skupini osoba oboljelih od alkoholizma, muškarci su ostvarili značajno više ukupnih bodova na upitniku za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođenog prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju nego žene (Tablica 9).

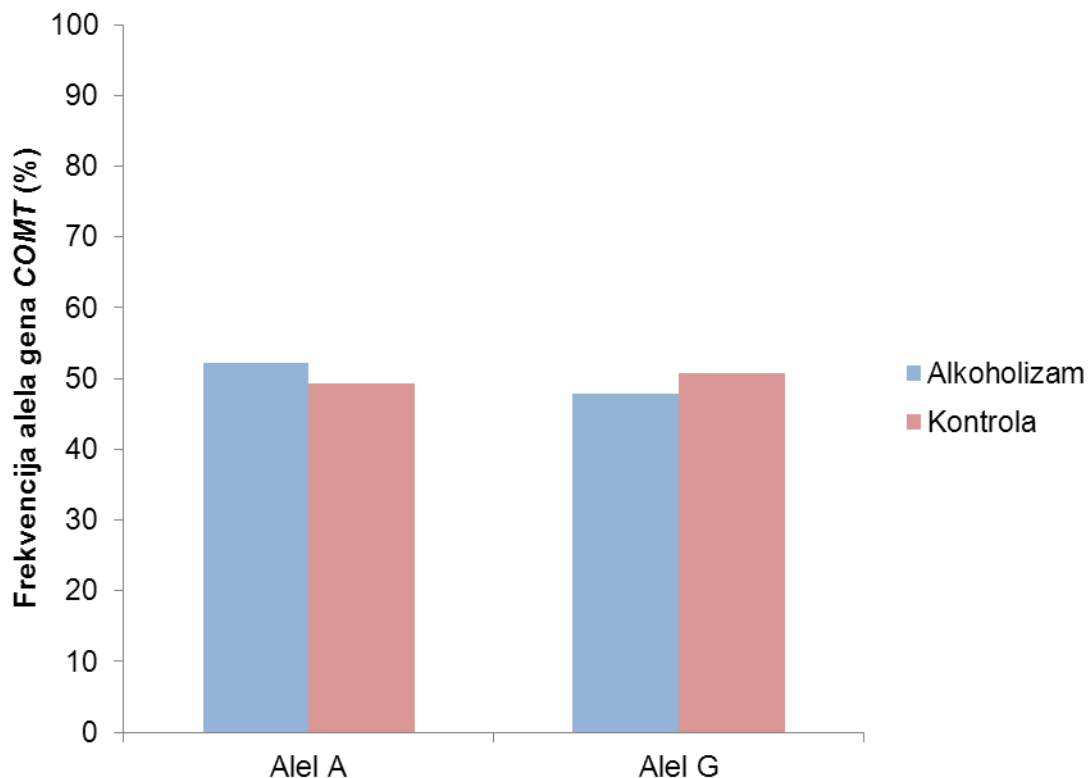
#### 4.2. POLIMORFIZAM Val108/158Met (rs4680) GENA ZA KATEHOL-O-METILTRANSFERAZU (COMT)

Genotipizacija metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) dala je podatke prema kojima je izračunata učestalost genotipova i alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod ispitivanih skupina. Frekvencije genotipova ne odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže u skupini osoba oboljelih od alkoholizma ( $p=0,931$ ) kao ni u skupini zdravih kontrolnih ispitanika ( $p=0,703$ ) što je provjereno pomoću  $\chi^2$ -testa. Frekvencije genotipova ne razlikuju se značajno između muških i ženskih ispitanika unutar skupine osoba oboljelih od alkoholizma ( $\chi^2=0,45$ ,  $df=2$ ;  $p = 0,799$ ) kao ni unutar skupine kontrolnih ispitanika ( $\chi^2=2,35$ ;  $df=2$ ;  $p=0,309$ ). Iz tog razloga daljnje analize nisu uključivale podjelu po spolu. Distribucije genotipova i alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* između skupina osoba oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika prikazane su u tablici 10, odnosno slici 17. Nema značajne razlike u distribuciji genotipova (Tablica 10) i alela (Slika 17) između osoba oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika.

Tablica 10. Distribucija genotipova obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika.

Val <sup>108/158</sup> Met COMT	Ispitanici s alkoholizmom	Kontrolni ispitanici
Genotip	N (%)	N (%)
AA	184 (27,1)	137 (23,9)
AG	340 (50,1)	291 (50,8)
GG	155 (22,8)	145 (25,3)
$\chi^2 = 2,06$ ; $df=2$ ; $p=0,357$		





Slika 17. Distribucija alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom.  $\chi^2 = 1,89$ ;  $df=1$ ;  $p = 0,170$

Distribuciju genotipova i alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod osoba oboljelih od alkoholizma podijeljenih prema specifičnim fenotipovima povezanim s alkoholizmom prikazuje tablica 11. Frekvencije genotipova i alela gena *COMT* značajno se razlikuju između osoba sa i bez trenutnih (u zadnjih tjedan dana) suicidalnih simptoma, osoba koje tijekom života jesu i onih koje nisu pokušale suicid te osoba s ranim i kasnim početkom prekomjerne uporabe alkohola (Tablica 11).

Tablica 11. Distribucija genotipova i alela obziroma na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod osoba oboljelih od alkoholizma raspoređenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		AA	AG	GG	A	G
Simptomi ustezanja	Da	50 (32,3)	72 (46,4)	33 (21,3)	172 (55,5)	138 (44,5)
	Ne	134 (25,6)	269 (51,2)	122 (23,2)	537 (51,1)	513 (48,9)
		$\chi^2=2,75; df=2; p=0,253$			$\chi^2=1,64; df=1; p=0,201$	
Agresivno ponašanje	Da	40 (23,5)	86 (50,6)	44 (25,9)	166 (48,8)	174 (51,2)
	Ne	137 (27,7)	248 (50,2)	109 (22,1)	522 (52,8)	466 (47,2)
		$\chi^2=1,64; df=2; p=0,440$			$\chi^2=1,47; df=1; p=0,225$	
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	45 (29,6)	72 (47,4)	35 (23,0)	162 (53,3)	142 (46,7)
	Teško	138 (26,5)	264 (50,7)	119 (22,8)	540 (51,9)	501 (48,1)
		$\chi^2=0,68; df=2; p=0,712$			$\chi^2=0,14; df=1; p=0,712$	
Delirium tremens	Da	10 (21,7)	25 (54,3)	11 (23,9)	45 (48,9)	47 (51,1)
	Ne	174 (27,4)	316 (49,8)	144 (22,7)	664 (52,4)	604 (47,6)
		$\chi^2=0,72; df=2; p=0,699$			$\chi^2=0,28; df=1; p=0,595$	
Komorbidna depresija	Da	43 (31,4)	66 (48,2)	28 (20,4)	152 (55,5)	122 (44,5)
	Ne	141 (26,0)	275 (50,6)	127 (23,4)	557 (51,6)	523 (48,4)
		$\chi^2=1,74; df=2; p=0,419$			$\chi^2=1,18; df=1; p=0,277$	

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		AA	AG	GG	A	G
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	67 (37,0)	81 (44,8)	33 (18,2)	215 (59,4)	147 (40,6)
	Ne	116 (23,5)	256 (51,9)	121 (24,5)	488 (49,5)	498 (50,5)
		$\chi^2=12,54$ ; df=2; <b>p=0,002</b>			$\chi^2=10,00$ df=1; <b>p=0,002</b>	
Pokušaj suicida	Da	48 (42,1)	51 (44,7)	15 (13,2)	147 (64,5)	81 (35,5)
	Ne	134 (24,2)	282 (51,0)	137 (24,8)	550 (49,7)	556 (50,3)
		$\chi^2=17,40$ ; df=2; <b>p&lt;0,001</b>			$\chi^2=15,89$ ; df=1; <b>p&lt;0,001</b>	
Početak prekomjerne uporabe alkohola	> 25. godine	55 (24,6)	102 (45,5)	67 (29,9)	212 (47,3)	236 (52,7)
	< 25. godine	123 (27,8)	237 (53,6)	82 (18,6)	483 (54,6)	401 (45,4)
		$\chi^2=11,08$ ; df=2; <b>p=0,004</b>			$\chi^2=6,09$ ; df=1; <b>p=0,014</b>	

Računanje standardiziranih reziduala pokazalo je da je kod suicidalnog ponašanja značajna razlika izazvana povećanim udjelom genotipa Met/Met (R=2,55) u skupini suicidalnih ovisnika o alkoholu. U skupini ovisnika o alkoholu koji su pokušali počinuti samoubojstvo također je povećan udio osoba s genotipom Met/Met (R=3,03) u usporedbi s ovisnicima o alkoholu koji nisu pokušali počinuti samoubojstvo. Razlika između osoba koje su s prekomjernom uporabom alkohola započele prije 25. i onih koji su započeli poslije 25. godine života je posljedica povećanog udjela genotipa Val/Val (R=2,39) u skupini ovisnika o alkoholu koji su s uporabom alkohola počeli prije 25. godine života.

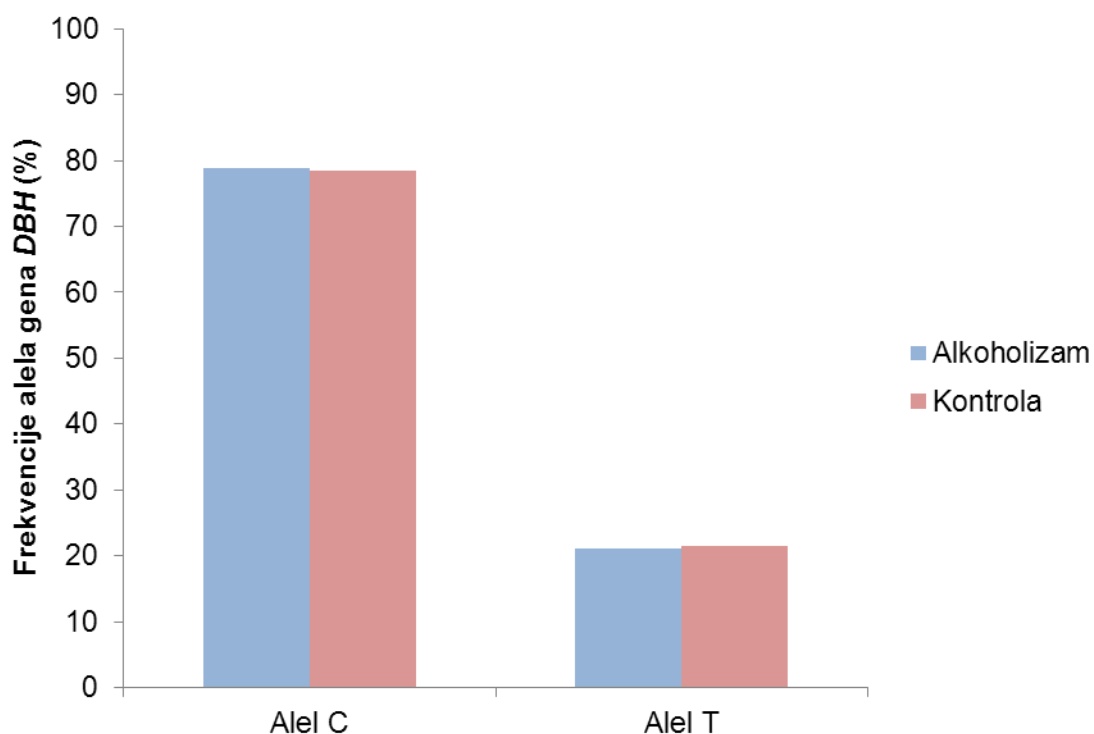
### 4.3. POLIMORFIZAM -1021C/T (rs1611115) GENA ZA DOPAMIN BETA-HIDROKSILAZU (DBH)

Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) određen je genotip ispitanika obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* te su izračunate frekvencije genotipova i alela. Pomoću  $\chi^2$ -testa pokazano je da ne postoji odstupanje frekvencije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže u skupini osoba oboljelih od alkoholizma ( $p=0,089$ ) i u skupini zdravih kontrolnih ispitanika ( $p=0,579$ ). Ne postoji značajna razlika u frekvenciji genotipova između muških i ženskih ispitanika unutar skupine kontrolnih ispitanika ( $\chi^2=1,65$ ;  $df=2$ ;  $p=0,437$ ) te unutar skupine ispitanika oboljelih od alkoholizma ( $\chi^2=4,55$ ;  $df=2$ ;  $p=0,103$ ) pa su daljnje analize napravljene bez podjelu po spolu. Distribucije genotipova i alela obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* kod osoba oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika prikazane su u tablici 12 i slici 18 gdje se vidi da nema značajne razlike u distribuciji genotipova i alela između osoba oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika (Tablica 12, Slika 18).

Tablica 13 prikazuje distribuciju genotipova i alela obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* kod osoba oboljelih od alkoholizma raspoređenih prema specifičnim fenotipovima povezanim s alkoholizmom. Frekvencije genotipova i alela gena *DBH* ne razlikuju se značajno unutar ispitanika s različitim fenotipovima povezanim s alkoholizmom (Tablica 13).

Tablica 12. Distribucija genotipova i alela obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* kod oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika.

<b>-1021C/T DBH</b>	<b>Ispitanici s alkoholizmom</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>
Genotip	N (%)	N (%)
CC	383 (60,5)	347 (61,7)
CT	228 (36,0)	192 (34,2)
TT	22 (3,5)	23 (4,1)
$\chi^2=0,67$ ; $df=2$ ; $p=0,716$		



Slika 18. Distribucija alela obzirom na polimorfizam -1021 C/T gena *DBH* između kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom.  $\chi^2=0,02$ ;  $df=1$ ;  $p=0,893$

Tablica 13. Distribucija genotipova i alela obziroma na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* kod oboljelih od alkoholizma podijeljenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

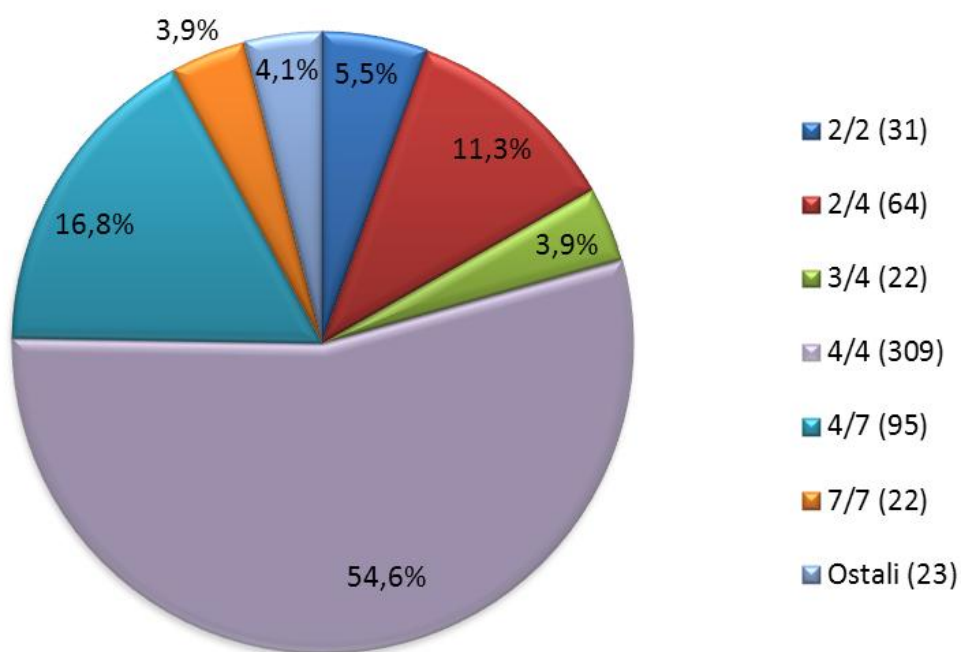
Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		CC	CT	TT	C	T
Simptomi ustezanja	Da	82 (57,7)	55 (38,7)	5 (3,5)	219 (77,1)	65 (22,9)
	Ne	301 (61,2)	174 (35,4)	17 (3,4)	776 (78,9)	208 (21,1)
		$\chi^2=0,56$ ; df=2; p=0,755			$\chi^2=0,30$ df=1; p=0,582	
Agresivno ponašanje	Da	101 (64,7)	50 (32,1)	5 (3,2)	252 (80,8)	60 (19,2)
	Ne	274 (59,3)	171 (37,0)	17 (3,7)	719 (77,8)	205 (22,2)
		$\chi^2=1,45$ ; df=2; p=0,486			$\chi^2=1,04$ ; df=1; p=0,308	
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	92 (68,2)	40 (29,6)	3 (2,2)	224 (83,0)	46 (17,0)
	Teško	287 (58,3)	186 (37,8)	19 (3,9)	760 (77,2)	224 (22,8)
		$\chi^2=4,46$ ; df=2; p=0,107			$\chi^2=3,78$ ; df=1; p=0,052	
Delirium tremens	Da	27 (61,4)	15 (34,1)	2 (4,5)	69 (78,4)	19 (21,6)
	Ne	356 (60,3)	214 (36,3)	20 (3,4)	926 (78,5)	254 (21,5)
		$\chi^2=0,22$ ; df=2; p=0,896			$\chi^2=0,01$ ; df=1; p=0,904	
Komorbidna depresija	Da	78 (57,8)	49 (36,3)	8 (5,9)	205 (75,9)	65 (24,1)
	Ne	305 (61,1)	180 (36,1)	14 (2,8)	790 (79,2)	208 (20,8)
		$\chi^2=3,18$ ; df=2; p=0,204			$\chi^2=1,13$ ; df=1; p=0,288	

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		CC	CT	TT	C	T
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	99 (55,3)	72 (40,2)	8 (4,5)	270 (75,4)	88 (24,6)
	Ne	281 (62,6)	154 (34,3)	14 (3,1)	716 (79,7)	182 (20,3)
		$\chi^2=3,04$ ; df=2; p=0,219			$\chi^2=2,57$ ; df=1; p=0,109	
Pokušaj suicida	Da	67 (61,5)	40 (36,7)	2 (1,8)	174 (79,8)	44 (20,2)
	Ne	311 (60,8)	183 (35,7)	18 (3,5)	805 (78,6)	219 (21,4)
		$\chi^2=0,82$ ; df=2; p=0,664			$\chi^2=0,09$ ; df=1; p=0,761	
Početak prekomjerne uporabe alkohola	> 25 godina	136 (63,2)	70 (32,6)	9 (4,2)	342 (79,7)	87 (20,3)
	< 25 godina	240 (58,7)	156 (38,1)	13 (3,2)	636 (77,8)	182 (22,2)
		$\chi^2=2,11$ ; df=2; p=0,348			$\chi^2=0,53$ ; df=1; p=0,465	

#### 4.4. POLIMORFIZAM VARIJABILNOG BROJA PONAVLJANJA U 3. EGZONU GENA ZA DOPAMINSKI RECEPTOR D4 (DRD4)

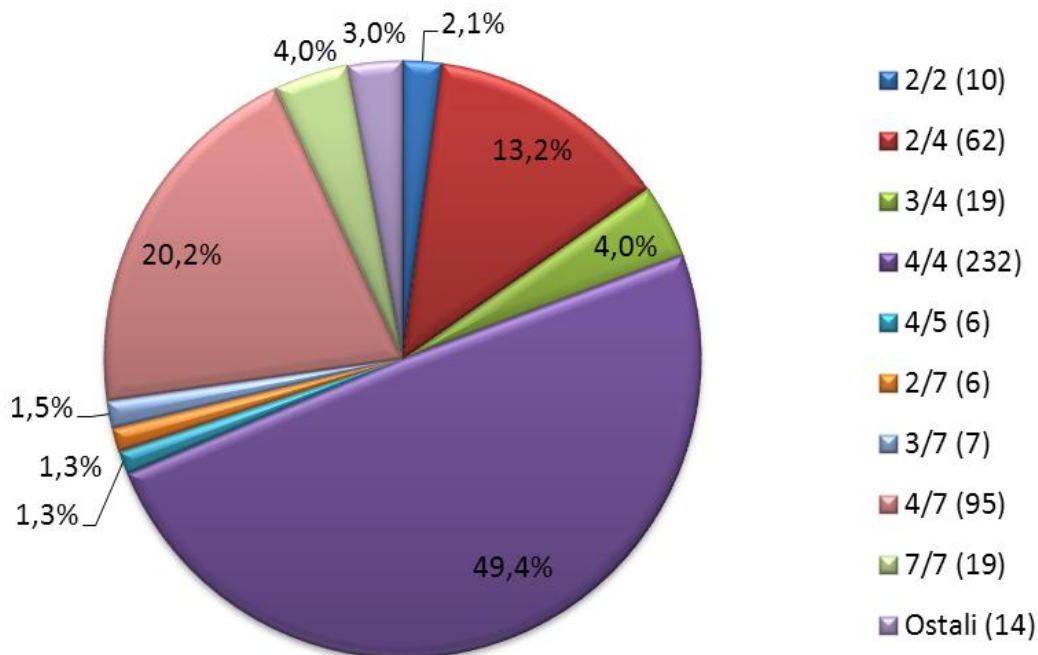
Genotipizacija obzirom na polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja (VNTR) u 3. egzonu gena *DRD4* provedena je klasičnom lančanom reakcijom polimeraze (PCR) uz razdvajanje produkata reakcije elektroforezom na 2 % gelu agaroze. Prema dobivenim rezultatima izračunate su frekvencije genotipova i alela kod kontrolnih i ispitanika oboljelih od alkoholizma. Usklađenost distribucije genotipova s Hardy-Weinbergovom ravnotežom provjerena je  $\chi^2$ -testom te se pokazalo da u skupini osoba oboljelih od alkoholizma nema odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (p=0,135), dok ono postoji u skupini kontrolnih ispitanika (p<0,001). Budući da ne postoji značajna razlika u distribuciji genotipova obzirom na spol ni u skupini

kontrolnih ( $\chi^2=0,75$ ;  $df=2$ ;  $p=0,688$ ), niti u skupini ispitanika oboljelih od alkoholizma ( $\chi^2=2,26$ ;  $df=2$ ;  $p=0,323$ ), sve daljnje analize su napravljene bez podjele po spolu. U skupini kontrolnih ispitanika zastupljeno je 18, a u skupini ispitanika s alkoholizmom 17 genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* čije frekvencije su prikazane slikama 19 i 20.



Slika 19. Frekvencije genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena za *DRD4* u skupini kontrolnih ispitanika. Broj ispitanika s određenim genotipom prikazan je u zagradi. Ostali: 2/3 (5; 0,9%), 2/7 (1; 0,2%), 3/3 (2; 0,4%), 3/6 (1; 0,2%), 4/5 (4; 0,7%), 4/6 (1; 0,2%), 4/8 (1; 0,2%), 5/5 (2; 0,4%), 5/7 (1; 0,2%), 6/7 (2; 0,4%), 6/8 (1; 0,2%) i 7/8 (2; 0,4%).





Slika 20. Frekvencije genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena za *DRD4* u skupini ispitanika s alkoholizmom. Broj ispitanika s određenim genotipom prikazan je u zagradi. Ostali: 2/3 (1; 0,2%), 2/5 (1; 0,2%), 3/3 (3; 0,6%), 4/6 (1; 0,2%), 4/8 (2; 0,4%), 5/7 (3; 0,6%), 7/8 (2; 0,4%) i 8/8 (1; 0,2%).

Kod VNTR-a 3. egzona gena za *DRD4* aleli su grupirani kao tzv. kratki (6 i manje od 6 ponavljanja) i dugi (7 i više od 7 ponavljanja) aleli. Budući da se dugi aleli smatraju rizičnim alelima, sve daljnje analize su provedene tako da su ispitanici podijeljeni na nosioce dugih (L, od eng. 'long') alela i homozigote za kratke (S, od eng. 'short') alele. Tako u nosioce alela L spadaju svi ispitanici koji imaju genotip s kombinacijom dvaju duga (LL) ili jednog dugog i jednog kratkog (LS) alela, a homozigoti za kratke alele su svi ispitanici čiji genotipovi imaju kombinaciju dvaju kratka alela (SS). Postoji značajna razlika u distribuciji genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između kontrolnih i ispitanika oboljelih od alkoholizma (Tablica 14) i to zahvaljujući blago povećanom udjelu nosioca dugih alela u skupini ovisnika o alkoholu ( $R=1,45$ ).

Tablica 14. Distribucija genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između kontrolne i skupine ispitanika s alkoholizmom.

VNTR <i>DRD4</i>	Ispitanici s alkoholizmom	Kontrolni ispitanici
Genotip	N (%)	N (%)
LL + LS	135 (28,6)	128 (22,6)
SS	335 (71,4)	438 (77,4)
$\chi^2=4,83$ , $df=1$ ; <b>p=0,028</b>		

U svrhu provjere postoji li zajednički učinak kombinacije genotipova za VNTR 3. egzona gena *DRD4* i ostalih ispitivanih polimorfizama, napravljena je analiza logističkom regresijom s dijagnozom (alkoholizam ili kontrola) kao zavisnom varijablom, a genotipom za VNTR 3. egzona gena *DRD4* i jednog od ostalih ispitivanih polimorfizama kao nezavisnim varijablama. Pritom je praćeno kakva je interakcija frekvencije nosioca dugih i homozigota za kratke alele gena *DRD4* s različitim kombinacijama nosioca za ostale ispitivane polimorfizme u alkoholizmu u odnosu na kontrolu. Pritom su ispitanici bili podijeljeni na sljedeće načine:

- 1) za polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*:
  - a) nosioci alela A (genotipovi AA i AG) i homozigoti GG
  - b) nosioci alela G (genotipovi GG i AG) i homozigoti AA
- 2) za polimorfizam -1021C/T gena *DBH*:
  - a) nosioci alela C (genotipovi CC i CT) i homozigoti TT
  - b) nosioci alela T (genotipovi TT i CT) i homozigoti CC
- 3) za polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B*:
  - a) nosioci alela A (genotipovi AA i AG) i homozigoti GG za ženske ispitanike
  - b) nosioci alela G (genotipovi GG i AG) i homozigoti AA za ženske ispitanike
  - c) nosioci alela A i alela G za muške ispitanike

Rezultate logističke regresije prikazuje tablica 15. Značajna interakcija postoji između nosioca dugih alela gena *DRD4* i nosioca alela G gena *COMT*, alela C gena *DBH* i alela A gena *MAO-B* kod ženskih ispitanika. Interakcije ostalih kombinacija genotipova nisu pokazale značajan doprinos.

Tablica 15. Rezultati logističke regresije s dijagnozom (alkoholizam i kontrola) kao zavisnom varijablom te ispitivanim parovima genotipova kao nezavisnim varijablama.

		<b>DRD4</b>					
		Nosioci dugih alela i homozigoti SS	$\beta$	SE	Wald test	p	OR 95% CI
<b>COMT</b>	Nosioci alela A i homozigoti GG		0,237	0,157	2,275	0,131	1,268 (0,931-1,726)
	Nosioci alela G i homozigoti AA		0,324	0,157	4,248	<b>0,039</b>	1,383 (1,016-1,882)
<b>DBH</b>	Nosioci alela C i homozigoti TT		0,372	0,147	6,371	<b>0,012</b>	1,145 (1,087-1,936)
	Nosioci alela T i homozigoti CC		0,113	0,218	0,269	0,604	1,120 (0,731-1,716)
<b>MAO-B žene</b>	Nosioci alela A i homozigoti GG		1,008	0,491	4,211	<b>0,040</b>	2,740 (1,046-7,174)
	Nosioci alela G i homozigoti AA		0,857	0,535	2,573	0,109	2,357 (0,827-6,719)
<b>MAO-B muškarci</b>	Nosioci alela A i alela G		0,183	0,186	0,964	0,326	1,200 (0,834-1,728)

Ne postoji značajna razlika u učestalosti genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema prisutnosti specifičnog fenotipa povezanog s alkoholizmom (Tablica 16).

Tablica 16. Distribucija genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između ispitanika podijeljenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)	
		LL+LS	SS
Apstinencijski sindrom	Da	30 (29,1)	73 (70,9)
	Ne	105 (28,6)	262 (71,4)
		$\chi^2=0,00$ ; df=1; p=0,983	
Agresivno ponašanje	Da	36 (30)	84 (70)
	Ne	94 (28,1)	241 (71,9)
		$\chi^2=0,08$ ; df=1; p= 0,775	
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	24 (29,3)	58 (70,7)
	Teško	106 (27,8)	275 (72,2)
		$\chi^2=0,02$ ; df=1; p = 0,897	
Delirium tremens	Da	12 (30,8)	27 (69,2)
	Ne	123 (28,6)	307 (71,4)
		$\chi^2=0,01$ ; df=1; p=0,919	

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)	
		LL+LS	SS
Komorbidna depresija	Da	29 (30,2)	67 (69,8)
	Ne	105 (28,2)	267 (71,8)
		$\chi^2=0,07$ ; df=1; p=0,798	
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	43 (32,3)	90 (67,7)
	Ne	90 (27,1)	242 (72,9)
		$\chi^2=1,03$ ; df=1; p=0,311	
Pokušaj suicida	Da	25 (29,4)	60 (70,6)
	Ne	107 (28,5)	268 (71,5)
		$\chi^2=0,00$ ; df=1; p=0,977	
Početak prekomjerne uporabe alkohola	> 25. godine	49 (30,8)	110 (69,2)
	< 25. godina	83 (27,6)	218 (72,4)
		$\chi^2=0,39$ ; df=1; p=0,533	

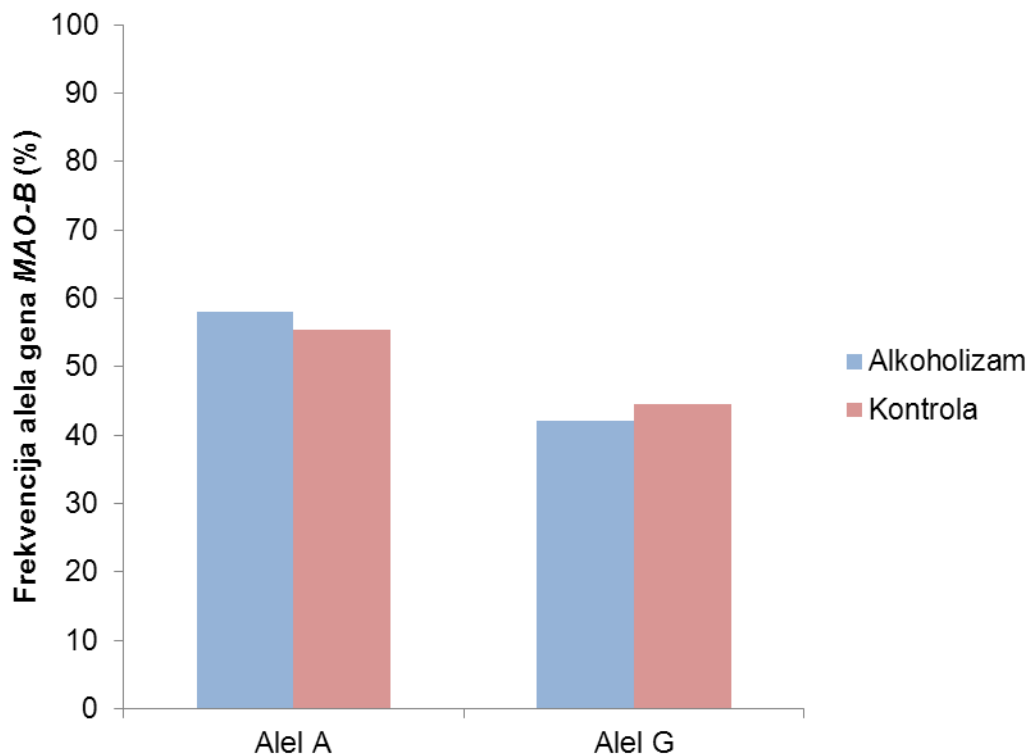
#### 4.5. POLIMORFIZAM A/G (rs1799836) 13. INTRONA GENA ZA MONOAMINOOKSIDAZU TIPA B (MAO-B)

Genotipizacija obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* provedena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) pri čemu su utvrđene frekvencije genotipova i alela u skupini kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom. Budući da se gen *MAO-B* nalazi na kromosomu X, muški ispitanici su

nosioci samo jednog alela. Zbog toga su sve analize napravljene posebno za ispitanike ženskog odnosno muškog spola. Usklađenost s Hardy-Weinbergovom ravnotežom provjerena je  $\chi^2$ -testom samo za ženske ispitanike, budući da u skupini muškaraca ne postoje heterozigoti za MAO-B. U skupini kontrolnih ( $p=0,909$ ), kao i ispitanica s alkoholizmom ( $p=0,412$ ), ne postoji odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Distribucija genotipova u kontrolnoj i skupini osoba s alkoholizmom prikazana je u tablici 17. Distribucija alela kod žena kontrolne i skupine ispitanika s alkoholizmom prikazana je slikom 21. Nema značajne razlike u distribuciji genotipova i alela između kontrolne i skupine oboljelih od alkoholizma (Tablica 17, Slika 21).

Tablica 17. Distribucija genotipova i alela obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena MAO-B kod kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom podijeljenih po spolu.

<b>Žene</b>		
<b>A/G MAO-B</b>	<b>Ispitanici s alkoholizmom</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>
Genotip	N (%)	N (%)
AA	39 (31,5)	19 (34,5)
AG	65 (52,4)	27 (49,1)
GG	20 (16,1)	9 (16,4)
$\chi^2=0,20$ ; $df=2$ ; $p=0,907$		
<b>Muškarci</b>		
	<b>Ispitanici s alkoholizmom</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>
Genotip	N (%)	N (%)
A	295 (58,0)	285 (55,4)
G	214 (42,0)	229 (44,6)
$\chi^2=0,56$ ; $df=1$ ; $p=0,455$		



Slika 21. Distribucija alela obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* između ženskih kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom.  $\chi^2=0,02$ ;  $df=1$ ;  $p=0,891$

Također, frekvencije genotipova i alela uspoređene su između ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema prisutnosti specifičnog fenotipa povezanog s alkoholizmom što je prikazano u tablici 18 za ženske i tablici 19 za muške ispitanike. Kod ženskih ispitanika pronađena je značajna razlika u distribuciji genotipova između ispitanica sa i onih bez trenutno (u zadnjih tjedan dana) prisutnih suicidalnih simptoma (Tablica 18). Kod muških ispitanika ne postoji značajna razlika u distribuciji genotipova između ispitanika s različitim s alkoholizmom povezanim fenotipovima (Tablica 19).

Tablica 18. Distribucija genotipova obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena MAO-B između ženskih ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		AA	AG	GG	A	G
Simptomi ustezanja	Da	4 (20,0)	11 (55,0)	5 (25,0)	19 (47,5)	21 (52,5)
	Ne	33 (32,4)	54 (52,9)	15 (14,7)	120 (58,8)	84 (41,2)
		$\chi^2=1,94; df=2; p=0,380$			$\chi^2=1,32; df=1; p=0,251$	
Agresivno ponašanje	Da	1 (7,7)	10 (76,9)	2 (15,4)	12 (46,2)	14 (53,8)
	Ne	35 (33,4)	54 (51,4)	16 (15,2)	124 (59,0)	86 (41,0)
		$\chi^2=3,88; df=2; p=0,144$			$\chi^2=1,09; df=1; p=0,296$	
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	12 (37,5)	15 (46,9)	5 (15,6)	39 (60,9)	99 (55,6)
	Teško	25 (28,1)	49 (55,1)	15 (16,8)	25 (39,1)	79 (44,4)
		$\chi^2=1,00; df=2; p=0,606$			$\chi^2=0,35; df=1; p=0,555$	
Delirium tremens	Da	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (50,0)	2(50,0)
	Ne	36 (30,2)	64 (53,8)	19 (16,0)	136 (57,1)	102 (42,9)
		$\chi^2=0,78; df=2; p=0,678$			$\chi^2=0,50; df=1; p=0,823$	
Komorbidna depresija	Da	13 (31,7)	21 (51,2)	7 (17,1)	47 (57,3)	35 (42,7)
	Ne	24 (29,6)	44 (54,3)	13 (16,1)	92 (56,8)	70 (43,2)
		$\chi^2=0,11; df=2; p=0,949$			$\chi^2=0,00; df=1; p=0,953$	



Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)			Alel N (%)	
		AA	AG	GG	A	G
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	12 (30,0)	23 (57,5)	5 (12,5)	47 (58,8)	33 (41,2)
	Ne	24 (29,6)	42 (51,9)	15 (18,5)	90 (55,6)	72 (44,4)
		$\chi^2=0,75$ ; df=2; p=0,688			$\chi^2=0,11$ ; df=1; p=0,739	
Pokušaj suicida	Da	5 (16,1)	23 (74,2)	3 (9,7)	33 (53,2)	29 (46,8)
	Ne	31 (34,4)	42 (46,7)	17 (18,9)	104 (57,8)	76 (42,2)
		$\chi^2=7,04$ ; df=2; <b>p=0,030</b>			$\chi^2=0,23$ ; df=1; p=0,635	
Početak prekomjerne uporabe alkohola	> 25. godine	5 (20,8)	17 (70,8)	2 (8,4)	27 (56,3)	21 (43,7)
	< 25. godine	32 (32,6)	48 (49,0)	18 (18,4)	112 (57,1)	84 (42,9)
		$\chi^2=3,80$ ; df=2; p=0,150			$\chi^2=0,00$ ; df=1; p=0,960	

Tablica 19. Distribucija genotipova obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena MAO-B kod muških ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

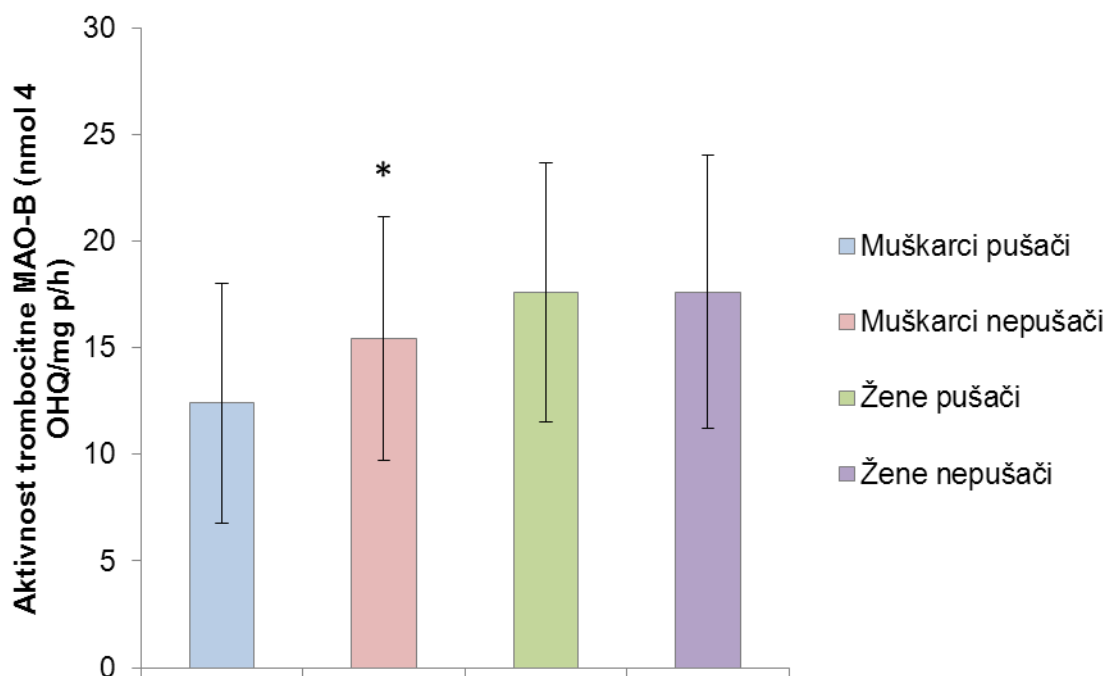
Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)	
		A	G
Simptomi ustezanja	Da	73 (59,8)	49 (40,2)
	Ne	225 (57,7)	165 (42,3)
		$\chi^2=0,10$ ; df=1; p=0,754	
Agresivno ponašanje	Da	79 (55,2)	64 (44,8)
	Ne	211 (59,1)	146 (40,9)
		$\chi^2=0,48$ ; df=1; p=0,490	
Težina ovisnosti o alkoholu	Blago	63 (61,2)	40 (38,8)
	Teško	232 (57,6)	171 (42,4)
		$\chi^2=0,30$ ; df=1; p=0,583	
Delirium tremens	Da	28 (68,3)	13 (31,7)
	Ne	270 (57,3)	201 (42,7)
		$\chi^2=1,44$ ; df=1; p=0,230	
Komorbidna depresija	Da	53 (56,4)	41 (43,6)
	Ne	245 (58,6)	173 (41,4)
		$\chi^2=0,08$ ; df=1; p=0,779	

Fenotip povezan s alkoholizmom		Genotip N (%)	
		A	G
Trenutno suicidalno ponašanje	Da	83 (59,7)	56 (40,3)
	Ne	212 (57,6)	156 (42,4)
		$\chi^2=0,11$ ; df=1; p=0,743	
Pokušaj suicida	Da	52 (66,7)	26 (33,3)
	Ne	239 (56,6)	183 (43,4)
		$\chi^2=2,33$ ; df=1; p=0,127	
Početak prekomjerne uoprabe alkohola	> 25. godine	108 (56,5)	83 (43,5)
	< 25. godine	183 (58,8)	128 (41,2)
		$\chi^2=0,17$ ; df=1; p=0,679	

#### 4.6. AKTIVNOST MONOAMINOOKSIDAZE TIP A (MAO-A) U TROMBOCITIMA

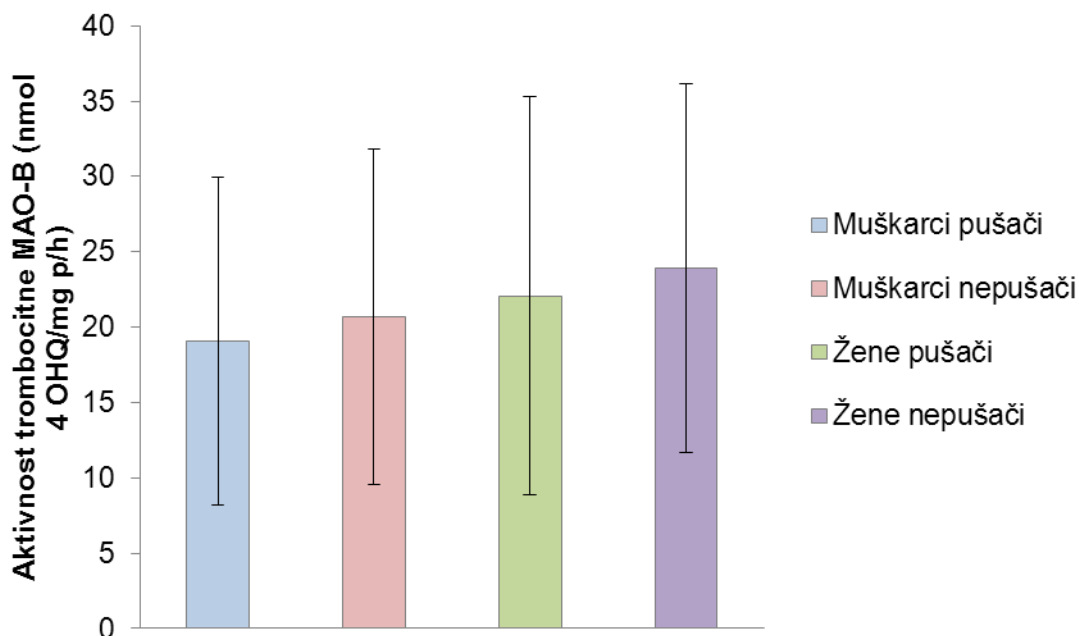
Spektrofluorimetrijskom metodom određena je aktivnost enzima MAO-B u trombocitima 300 (268 muškaraca i 32 žene) zdravih kontrolnih ispitanika te 658 (533 muškarca i 125 žena) ispitanika ovisnih o alkoholu. U literaturi je poznato da na aktivnost trombocitne MAO-B utječu spol i pušenje i to na način da je aktivnost snižena kod muškaraca i kod pušača, a taj trend je vidljiv i na slikama 22 i 23 koje prikazuju aktivnost trombocitne MAO-B kod grupa ispitanika podijeljenih prema spolu i pušačkom statusu. Statistička analiza dvostrukom analizom varijance (dvostruka ANOVA) pokazala je značajan utjecaj spola ( $F=7,81$ ; df=1; p=0,005), ali ne i pušenja ( $F=2,09$ ; df=1; p=0,149), na aktivnost trombocitne MAO-B u skupini ispitanika s alkoholizmom. Također, dvostruka ANOVA je otkrila značajan utjecaj spola ( $F=9,49$ ;

df=1; p=0,002) i izostanak utjecaja pušenja (F=1,63; df=1; p=0,202) i u skupini kontrolnih ispitanika. U skladu s iz literature poznatim činjenicama te rezultatima dobivenim dvostrukom ANOVA-om, sve daljnje analize provođene su uzimajući u obzir mogući utjecaj spola, ali i pušenja, na aktivnost trombocitne MAO-B.



Slika 22. Aktivnost trombocitne MAO-B u skupini kontrolnih ispitanika podijeljenih prema spolu i pušenju. Stupci odgovaraju srednjim vrijednostima sa standardnim devijacijama.

\* vs muškarci pušači (F=7,96; df=3; p<0,001; jednostruka ANOVA)



Slika 23. Aktivnost trombocitne MAO-B u skupini ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema spolu i pušenju. Stupci odgovaraju srednjim vrijednostima sa standardnim devijacijama.

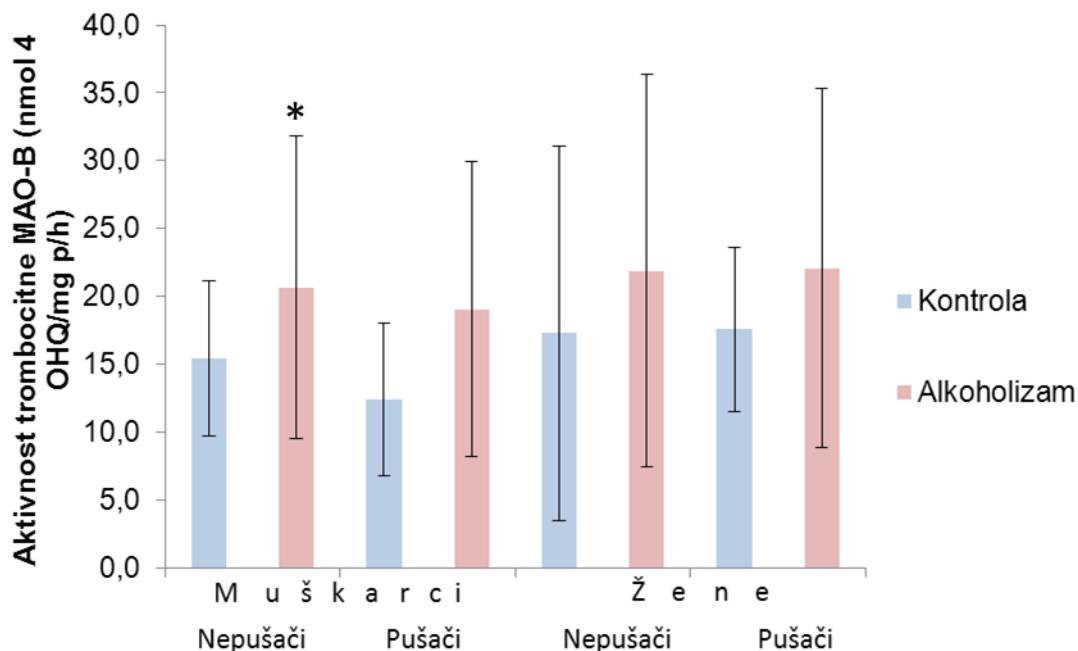
Kako bi se provjerilo postoji li povezanost polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* s aktivnošću trombocitne MAO-B, provedena je višestruka regresijska analiza s aktivnošću trombocitne MAO-B kao zavisnom varijablom te genotipom obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* kao nezavisnom varijablom. Analiza je izvršena zasebno za skupinu kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom. Također, ispitanici u obje skupine su podijeljeni po spolu, budući da kod muškaraca, za razliku od žena, ne postoji heterozigotni genotip. Model višestruke regresijske analize uvijek je korigiran za pušenje. Rezultati upućuju na izostanak značajne povezanosti između genotipa za polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* i aktivnosti trombocitne MAO-B kod muškaraca i žena kontrolne skupine kao i kod muškaraca i žena s alkoholizmom (Tablica 20).

Tablica 20. Rezultati višestruke regresijske analize s aktivnošću trombocitne MAO-B kao zavisnom i genotipom za polimorfizam A/G 13. introna gena MAO-B kao nezavisnom varijablom.

		Korigirani R <sup>2</sup>	Koeficijent	Std. pogreška	t	p
Kontrolni ispitanici	Žene	0,000	-0,61	1,599	-0,381	0,706
	Muškarci	0,052	0,160	0,700	0,228	0,820
Ispitanici s alkoholizmom	Žene	0,000	-0,171	1,786	-0,096	0,924
	Muškarci	0,005	-0,155	0,967	-0,160	0,873

Svi modeli su korigirani su za pušenje

Uspoređena je aktivnost trombocitne MAO-B između zdravih kontrolnih i ispitanika oboljelih od alkoholizma kako bi se provjerilo postoji li povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B s alkoholizmom. Pritom je korištena metoda višestruke regresijske analize s aktivnošću trombocitne MAO-B kao zavisnom varijablom. Nezavisna varijabla bila je dijagnoza (alkoholizam ili kontrola), a model je korigiran za spol i pušenje. Rezultat višestruke regresijske analize (Korigirani R<sup>2</sup>=0,078; Koeficijent=5,775; Std. pogreška=0,725; t=7,967; p<0,001) pokazuje da postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom (aktivnost trombocitne MAO-B povišena je kod ispitanika s alkoholizmom) na što upućuje i grafički prikaz dobivenih rezultata (Slika 24). Kako bi se detaljnije istražila ta značajna razlika, aktivnost MAO-B u trombocitima je podijeljena prema spolu, dijagnozi i pušačkom statusu (Slika 24). Pronađene su značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B (H=77,15; df=7; p<0,001; Kruskal-Wallis-ova ANOVA), koje su izazvane značajno (U=24723,00; p<0,001; Mann-Whitney) povišenom aktivnosti MAO-B u trombocitima muških ispitanika nepušača s alkoholizmom u odnosu na aktivnost enzima kod muških kontrolnih ispitanika nepušača.



Slika 24. Grafički prikaz aktivnosti trombocitne MAO-B kod ispitanika podijeljenih na kontrolne i ispitanike s alkoholizmom te prema spolu i pušenju.

\*vs kontrolni muškarci nepušači

Kako bi se provjerilo postoji li povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B s pojedinim fenotipom povezanim s alkoholizmom, provedena je višestruka regresijska analiza s aktivnošću MAO-B kao zavisnom i specifičnim fenotipom kao nezavisnom varijablom. Svaki model je korigiran za spol i pušenje. Dobiveni rezultati (Tablica 21) upućuju na značajnu razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između ispitanika sa i bez simptoma uzdržavanja te između ispitanika s procijenjenom blažom i onih s težom ovisnošću o alkoholu.

Tablica 21. Aktivnost trombocitne MAO-B kod ispitanika s alkoholizmom podijeljenih prema fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

Fenotip povezan s alkoholizmom	Korigirani R2	Koeficijent	Std. pogreška	t	p
Simptomi ustezanja	0,019	-2,157	1,053	-2,048	<b>0,041</b>
Agresivno ponašanje	0,011	-0,569	1,028	-0,554	0,58
Težina ovisnosti o alkoholu	0,03	-3,66	1,064	-3,44	<b>&gt;0,001</b>
Delirium tremens	0,013	0,333	1,767	0,189	0,851
Komorbidna depresija	0,016	-1,456	1,110	-1,313	0,190
Trenutno suicidalno ponašanje	0,014	-0,854	0,994	-0,859	0,391
Pokušaj suicida	0,017	-2,123	1,191	-1,784	0,075
Početak prekomjerne uporabe alkohola	0,015	-1,031	0,946	-1,089	0,277

Svi modeli korigirani su za spol i pušenje

#### 4.7. ANALIZA UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA ISPITANIKA S OVISNOŠĆU O ALKOHOLU PODIJELJENIH PREMA SUICIDALNOM POKUŠAJU

Ukupni plazmatski proteini analizirani su kod 10 ispitanika s ovisnošću o alkoholu raspoređenih u 5 skupina. Svaku skupinu činio je jedan ispitanik sa suicidalnim pokušajem i jedan ispitanik bez suicidalnih simptoma. Ispitanicima iste grupe je istovremeno vađen uzorak krvi, kao što je i proteomska analiza tih uzorka rađena istovremeno. Istaloženi i pročišćeni proteini iz plazme su razdvojeni pomoću dvodimenzionalne elektroforeze (2-DE), a dobiveni rezultati su uspoređeni između dva ispitanika jedne grupe. Kvantitativne i kvalitativne analize su ukazale na 14 različito eksprimiranih proteinskih točaka koje su izrezane iz gela, analizirane spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF te su pretraživanjem baze podataka NCBI



identificirani proteini prikazani u tablici 22. Proteini istog pristupnog broja koji su navedeni više puta zauzimaju različiti položaj tijekom 2-DE.

Pronađeni diferencijalno eksprimirani proteini imaju različite uloge o organizmu. Većina pronađenih diferencijalno eksprimiranih proteina može se dovesti u vezu s alkoholizmom, bolesti koja bitno doprinosi poremećajima bubrežne i funkcije gastrointestinalnog sustava, jetre te kardiovaskularnog sustava. Ukoliko se 10 ispitanika promatra kao dvije skupine, suicidalni i nesuicidalni ovisnici o alkoholu, moguće je uočiti da je od 14 različito eksprimiranih proteina, 1 od njih zastupljeniji kod suicidalnih u odnosu na nesuicidalne. Naime, haptoglobin Hp2, nalazimo u 5 od 5 suicidalnih i samo kod 1 od 5 nesuicidalnih ovisnika o alkoholu.

Tablica 22. Kvalitativno i/ili kvantitativno različito eksprimirani proteini kod parova suicidalnih i nesuicidalnih ispitanika s ovisnošću o alkoholu. Svakom proteinu pridružen je pristupni broj prema bazi podataka NCBI te postotak združivanja (eng. protein score). Strelica označava protein s povišenom ekspresijom. Ostali proteini imaju kvalitativno različitu ekspresiju.

<b>Protein</b>	<b>Pristupni broj</b>	<b>Postotak združivanja*</b>
Prekursor serumske komponente amiloida P [Homo sapiens]	gi 4502133	80
Apolipoprotein A-I, izoforma CRA-b [Homo sapiens]	gi 119587681	67
Apolipoprotein A-I, izoforma CRA-b [Homo sapiens]	gi 119587681	147
Retinol vezujući protein 4 iz plazme [Homo sapiens]	gi 18088326	86
Retinol vezujući protein 4 iz plazme [Homo sapiens]	gi 18088326	111
Haptoglobin Hp2	gi 223976	41
Lanac A, kristalna struktura varijante transtiretina	gi 212374952	52
Varijanta 1 prekursora apolipoproteina C3 [Homo sapiens] ↑	gi 167887493	120

<b>Protein</b>	<b>Pristupni broj</b>	<b>Postotak združivanja*</b>
Varijanta 1 prekursora apolipoproteina C3 [Homo sapiens] ↑	gi 167887493	49
hCG2045316 [Homo sapiens]	gi 119595991	23
Antigen MHC razreda I [Homo sapiens]	gi 46425446	24
Antigen MHC razreda I [Homo sapiens]	gi 46425446	18
Antigen MHC razreda I [Homo sapiens]	gi 46425446	21
Srčani troponin T tipa 2 [Homo sapiens]	gi 168985378	19

\*kombinirani postoci svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima jednog proteina. Viša vrijednost postotka združivanja znači pouzdaniju identifikaciju proteina.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju praćen je učinak polimorfizama Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* i -1021C/T gena *DBH*, VNTR-a u 3. egzonu gena *DRD4*, polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* i aktivnosti MAO-B na alkoholizam. Također je praćena ekspresija ukupnih citoplazmatskih proteina između suicidalnih i nesuicidalnih ispitanika ovisnih o alkoholu. Budući da je alkoholizam izrazito složena bolest s velikim brojem čimbenika koji mogu doprinjeti njegovom nastanku, u ovom istraživanju učinak navedenih čimbenika nije praćen samo globalno kod ispitanika s alkoholizmom i kontrolnih ispitanika, već je i sam alkoholizam podijeljen na specifične fenotipove povezane s alkoholizmom. Kao što je već rečeno, iako je moguće postojanje manjeg broja gena koji izravno utječu na razvoj ovisnosti o alkoholu, puno je veća vjerojatnost da postoje geni koji utječu na intermedijarne osobine, odnosno specifične fenotipove, koji onda doprinose potpunoj slici bolesti (Almasy, 2003). Ispitanici uključeni u ovu studiju su pomoću strukturnog upitnika za anamnezu alkoholizma, Hamiltonove ocjenske ljestvica za depresiju (Hamilton, 1960), upitnika za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođenog prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju (Brown i sur., 1979) i ljestvice općih kliničkih dojmova (Guy, 1976), podijeljeni na one sa ili bez fenotipova povezanih s alkoholizmom (ustezanje, agresivno ponašanje, težina ovisnosti o alkoholu, ustezanje s delirium tremensom, komorbidna depresija, trenutno suicidalno ponašanje, pokušaj suicida tijekom života, početak prekomjerne uporabe alkohola). Prosječni bodovi ostvareni na kliničkim ljestvicama pokazuju da su bolesnici s alkoholizmom blago suicidalni i agresivni te s težom alkoholnom ovisnošću. U skupini osoba oboljelih od alkoholizma bile su manje zastupljene agresivne žene nego agresivni muškarci, a muškarci su ostvarili i više ukupnih bodova na upitniku za anamnezu agresivnog ponašanja prilagođenog prema Brown-Goodwinovoj ljestvici za agresiju. Povećana agresija u skupini muških ispitanika je u skladu s podacima iz literature (Giancola i sur., 2002). Također, bilo je manje žena nego muškaraca sa simptomima ustezanja popraćenim delirium tremensom što je u skladu s podacima iz literature (Wojnar i sur., 1997). Komorbidna depresija i pokušaj

suicida su bili češći kod žena ovisnih o alkoholu nego kod muškaraca. Veći udio depresivnih žena nego muškaraca kod ovisnika o alkoholu je već pronađen u američkoj populaciji (Boykoff i sur., 2010). Pojačana stopa suicida kod ženskih u odnosu na muške ovisnike o alkoholu pronađena je i u mađarskoj populaciji (Kovacs, 2008). Kod ovisnika o alkoholu, bilo je manje žena nego muškaraca koji su s prekomjernom uporabom alkohola počeli prije 25. godine što je i prethodno pokazano na manjem broju ispitanika (Nedić i sur., 2013). Klinička obrada bolesnika je vrlo dobro provedena što je velika prednost ovakve vrste studije gdje je nužno da dijagnoza i klinička slika bolesti budu što uže definirane. Također, studija je provedena na etnički homogenim populacijama zdravih ili o alkoholu ovisnih bijelaca hrvatskog porijekla. Stavka etniciteta je bitna u ovoj vrsti istraživanja jer je već dokazano da etnička pripadnost bitno utječe na rezultat genetičkih istraživanja (Bamshad i sur., 2004; Noskova i sur., 2008; Pivac i sur., 2009).

Zdravi kontrolni ispitanici su u prosjeku bili mlađi od ispitanika s alkoholizmom što može biti nedostatak studije. Međutim do sada je pokazano (Hingson i sur., 2006) da je kod čak 15 % osoba ovisnih o alkoholu, dijagnoza ovisnosti postavljena prije 18. godine života. Također, kod čak 47 % ovisnika dijagnoza je postavljena prije 21., a kod dvije trećine prije 25. godine života. S obzirom na prosječnu dob kontrolne skupine ove studije, može se pretpostaviti da su ispitanici dovoljno stari da se kod njih isključi mogućnost naknadnog razvitka kroničnog alkoholizma.

Frekvencije genotipova obzirom na polimorfizme gena *COMT*, *DBH* i *MAO-B* u skupinama zdravih i kontrolnih ispitanika nisu odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Također, nije bilo odstupanja frekvencije genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* od Hardy-Weinbergove ravnoteže u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu, ali u skupini kontrolnih ispitanika je odstupanje postojalo. To je iznenađujući rezultat koji se ujedno može smatrati i nedostatkom studije. Za pretpostaviti je da je polimorfizam gena *DRD4* „osjetljiviji” na test Hardy-Weinbergove ravnoteže upravo zbog većeg broja mogućih genotipova. Tim više, usklađenosti s Hardy-Weinbergovom ravnotežom bitno doprinosi i uzorkovanje. Iako je uzorkovanje provedeno potpuno nasumično, činjenica je da su osobe koje su se liječile od

alkoholizma dolazile sa šireg područja Republike Hrvatske nego li zdrave osobe koje su dolazile ne redovni pregled.

### **5.1. RAZLIKE U FREKVENCIJI GENOTIPOVA I ALELA IZMEĐU KONTROLNIH I ISPITANIKA OVISNIH O ALKOHOLU**

U ovom istraživanju nije pronađena značajna razlika u frekvenciji niti genotipova ni alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH* i polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* između kontrolnih i ispitanika oboljelih od alkoholizma. Značajna razlika između kontrolnih ispitanika i bolesnika s alkoholizmom pokazana je u distribuciji genotipova (nosioci dugog alela i homozigoti za kratke alele) obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4*.

Distribucija genotipova i alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* je sukladna istraživanjima provedenim na hrvatskoj (Nedić i sur., 2011b), japanskoj (Ishiguro i sur., 1999), korejskoj (Kweon i sur., 2005) i američkoj (Foroud i sur., 2007; Hendershot i sur., 2012) populaciji. Međutim, postoje i istraživanja koja su dokazala povezanost između ovog polimorfizma gena *COMT* i alkoholizma kod ispitanika bijele rase (Sery i sur., 2006). Također je zanimljivo istraživanje osjetljivosti dopaminskih receptora u prefrontalnom korteksu i malom mozgu koje je pokazalo da je osjetljivost smanjena kod osoba ovisnih o alkoholu te da je pod utjecajem polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* (Schellekens i sur., 2012). Osim toga je pokazano (Enoch i sur., 2009) da taj polimorfizam utječe na nekoliko aspekata kognicije od kojih su neki povezani s razinom edukacije u američkih nativnih stanovnika. Pritom se alel Met povezuje s uspješnijim procesiranjem prefrontalnog korteksa i boljom pažnjom, ali i s povećanom osjetljivošću na stres (Enoch i sur., 2009). Uzme li se u obzir ideja da je za sklonost alkoholizmu odgovoran upravo sustav kognicije na kojeg utječu svjesna i nesvjesna djelovanja (Bechara, 2005; Wiers i sur., 2007), može se zaključiti da polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* ima utjecaja na razvoj alkoholizma ispunjavajući određene preduvjete, ali taj učinak, zbog složenosti bolesti, u konačnici nije globalno vidljiv.

Rezultati vezani uz distribuciju genotipova i alela obzirom na polimorfizam -1021C/T gena *DBH* između kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom su u skladu s istraživanjem koje također niječe povezanost polimorfizma -1021C/T gena *DBH* s razvojem ovisnosti o alkoholu (Kieling i sur., 2008), ali uz isticanje povezanosti polimorfizma s izlaganjem životnim događajima s negativnim i pozitivnim psihološkim učinkom. U istraživanju koje također upućuje na nedostatak povezanosti polimorfizma -1021C/T gena *DBH* i alkoholizma (Kohnke i sur., 2002), ističe se snižena aktivnost DBH u plazmi ovisnika o alkoholu u odnosu na kontrolne ispitanike. S druge strane, kombinirana studija ovisnosti o alkoholu i nikotinu je pokazala da osobe ovisne o alkoholu, a koje su ujedno i nosioci bar jednog alela T, puše manje cigareta dnevno nego homozigoti CC (Freire i sur., 2006). Predloženi model (Cubells i Zabetian, 2004) pretpostavlja da alel T snižuje aktivnost DBH te dovodi do snižene pretvorbe dopamina u noradrenalin pri čemu raste omjer dopamin/noradrenalin. Također, neki znanstevnici nastoje istaknuti ulogu noradrenergičkog sustava, možda čak i ispred uloge dopaminergičkog sustava, u nastanku ovisnog ponašanja (Verbanck i sur., 1990; Le i sur., 2005). Na kraju se može pretpostaviti da, iako se očekuje da polimorfizam -1021C/T gena *DBH* ima određen utjecaj na razvoj alkoholizma, taj utjecaj ostaje neizražen uslijed složenih mehanizama nastanka bolesti.

Ovo istraživanje je uputilo na značajnu razliku u distribuciji genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između kontrolnih i ispitanika s ovisnošću o alkoholu. Ispitanici obje skupine su podijeljeni na nosioce dugih alela, koji se smatraju rizičnim alelima (Ding i sur., 2002), i homozigote za kratke alele. Naši su rezultati pokazali da su nosioci dugih alela češći u skupini ovisnika o alkoholu nego u kontrolnoj skupini. Postoje istraživanja koja su pronašla vezu VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* i alkoholizma, ali uz povećani udio nosioca dugog alela u kontrolnoj skupini (Du i sur., 2010). Obzirom da je to istraživanje vršeno na području Meksika, jedno od mogućih objašnjenja ovakvog nalaza mogu biti i etničke razlike. U skladu s dobivenim rezultatima je i istraživanje koje je pokazalo povezanost dugog alela s pojačano izraženom žudnjom za alkoholom (Hutchison i sur., 2002). Iako se u ovom radu nije posebno istraživala žudnja za alkoholom, donekle je opravdano povući paralelu

između alkoholizma i pojačane žudnje za alkoholom. Postoje i rezultati potpuno oprečni ovima, gdje se nije čelo povezanost VNTR-a 3. egzona gena *DRD4*, ali i odabranog polimorfizma u genu za *DRD3*, s alkoholizmom (Parsian i sur., 1997). U skladu s hipotezom ovog rada i pretpostavkama iz literature (Asghari i sur., 1995; Schoots i Van Tol, 2003), vrlo je vjerojatno da alel s više od 6 ponavljanja može uzrokovati nedostatke u funkciji dopaminske neurotransmisije i posljedično pridonjeti razvoju alkoholizma. Kod provjere postoji li zajednički učinak kombinacije genotipova za VNTR 3. egzona gena *DRD4* i ostalih ispitivanih polimorfizama, pokazano je da su kombinacije nosioca dugih alela gena *DRD4* i nosioca alela G gena *COMT*, alela C gena *DBH* i alela A gena *MAO-B* kod ženskih ispitanika učestalije u alkoholizmu. U skladu s tim nalazima, interakcijski učinak VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* i polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* pronađen je kod ispitanika s Tajvana ovisnih o metamfetaminu (Li i sur., 2004a).

Rezultati ovog rada nisu potvrdili hipotezu o povezanosti polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* s alkoholizmom. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima nekih drugih istraživanja (Mokrović i sur., 2008). Također, nije pronađena veza između navedenog polimorfizma i aktivnosti trombocitne *MAO-B* niti u skupini ovisnika o alkoholu ni kod kontrolnih ispitanika. Isto je pokazano i na manjem broju zdravih ispitanika (Pivac i sur., 2006) te ispitanicima s PTSP-om (Pivac i sur., 2007), iako postoje i suprotni nalazi, dobiveni *in vitro* (Balciuniene i sur., 2002) ili na manjem broju ispitanika (Garpenstrand i sur., 2000). Polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* utječe na određene korake u postupku ekspresije gena (Jakubauskiene i sur., 2012), međutim, ukupni učinak ne mijenja aktivnost samog enzima. Razgradni enzim dopamina, *MAO-B*, važan je za normalnu funkciju dopaminergičkog sustava koja je ključna za nastanak ovisničkog ponašanja. Iako je odabrani polimorfizam gena *MAO-B* očito povezan s nekim od brojnih postupaka održavanja aktivnosti dopaminergičkog sustava, njegova izravna veza s alkoholizmom nije potvrđena.

## **5.2. RAZLIKE U FREKVENCiji GENOTIPOVA I ALELA IZMEĐU ISPITANIKA OVISNIH O AKOHOLU PODIJELJENIH PREMA FENOTIPOVIMA POVEZANIM S ALKOHOLIZMOM**

Vrlo su rijetke studije, ili ih uopće nema, koje istražuju polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH*, VNTR u 3. egzonu gena *DRD4* i polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* u pojedinim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.

### **5.2.1. SIMPTOMI USTEZANJA I DELIRIUM TREMENS**

Nije pronađena značajna razlika u frekvenciji genotipova i alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH*, VNTR u 3. egzonu gena *DRD4* i polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* između ispitanika sa i bez simptoma ustezanja kao ni ispitanika s i bez komplikacije simptoma ustezanja, delirium tremensa. Postoje istraživanja u kojima je pokazana razlika u audio i vizualnim smetnjama izazvanim ustezanjem između ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema genotipu obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* (Nakamura i sur., 2001). Zaključak navedenog istraživanja je da bi aktivnost *COMT*-a mogla utjecati na fenotipove alkoholizma, posebice na pojavu delirium tremensa. S druge strane, postoje i istraživanja koja su isti polimorfizam proučavala u drugim ovisnostima, poput ovisnosti o nikotinu, te pokazala sličnu distribuciju genotipova gena *COMT* (De Ruyck i sur., 2010). Moguće je da je neslaganje rezultata posljedica različite rasne pripadnosti uzimajući u obzir da su Nakamura i sur. svoje istraživanje proveli na japanskoj, a De Ruyck i sur. na belgijskoj populaciji. U tom slučaju ispitanici naše studije su etnički puno bliže belgijskoj populaciji kod koje je pronađena slična distribucija genotipova kao u ovom istraživanju.

Nema puno studija o povezanosti polimorfizma -1021C/T gena *DBH* i simptoma ustezanja ili delirium tremensa. Konkhe i sur. (2002) su, sukladno našim rezultatima, ustanovili da ne postoji povezanost odabranog polimorfizma gena *DBH*, kao ni aktivnosti plazmatske *DBH* i simptoma ustezanja i delirium tremensa kod osoba ovisnih o alkoholu. Uočeno je da prilikom simptoma ustezanja kod zlorabe alkohola



i drugih sredstava ovisnosti dolazi do osiromašenja dopaminom u području nukleus akumbensa (NAc) (Rossetti i sur., 1992). Pretpostavlja se, iako nije dokazano, da bi to moglo biti uzrokom žudnje za alkoholom kod ustezanja (Pickens i Calu, 2011). Enzim DBH, prevođenjem dopamina u noradrenalin, mogao bi imati sličan učinak na koncentraciju slobodnog dopamina, međutim postoji istraživanje prema kojem je u NAc-u štakora smanjena ekspresija DBH (Swanson i Hartman, 1975) ili je više lokalizirana u određenim dijelovima NAc-a (Berridge i sur., 1997).

Rijetke su studije o povezanosti VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* i simptoma ustezanja i delirium tremensa. Pokazano je da prilikom dužeg perioda ustezanja dolazi do smanjenja osjetljivosti dopaminskih receptora (Wiesbeck i sur., 1996). Kako još uvijek nije sigurno na koji način ovaj polimorfizam doprinosi sveukupnoj funkciji receptora, rezultati ovog rada mogli bi upućivati na to da polimorfizam ne izaziva smanjenje osjetljivosti receptora. Osim toga uočeno je (Czermak i sur., 2004) da kod ovisnika o alkoholu u dužem periodu ustezanja dolazi do smanjenja koncentracije *DRD4* mRNA u limfocitima, što također upućuje na dopaminergičku neravnotežu uslijed ustezanja.

U nedostatku studija o povezanosti polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* sa simptomima ustezanja i delirium tremensa, može se izvući zaključak na temelju rezultata ovog rada. Rezultati su pokazali da navedeni polimorfizam ne utječe na razvoj simptoma ustezanja.

Iako je dopaminergički sustav izrazito uključen u mehanizme nagrade koji mogu djelovati na poticajne učinke uporabe alkohola te time dovesti do ovisnosti o alkoholu (Koob i sur., 1998), moguće je da se rizik pojave kliničkih entiteta poput ustezanja, ili pak delirium tremensa, razlikuje od rizika razvoja ovisnosti.

### 5.2.2. AGRESIVNO PONAŠANJE

Nije pronađena značajna razlika u frekvenciji genotipova i alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH*, VNTR u 3. egzonu gena *DRD4* i polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* kod ispitanika kod kojih je

bilo prisutno agresivno ponašanje u odnosu na one kod kojih nije bilo agresivnog ponašanja.

Alel Met se povezuje sa sniženom aktivnošću enzima COMT koja može dovesti do povećane dopaminergičke aktivnosti u prefrontalnom korteksu, što pak može izazvati agresivno ponašanje. Međutim, dobiveni rezultati nisu pokazali da postoji povezanost između agresivnog ponašanja i polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*. Iako ne postoje istraživanja o distribuciji ovog polimorfizma u ispitanika s agresivnim ponašanjem i alkoholizmom, postoje ona koja ovaj polimorfizam povezuju s agresivnim ponašanjem u shizofreniji (Gu i sur., 2009; Monuteaux i sur., 2009; Tosato i sur., 2011; Bhakta i sur., 2012) ili poremećaju pažnje s hiperaktivnošću (Caspi i sur., 2008; Palmason i sur., 2010).

Smanjena aktivnost DBH u prefrontalnom korteksu mogla bi utjecati na omjer dopamina i noradrenalina dovodeći do hiperdopaminergije koja bi pogodovala razvoju agresivnog ponašanja (Coccaro i sur., 2003). Miševi s izbačenim genom za DBH pokazuju potpuni gubitak agresivnog ponašanja (Marino i sur., 2005) što uopćuje na važnost DBH i noradrenergičkog sustava u ostvarivanju agresivnog ponašanja. Unatoč svemu, rezultati ovog rada nisu pokazali povezanost polimorfizma -1021C/T gena *DBH* i agresivnog ponašanja u alkoholizmu.

Iako postoje dokazi o povezanosti agresivnog ponašanja i VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* kod adolescenata (Hohmann i sur., 2009) i u shizofreniji (Fresan i sur., 2007), rezultati ovog rada nisu pokazali tu povezanost u osoba s alkoholizmom.

Agresivno ponašanje u ispitanika s alkoholizmom nije bilo povezano s polimorfizmom A/G 13. introna gena *MAO-B*. U skladu s tim rezultatima, nije pronađena povezanost polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* s agresivnim ponašanjem u shizofreniji (Zammit i sur., 2004), kao ni kod suicidalnih osoba (Antypa i sur., 2012).

Za agresivno ponašanje, kao i za simptome ustezanja, velikim je dijelom odgovoran serotonergički sustav (Deakin i Graeff, 1991; Davidson i sur., 2000). Naime, serotonergički sustav ima inhibicijski učinak na agresivno ponašanje (Davidson i sur.,

2000) i kako bi se ono ispoljilo, potreban je kombinirani učinak povećane aktivnosti dopaminergičkog (Harrison i sur., 1997) i smanjene aktivnosti serotonergičkog (Coccaro, 1989; Miczek i sur., 1994) sustava. Poznato je da uporaba alkohola ima učinak pojačavanja serotonergičke funkcije (LeMarquand i sur., 1994) te se može pretpostaviti da, u slučaju ovisnika o alkoholu, uloga serotonergičkog sustava nadilazi ulogu dopaminergičkog sustava u razvoju agresivnog ponašanja.

### 5.2.3. TEŽINA OVISNOSTI O ALKOHOLU

Nisu pronađene značajne rezlike u frekvenciji genotipova i alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH*, VNTR u 3. egzonu gena *DRD4* i polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* između ispitanika s blažom i onih s težom ovisnošću o alkoholu.

Pretpostavlja se da alkohol postiže svoje poticajne učinke putem aktivacije mezolimbickog dopaminergičkog sustava (Di Chiara i Imperato, 1986). Još uvijek nije poznat točan mehanizam kojim se to postiže, ali pretpostavlja se da mehanizam uključuje interakciju s različitim neurotransmitterskim i neuropeptidnim sustavima (Vengeliene i sur., 2008), a jedan od načina uključuje opioidni sustav. Studije na životinjama upućuju na to da etanol potiče oslobađanje  $\mu$ -endorfina koji pak, aktivirajući  $\mu$ -opioidne receptore u ventralnom tegmentalnom području, potiče oslobađanje dopamina u NAc (Herz, 1997). Pritom je cijeli postupak najvjerojatnije popraćen inaktivacijom GABA-ergičkih neurona koji normalno inhibicijski nadziru dopaminergički sustav (Johnson i North, 1992). Nedavno istraživanje (Spreckelmeyer i sur., 2011) je pokazalo da postoji povezanost osjetljivosti na podražaje  $\mu$ -opioidnih receptora i težine ovisnosti o alkoholu.

Očito je da na težinu alkoholne ovisnosti utječe više neurotransmitterskih sustava, uključujući i dopaminergički i noradrenergički. Iako postoje osnove za pretpostavku da odabrani polimorfizmi svojim utjecajem na funkciju dopaminergičkog i noradrenergičkog sustava utječu i na težinu ovisnosti o alkoholu, vrlo je vjerojatno da je utjecaj nadvladan i brojnim ostalim čimbenicima.

#### 5.2.4. KOMORBIDNA DEPRESIJA

Nisu pronađene značajne razlike u frekvencije genotipova i alela obzirom na polimorfizme Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH*, VNTR u 3. egzonu gena *DRD4* i polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* između osoba ovisnih o alkoholu podijeljenih prema prisutnosti komorbidne depresije.

Već je prije pokazano da inhibitor enzima *COMT*, tolkapon, ima učinak na ublažavanje depresivnih simptoma (Fava i sur., 1999). Postoji i nekoliko studija u kojima se polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* povezuje (Szegedi i sur., 2005; Arias i sur., 2006) ili ne povezuje (Xu i sur., 2011) s odgovorom na antidepresivnu terapiju. Također, pokazana je povezanost genotipa Met/Met obzirom na navedeni polimorfizam gena *COMT* i depresivnih simptoma kod žena sa sindromom fibromialgije (Fernandez-de-Las-Penas i sur., 2012), ali ne i kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti (Arlt i sur., 2012). Veći broj studija je pokazalo da također ne postoji povezanost polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* i kliničke depresije (Cusin i sur., 2002; Serretti i sur., 2006; Baune i sur., 2008). S obzirom na to da je najveći posredni čimbenik u razvoju kliničke depresije stres, a alel Met se povezuje s povišenim endokrinim i subjektivnim odgovorom na stres (Jabbi i sur., 2007), za očekivati je da postoji utjecaj polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* na razvoj komorbidne depresije u alkoholizmu. Međutim, treba uzeti u obzir i etiologije alkoholne i kliničke depresije, koje se očito dovoljno različite da se ne uoči očekivani učinak polimorfizma.

U skladu s rezultatima, koji upućuju na to da ne postoji povezanost polimorfizma -1021C/T gena *DBH* i komorbidne depresije, su i rezultati studije koja je uključivala bolesnike s kliničkom depresijom (Hess i sur., 2009). Postoje istraživanja koja su pronašla da je aktivnost plazmatske *DBH* povišena u depresivnih bolesnika (Markianos i sur., 1976; Matuzas i sur., 1982), ali i istraživanja s potpuno oprečnim rezultatima (Lamprecht i sur., 1974; Mathew i sur., 1981). Usprkos teorijskom zaleđu koje upućuje na to da bi ovaj polimorfizam trebao biti povezan s alkoholnom depresijom, naši rezultati, kao i rezultati iz literature, nisu uspjeli potvrditi tu hipotezu.

Većina studija koje su se bavile utjecajem VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* na razvoj i ozbiljnost kliničke depresije niječu postojanje povezanosti (Frisch i sur., 1999; Serretti i sur., 1999; Serretti i sur., 2002; Garriock i sur., 2006). Manki i sur. (1996) su pronašli da su nosioci alela s 5 ponavljanja češće depresivni nego nosioci alela s 4 ponavljanja, međutim, ispitanici u toj studiji su bili pripadnici azijske populacije za koje je već potvrđena razlika, u odnosu na europske populacije, u frekvencije genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* (Chang i sur., 1996).

Studija provedena na zdravoj populaciji (Dlugos i sur., 2009) pokazala je povezanost polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* i razine negativne emocionalnosti koja se smatra pokazateljem sklonosti ka razvoju kliničke depresije. Također, postoji studija koja isti polimorfizam dovodi u vezu s odgovorom na terapiju kliničke depresije antidepressivima mitrazapinom i paroksetinom (Tadić i sur., 2007). Poznato je i da ireverzibilni inhibitor enzima MAO-B, selegilin, ima antidepressivne učinke (Culpepper i Kovalick, 2008). Iako je za pretpostaviti da odabrani polimorfizam utječe na razvoj komorbidne depresije u alkoholizmu, dobiveni rezultati nisu to potvrdili.

Zbog svog sedativnog djelovanja, alkohol se vrlo često konzumira sa svrhom oslobađanja od depresije i anksioznosti (Spanagel i sur., 1995; Da Silva i sur., 2005). S druge strane, dugotrajna konzumacija alkohola može biti i uzrokom depresije, dok apstinencijski sindrom može izazvati pojavu anksioznosti (Regier i sur., 1990). Zbog navedenog se nameće zaključak da depresija povezana s alkoholizmom ima specifičnu etiologiju koja se donekle razlikuje od etiologije kliničke depresije kao zasebnog entiteta.

#### **5.2.5. TRENUTNO SUICIDALNO PONAŠANJE I POKUŠAJ SUICIDA TIJEKOM ŽIVOTA**

Rezultati su pokazali da postoji povezanost pokušaja suicida s polimorfizmom Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* i polimorfizmom A/G 13. introna gena *MAO-B* kod žena. Također, rezultati upućuju na povezanost polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* i trenutnog suicidalnog ponašanja. Međutim, nije pronađena povezanost polimorfizma -1021C/T gena *DBH* i VNTR-a u 3. egzonu gena *DRD4* s trenutnim suicidalnim ponašanjem ili pokušajem suicida.

U literaturi postoje istraživanja koja niječu povezanost polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* s pokušajem suicida (Liou i sur., 2001) ili suicidalnim ponašanjem (Zalsman i sur., 2008; Tovilla-Zarate i sur., 2011), ali postoje i oprečni rezultati. Povećeni udio genotipa Met/Met je u skladu s nekim prijašnjim istraživanjima (Rujescu i sur., 2003), istraživanjem s manjim brojem ispitanika ovisnih o alkoholu (Nedić i sur., 2011b), kao i istraživanjem *post mortem* kod osoba koje su počinile suicid (Ono i sur., 2004). Rezultati ovog, kao i nekih drugih istraživanja obuhvaćenih meta-analizom (Kia-Keating i sur., 2007), upućuju na povezanost polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* sa suicidalnim ponašanjem.

U skladu s dobivenim rezultatima, postoje istraživanja koja niječu povezanost polimorfizma -1021C/T gena *DBH* s pokušajem suicida (Murphy i sur., 2011). Iako *DBH* povezuje dva neurotransmitterska sustava, dopaminergički i noradrenergički, čija uloga u suicidalnom ponašanju se često ističe (Pitchot i sur., 2001; Pandey i Dwivedi, 2007), ovi rezultati nisu uspjeli dokazati vezu između polimorfizma gena *DBH* i suicidalnog ponašanja i pokušaja suicida.

Rezultati o nedostatku povezanosti VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* s trenutnim suicidalnim ponašanjem i pokušajem suicida su u skladu s nekim drugim istraživanjima koja su uključivala osobe koje su pokušale suicid u odrasloj (Persson i sur., 1999) ili adolescentnoj dobi (Zalsman i sur., 2004).

Dobiveni rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u distribuciji genotipova, ali ne i alela, obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* između ženskih ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih obzirom na to jesu li tijekom života pokušali izvršiti suicid. Razlika izostaje kod muških ispitanika podijeljenih na isti način što je u skladu s postojećim istraživanjima (Antypa i sur., 2012). Razlika uvjetovana spolom je, na neki način, i očekivana obzirom na činjenicu da se gen *MAO-B* nalazi na kromosomu X pa žene imaju njegove dvije kopije.

Suicidalno ponašanje je često uvjetovano stresnim događajima, a upravo su dopaminergički i noradrenergički sustavi uključeni u nadzor odgovora na stres (Westrin, 2000). Neurobiološki nalazi upućuju na sniženu razinu noradrenalina i

aktivnost noradrenergičkih neurona te povećanu aktivnost  $\alpha$ 2-adrenergičkih receptora u moždanom deblu žrtva suicida (Ordway i sur., 1994). Također, nusprodukti metabolizma dopamina su povišeni kod osoba koje su počinile nasilni suicid (Maris, 2002). Sve navedeno upućuje na moguću povezanost odabranih polimorfizama i suicidalnog ponašanja, što je za neke polimorfizme i pronađeno. Istraživanja na primatima su pokazala da na abnormalnosti odgovora na stres, bitan utjecaj imaju okolišni čimbenici iz rane životne dobi (Bastian i sur., 2003) pa je preporučljivo u ovakvom tipu istraživanja dobiti i te podatke o ispitanicima.

#### 5.2.6. POČETAK PREKOMJERNE UPORABE ALKOHOLA

Dobiveni rezultati su ukazali na povećani udio genotipa Val/Val obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* kod osoba s ranim početkom alkoholizma. Za sada su istraživanja slične tematike izrazito rijetka. Postoji studija kod koje se navode suprotni rezultati uz isticanje nedostataka povezanosti polimorfizma Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* sa životnom dobi u kojoj počinje prekomjerna uporaba alkohola (Hallikainen i sur., 2000). Više znanstvenika tvrdi da važna razlika između ranog i kasnog početka alkoholizma leži u aktivnosti serotonergičkog i dopaminergičkog sustava. Pri čemu je rani početak alkoholizma pod utjecajem serotonergičkog, a kasni dopaminergičkog sustava (Cloninger, 1995; Kranzler i sur., 1996). Kako se genotip Val/Val povezuje s povećanom aktivnošću enzima *COMT*, koja rezultira smanjenom aktivnošću dopaminergičkog sustava, posebice u prefrontalnom korteksu, za pretpostaviti je da će taj genotip biti zastupljeniji u osoba s ranim početkom alkoholizma, što je i potvrđenom ovim rezultatima.

Rezultati su pokazali kako nema značajne povezanosti polimorfizama -1021C/T gena *DBH*, VNTR-a 3. egzona gena *DRD4* i polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B* s početkom prekomjerne uporabe alkohola.

Često se rani početak (prije 25. godine života) prekomjerne uporabe alkohola povezuje sa sniženom aktivnošću enzima *MAO-B* (Sullivan i sur., 1990; von Knorring i sur., 1991; Farren i Tipton, 1999). Kako se pokazalo da polimorfizam 13. introna

gena *MAO-B* nije povezan s aktivnošću enzima, nije neobično da ne postoji ni veza s početkom prekomjerne uporabe alkohola.

Uz podjelu prema dobi u kojoj je započela prekomjerna uporaba alkohola, ističu se još neki kriteriji koji idu uz takvu podjelu (povećana sklonost ka traženju novotarija (NS), izbjegavanje štete (HA), ovisnost o nagradi (RD)) (Cloninger, 1987). Pritom su navedene značajke osobnosti povezane s dopaminergičkim (NS), serotonergičkim (HA) i noradrenergičkim (RD) sustavom (Cloninger, 1987). Iako su DRD4 i enzim DBH ključne sastavnice dopaminergičkog i noradrenergičkog sustava, izostao je značajan učinak polimorfizama njihovih gena na početak prekomjerne uporabe alkohola. Mogući razlog leži i u činjenici da dodatni kriteriji u podjeli na rani i kasni početak alkoholizma nisu uzeti u obzir.

### **5.3. AKTIVNOST TROMBOCITNE MAO-B**

U skladu s literaturnim podacima (Coccini i sur., 2005; Nenadić Šviglin i sur., 2011), rezultati su pokazali da je aktivnost trombocitne MAO-B viša kod ženskih nego kod muških ispitanika. Pretpostavlja se da su spolne razlike u aktivnosti MAO-B posljedica povišene ekspresije proteina u trombocitima žena. Osnova te pretpostavke leži u činjenici da te razlike slabe kad se aktivnost izrazi u odnosu na koncentraciju proteina MAO-B u trombocitima (Snell i sur., 2002). Suprotno navodima iz literature (Garpenstrand i sur., 2000; Orelanđ i sur., 2002; Fowler i sur., 2003; Orelanđ, 2004; Costa-Mallen i sur., 2005; Pivac i sur., 2006), pokazalo se da pušenje nema naročito izražen učinak na aktivnost trombocitne MAO-B između skupina s ovisnošću o alkoholu, no ta je razlika bila značajna kod muških kontrolnih ispitanika. Naime aktivnost trombocitne MAO-B je bila značajno niža u pušača u odnosu na u nepušače. Postoje istraživanja koja upućuju na to da pušenje izaziva dugotrajne učinke putem epigenetskog nadzora aktivnosti MAO-B (Launay i sur., 2009).

Aktivnost trombocitne MAO-B je bila povišena kod svih ispitanika s alkoholizmom u usporedbi s kontrolnim ispitanicima. Ti rezultati nisu u skladu s većinom dosadašnjih studija koje su pronašle sniženje aktivnosti trombocitne MAO-B kod ovisnika o



alkoholu u odnosu na zdravu kontrolu (Demir i sur., 2002; Snell i sur., 2002) ili pak nisu pronašle razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između navedenih ispitivanih skupina (Čičin-Šain i sur., 2007). Zbog čestih neslaganja u rezultatima studija koje proučavaju aktivnost trombocitne MAO-B, već su predloženi (Anthenelli i sur., 1995; Whitfield i sur., 2000) čimbenici o kojima bi u takvim studijama trebalo voditi računa: trajanje perioda ustezanja, pušenje, etnicitet, utjecaj drugih psihopatoloških stanja i utjecaj značajki osobnosti. Osim toga, uzrok neslaganja često može biti i razlika u veličini ispitivanog uzorka.

Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ovisnika o alkoholu podijeljenih prema prisutnosti sindroma ustezanja, ali ne i delirium tremensa. Ispitanici kod kojih su prisutni simptomi ustezanja su imali nižu aktivnost trombocitne MAO-B. Osobe sa simptomima ustezanja vjerojatno duži period nisu konzumirale alkohol pa im se aktivnost trombocitne MAO-B počinje spuštati. Slično se može zaključiti i prema studiji koja je pokazala da se aktivnost trombocitne MAO-B ne razlikuje između kontrolnih i ispitanika kod kojih već duže vrijeme traje period ustezanja (Berggren i sur., 2002). Coccini i sur. (2002) su također pokazali da aktivnost trombocitne MAO-B pada s duljinom trajanja ustezanja. Nadalje, pokazano je (Sandler, 1983) da se tijekom ustezanja u mozgu pojačano eksprimira tribulin, ligand benzodiazepinskih receptora i endogeni inhibitor MAO-B, koji bi mogao izazvati simptome delirium tremensa. Alkohol suprimira proizvodnju tribulina, a osobe su potaknute na uporabu alkohola kako bi se spriječili učinci pojačane proizvodnje tribulina (Sandler, 1983).

Ne postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ovisnika o alkoholu podijeljenih prema prisutnosti agresivnog ponašanja. Istraživanje provedeno na primatima (Wargelius i sur., 2010) je pokazalo da oni majmuni koji su nakon unosa alkohola bili i agresivni, imaju sniženu aktivnost trombocitne MAO-B. Slična poveznica između agresije i snižene aktivnosti trombocitne MAO-B pronađena je i kod agresivnih osoba pritvorenih zbog kažnjivih prijestupa (Garpenstrand i sur., 2002; Skondras i sur., 2004). Za pretpostaviti je da se agresivno ponašanje dovodi u vezu

sa sniženom aktivnošću enzima MAO-B jer to znači i veću količinu raspoloživog dopamina koja je nužna za poticanje agresivnog ponašanja (Harrison i sur., 1997). Postoje i istraživanja čiji rezultati su u skladu s rezultatima ovog rada i koja nisu pronašla povezanost agresivnog ponašanja i aktivnosti trombocitne MAO-B (Devor i sur., 1994).

Rezultati su pokazali da osobe s procijenjenom težom ovisnošću o alkoholu imaju višu aktivnost trombocitne MAO-B od onih s lakšom ovisnošću. Ti bi se rezultati mogli objasniti i time što viša aktivnost enzima znači i pojačanu razgradnju dopamina koja rezultira nižom količinom slobodnog dopamina što, pak, pojedinca može poticati na uporabu alkohola. S druge strane, neki autori (Farren i sur., 1998) su pronašli da ne postoji korelacija između aktivnosti trombocitne MAO-B i težine ovisnosti o alkoholu.

Rezultati nisu uspjeli potvrditi hipotezu da postoji razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ovisnika o alkoholu podijeljenih prema prisustvu komorbidne depresije što je u skladu s nekim istraživanjima (Whitfield i sur., 2000; Pombo i sur., 2008). Postoje i oprečna istraživanja koja depresiju povezuju sa sniženom aktivnošću trombocitne MAO-B (Wahlund i sur., 1995; Uzbekov i sur., 2006). Potonji rezultati nisu u skladu s činjenicom da se kao vrlo uspješni antidepresivi, između ostalih, koriste upravo inhibitori enzima MAO-B (Thase i sur., 1995; Robinson, 2002). Naime, iz tih podataka proizilazi da MAO-B ima važnu ulogu u nastanku i održavanju depresije. Međutim, korištenje inhibitora MAO-B kao antidepresiva se ne slaže s time da je aktivnost MAO-B ionako snižena u depresivnih pacijenata. Izostanak razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između depresivnih i nedeprativnih ovisnika o alkoholu može se pokušati objasniti i mogućom različitom etiologijom alkoholne i kliničke depresije.

Rezultati ovog rada ističu izostanak značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između trenutno suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu te između ovisnika o alkoholu koji jesu i onih koji nisu pokušali suicid tijekom života. Ti rezultati su u skladu s nekim postojećim studijama (Muller-Oerlinghausen i sur., 2004; Lewitzka i sur., 2008), ali se ne slažu sa studijom u kojoj je pronađena snižena aktivnost trombocitne

MAO-B kod suicidalnih u odnosu na nesuicidalne depresivne pacijente i zdrave kontrolne ispitanike (Roggenbach i sur., 2007a).

Dobiveni rezultati nisu potvrdili pretpostavku da postoji razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između osoba s ranim i onih s kasnim početkom alkoholizma, što se slaže s prethodnim istraživanjima (Suarez i sur., 1995; Whitfield i sur., 2000), ali je suprotno drugim nalazima (Pandey i sur., 1988; von Knorring i sur., 1991).

Iako je enzim MAO-B važna karika u normalnoj funkciji dopaminergičkog sustava te je za pretpostaviti da utječe na pojedine fenotipove alkoholizma, povezanost je pronađena samo kod sindroma ustezanja i težine ovisnosti o alkoholu. Alkoholizam je vrlo kompleksna bolest te se podjelom na pojedine fenotipove povećava vjerojatnost pronalaženja povezanosti s pojedinim biološkim pokazateljima. Međutim, čak je i biološka osnova pojedinih fenotipova povezanih s alkoholizmom dovoljno složena da je nemoguće odvojiti utjecaj jednog od utjecaja većeg broja drugih čimbenika koji doprinose razvoju pojedinog fenotipa.

#### **5.4. ANALIZA UKUPNIH PROTEINA U PLAZMI SUICIDALNIH I NESUICIDALNIH OVISNIKA O ALKOHOLU**

Kvantitativne i kvalitativne analize su pokazale 14 (prekursor serumske komponente amiloida P; apolipoprotein A-I, izoforma CRA-b; retinol vezujući protein 4 iz plazme; haptoglobin Hp2; lanac A, kristalna struktura varijante transtiretina; varijanta 1 prekursora apolipoproteina C3; hCG2045316; antigen MHC razreda I; srčani troponin T tipa 2) različito eksprimiranih proteinskih točaka koje su identificirane pretraživanjem baze podataka NCBI.

Većina pronađenih diferencijalno eksprimiranih proteina može se dovesti u vezu s alkoholizmom, ali ne i specifično sa suicidalnom ponašanjem. Za prekursora serumske komponente amiloida P pronađeno je da se sintetizira kao odgovor na akutnu fazu infekcije (Lu i sur., 2008), ima utjecaja na stvaranje i održavanje amiloidnih plakova (Kiernan i sur., 2004) te se predlaže i kao biomarker Alzheimerove

bolesti (Verwey i sur., 2008). Apolipoprotein A-I sudjeluje u povratnom prijenosu kolesterola iz tkiva u jetru potičući izlučivanje kolesterola iz tkiva (Hozoji i sur., 2009), a pronađen je pojačano eksprimiran u serumu ovisnika o alkoholu (Sogawa i sur., 2011). Kronična uporaba alkohola povećava koncentraciju apolipoproteina u serumu, uključujući apolipoprotein A-I i C-III (Lecomte i sur., 1996). Retinol vezujući protein (RBP) dostavlja retinol iz jetrenih zaliha u periferna tkiva, a u plazmi se kompleks RBP-retinol veže za transtiretin sprječavajući njegov gubitak bubrežnom filtracijom (Frey i sur., 2009). Pronađena je njegova promjenjena ekspresija u plazmi ovisnika o alkoholu (Freeman i sur., 2011). Haptoglobin se veže sa slobodnim plazmatskim hemoglobinom sprječavajući gubitak željeza putem bubrega i čineći hemoglobin dostupnim razgradnim enzimima (Fasano, 2011). Kod ovisnika o alkoholu pronađena je abnormalna glikozilacija haptoglobina u serumu (Gravel i sur., 1996). Poremećaji srčanog troponina T tipa 2 uzrokom su proširene kardiomiopatije tipa 1D, a pronađeni su slučajevi akutne alkoholne miopatije udružene s mioglobinurijom uzrokovanom prekomjernom uporabom alkohola (Zhu i sur., 2003).

Protein haptoglobin Hp2 je eksprimiran u 5 od 5 suicidalnih i samo kod 1 od 5 nesuicidalnih ovisnika o alkoholu. Uzimajući u obzir prethodne nalaze o povećanoj koncentraciji haptoglobina kod ovisnika o alkoholu, ali i kod depresivnih pacijenata (Joyce i sur., 1992), postoji mogućnost određene povezanosti ekspresije haptoglobina i suicidalnosti.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Kontrolni i ispitanici s alkoholizmom se razlikuju prema frekvenciji genotipova obzirom na polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja u 3. egzonu gena *DRD4*, što upućuje na postojanje utjecaja tog polimorfizma na nastanak ovisnosti o alkoholu.
2. Nema značajnog utjecaja polimorfizama Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH* i A/G 13. introna gena *MAO-B* na razvoj alkoholizma.
3. Postoji značajna interakcija u utjecaju na razvoj alkoholizma između nosioca dugih alela gena *DRD4* i nosioca alela G gena *COMT*, alela C gena *DBH* i, kod ženskih ispitanika, alela A gena *MAO-B*.
4. Polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* je povezan s trenutno prisutnim simptomima suicidalnog ponašanja, pokušajem suicida tijekom života te s početkom prekomjerne uporabe alkohola. Kod ostalih fenotipova povezanih s alkoholizmom ne postoje značajne razlike u frekvencije genotipova i alela obzirom na polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* što upućuje na izostanak utjecaja polimorfizma na nastanak tih fenotipova.
5. Polimorfizam -1021 C/T gena *DBH* nije povezan s proučavanim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
6. Polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja u 3. egzonu gena *DRD4* nije povezan s proučavanim fenotipovima povezanim s alkoholizmom.
7. Frekvencije genotipova, ali ne i alela, obzirom na polimorfizam A/G 13. egzona gena *MAO-B* razlikuju se između ženskih ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema tome jesu li ili nisu pokušali suicid tijekom života. Kod ostalih fenotipova povezanih s alkoholizmom ne postoje značajne razlike u frekvencije genotipova ili alela obzirom na polimorfizam A/G 13. egzona gena *MAO-B* kod muških i ženskih ispitanika, što upućuje na izostanak utjecaja polimorfizma na nastanak tih fenotipova.
8. Aktivnost trombocitne MAO-B ispitanika s alkoholizmom je povišena u odnosu na aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika.

9. Aktivnost trombocitne MAO-B nije pod utjecajem polimorfizma A/G 13. introna gena *MAO-B*.
10. Aktivnost trombocitne MAO-B se razlikuje između ovisnika o alkoholu sa i onih bez simptoma ustezanja te između ispitanika s težom i onih s lakšom ovisnošću alkoholu. Kod ostalih fenotipova povezanih s alkoholizmom ne postoje značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B.
11. Kvantitativne i kvalitativne analize ukupnih citoplazmatskih proteina su pokazale 14 različito eksprimiranih proteinskih točaka između suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu. Najvećoj ukupnoj razlici doprinosi različita ekspresija proteina haptoglobin Hp2.

# 7. LITERATURA

Agrawal A, Lynskey MT (2008) Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction* **103**: 1069-1081

Almasy L (2003) Quantitative risk factors as indices of alcoholism susceptibility. *Ann Med* **35**: 337-343

American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.

Amit Z, Brown ZW (1982) Actions of drugs of abuse on brain reward systems: a reconsideration with specific attention to alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* **17**: 233-238

Anthenelli RM, Smith TL, Craig CE, Tabakoff B, Schuckit MA (1995) Platelet monoamine oxidase activity levels in subgroups of alcoholics: diagnostic, temporal, and clinical correlates. *Biol Psychiatry* **38**: 361-368

Anton RF (1995) New directions in the pharmacotherapy of alcoholism. *Psychiatric Annals* **25**: 353-362

Antypa N, Giegling I, Calati R, Schneider B, Hartmann AM, Friedl M, Konte B, Lia L, De Ronchi D, Serretti A, Rujescu D (2012) MAOA and MAOB polymorphisms and anger-related traits in suicidal participants and controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*

Arias B, Serretti A, Lorenzi C, Gasto C, Catalan R, Fananas L (2006) Analysis of COMT gene (Val 158 Met polymorphism) in the clinical response to SSRIs in depressive patients of European origin. *J Affect Disord* **90**: 251-256

Arlt S, Demiralay C, Tharun B, Geisel O, Storm N, Eichenlaub M, Lehmbeck JT, Wiedemann K, Leuenberger B, Jahn H (2012) Genetic Risk Factors for Depression in Alzheimer s Disease Patients. *Curr Alzheimer Res*

Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH (1995) Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* **65**: 1157-1165

Axelrod J (1957) O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols in vitro and in vivo. *Science* **126**: 400-401

Axelrod J, Tomchick R (1958) Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J Biol Chem* **233**: 702-705

Babić M, Nedic G, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N (2012) Lack of association between dopamine receptor D4 variable numbers of tandem repeats gene polymorphism and smoking. *Neurosci Lett* **520**: 67-70

- Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, Seeburg PH, Shih JC (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4934-4938
- Bai HW, Shim JY, Yu J, Zhu BT (2007) Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases. *Chem Res Toxicol* **20**: 1409-1425
- Bainbridge JL, Page RL, 2nd, Ruscin JM (2008) Elucidating the mechanism of action and potential interactions of MAO-B inhibitors. *Neurol Clin* **26**: S85-96, vi
- Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Pettersson U, Jazin E (2002) Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet* **110**: 1-7
- Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, Stephens JC (2004) Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nat Rev Genet* **5**: 598-609
- Bastian ML, Sponberg AC, Suomi SJ, Higley JD (2003) Long-term effects of infant rearing condition on the acquisition of dominance rank in juvenile and adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Dev Psychobiol* **42**: 44-51
- Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, Domschke K (2008) Association of the COMT val158met variant with antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychopharmacol* **33**: 924-932
- Bechara A (2005) Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. *Nat Neurosci* **8**: 1458-1463
- Belpaire F, Laduron P (1968) Tissue Fractionation and Catecholamines .I. Latency and Activation Properties of Dopamine-Beta-Hydroxylase in Adrenal Medulla. *Biochemical Pharmacology* **17**: 411-&
- Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat Genet* **12**: 81-84
- Berggren U, Eriksson M, Fahlke C, Blennow K, Sundkler A, Balldin J (2002) Platelet monoamine oxidase-B activity in type 1 alcohol-dependent subjects in sustained full remission. *Alcohol Alcohol* **37**: 340-343
- Berridge CW, Stratford TL, Foote SL, Kelley AE (1997) Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse* **27**: 230-241
- Bertocci B, Miggiano V, Da Prada M, Dembic Z, Lahm HW, Malherbe P (1991) Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1416-1420



- Bhakta SG, Zhang JP, Malhotra AK (2012) The COMT Met158 allele and violence in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* **140**: 192-197
- Biederman J, Wilens TE, Mick E, Faraone SV, Spencer T (1998) Does attention-deficit hyperactivity disorder impact the developmental course of drug and alcohol abuse and dependence? *Biol Psychiatry* **44**: 269-273
- Biernacka JM, Geske J, Jenkins GD, Colby C, Rider DN, Karpyak VM, Choi DS, Fridley BL (2013) Genome-wide gene-set analysis for identification of pathways associated with alcohol dependence. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**: 271-278
- Bilder RM, Volavka J, Lachman HM, Grace AA (2004) The catechol-O-methyltransferase polymorphism: relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacol* **29**: 1943-1961
- Binda C, Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson DE, Mattevi A (2002) Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol* **9**: 22-26
- Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (eds) (2008) *Encyclopedia of Neuroscience* Heidelberg: Springer
- Blackburn NJ, Hasnain SS, Pettingill TM, Strange RW (1991) Copper K-Extended X-Ray Absorption Fine-Structure Studies of Oxidized and Reduced Dopamine Beta-Hydroxylase - Confirmation of a Sulfur Ligand to Copper(I) in the Reduced Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 23120-23127
- Boudikova B, Szumlanski C, Maidak B, Weinshilboum R (1990) Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther* **48**: 381-389
- Bowirrat A, Oscar-Berman M (2005) Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and Reward Deficiency syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **132B**: 29-37
- Boyce JM, Risinger FO (2002) Dopamine D3 receptor antagonist effects on the motivational effects of ethanol. *Alcohol* **28**: 47-55
- Boykoff N, Schneekloth TD, Hall-Flavin D, Loukianova L, Karpyak VM, Stevens SR, Biernacka JM, Mrazek DA, Frye MA (2010) Gender Differences in the Relationship between Depressive Symptoms and Cravings in Alcoholism. *Am J Addiction* **19**: 352-356
- Brown GL, Goodwin FK, Ballenger JC, Goyer PF, Major LF (1979) Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites. *Psychiatry Res* **1**: 131-139
- Brown ZW, Amit Z, Levitan DE, Ogren SO, Sutherland EA (1977) Noradrenergic mediation of the positive reinforcing properties of ethanol: II. Extinction of ethanol-drinking behavior in laboratory rats by inhibition of dopamine-beta-hydroxylase. Implications for treatment procedures in human alcoholics. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **230**: 76-82

- Buchsbaum MS, Coursey RD, Murphy DL (1976) The biochemical high-risk paradigm: behavioral and familial correlates of low platelet monoamine oxidase activity. *Science* **194**: 339-341
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990) Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* **55**: 1067-1070
- Caspi A, Langley K, Milne B, Moffitt TE, O'Donovan M, Owen MJ, Polo Tomas M, Poulton R, Rutter M, Taylor A, Williams B, Thapar A (2008) A replicated molecular genetic basis for subtyping antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* **65**: 203-210
- Cass WA, Zahniser NR, Flach KA, Gerhardt GA (1993) Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *J Neurochem* **61**: 2269-2278
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK (1996) The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Human Genetics* **98**: 91-101
- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR (2004a) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* **75**: 807-821
- Chen K, Holschneider DP, Wu W, Rebrin I, Shih JC (2004b) A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J Biol Chem* **279**: 39645-39652
- Chen K, Wu HF, Grimsby J, Shih JC (1994) Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol* **46**: 1226-1233
- Chen K, Wu HF, Shih JC (1993) The deduced amino acid sequences of human platelet and frontal cortex monoamine oxidase B are identical. *J Neurochem* **61**: 187-190
- Cheng XD, Roberts RJ (2001) AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Research* **29**: 3784-3795
- Chick J, Kreitman N, Plant M (1981) Mean Cell-Volume and Gamma-Glutamyl-Transpeptidase as Markers of Drinking in Working Men. *Lancet* **1**: 1249-1251
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**: 281-307
- Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* **236**: 410-416
- Cloninger CR (1995) The psychobiological regulation of social cooperation. *Nat Med* **1**: 623-625

Coccaro EF (1989) Central serotonin and impulsive aggression. *Br J Psychiatry Suppl*: 52-62

Coccaro EF, Lee R, McCloskey M (2003) Norepinephrine function in personality disorder: plasma free MHPG correlates inversely with life history of aggression. *CNS Spectr* **8**: 731-736

Coccini T, Castoldi AF, Gandini C, Randine G, Vittadini G, Baiardi P, Manzo L (2002) Platelet monoamine oxidase B activity as a state marker for alcoholism: Trend over time during withdrawal and influence of smoking and gender. *Alcohol Alcoholism* **37**: 566-572

Coccini T, Randine G, Castoldi AF, Balloni L, Baiardi P, Manzo L (2005) Lymphocyte muscarinic receptors and platelet monoamine oxidase-B as biomarkers of CNS function: effects of age and gender in healthy humans. *Environ Toxicol Phar* **19**: 715-720

Combarros O, Warden DR, Hammond N, Cortina-Borja M, Belbin O, Lehmann MG, Wilcock GK, Brown K, Kehoe PG, Barber R, Coto E, Alvarez V, Deloukas P, Gwilliam R, Heun R, Kolsch H, Mateo I, Oulhaj A, Arias-Vasquez A, Schuur M, Aulchenko YS, Ikram MA, Breteler MM, van Duijn CM, Morgan K, Smith AD, Lehmann DJ (2010) The dopamine beta-hydroxylase -1021C/T polymorphism is associated with the risk of Alzheimer's disease in the Epistasis Project. *BMC Med Genet* **11**: 162

Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B, Grp WIS (2002) CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: The WHO/ISBRA Collaborative Project. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **26**: 332-339

Cornelius JR, Salloum IM, Cornelius MD, Perel JM, Thase ME, Ehler JG, Mann JJ (1993) Fluoxetine trial in suicidal depressed alcoholics. *Psychopharmacol Bull* **29**: 195-199

Corrodi H, Fuxe K, Hokfelt T (1966) The effect of ethanol on the activity of central catecholamine neurones in rat brain. *J Pharm Pharmacol* **18**: 821-823

Costa-Mallen P, Costa LG, Checkoway H (2005) Genotype combinations for monoamine oxidase-B intron 13 polymorphism and dopamine D2 receptor Taq1B polymorphism are associated with ever-smoking status among men. *Neurosci Lett* **385**: 158-162

Cotton NJ, Stoddard B, Parson WW (2004) Oxidative inhibition of human soluble catechol-O-methyltransferase. *J Biol Chem* **279**: 23710-23718

Craig SP, Buckle VJ, Lamouroux A, Mallet J, Craig IW (1988) Localization of the human dopamine beta hydroxylase (DBH) gene to chromosome 9q34. *Cytogenet Cell Genet* **48**: 48-50

Cubells JF, Zabetian CP (2004) Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl)* **174**: 463-476

Culpepper L, Kovalick LJ (2008) A review of the literature on the selegiline transdermal system: an effective and well-tolerated monoamine oxidase inhibitor for the treatment of depression. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **10**: 25-30

Cusin C, Serretti A, Lattuada E, Lilli R, Lorenzi C, Smeraldi E (2002) Association study of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with illness time course in mood disorders. *Am J Med Genet* **114**: 380-390

Czermak C, Lehofer M, Wagner EM, Prietl B, Lemonis L, Rohrhofer A, Schauenstein K, Liebmann PM (2004) Reduced dopamine D4 receptor mRNA expression in lymphocytes of long-term abstinent alcohol and heroin addicts. *Addiction* **99**: 251-257

Čičin-Šain L, Matosic A, Mokrovic G, Balijsa M, Marusic S, Jernej B (2007) Platelet monoamine oxidase kinetics, alcoholism subtypes and cigarette smoking. *Neuropsychobiology* **56**: 138-145

D'Souza MS, Ikegami A, Olsen CM, Duvauchelle CL (2003) Chronic D1 agonist and ethanol coadministration facilitate ethanol-mediated behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* **76**: 335-342

Da Silva GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN (2005) Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **77**: 693-706

Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence. *Science* **289**: 591-594

Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF (2001) Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* **61**: 6716-6722

De Ruyck K, Nackaerts K, Beels L, Werbrouck J, De Volder A, Meysman M, Salhi B, Van Meerbeeck J, Thierens H (2010) Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. *Pharmacogenomics* **11**: 1053-1063

Deakin JF, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* **5**: 305-315

Demir B, Ucar G, Ulug B, Ulusoy S, Sevinc I, Batur S (2002) Platelet monoamine oxidase activity in alcoholism subtypes: relationship to personality traits and executive functions. *Alcohol Alcohol* **37**: 597-602

Devor EJ, Abell CW, Hoffman PL, Tabakoff B, Cloninger CR (1994) Platelet MAO activity in type I and type II alcoholism. *Ann N Y Acad Sci* **708**: 119-128

Di Chiara G, Imperato A (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Ann N Y Acad Sci* **473**: 367-381

Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W (2005) Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* **14**: 135-143

Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 309-314

Dlugos AM, Palmer AA, de Wit H (2009) Negative emotionality: monoamine oxidase B gene variants modulate personality traits in healthy humans. *J Neural Transm* **116**: 1323-1334

Donnelly CH, Murphy DL (1977) Substrate- and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* **26**: 853-858

Doyle AES, Goodman JE, Silber PM, Yager JD (2004) Catechol-O-methyltransferase low activity genotype (COMTLL) is associated with low levels of COMT protein in human hepatocytes. *Cancer Lett* **214**: 189-195

Dreber A, Apicella CL, Eisenberg DTA, Garcia JR, Zamore RS, Lum JK, Campbell B (2009) The 7R polymorphism in the dopamine receptor D4 gene (DRD4) is associated with financial risk taking in men. *Evol Hum Behav* **30**: 85-92

Du Y, Yang M, Yeh HW, Wan YJ (2010) The association of exon 3 VNTR polymorphism of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with alcoholism in Mexican Americans. *Psychiatry Res* **177**: 358-360

Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* **12**: 78-80

Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V, Jones K, Kwon J, Li TK, Nurnberger JI, Jr., O'Connor SJ, Reich T, Rice J, Schuckit MA, Porjesz B, Foroud T, Begleiter H (2004) 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* **74**: 705-714

Eisenberg J, Zohar A, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Gritsenko I, Nemanov L, Ebstein RP (2000) A haplotype relative risk study of the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet* **96**: 258-261

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* **56**: 331-349

El-Ghundi M, George SR, Drago J, Fletcher PJ, Fan T, Nguyen T, Liu C, Sibley DR, Westphal H, O'Dowd BF (1998) Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *Eur J Pharmacol* **353**: 149-158

Enoch MA, Waheed JF, Harris CR, Albaugh B, Goldman D (2009) COMT Val158Met and cognition: main effects and interaction with educational attainment. *Genes Brain Behav* **8**: 36-42

- Escriba PV, Sastre M, Wang H, Regunathan S, Reis DJ, Garcia-Sevilla JA (1994) Immunodetection of putative imidazoline receptor proteins in the human and rat brain and other tissues. *Neurosci Lett* **178**: 81-84
- Farren CK, Clare AW, Tipton KF, Dinan TG (1998) Platelet MAO activity in subtypes of alcoholics and controls in a homogenous population. *J Psychiatr Res* **32**: 49-54
- Farren CK, Tipton KF (1999) Trait markers for alcoholism: clinical utility. *Alcohol Alcohol* **34**: 649-665
- Fasano A (2011) Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* **91**: 151-175
- Fava M, Rosenbaum JF, Kolsky AR, Alpert JE, Nierenberg AA, Spillmann M, Moore C, Renshaw P, Bottiglieri T, Moroz G, Magni G (1999) Open study of the catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone in major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* **19**: 329-335
- Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR (2005) Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet B* **133B**: 79-84
- Fernandez-de-Las-Penas C, Ambite-Quesada S, Gil-Crujera A, Cigaran-Mendez M, Penacoba-Puente C (2012) Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism influences anxiety, depression, and disability, but not pressure pain sensitivity, in women with fibromyalgia syndrome. *J Pain* **13**: 1068-1074
- Fischer-Colbrie R, Schachinger M, Zangerle R, Winkler H (1982) Dopamine beta-hydroxylase and other glycoproteins from the soluble content and the membranes of adrenal chromaffin granules: isolation and carbohydrate analysis. *J Neurochem* **38**: 725-732
- Foroud T, Edenberg HJ, Goate A, Rice J, Flury L, Koller DL, Bierut LJ, Conneally PM, Nurnberger JI, Bucholz KK, Li TK, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Porjesz B, Begleiter H, Reich T (2000) Alcoholism susceptibility loci: Confirmation studies in a replicate sample and further mapping. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **24**: 933-945
- Foroud T, Wetherill LF, Dick DM, Hesselbrock V, Nurnberger JI, Jr., Kramer J, Tischfield J, Schuckit M, Bierut LJ, Xuei X, Edenberg HJ (2007) Lack of association of alcohol dependence and habitual smoking with catechol-O-methyltransferase. *Alcohol Clin Exp Res* **31**: 1773-1779
- Fowler CJ, Ekstedt B, Egashira T, Kinemuchi H, Oreland L (1979) The interaction between human platelet monoamine oxidase, its monoamine substrates and oxygen. *Biochem Pharmacol* **28**: 3063-3068
- Fowler JS, Logan J, Volkow ND, Wang GJ, MacGregor RR, Ding YS (2002) Monoamine oxidase: radiotracer development and human studies. *Methods* **27**: 263-277
- Fowler JS, Logan J, Wang GJ, Volkow ND (2003) Monoamine oxidase and cigarette smoking. *Neurotoxicology* **24**: 75-82

Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, Shea C, Alexoff D, MacGregor RR, Schlyer DJ, Zezulkova I, Wolf AP (1996) Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14065-14069

Freeman WM, Vanguilder HD, Guidone E, Krystal JH, Grant KA, Vrana KE (2011) Plasma proteomic alterations in non-human primates and humans after chronic alcohol self-administration. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**: 899-911

Freire MT, Marques FZ, Hutz MH, Bau CH (2006) Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **256**: 93-97

Fresan A, Camarena B, Apiquian R, Aguilar A, Urraca N, Nicolini H (2007) Association study of MAO-A and DRD4 genes in schizophrenic patients with aggressive behavior. *Neuropsychobiology* **55**: 171-175

Frey SK, Spranger J, Henze A, Pfeiffer AF, Schweigert FJ, Raila J (2009) Factors that influence retinol-binding protein 4-transthyretin interaction are not altered in overweight subjects and overweight subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **58**: 1386-1392

Frisch A, Postilnick D, Rockah R, Michaelovsky E, Postilnick S, Birman E, Laor N, Rauchverger B, Kreinin A, Poyurovsky M, Schneidman M, Modai I, Weizman R (1999) Association of unipolar major depressive disorder with genes of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Mol Psychiatry* **4**: 389-392

Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, Rylander G, Oreland L (2000) Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *J Neural Transm* **107**: 523-530

Garpenstrand H, Longato-Stadler E, af Klinteberg B, Grigorenko E, Damberg M, Oreland L, Hallman J (2002) Low platelet monoamine oxidase activity in Swedish imprisoned criminal offenders. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**: 135-140

Garrick NA, Murphy DL (1982) Monoamine oxidase type A: differences in selectivity towards l-norepinephrine compared to serotonin. *Biochem Pharmacol* **31**: 4061-4066

Garriock HA, Delgado P, Kling MA, Carpenter LL, Burke M, Burke WJ, Schwartz T, Marangell LB, Husain M, Erickson RP, Moreno FA (2006) Number of risk genotypes is a risk factor for major depressive disorder: a case control study. *Behav Brain Funct* **2**: 24

Gasso P, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Garcia C, Parellada E, Lafuente A (2008) Association of A/G polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with schizophrenia in a Spanish population. *Neuropsychobiology* **58**: 65-70

Geha RM, Chen K, Wouters J, Ooms F, Shih JC (2002) Analysis of conserved active site residues in monoamine oxidase A and B and their three-dimensional molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 17209-17216

Gelernter J, Kennedy JL, van Tol HH, Civelli O, Kidd KK (1992) The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics* **13**: 208-210

- Gelernter J, Kranzler H, Coccaro E, Siever L, New A, Mulgrew CL (1997) D4 dopamine-receptor (DRD4) alleles and novelty seeking in substance-dependent, personality-disorder, and control subjects. *Am J Hum Genet* **61**: 1144-1152
- Gelernter J, Kranzler HR (2009) Genetics of alcohol dependence. *Hum Genet* **126**: 91-99
- Giancola PR, Helton EL, Osborne AB, Terry MK, Fuss AM, Westerfield JA (2002) The effects of alcohol and provocation on aggressive behavior in men and women. *J Stud Alcohol* **63**: 64-73
- Gingrich JA, Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* **16**: 299-321
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**: 606-612
- Goldberg TE, Egan MF, Gscheidle T, Coppola R, Weickert T, Kolachana BS, Goldman D, Weinberger DR (2003) Executive subprocesses in working memory - Relationship to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and schizophrenia. *Arch Gen Psychiat* **60**: 889-896
- Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ (2003) Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **305**: 800-811
- Goodman JE, Jensen LT, He P, Yager JD (2002) Characterization of human soluble high and low activity catechol-O-methyltransferase catalyzed catechol estrogen methylation. *Pharmacogenetics* **12**: 517-528
- Grant BF, Hasin DS, Chou SP, Stinson FS, Dawson DA (2004) Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* **61**: 1107-1115
- Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF, Guimon J (1996) New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 78-85
- Grenard JL, Ames SL, Wiers RW, Thush C, Sussman S, Stacy AW (2008) Working memory capacity moderates the predictive effects of drug-related associations on substance use. *Psychol Addict Behav* **22**: 426-432
- Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC (1991) Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3637-3641
- Grimsby J, Lan NC, Neve R, Chen K, Shih JC (1990) Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *J Neurochem* **55**: 1166-1169
- Groshong R, Baldessarini RJ, Gibson DA, Lipinski JF, Axelrod D, Pope A (1978) Activities of types A and B MAO and catechol-o-methyltransferase in blood cells and skin fibroblasts of normal and chronic schizophrenic subjects. *Arch Gen Psychiatry* **35**: 1198-1205



Grossman MH, Emanuel BS, Budarf ML (1992a) Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1----q11.2. *Genomics* **12**: 822-825

Grossman MH, Szumlanski C, Littrell JB, Weinstein R, Weinshilbom RM (1992b) Electrophoretic analysis of low and high activity forms of catechol-O-methyltransferase in human erythrocytes. *Life Sci* **50**: 473-480

Gu Y, Yun LB, Tian YY, Hu ZQ (2009) Association between COMT gene and Chinese male schizophrenic patients with violent behavior. *Med Sci Monitor* **15**: Cr484-Cr489

Guy W (1976) *ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology*, Rockville,MD: U.S. Department of Health, Education, and Welfare.

Hallikainen T, Lachman H, Saito T, Volavka J, Kauhanen J, Salonen JT, Ryyanen OP, Koulu M, Karvonen MK, Pohjalainen T, Syvalahti E, Hietala J, Tiihonen J (2000) Lack of association between the functional variant of the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene and early-onset alcoholism associated with severe antisocial behavior. *American Journal of Medical Genetics* **96**: 348-352

Hamilton M (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiat* **23**: 56-62

Harris SE, Wright AF, Hayward C, Starr JM, Whalley LJ, Deary IJ (2005) The functional COMT polymorphism, Val158Met, is associated with logical memory and the personality trait intellect/imagination in a cohort of healthy 79 year olds. *Neurosci Lett* **385**: 1-6

Harrison AA, Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central 5-HT depletion enhances impulsive responding without affecting the accuracy of attentional performance: interactions with dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* **133**: 329-342

Heath AC (1995) Genetic influences on alcoholism risk? A review of adoption and twin studies. *Alcohol Health and Research World* **19**: 166-171

Heath AC, Slutske WS, Bucholz KK, Madden PAF, Martin NG (1996) Behavioral genetic methods in prevention research: An overview. *The Science of Prevention: Methodological Advances from Alcohol and Substance Abuse Research*: 123-163

Heath AC, Slutske WS, Madden PA (1997) Gender differences in the genetic contribution to alcoholism risk and to alcohol consumption patterns. *Gender and Alcohol*: 114-149

Heinz A, Smolka MN (2006) The effects of catechol O-methyltransferase genotype on brain activation elicited by affective stimuli and cognitive tasks. *Rev Neurosci* **17**: 359-367

Hendershot CS, Lindgren KP, Liang T, Hutchison KE (2012) COMT and ALDH2 polymorphisms moderate associations of implicit drinking motives with alcohol use. *Addict Biol* **17**: 192-201

Herz A (1997) Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* **129**: 99-111

- Hess C, Reif A, Strobel A, Boreatti-Hummer A, Heine M, Lesch KP, Jacob CP (2009) A functional dopamine-beta-hydroxylase gene promoter polymorphism is associated with impulsive personality styles, but not with affective disorders. *J Neural Transm* **116**: 121-130
- Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age of alcohol-dependence onset: associations with severity of dependence and seeking treatment. *Pediatrics* **118**: e755-763
- Ho SL, Kapadi AL, Ramsden DB, Williams AC (1995) An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **37**: 403-405
- Hofmann W, Friese M, Strack F (2009) Impulse and self-control from a dual-systems perspective. *Perspect Psychol Sci* **4**: 162-176
- Hohmann S, Becker K, Fellinger J, Banaschewski T, Schmidt MH, Esser G, Laucht M (2009) Evidence for epistasis between the 5-HTTLPR and the dopamine D4 receptor polymorphisms in externalizing behavior among 15-year-olds. *J Neural Transm* **116**: 1621-1629
- Hong J, Shu-Leong H, Tao X, Lap-Ping Y (1998) Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *Neuroreport* **9**: 2861-2864
- Houben K, Havermans RC, Wiers RW (2010) Learning to dislike alcohol: conditioning negative implicit attitudes toward alcohol and its effect on drinking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **211**: 79-86
- Hozoji M, Kimura Y, Kioka N, Ueda K (2009) Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for ApoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J Biol Chem* **284**: 11293-11300
- Huh MMO, Friedhoff AJ (1979) Multiple Molecular-Forms of Catechol-O-Methyltransferase - Evidence for 2 Distinct Forms, and Their Purification and Physical Characterization. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 299-308
- Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C (2003) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry* **84**: 698-704
- Hutchison KE, McGeary J, Smolen A, Bryan A, Swift RM (2002) The DRD4 VNTR polymorphism moderates craving after alcohol consumption. *Health Psychol* **21**: 139-146
- Ishiguro H, Haruo Shibuya T, Toru M, Saito T, Arinami T (1999) Association study between high and low activity polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcoholism. *Psychiatr Genet* **9**: 135-138
- Jabbi M, Kema IP, van der Pompe G, te Meerman GJ, Ormel J, den Boer JA (2007) Catechol-o-methyltransferase polymorphism and susceptibility to major depressive disorder modulates psychological stress response. *Psychiatr Genet* **17**: 183-193

Jacob T, Leonard K (1994) Family and peer influences in the development of adolescent alcohol abuse. *Development of alcohol problems: Exploring the biopsychosocial matrix of risk*: 123-156

Jakubauskiene E, Janaviciute V, Peculiene I, Soderkvist P, Kanopka A (2012) G/A polymorphism in intronic sequence affects the processing of MAO-B gene in patients with Parkinson disease. *Febs Letters* **586**: 3698-3704

Jeanjean AP, Laterre EC, Maloteaux JM (1997) Neuroleptic binding to sigma receptors: possible involvement in neuroleptic-induced acute dystonia. *Biol Psychiatry* **41**: 1010-1019

Jellinek EM (1962) Alcoholism: Phases of alcohol addiction. *Q J Stud Alcohol* **13**: 673-684

Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**: 483-488

Joyce PR, Hawes CR, Mulder RT, Sellman JD, Wilson DA, Boswell DR (1992) Elevated levels of acute phase plasma proteins in major depression. *Biol Psychiatry* **32**: 1035-1041

Judaš N, Kostović I (1997) Temelji neuroznanosti.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2006) Principles of neural science, 4th edition

Kapoor A, Shandilya M, Kundu S (2011) Structural insight of dopamine beta-hydroxylase, a drug target for complex traits, and functional significance of exonic single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* **6**: e26509

Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, Gogos JA (1997) Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 4572-4575

Karayiorgou M, Sobin C, Blundell ML, Galke BL, Malinova L, Goldberg P, Ott J, Gogos JA (1999) Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* **45**: 1178-1189

Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P (1995) Neuronal and non-neuronal catechol-O-methyltransferase in primary cultures of rat brain cells. *Int J Dev Neurosci* **13**: 825-834

Karoum F, Wyatt RJ, Majchrowicz E (1976) Brain concentrations of biogenic amine metabolites in acutely treated and ethanol-dependent rats. *Br J Pharmacol* **56**: 403-411

Kazmi MA, Snyder LA, Cypess AM, Graber SG, Sakmar TP (2000) Selective reconstitution of human D4 dopamine receptor variants with Gi alpha subtypes. *Biochemistry* **39**: 3734-3744

Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**: 93-96

Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z (2006) No direct effect of the-521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *Bmc Mol Biol* **7**

Kia-Keating BM, Glatt SJ, Tsuang MT (2007) Meta-analyses suggest association between COMT, but not HTR1B, alleles, and suicidal behavior. *Am J Med Genet B* **144B**: 1048-1053

Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA (2008) The-1021 C/T DBH polymorphism is associated with neuropsychological performance among children and adolescents with ADHD. *Am J Med Genet B* **147B**: 485-490

Kiernan UA, Nedelkov D, Tubbs KA, Niederkofler EE, Nelson RW (2004) Proteomic characterization of novel serum amyloid P component variants from human plasma and urine. *Proteomics* **4**: 1825-1829

Kim CH, Leung A, Huh YH, Yang E, Kim DJ, Leblanc P, Ryu H, Kim K, Kim DW, Garland EM, Raj SR, Biaggioni I, Robertson D, Kim KS (2011) Norepinephrine deficiency is caused by combined abnormal mRNA processing and defective protein trafficking of dopamine beta-hydroxylase. *J Biol Chem* **286**: 9196-9204

Kohnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, Kolb W, Gaertner I, Buchkremer G, Vonthein R, Schick S, Lutz U, Kohnke AM, Cubells JF (2002) A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol Psychiatry* **52**: 1151-1158

Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F (1994) Alcohol, the reward system and dependence. *EXS* **71**: 103-114

Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytia P, Merlo-Pich E, Weiss F (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **22**: 3-9

Kotler M, Manor I, Sever Y, Eisenberg J, Cohen H, Ebstein RP, Tyano S (2000) Failure to replicate an excess of the long dopamine D4 exon III repeat polymorphism in ADHD in a family-based study. *Am J Med Genet* **96**: 278-281

Kovacs K (2008) Suicide and alcohol-related mortality in Hungary in the last two decades. *Int J Public Health* **53**: 252-259

Krajl M (1965) A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* **14**: 1684-1686

Kranzler HR, Burleson JA, Brown J, Babor TF (1996) Fluoxetine treatment seems to reduce the beneficial effects of cognitive-behavioral therapy in type B alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* **20**: 1534-1541

Kranzler HR, Burleson JA, Korner P, Del Boca FK, Bohn MJ, Brown J, Liebowitz N (1995) Placebo-controlled trial of fluoxetine as an adjunct to relapse prevention in alcoholics. **152**: 391-397

Kuhnen CM, Chiao JY (2009) Genetic determinants of financial risk taking. *PLoS One* **4**: e4362

- Kweon YS, Lee HK, Lee CT, Pae CU (2005) Association study of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Korean male alcoholics. *Psychiatr Genet* **15**: 151-154
- Lachman HM, Morrow B, Shprintzen R, Veit S, Parsia SS, Faedda G, Goldberg R, Kucherlapati R, Papolos DF (1996a) Association of codon 108/158 catechol-O-methyltransferase gene polymorphism with the psychiatric manifestations of velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* **67**: 468-472
- Lachman HM, Nolan KA, Mohr P, Saito T, Volavka J (1998) Association between catechol O-methyltransferase genotype and violence in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* **155**: 835-837
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM (1996b) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* **6**: 243-250
- Lamouroux A, Vigny A, Biguet NF, Darmon MC, Franck R, Henry JP, Mallet J (1987) The Primary Structure of Human Dopamine-Beta-Hydroxylase - Insights into the Relationship between the Soluble and the Membrane-Bound Forms of the Enzyme. *Embo Journal* **6**: 3931-3937
- Lamprecht F, Ebert MH, Turek I, Kopin IJ (1974) Serum dopamine-beta-hydroxylase in depressed patients and the effect of electroconvulsive shock treatment. *Psychopharmacologia* **40**: 241-248
- Langley K, Marshall L, van den Bree M, Thomas H, Owen M, O'Donovan M, Thapar A (2004) Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD. *Am J Psychiatry* **161**: 133-138
- Launay JM, Del Pino M, Chironi G, Callebert J, Peoc'h K, Megnien JL, Mallet J, Simon A, Rendu F (2009) Smoking Induces Long-Lasting Effects through a Monoamine-Oxidase Epigenetic Regulation. *PLoS One* **4**
- Le AD, Harding S, Juzysch W, Funk D, Shaham Y (2005) Role of alpha-2 adrenoceptors in stress-induced reinstatement of alcohol seeking and alcohol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **179**: 366-373
- Lecomte E, Herbeth B, Paille F, Steinmetz J, Artur Y, Siest G (1996) Changes in serum apolipoprotein and lipoprotein profile induced by chronic alcohol consumption and withdrawal: determinant effect on heart disease? *Clin Chem* **42**: 1666-1675
- LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: clinical evidence. *Biol Psychiatry* **36**: 326-337
- Lesch O, Walter H (1996) Subtypes of alcoholism and their role in therapy. *Alcohol Alcsm* **1**: 63-67

- Leung PW, Lee CC, Hung SF, Ho TP, Tang CP, Kwong SL, Leung SY, Yuen ST, Lieh-Mak F, Oosterlaan J, Grady D, Harxhi A, Ding YC, Chi HC, Flodman P, Schuck S, Spence MA, Moyzis R, Swanson J (2005) Dopamine receptor D4 (DRD4) gene in Han Chinese children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **133B**: 54-56
- Lewinsohn R, Glover V, Sandler M (1980) Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B in man. *Biochem Pharmacol* **29**: 1221-1230
- Lewitzka U, Muller-Oerlinghausen B, Felber W, Brunner J, Hawellek B, Rujescu D, Ising M, Lauterbach E, Broocks A, Bondy B, Rao ML, Frahnert C, Heuser I, Hohagen F, Maier W, Bronisch T (2008) Is MAO-B activity in platelets associated with the occurrence of suicidality and behavioural personality traits in depressed patients? *Acta Psychiatr Scand* **117**: 41-49
- Li T, Chen CK, Hu X, Ball D, Lin SK, Chen W, Sham PC, Loh el W, Murray RM, Collier DA (2004a) Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **129B**: 120-124
- Li Y, Yang XF, Chang MS, Yager JD, van Breemen RB, Bolton JL (2005) Functional and structural comparisons of cysteine residues in the Val108 wild type and Met108 variant of human soluble catechol O-methyltransferase. *Chem-Biol Interact* **152**: 151-163
- Li Y, Yao JQ, Chang MS, Nikolic DJ, Yu LN, Yager JD, Mesecar AD, van Breemen RB, Bolton JL (2004b) Equine catechol estrogen 4-hydroxyequilenin is a more potent inhibitor of the variant form of catechol-O-methyltransferase. *Chem Res Toxicol* **17**: 512-520
- Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* **2**: 767-773
- Liou YJ, Tsai SJ, Hong CJ, Wang YC, Lai IC (2001) Association analysis of a functional catechol-o-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenic patients in Taiwan. *Neuropsychobiology* **43**: 11-14
- Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, Bennett PH, Goldman D (1998) Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. *Am J Med Genet* **81**: 216-221
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* **34**: 4202-4210
- Lowry OH, N.J. R, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD (2008) Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature* **456**: 989-992

- Lundstrom K, Salminen M, Jalanko A, Savolainen R, Ulmanen I (1991) Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol* **10**: 181-189
- Lundstrom K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Ulmanen I (1995) Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1251**: 1-10
- Lynn DE, Lubke G, Yang M, McCracken JT, McGough JJ, Ishii J, Loo SK, Nelson SF, Smalley SL (2005) Temperament and character profiles and the dopamine D4 receptor gene in ADHD. *Am J Psychiatry* **162**: 906-913
- Malhotra AK, Virkkunen M, Rooney W, Eggert M, Linnoila M, Goldman D (1996) The association between the dopamine D4 receptor (D4DR) 16 amino acid repeat polymorphism and novelty seeking. *Mol Psychiatry* **1**: 388-391
- Manki H, Kanba S, Muramatsu T, Higuchi S, Suzuki E, Matsushita S, Ono Y, Chiba H, Shintani F, Nakamura M, Yagi G, Asai M (1996) Dopamine D2, D3 and D4 receptor and transporter gene polymorphisms and mood disorders. *J Affect Disord* **40**: 7-13
- Mannisto PT, Kaakkola S (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* **51**: 593-628
- Mannisto PT, Ulmanen I, Lundstrom K, Taskinen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Kaakkola S (1992) Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Prog Drug Res* **39**: 291-350
- Marino MD, Bourdelat-Parks BN, Cameron Liles L, Weinshenker D (2005) Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behav Brain Res* **161**: 197-203
- Maris RW (2002) Suicide. *Lancet* **360**: 319-326
- Markianos ES, Nystrom I, Reichel H, Matussek N (1976) Serum Dopamine-Beta-Hydroxylase in Psychiatric-Patients and Normals - Effect of D-Amphetamine and Haloperidol. *Psychopharmacology* **50**: 259-267
- Martin JL, McMillan FM (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 783-793
- Mason BJ, Goodman AM, Chabac S, Lehert P (2006) Effect of oral acamprosate on abstinence in patients with alcohol dependence in a double-blind, placebo-controlled trial: the role of patient motivation. *J Psychiatr Res* **40**: 383-393
- Mathew RJ, Ho BT, Davis C, Taylor D, Reck J (1981) Depression, antidepressants, and plasma DBH. *Psychiatry Res* **5**: 331-334
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR (2003) Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* **116**: 127-137

Matuzas W, Meltzer HY, Uhlenhuth EH, Glass RM, Tong C (1982) Plasma dopamine-beta-hydroxylase in depressed patients. *Biol Psychiatry* **17**: 1415-1424

Maxwell A (2013) Are some individuals diagnosed with ADHD prone to alcohol abuse?: consideration of two possible mediating factors for this susceptibility. *J Atten Disord* **17**: 98-101

Melendez RI, Rodd-Henricks ZA, Engleman EA, Li TK, McBride WJ, Murphy JM (2002) Microdialysis of dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) rats during anticipation and operant self-administration of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* **26**: 318-325

Meyer-Lindenberg A, Kohn PD, Kolachana B, Kippenhan S, McInerney-Leo A, Nussbaum R, Weinberger DR, Berman KF (2005) Midbrain dopamine and prefrontal function in humans: interaction and modulation by COMT genotype. *Nat Neurosci* **8**: 594-596

Miczek KA, DeBold JF, van Erp AM (1994) Neuropharmacological characteristics of individual differences in alcohol effects on aggression in rodents and primates. *Behav Pharmacol* **5**: 407-421

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189-225

Mokrović G, Matosic A, Hranilovic D, Stefulj J, Novokmet M, Oreskovic D, Balija M, Marusic S, Cicin-Sain L (2008) Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes: association studies. *Coll Antropol* **32 Suppl 1**: 127-131

Monuteaux MC, Biederman J, Doyle AE, Mick E, Faraone SV (2009) Genetic risk for conduct disorder symptom subtypes in an ADHD sample: specificity to aggressive symptoms. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **48**: 757-764

Muller-Oerlinghausen B, Roggenbach J, Franke L (2004) Serotonergic platelet markers of suicidal behavior--do they really exist? *J Affect Disord* **79**: 13-24

Muramatsu T, Higuchi S, Murayama M, Matsushita S, Hayashida M (1996) Association between alcoholism and the dopamine D4 receptor gene. *J Med Genet* **33**: 113-115

Murphy DL (1976) *Clinical, genetic, hormonal and drug influences on the activity of human platelet monoamine oxidase.*, Vol. 39, Amsterdam: Elsevier.

Murphy TM, Ryan M, Foster T, Kelly C, McClelland R, O'Grady J, Corcoran E, Brady J, Reilly M, Jeffers A, Brown K, Maher A, Bannan N, Casement A, Lynch D, Bolger S, Tewari P, Buckley A, Quinlivan L, Daly L, Kelleher C, Malone KM (2011) Risk and protective genetic variants in suicidal behaviour: association with SLC1A2, SLC1A3, 5-HTR1B & NTRK2 polymorphisms. *Behav Brain Funct* **7**: 22



- Mustapić M, Pivac N, Kozaric-Kovacic D, Dezeljin M, Cubells JF, Muck-Seler D (2007) Dopamine beta-hydroxylase (DBH) activity and -1021C/T polymorphism of DBH gene in combat-related post-traumatic stress disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**: 1087-1089
- Nakamura A, Inada T, Kitao Y, Katayama Y (2001) Association between catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and severe alcoholic withdrawal symptoms in male Japanese alcoholics. *Addict Biol* **6**: 233-238
- Nakamura T, Matsushita S, Nishiguchi N, Kimura M, Yoshino A, Higuchi S (1999) Association of a polymorphism of the 5HT2A receptor gene promoter region with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* **4**: 85-88
- Nakatome M, Honda K, Tun Z, Sakurada M, Harihara S (1998) Comparison of a hypervariable segment in the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene between the Japanese and Mongolian populations. *Nihon Hoigaku Zasshi* **52**: 133-138
- Naoi M, Maruyama W, Youdim MB, Yu P, Boulton AA (2003) Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B monoamine oxidase. *Inflammopharmacology* **11**: 175-181
- Nedić G, Borovecki F, Klepac N, Mubrin Z, Hajnsek S, Nikolac M, Muck-Seler D, Pivac N (2011a) Association study of a functional catechol-o-methyltransferase polymorphism and cognitive function in patients with dementia. *Coll Antropol* **35 Suppl 1**: 79-84
- Nedić G, Nikolac M, Borovecki F, Hajnsek S, Muck-Seler D, Pivac N (2010a) Association study of a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects. *Neurosci Lett* **473**: 216-219
- Nedić G, Nikolac M, Sziglin KN, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N (2011b) Association study of a functional catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158Met polymorphism and suicide attempts in patients with alcohol dependence. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**: 377-388
- Nedić G, Perkovic MN, Sziglin KN, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N (2013) Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **40**: 193-198
- Nedić G, Pivac N, Hercigonja DK, Jovancevic M, Curkovic KD, Muck-Seler D (2010b) Platelet monoamine oxidase activity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* **175**: 252-255
- Nenadić Šziglin K, Nedic G, Nikolac M, Mustapic M, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N (2011) Insomnia, platelet serotonin and platelet monoamine oxidase in chronic alcoholism. *Neurosci Lett* **500**: 172-176
- Neuhaus AH, Opgen-Rhein C, Urbanek C, Hahn E, Ta TM, Seidelsohn M, Strathmann S, Kley F, Wieseke N, Sander T, Dettling M (2009) COMT Val 158 Met polymorphism is associated with cognitive flexibility in a signal discrimination task in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* **42**: 141-144

Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **24**: 165-205

Nolan KA, Volavka J, Czobor P, Cseh A, Lachman H, Saito T, Tiihonen J, Putkonen A, Hallikainen T, Kotilainen I, Rasanen P, Isohanni M, Jarvelin MR, Karvonen MK (2000) Suicidal behavior in patients with schizophrenia is related to COMT polymorphism. *Psychiat Genet* **10**: 117-124

Noskova T, Pivac N, Nedic G, Kazantseva A, Gaysina D, Faskhutdinova G, Gareeva A, Khahlova Z, Khusnutdinova E, Kovacic DK, Kovacic Z, Jokic H, Seler DM (2008) Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. *Prog Neuro-Psychoph* **32**: 1735-1739

O'Connor DT, Cervenka JH, Stone RA, Levine GL, Parmer RJ, Franco-Bourland RE, Madrazo I, Langlais PJ, Robertson D, Biaggioni I (1994) Dopamine beta-hydroxylase immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to central noradrenergic neuronal activity and variation in Parkinson's disease and congenital dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Clin Sci (Lond)* **86**: 149-158

O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* **264**: 7564-7569

O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B (1992) Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* **49**: 881-887

Ono H, Shirakawa O, Nushida H, Ueno Y, Maeda K (2004) Association between catechol-O-methyltransferase functional polymorphism and male suicide completers. *Neuropsychopharmacol* **29**: 1374-1377

Ordway GA, Widdowson PS, Smith KS, Halaris A (1994) Agonist binding to alpha 2-adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide. *J Neurochem* **63**: 617-624

Oreland L (2004) Platelet monoamine oxidase, personality and alcoholism: the rise, fall and resurrection. *Neurotoxicology* **25**: 79-89

Oreland L, Damberg M, Hallman J, Garpenstrand H (2002) Smoking only explains part of the associations between platelet monoamine oxidase activity and personality. *J Neural Transm* **109**: 963-975

Ou XM, Chen K, Shih JC (2004) Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (MAO) B gene. *J Biol Chem* **279**: 21021-21028

Ou XM, Johnson C, Lu D, Johnson S, Paul IA, Austin MC, Iyo AH, Miguel-Hidalgo JJ, Luo J, Bell RL, Grunewald M, Wang J, Sittman DB (2011) Ethanol increases TIEG2-MAO B cell death cascade in the prefrontal cortex of ethanol-preferring rats. *Neurotox Res* **19**: 511-518

- Ou XM, Stockmeier CA, Meltzer HY, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, Chen K, Lu D, Johnson C, Youdim MB, Austin MC, Luo J, Sawa A, May W, Shih JC (2010) A novel role for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and monoamine oxidase B cascade in ethanol-induced cellular damage. *Biol Psychiatry* **67**: 855-863
- Ovchinnikov YA, Abdulaev NG, Bogachuk AS (1988) 2 Adjacent Cysteine Residues in the C-Terminal Cytoplasmic Fragment of Bovine Rhodopsin Are Palmitylated. *Febs Letters* **230**: 1-5
- Oxenstierna G, Edman G, Iselius L, Orelund L, Ross SB, Sedvall G (1986) Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals--a genetic study. *J Psychiatr Res* **20**: 19-29
- Paasonen MK, Solatunturi E, Kivalo E (1964) Monoamine-Oxidase Activity of Blood-Platelets and Their Ability to Store 5-Hydroxytryptamine in Some Mental Deficiencies. *Psychopharmacologia* **6**: 120-124
- Palmason H, Moser D, Sigmund J, Vogler C, Hanig S, Schneider A, Seitz C, Marcus A, Meyer J, Freitag CM (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder phenotype is influenced by a functional catechol-O-methyltransferase variant. *J Neural Transm* **117**: 259-267
- Pandey GN, Dwivedi Y (2007) Noradrenergic function in suicide. *Arch Suicide Res* **11**: 235-246
- Pandey GN, Fawcett J, Gibbons R, Clark DC, Davis JM (1988) Platelet monoamine oxidase in alcoholism. *Biol Psychiatry* **24**: 15-24
- Parsian A, Chakraverty S, Fisher L, Cloninger CR (1997) No association between polymorphisms in the human dopamine D3 and D4 receptors genes and alcoholism. *Am J Med Genet* **74**: 281-285
- Paterson AD, Sunohara GA, Kennedy JL (1999) Dopamine D4 receptor gene: novelty or nonsense? *Neuropsychopharmacol* **21**: 3-16
- Pawan GL (1972) Metabolism of alcohol (ethanol) in man. *Proc Nutr Soc* **31**: 83-89
- Persson ML, Geijer T, Wasserman D, Rockah R, Frisch A, Michaelovsky E, Jonsson EG, Apter A, Weizman A (1999) Lack of association between suicide attempt and a polymorphism at the dopamine receptor D4 locus. *Psychiatr Genet* **9**: 97-100
- Petronis A, Van Tol HH, Lichten JB, Livak KJ, Kennedy JL (1993) The D4 dopamine receptor gene maps on 11p proximal to HRAS. *Genomics* **18**: 161-163
- Pettinati HM, O'Brien CP, Rabinowitz AR, Wortman SP, Oslin DW, Kampman KM, Dackis CA (2006) The status of naltrexone in the treatment of alcohol dependence: specific effects on heavy drinking. *J Clin Psychopharmacol* **26**: 610-625
- Phillips TJ, Brown KJ, Burkhart-Kasch S, Wenger CD, Kelly MA, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ (1998) Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nat Neurosci* **1**: 610-615

- Pickens CL, Calu DJ (2011) Alcohol reward, dopamine depletion, and GDNF. *J Neurosci* **31**: 14833-14834
- Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M (2004) Biphasic effect of acamprosate on NMDA but not on GABAA receptors in spontaneous rhythmic activity from the isolated neonatal rat respiratory network. *Neuropharmacology* **47**: 35-45
- Pitchot W, Reggers J, Pinto E, Hansenne M, Fuchs S, Pirard S, Anseau M (2001) Reduced dopaminergic activity in depressed suicides. *Psychoneuroendocrinology* **26**: 331-335
- Pivac N, Kim B, Nedic G, Joo YH, Kozaric-Kovacic D, Hong JP, Muck-Seler D (2009) Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy participants. *Croat Med J* **50**: 43-48
- Pivac N, Knezevic J, Kozaric-Kovacic D, Dezeljin M, Mustapic M, Rak D, Matijevic T, Pavelic J, Muck-Seler D (2007) Monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity in combat-related posttraumatic stress disorder. *J Affect Disord* **103**: 131-138
- Pivac N, Knezevic J, Mustapic M, Dezeljin M, Muck-Seler D, Kozaric-Kovacic D, Balija M, Matijevic T, Pavelic J (2006) The lack of association between monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity among men. *Life Sciences* **79**: 45-49
- Pivac N, Pregelj P, Nikolac M, Zupanc T, Nedic G, Seler DM, Paska AV (2011) The association between catechol-O-methyl-transferase Val(108/158)Met polymorphism and suicide. *Genes Brain Behav* **10**: 565-569
- Pohorecky LA, Brick J (1988) Pharmacology of ethanol. *Pharmacol Ther* **36**: 335-427
- Pombo S, Levy P, Bicho M, Ismail F, Cardoso JM (2008) Neuropsychological function and platelet monoamine oxidase activity levels in type I alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* **43**: 423-430
- Prigge ST, Mains RE, Eipper BA, Amzel LM (2000) New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1236-1259
- Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, Goodwin FK (1990) Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* **264**: 2511-2518
- Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K, Porjesz B, Li TK, Conneally PM, Nurnberger JI, Jr., Tischfield JA, Crowe RR, Cloninger CR, Wu W, Shears S, Carr K, Crose C, Willig C, Begleiter H (1998) Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet* **81**: 207-215
- Ritter S, Stein L (1973) Self-stimulation of noradrenergic cell group (A6) in locus coeruleus of rats. *J Comp Physiol Psychol* **85**: 443-452

- Rivett AJ, Francis A, Roth JA (1983) Distinct cellular localization of membrane-bound and soluble forms of catechol-O-methyltransferase in brain. *J Neurochem* **40**: 215-219
- Robertson D, Goldberg MR, Onrot J, Hollister AS, Wiley R, Thompson JG, Jr., Robertson RM (1986) Isolated failure of autonomic noradrenergic neurotransmission. Evidence for impaired beta-hydroxylation of dopamine. *N Engl J Med* **314**: 1494-1497
- Robertson JG, Adams GW, Medzihradzky KF, Burlingame AL, Villafranca JJ (1994) Complete Assignment of Disulfide Bonds in Bovine Dopamine-Beta-Hydroxylase. *Biochemistry* **33**: 11563-11575
- Robinson DS (2002) Monoamine oxidase inhibitors: a new generation. *Psychopharmacol Bull* **36**: 124-138
- Roggenbach J, Muller-Oerlinghausen B, Franke L, Uebelhack R, Blank S, Ahrens B (2007a) Peripheral serotonergic markers in acutely suicidal patients. 1. Comparison of serotonergic platelet measures between suicidal individuals, nonsuicidal patients with major depression and healthy subjects. *J Neural Transm* **114**: 479-487
- Roggenbach J, Muller-Oerlinghausen B, Franke L, Uebelhack R, Blank S, Ahrens B (2007b) Peripheral serotonergic markers in acutely suicidal patients. 1. Comparison of serotonergic platelet measures between suicidal individuals, nonsuicidal patients with major depression and healthy subjects. *J Neural Transm* **114**: 479-487
- Rosalki S (1984) Identifying the alcoholic. *Clinical Biochemistry of Alcoholism*: 65-92
- Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* **221**: 227-234
- Rujescu D, Giegling I, Gietl A, Hartmann AM, Moller HJ (2003) A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol Psychiat* **54**: 34-39
- Russ MJ, Lachman HM, Kashdan T, Saito T, Bajmakovic-Kacila S (2000) Analysis of catechol-O-methyltransferase and 5-hydroxytryptamine transporter polymorphisms in patients at risk for suicide. *Psychiatry Res* **93**: 73-78
- Rutherford K, Alphandery E, McMillan A, Daggett V, Parson WW (2008a) The V108M mutation decreases the structural stability of catechol O-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 1098-1105
- Rutherford K, Bennion BJ, Parson WW, Daggett V (2006) The 108M polymorph of human catechol o-methyltransferase is prone to deformation at physiological temperatures. *Biochemistry* **45**: 2178-2188
- Rutherford K, Le Trong I, Stenkamp RE, Parson WW (2008b) Crystal structures of human 108V and 108M catechol O-methyltransferase. *J Mol Biol* **380**: 120-130

- Salminen M, Lundstrom K, Tilgmann C, Savolainen R, Kalkkinen N, Ulmanen I (1990) Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene* **93**: 241-247
- Sanders AR, Duan J, Gejman PV (2002) DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics* **3**: 745-762
- Sandler M (1983) Monoamines, monoamine oxidase and alcoholism. *Subst Alcohol Actions Misuse* **4**: 89-96
- Saxena A, Fleming PJ (1983) Isolation and reconstitution of the membrane-bound form of dopamine beta-hydroxylase. *J Biol Chem* **258**: 4147-4152
- Scanlon PD, Raymond FA, Weinshilbom RM (1979) Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. *Science* **203**: 63-65
- Schalling D, Asberg M, Edman G, Orelund L (1987) Markers for vulnerability to psychopathology: temperament traits associated with platelet MAO activity. *Acta Psychiatr Scand* **76**: 172-182
- Schellekens AF, Franke B, Ellenbroek B, Cools A, de Jong CA, Buitelaar JK, Verkes RJ (2012) Reduced dopamine receptor sensitivity as an intermediate phenotype in alcohol dependence and the role of the COMT Val158Met and DRD2 Taq1A genotypes. *Arch Gen Psychiatry* **69**: 339-348
- Schoots O, Van Tol HH (2003) The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression. *Pharmacogenomics J* **3**: 343-348
- Schultz E, Nissinen E (1989) Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. *Biochem Pharmacol* **38**: 3953-3956
- Sedek G, Jorga K, Schmitt M, Burns RS, Leese P (1997) Effect of tolcapone on plasma levodopa concentrations after coadministration with levodopa/carbidopa to healthy volunteers. *Clin Neuropharmacol* **20**: 531-541
- Senard JM, Rouet P (2006) Dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Orphanet J Rare Dis* **1**: 7
- Serretti A, Cristina S, Lilli R, Cusin C, Lattuada E, Lorenzi C, Corradi B, Grieco G, Costa A, Santorelli F, Barale F, Nappi G, Smeraldi E (2002) Family-based association study of 5-HTTLPR, TPH, MAO-A, and DRD4 polymorphisms in mood disorders. *Am J Med Genet* **114**: 361-369
- Serretti A, Lilli R, Di Bella D, Bertelli S, Nobile M, Novelli E, Catalano M, Smeraldi E (1999) Dopamine receptor D4 gene is not associated with major psychoses. *American Journal of Medical Genetics* **88**: 486-491
- Serretti A, Rotondo A, Lorenzi C, Smeraldi E, Cassano GB (2006) Catechol-O-methyltransferase gene variants in mood disorders in the Italian population. *Psychiatr Genet* **16**: 181-182

Sery O, Didden W, Mikes V, Pitelova R, Znojil V, Zvolsky P (2006) The association between high-activity COMT allele and alcoholism. *Neuro Endocrinol Lett* **27**: 231-235

Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI (1998) Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* **18**: 2697-2708

Shao C, Li Y, Jiang K, Zhang D, Xu Y, Lin L, Wang Q, Zhao M, Jin L (2006) Dopamine D4 receptor polymorphism modulates cue-elicited heroin craving in Chinese. *Psychopharmacology (Berl)* **186**: 185-190

Shield AJ, Thomaes BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM (2004) Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant alleles. *Mol Psychiatry* **9**: 151-160

Silobrić Radić M, Jelavić M (2011) Mentalni poremećaji u Republici Hrvatskoj.

Skondras M, Markianos M, Botsis A, Bistolaki E, Christodoulou G (2004) Platelet monoamine oxidase activity and psychometric correlates in male violent offenders imprisoned for homicide or other violent acts. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **254**: 380-386

Slater EP, Zaremba S, Hogue-Angeletti RA (1981) Purification of membrane-bound dopamine beta-monoxygenase from chromaffin granules: relation to soluble dopamine beta-monoxygenase. *Arch Biochem Biophys* **211**: 288-296

Snell LD, Glanz J, Tabakoff B, Marker WISST (2002) Relationships between effects of smoking, gender, and alcohol dependence on platelet monoamine oxidase-B: Activity, affinity labeling, and protein measurements. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **26**: 1105-1113

Sobik L, Hutchison K, Craighead L (2005) Cue-elicited craving for food: a fresh approach to the study of binge eating. *Appetite* **44**: 253-261

Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F (2011) Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis. *Alcohol Clin Exp Res* **35**: 211-217

Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stohr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R (1995) Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **122**: 369-373

Spielman RS, Weinshilboum RM (1981) Genetics of red cell COMT activity: analysis of thermal stability and family data. *Am J Med Genet* **10**: 279-290

Spreckelmeyer KN, Paulzen M, Raptis M, Baltus T, Schaffrath S, Van Waesberghe J, Zalewski MM, Rosch F, Vernaleken I, Schafer WM, Grunder G (2011) Opiate-Induced Dopamine Release Is Modulated by Severity of Alcohol Dependence: An [F-18]Fallypride Positron Emission Tomography Study. *Biol Psychiat* **70**: 770-776

Srinivasan BS, Doostzadeh J, Absalan F, Mohandessi S, Jalili R, Bigdeli S, Wang J, Mahadevan J, Lee CL, Davis RW, William Langston J, Ronaghi M (2009) Whole genome survey of coding SNPs reveals a reproducible pathway determinant of Parkinson disease. *Hum Mutat* **30**: 228-238

Stewart LC, Klinman JP (1988) Dopamine beta-hydroxylase of adrenal chromaffin granules: structure and function. *Annu Rev Biochem* **57**: 551-592

Strous RD, Bark N, Parsia SS, Volavka J, Lachman HM (1997) Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: Evidence for association with aggressive and antisocial behavior. *Psychiat Res* **69**: 71-77

Strous RD, Nolan KA, Lapidus R, Diaz L, Saito T, Lachman HM (2003) Aggressive Behavior in schizophrenia is associated with the low enzyme activity COMT polymorphism: A replication study. *Am J Med Genet B* **120B**: 29-34

Suarez BK, Hampe CL, Parsian A, Cloninger CR (1995) Monoamine oxidases and alcoholism. II. Studies in alcoholic families. *Am J Med Genet* **60**: 417-423

Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP (2006) The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol* **26**: 290-302

Sullivan JL, Baenziger JC, Wagner DL, Rauscher FP, Nurnberger JI, Jr., Holmes JS (1990) Platelet MAO in subtypes of alcoholism. *Biol Psychiatry* **27**: 911-922

Swanson LW, Hartman BK (1975) The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* **163**: 467-505

Szegedi A, Rujescu D, Tadic A, Muller MJ, Kohlen R, Stassen HH, Dahmen N (2005) The catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism affects short-term treatment response to mirtazapine, but not to paroxetine in major depression. *Pharmacogenomics J* **5**: 49-53

Šagud M, Muck-Seler D, Mihaljevic-Peles A, Vuksan-Cusa B, Zivkovic M, Jakovljevic M, Pivac N (2010) Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. *Psychiatr Danub* **22**: 270-274

Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R (1997) Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* **99**: 2365-2374

Tadić A, Rujescu D, Muller MJ, Kohlen R, Stassen HH, Dahmen N, Szegedi A (2007) A monoamine oxidase B gene variant and short-term antidepressant treatment response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**: 1370-1377

Tanda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G (1997) Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* **9**: 2077-2085



Tang YL, Epstein MP, Anderson GM, Zabetian CP, Cubells JF (2007) Genotypic and haplotypic associations of the DBH gene with plasma dopamine beta-hydroxylase activity in African Americans. *Eur J Hum Genet* **15**: 878-883

Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I (1994) Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* **223**: 1049-1059

Thase ME, Trivedi MH, Rush AJ (1995) MAOIs in the contemporary treatment of depression. *Neuropsychopharmacol* **12**: 185-219

The National Collaborating Centre for Chronic Conditions (2006) *Symptomatic pharmacological therapy in Parkinson's disease*, London: Royal College of Physicians.

Thomasson HR, Beard JD, Li TK (1995) ADH2 gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. *Alcohol Clin Exp Res* **19**: 1494-1499

Tosato S, Bonetto C, Di Forti M, Collier D, Cristofalo D, Bertani M, Zanoni M, Marrella G, Lazzarotto L, Lasalvia A, De Gironcoli M, Tansella M, Dazzan P, Murray R, Ruggeri M (2011) Effect of COMT genotype on aggressive behaviour in a community cohort of schizophrenic patients. *Neurosci Lett* **495**: 17-21

Tovilla-Zarate C, Juarez-Rojop I, Ramon-Frias T, Villar-Soto M, Pool-Garcia S, Medellin BC, Mendoza ADG, Narvaez LL, Humberto N (2011) No association between COMT val158met polymorphism and suicidal behavior: meta-analysis and new data. *Bmc Psychiatry* **11**

Trendelenburg U (1990) The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. *J Neural Transm Suppl* **32**: 3-18

Uzbekov MG, Misionzhnik EY, Maximova NM, Vertogradova OP (2006) Biochemical profile in patients with anxious depression under the treatment with serotonergic antidepressants with different mechanisms of action. *Hum Psychopharmacol* **21**: 109-115

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**: 610-614

Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* **358**: 149-152

Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR (2000) Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* **129**: 1-19

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* **154**: 299-315

Verbanck P, Seutin V, Dresse A, Scuvee J, Massotte L, Giesbers I, Kornreich C (1990) Electrophysiological effects of ethanol on monoaminergic neurons: an in vivo and in vitro study. *Alcohol Clin Exp Res* **14**: 728-735

Verwey NA, Schuitemaker A, van der Flier WM, Mulder SD, Mulder C, Hack CE, Scheltens P, Blankenstein MA, Veerhuis R (2008) Serum amyloid p component as a biomarker in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **26**: 522-527

Viveros OH, Arqueros L, Kirshner N (1968) Release of Catecholamines and Dopamine-Beta-Oxidase from Adrenal Medulla. *Life Sci Pt 1 Physi* **7**: 609-&

Volpicelli JR, Watson NT, King AC, Sherman CE, O'Brien CP (1995) Effect of naltrexone on alcohol "high" in alcoholics. *Am J Psychiatry* **152**: 613-615

von Knorring AL, Hallman J, von Knorring L, Orelund L (1991) Platelet monoamine oxidase activity in type 1 and type 2 alcoholism. *Alcohol Alcohol* **26**: 409-416

von Knorring L, von Knorring AL, Smigan L, Lindberg U, Edholm M (1987) Personality traits in subtypes of alcoholics. *J Stud Alcohol* **48**: 523-527

Wahlund B, Saaf J, Wetterberg L (1995) Clinical symptoms and platelet monoamine oxidase in subgroups and different states of affective disorders. *J Affect Disord* **35**: 75-87

Wang K, Li M, Bucan M (2007) Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies. *Am J Hum Genet* **81**: 1278-1283

Wargelius HL, Fahlke C, Suomi SJ, Orelund L, Higley JD (2010) Platelet monoamine oxidase activity predicts alcohol sensitivity and voluntary alcohol intake in rhesus monkeys. *Ups J Med Sci* **115**: 49-55

Wedren S, Rudqvist TR, Granath F, Weiderpass E, Ingelman-Sundberg M, Persson I, Magnusson C (2003) Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and post-menopausal breast cancer risk. *Carcinogenesis* **24**: 681-687

Weinshenker D, Rust NC, Miller NS, Palmiter RD (2000) Ethanol-associated behaviors of mice lacking norepinephrine. *J Neurosci* **20**: 3157-3164

Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL (1999) Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol* **39**: 19-52

Weinshilboum RM, Raymond FA (1977) Inheritance of low erythrocyte catechol-o-methyltransferase activity in man. *Am J Hum Genet* **29**: 125-135

Weinshilboum RM, Raymond FA, Elveback LR, Weidman WH (1973) Serum dopamine-beta-hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science* **181**: 943-945

Weinshilboum RM, Schorott HG, Raymond FA, Weidman WH, Elveback LR (1975) Inheritance of very low serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet* **27**: 573-585

Weinshilboum RM, Thoa NB, Johnson DG, Kopin IJ, Axelrod J (1971) Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves. *Science* **174**: 1349-1351

Westrin A (2000) Stress system alterations and mood disorders in suicidal patients. A review. *Biomed Pharmacother* **54**: 142-145

Whitfield JB, Pang D, Bucholz KK, Madden PA, Heath AC, Statham DJ, Martin NG (2000) Monoamine oxidase: associations with alcohol dependence, smoking and other measures of psychopathology. *Psychol Med* **30**: 443-454

Wiers RW, Bartholow BD, van den Wildenberg E, Thush C, Engels RC, Sher KJ, Grenard J, Ames SL, Stacy AW (2007) Automatic and controlled processes and the development of addictive behaviors in adolescents: a review and a model. *Pharmacol Biochem Behav* **86**: 263-283

Wiesbeck GA, Davids E, Wodarz N, Thome J, Weijers G, Jakob F, Boening J (1996) Alcohol withdrawal and dopamine receptor sensitivity after prolonged abstinence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **20**: 1171-1180

Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC (2007) Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophrenia Bull* **33**: 635-641

Winkler H, Hortnagl H, Smith AD (1970) Membranes of the adrenal medulla. Behaviour of insoluble proteins of chromaffin granules on gel electrophoresis. *Biochem J* **118**: 303-310

Winqvist R, Lundstrom K, Salminen M, Laatikainen M, Ulmanen I (1992) The human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene maps to band q11.2 of chromosome 22 and shows a frequent RFLP with BglI. *Cytogenet Cell Genet* **59**: 253-257

Winterer G, Weinberger DR (2004) Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci* **27**: 683-690

Wise RA, Rompre PP (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* **40**: 191-225

Wojnar M, Wasilewski D, Matsumoto H, Cedro A (1997) Differences in the course of alcohol withdrawal in women and men: a Polish sample. *Alcohol Clin Exp Res* **21**: 1351-1355

Wong WK, Chen K, Shih JC (2001) Regulation of human monoamine oxidase B gene by Sp1 and Sp3. *Mol Pharmacol* **59**: 852-859

World Health Organisation (1990) International classification of diseases, 10th revision (ICD-10).

World Health Organization (2011) Global status report on alcohol and health.

Xu Z, Zhang ZJ, Shi YY, Pu MJ, Yuan YG, Zhang XR, Li LJ (2011) Influence and interaction of genetic polymorphisms in catecholamine neurotransmitter systems and early life stress on antidepressant drug response. *J Affect Disorders* **133**: 165-173

Yavich L, Forsberg MM, Karayiorgou M, Gogos JA, Mannisto PT (2007) Site-specific role of catechol-O-methyltransferase in dopamine overflow within prefrontal cortex and dorsal striatum. *J Neurosci* **27**: 10196-10209

Yim DS, Park SK, Yoo KY, Yoon KS, Chung HH, Kang HJ, Ahn SH, Noh DY, Choe KJ, Jang IJ, Shin SG, Strickland PT, Hirvonen A, Kang DH (2001) Relationship between the Val(158)Met polymorphism of catechol O-methyl transferase and breast cancer. *Pharmacogenetics* **11**: 279-286

Yoshida A (1992) Molecular-Genetics of Human Aldehyde Dehydrogenase. *Pharmacogenetics* **2**: 139-147

Yoshida A (1994) Genetic Polymorphisms of Alcohol Metabolizing Enzymes Related to Alcohol Sensitivity and Alcoholic Diseases. *Alcohol Alcoholism* **29**: 693-696

Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim KS, Kim CH, Malison RT, Gelernter J, Cubells JF (2001) A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: Evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *American Journal of Human Genetics* **68**: 515-522

Zabetian CP, Buxbaum SG, Elston RC, Kohnke MD, Anderson GM, Gelernter J, Cubells JF (2003) The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet* **72**: 1389-1400

Zalsman G, Frisch A, Lewis R, Michaelovsky E, Hermesh H, Sher L, Nahshoni E, Wolovik L, Tyano S, Apter A, Weizman R, Weizman A (2004) DRD4 receptor gene exon III polymorphism in inpatient suicidal adolescents. *J Neural Transm* **111**: 1593-1603

Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Brent DA, Giner L, Haghghi F, Burke AK, Ellis SP, Currier D, Mann JJ (2008) No Association of COMT Val158Met Polymorphism with Suicidal Behavior or CSF Monoamine Metabolites in Mood Disorders. *Arch Suicide Res* **12**: 327-335

Zammit S, Jones G, Jones SJ, Norton N, Sanders RD, Milham C, McCarthy GM, Jones LA, Cardno AG, Gray M, Murphy KC, O'Donovan MC, Owen MJ (2004) Polymorphisms in the MAOA, MAOB, and COMT genes and aggressive behavior in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **128B**: 19-20

Zhu BL, Quan L, Oritani S, Ishida K, Fujita MQ, Ogawa M, Maeda H (2003) [Acute alcoholism with myoglobinuria: an autopsy case report]. *Chudoku Kenkyu* **16**: 73-76

Zhu QS, Grimsby J, Chen K, Shih JC (1992) Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci* **12**: 4437-4446

Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, Koeppe RA, Stohler CS, Goldman D (2003) COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* **299**: 1240-1243

Zwerling I, Rosenbaum M (1959) Alcoholic Addiction and Personality (Nonpsychotic Conditions). In *American Handbook of Psychiatry*, Arieti S (ed), Vol. 1, pp 623-644. New York: Basic Books

## 8. SAŽETAK

Alkoholizam je česta i izrazito složena psihijatrijska bolest čija neurobiološka podloga velikim dijelom obuhvaća poremećaje dopaminergičke funkcije na koju bitno utječu dopaminski receptori i metabolički enzimi dopamina. U ovom radu istražena je povezanost aktivnosti trombocitne monoaminoooksidaze tipa B (MAO-B) i polimorfizama Val<sup>108/158</sup>Met gena za katehol-o-metiltransferazu (COMT), -1021C/T gena za dopamin beta-hidroksilazu (DBH), A/G 13. introna gena MAO-B te polimorfizma varijabilnog broja ponavljanja (VNTR) u 3. egzonu gena za dopaminski receptor D4 (DRD4) s alkoholizmom i fenotipovima povezanim s alkoholizmom. Istraživanje je obuhvatilo 690 ispitanika oboljelih od alkoholizma i 580 zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati istraživanja pokazali su značajnu razliku u frekvenciji genotipova obzirom na VNTR 3. egzona gena *DRD4* između kontrolnih i ispitanika s alkoholizmom. Nije pronađen značajan utjecaj polimorfizama Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT*, -1021C/T gena *DBH* i A/G 13. introna gena *MAO-B* na razvoj alkoholizma. Polimorfizam Val<sup>108/158</sup>Met gena *COMT* bio je povezan sa suicidalnim ponašanjem, pokušajem suicida i početkom prekomjerne uporabe alkohola, a povezanost je izostala kod ostalih fenotipova povezanih s alkoholizmom. Frekvencije genotipova obzirom na polimorfizam A/G 13. introna gena *MAO-B* se razlikovala između ženskih ispitanika ovisnih o alkoholu sa i bez pokušaja suicida, dok je kod ostalih fenotipova razlika izostala. Polimorfizam -1021 C/T gena *DBH* i VNTR 3. egzona gena *DRD4* nisu povezani s proučavanim fenotipovima povezanim s alkoholizmom. Aktivnost trombocitne MAO-B je povišena kod osoba s alkoholizmom u odnosu na kontrolne ispitanike. Aktivnost trombocitne MAO-B se razlikuje između ovisnika o alkoholu sa i onih bez simptoma ustezanja te između ispitanika s težom i onih s lakšom ovisnošću alkoholu. Kod ostalih fenotipova povezanih s alkoholizmom ne postoje značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B. Kvantitativne i kvalitativne analize ukupnih plazmatskih proteina su pokazale 14 različito eksprimiranih proteinskih točaka između suicidalnih i nesuicidalnih ovisnika o alkoholu, a najvećoj ukupnoj razlici doprinosi različita ekspresija proteina haptoglobin Hp2.

## 9. SUMMARY

Alcoholism is common and very complex psychiatric disorder whose neurobiological basis largely encompasses dopaminergic system malfunction with an emphasis on the role of dopamine receptors and dopamine metabolic enzymes. In this paper we investigated the association of platelet monoamine oxidase type B (MAO-B) activity and polymorphisms Val<sup>108/158</sup>Met for catechol-O-methyltransferase (COMT), -1021C/T for dopamine beta-hydroxylase (DBH), 13th intron A/G for MAO-B and variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in the third exon of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with alcoholism and alcohol-related phenotypes. The study included 690 patients with alcoholism, and 580 healthy control subjects. Results showed a significant difference in the frequency of *DRD4* VNTR genotypes between controls and patients with alcoholism. Polymorphisms Val<sup>108/158</sup>Met *COMT*, -1021C/T *DBH* and 13th intron A/G *MAO-B* had no significant effect in the development of alcoholism. Val<sup>108/158</sup>Met *COMT* polymorphism was associated with suicidal behavior, suicide attempt and the beginning of the excessive use of alcohol, and the association has failed in other alcohol-related phenotypes. Genotype frequencies of the 13th intron A/G *MAO-B* polymorphism differed between female alcohol-dependent patients with and without suicide attempts, while we found no differences in other alcohol-related phenotypes. -1021 C/T *DBH* and *DRD4* VNTR polymorphisms are not associated with the studied alcohol-related phenotypes. Platelet MAO-B activity was elevated in subjects with alcoholism as compared to control subjects. Platelet MAO-B activity differed between alcoholic patients with and those without withdrawal symptoms, and between subjects with severe and those with mild alcohol addiction. Platelet MAO-B activity did not differ between other alcohol-related phenotypes. Quantitative and qualitative analysis of total plasma protein showed 14 differentially expressed protein spots between suicidal and non-suicidal alcoholic patients, and the overall difference is mainly due to different expression of haptoglobin HP2.

# 10. POPIS KRATICA

ADH – alkohol dehidrogenaza  
ADHD - poremećaj pažnje s hiperaktivnošću  
ALDH - aldehid dehidrogenaza  
ALT - alanin aminotransferaza  
AST - aspartatna aminotrasferaza  
CDT - ugljikohidratima deficitarni transferin  
CGI - ljestvica općih kliničkih dojmova  
COMT - katehol-o-metil transferaza  
DAT - dopaminski transporter  
DBH - dopamin beta-hidroksilaza  
DDC - DOPA dekarboksilaza  
DRD4 - dopaminski receptor D4  
DSM-IV - dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, 4. izdanje  
DT - delirium tremens  
FAD - flavin adenin dinukleotid  
FDA - američka agencija za hranu i lijekove  
GABA - gama aminomaslačna kiselina  
GABRA - GABA receptor A  
GAPDH - gliceraldehid -3-fosfat dehidrogenaza  
GGT - gama-glutamiltransferaza  
GWAS - cjelogenomska studija povezanosti  
HA - izbjegavanje štete  
HDRS - Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju  
HTR2A - serotonininski receptor 2A  
HTR2B - serotonininski receptor 2B  
IEF - izoelektrično fokusiranje  
IPG - imobilizirani nosači gradijenta pH  
KLF11- transkripcijski čimbenik nalik Krüppellovom čimbeniku



L-DOPA - L-3,4-dihidroksifenilalanin  
MAO-A - monoaminooksidaza tipa A  
MAO-B - monoaminooksidaza tipa B  
MCV - prosječni volumen eritrocita  
MKB-10 - međunarodna klasifikacija bolesti, 10. Revizija  
Nac – kuleus akumbens  
NET - noradrenalinski transporter  
NFQ - utišivač fluorescencije  
NMDA - N-metil-D-aspartat  
NS - traženje novotarija  
PCR - lančana reakcija polimerazom  
PFC - prefrontalni korteks  
PTSP-posttraumatski stresni poremećaj  
RBP - retinol vezujući protein  
RCLB - pufer za lizu eritrocita  
RD - ovisnost o nagradi  
ROS - reaktivne kisikove vrste  
SDS-PAGE - denatirirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s natrij-dodecilsulfatom  
SNc - supstancija nigra pars kompakta  
SNP - polimorfizam zamjene jedne baze  
VTA - ventralno tegmentalno područje  
5-HTT - serotonininski transporter  
5-HTTLPR - polimorfna regija vezana za gen serotoniniskog transportera

# 11. ŽIVOTOPIS

## Osobni podaci

**Ime i prezime:** Gordana Nedić Erjavec

**Datum i mjesto rođenja:** 11.04.1983., Zagreb, Hrvatska

**Adresa prebivališta:** Jagodno 7, 10415 Novo Čiče

**Telefon:** 098 632 900

**E-mail:** [gnedic@irb.hr](mailto:gnedic@irb.hr)

**Matični broj iz upisa znanstvenika:** 296152

**Bračni status:** udana

## Obrazovanje

**1997.-2001.** Opća gimnazija Velika Gorica

**2001.-2006.** Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odjek, smjer  
Molekularna biologija

**2008.-2013.** Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
'Molekularne bioznanosti', Sveučilište u Osijeku

## Radno iskustvo

**2007.-danas** Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju  
**pozicija** znanstveni novak, asistent

## Članstva u znanstvenim organizacijama i tijelima

Hrvatsko društvo farmakologa

European Pharmacological Society

International Union of Pharmacological Society

Hrvatsko društvo za neuroznanost  
International Brain Research Organization  
Federation of European Neuroscience Societies

### Jezici

**Materinski** hrvatski

**Ostali** engleski, njemački

### Znanstveni radovi citirani u bazi Current Contents:

1. **Nedić G**, Nikolac Perković M, Nenadić Šviglin K, Mück-Šeler D, Borovečki F, Pivac N (2013): Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 193-198
2. Babić M, **Nedić G**, Mück-Šeler D, Borovečki F, Pivac N (2012): Lack of association between dopamine receptor D4 variable numbers of tandem repeats gene polymorphism and smoking. *Neurosci Lett* 520: 67-70
3. Nikolac M, Šagud M, **Nedić G**, Nenadić Šviglin K, Mihaljević Peleš A, Uzun S, Vuskan Ćusa B, Kozumplik O, Živković M, Mustapić M, Jakovljević M, Pavlović M, Mück-Šeler D, Borovečki F, Pivac N (2012): The lack of association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and smoking in schizophrenia and alcohol dependence. *Psychiatry Res* 205: 179-180
4. Pivac N, Kozarić-Kovačić D, Grubišić-Ilić M, **Nedić G**, Rakoš I, Nikolac M, Blažev M, Dorotea Mück-Šeler D (2012): The association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met variants and psychotic symptoms in posttraumatic stress disorder. *World J Biol Psychiatry* 13: 306-311
5. Šagud M, Nikolac M, Mihaljević-Peleš A, **Nedić G**, Vuksan Ćusa B, Mustapić M, Jakovljević M, Mück-Šeler D, Pivac N (2012) The lack of effect of

- ziprasidone on platelet serotonin concentration in schizophrenic patients. Letter to the editors. *Psychopharmacology* 219:1179-1181
6. **Nedić G**, Nikolac M, Nenadić Šviglin K, Mück Šeler D, Borovečki F, Pivac N (2011): Association study of a functional catechol-o-methyltransferase (COMT) val108/158Met and suicide attempts in patients with alcohol dependence. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 377-388
  7. **Nedić G**, Borovečki F, Klepac N, Mubrin Z, Hajnšek S, Nikolac M, Mück-Šeler D, Pivac N (2011) Association Study of a Functional Catechol-O-Methyltransferase Polymorphism and Cognitive Function in Patients with Dementia. *Coll Antropol* 35: Suppl 1, 79-84
  8. Nenadić Šviglin K, **Nedić G**, Nikolac M, Mustapić M, Mück-Šeler D, Borovečki F, Pivac N (2011) Insomnia, platelet serotonin and platelet monoamine oxidase in chronic alcoholism. *Neurosci Lett* 500:172-176
  9. Nenadić-Šviglin K, **Nedić G**, Nikolac M, Kozarić-Kovačić D, Stipčević T, Mück-Šeler D, Pivac N (2011) Suicide attempt, comorbid depression and platelet serotonin in alcohol dependence. *Alcohol* 45: 209-216
  10. Pivac N, Knežević A, Gornik O, Pucić M, Igl W, Peeters H, Crepel A, Steyaert J, Novokmet M, Redžić I, Nikolac M, Novković Hercigonja V, Dodig Ćurković K, Ćurković M, **Nedić G**, Borovečki F, Rudan I, Lauc G (2011) Human plasma glycome in attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorders. *Mol Cell Proteomics* 10.1: 1-7 10.1074
  11. Pivac N, Nikolac M, **Nedić G**, Mustapić M, Borovečki F, Hajnšek S, Presečki P, Pavlović M, Mimica N, Mück-Šeler D (2011). Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 356-362
  12. Pregelj P, **Nedić G**, Videtič Paska A, Županc T, Nikolac M, Balažić J, Tomori M, Komel R, Mück Šeler D, Pivac N (2011) The association between brain-derived neurotrophic factor polymorphism (BDNF Val66Met) and suicide. *J Affect Disord* 128: 287-290.

13. **Nedić G**, Nikolac M, Borovečki F, Hajnšek S, Mück-Šeler D, Pivac N (2010) Association study of a functional catechol-O-methyl-transferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects. *Neurosci Lett* 473: 216-219
14. **Nedić G**, Pivac N, Kocijan Hercigonja D, Jovančević M, Dodig Ćurković K, Mück-Šeler D (2010) Platelet monoamine oxidase activity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 175: 252-255
15. Hercigonja Novković V, Rudan V, Pivac N, **Nedić G**, Mück-Šeler D (2009) Platelet serotonin concentration in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 59: 17-22
16. Mück-Šeler D, Presečki P, Mimica N, Mustapić M, Pivac N, Babić A, **Nedić G**, Folnegović-Šmalc V (2009). Platelet serotonin concentration and monoamine oxidase type B activity in female patients in early, middle and late phase of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 1226-1231
17. Pivac N, **Nedić G**, Mustapić M, Babić A, Stipčević T, Borovečki F, Hajnšek S, Mück-Šeler D (2009) The lack of genotype-phenotype relationship between platelet serotonin concentration and serotonin transporter gene promoter polymorphism in healthy subjects. *Neurosci Lett* 462: 45-48
18. Pivac N, Kim B, **Nedić G**, Joo YH, Kozarić-Kovačić D, Hong JP, Mück-Šeler S (2009) Ethnic differences in the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy subjects. *Croat Med J* 50: 43-48
19. Kovačić Z, Henigsberg N, Pivac N, **Nedić G**, Borovečki A (2008) Platelet serotonin concentration and suicidal behavior in combat related posttraumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 544-551
20. Mück-Šeler D, Šagud M, Mustapić M, **Nedić G**, Babić A, Mihaljević Peles A, Jakovljević M, Pivac N (2008). The effect of lamotrigine on platelet monoamine oxidase type B activity in patients with bipolar depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 1195-1198
21. Noskova T, Pivac N, **Nedić G**, Kazantseva A, Gaysina D, Faskhutdinova G, Gareeva A, Khalilova Z, Khusnutdinova E, Kozarić Kovačić D, Kovačić Z, Jokić M, Mück Šeler D (2008) Ethnic differences in the serotonin transporter

polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 32: 1735-1739

22. Šagud M, Pivac N, **Nedić G**, Mihaljević Peleš A, Kramarić M, Jakovljević M, Mück Šeler D (2008) The effect of lamotrigine on platelet serotonin concentration in patients with bipolar depression. Letter to the editors. Psychopharmacology 4: 683-685

#### Znanstveni radovi citirani u drugim bazama:

1. Šagud M, Nikolac M, Mihaljević-Peleš A, **Nedić G**, Vuksan Ćusa B, Mustapić M, Marčinko D, Jakovljević M, Mück-Šeler D, Pivac N (2012): Antipsychotic drugs do not affect platelet 5-HT concentration in schizophrenic patients. Transl Neurosci 3: 56-60.
2. Pivac N, Pregelj P, Nikolac M, Županc T, **Nedić G**, Mück Šeler D, Videtič Paska A (2011): The association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and suicide. Genes Brain Behav 10: 565-569.

#### Poglavlja u knjigama

1. Pivac N, **Nedić G**, Kozarić-Kovačić D, Nikolac M, Grubišić Ilić M, Mustapić M, Jendričko T, Rakoš I, Kovačić Z, Mück-Šeler D. Biomarkers as new tools to improve the diagnosis and treatment of PTSD. NATO Science for peace programme: NATO ASI - Invisible Wounds, New Tools to Enhance PTSD Diagnosis and Treatment, Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2013., prihvaćeno za tisak
2. Pivac N, **Nedić G**, Nikolac M, Fistonić M, Kovačević M, Mustapić M, Gverić-Korkut I, Grubišić-Ilić M, Kozarić-Kovačić D, Muck-Šeler D. Neurobiological basis of pain syndrome in war veterans with PTSD: preliminary findings. Pain Syndrome - From Recruitment to returning Troups / Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2011. Str. 94-122.
3. Pivac N, **Nedić G**, Nikolac M, Mustapić M, Švob Štrac D, Jazvinščak Jembrek M, Muck-Šeler D. Molecular mechanisms of traumatic brain injury. Traumatic

- brain injury. Wounds of war III. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2011. Str. 81-111.
4. Muck-Šeler D, Mustapić M, **Nedić G**, Babić A, Mimica N, Kozarić-Kovačić D, Nenadić-Šviglin K, Stipčević T, Presečki P, Nikolac M, Borovečki F, Folnegović Šmalc V, Kovačić Z, Pivac N. Genetic and biochemical markers of serotonergic and catecholaminergic systems in neuropsychiatric disorders. Advances in Genetics Research. Urbano, Kevin V. (ur.). New York: Nova Science Publishers, Inc, 2010. Str. 1-67.
  5. Pivac N, Kozarić-Kovačić D, **Nedić G**, Nikolac M, Mustapić M, Babić A, Grubišić-Ilić M, Kovačić Z, Muck-Šeler D. Genetic markers in suicidal and non-suicidal veterans with combat-related posttraumatic stress disorder, Chapter 4. Posttraumatic stress disorder (PTSD): causes, symptoms and treatment. Egan, Sylvia J (ur.). New York: NOVA SCI Publisher, 2010. Str. 109-139.
  6. Pivac N, **Nedić G**, Nikolac M, Nenadić-Šviglin K, Kozarić-Kovačić D, Mustapić M, Kovačić Z, Grubišić Ilić M, Borovečki F, Hajnšek S, Muck-Šeler D. Sleep disturbances and serotonergic markers in psychiatric disorders. Advances in Psychology Research. Vol. 7. Columbus, Alexandra M. (ur.). New York: NOVA Science Publisher, 2010. Str. 1-85.
  7. Pivac N, Nikolac M, **Nedić G**, Muck-Šeler D. Genetics of suicidal behavior. Coping with posttraumatic stress disorder in returning troops. Wounds of war II. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2010. Str. 31-55.
  8. Pivac N, Kozarić-Kovačić D, **Nedić G**, Mustapić M, Stipčević T, Nenadić-Šviglin K, Grubišić-Ilić M, Muck-Šeler D. Neurobiology of suicidal behavior. Lowering Suicide Risk in Returning Troops: Wounds of War. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2008. Str. 3-22.

#### Sudjelovanje na kongresu (usmena prezentacija).

1. **Nedić G**, Hercigonja-Novković V, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, Škledar M, Nikolac M, Muck-Šeler D, Pivac N: Dopaminergic mechanisms in attention deficit-hyperactivity disorders in children, 6th Croatian Congress of Pharmacology with International Participation, Opatija, Croatia, 15.-18.9. 2010.

Sudjelovanje na kongresu (poster):

2. **Nedić G**, Novković-Hercigonja V, Dodig-Ćurković K, Mück-Šeler D, Pivac N. Dopamine D4 receptor exon III polymorphism in attention-deficit/hyperactivity disorder // Journal of neurochemistry, vol 118, Suppl. 1/ Murphy S, Schulz J (ed.). Geneva: International society for neurochemistry, 2011. 165-244
3. **Nedić G**, Hercigonja-Novković V, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, Škledar M, Nikolac M, Mück-Šeler D, Pivac N. Dopaminergic mechanisms in attention deficit hyperactivity disorders in children // Periodicum Biologorum, vol 112, Suppl. 1 / Vitale B (ed.). Zagreb: Croatian society for natural science, Rudjer Boskovic Institute, Laserplus, 2010. 34-34
4. **Nedić G**, Deželjin M, Knežević J, Kozarić-Kovačić D, Mück-Šeler D, Pavelić J, Pivac N. Polimorfizam monoaminooksidaze tipa B i katehol-o-metiltrasferaze u posttraumatskom stresnom poremećaju // Paediatrica Croatica / Barišić I (ed.). Zagreb : Denona d.o.o., 2007. 136-136
5. **Nedić G**, Knežević J, Deželjin M, Kozarić-Kovačić D, Balija M, Pavelić J, Mück-Šeler D, Pivac N. Monoamine oxidase type B polymorphism in combat related posttraumatic stress disorder // Final programme and abstract book of the 5th Croatian Congress of Pharmacology and 2nd Congress of Croatian Physiological Society with international participation, Periodicum Biologorum 109, suppl 2 / Vitale B (ed.). Zagreb: Medicinska zaklada, 2007. 92-92