



Praca oryginalna
Original paper

Paulina Całka, Marzanna Ciesielka, Grzegorz Teresiński

Analysis of polymorphic variants in the *ADH7* gene in alcohol abusers and addicts

Analiza wariantów polimorficznych w genie *ADH7* u osób nadużywających i uzależnionych od alkoholu

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Abstract

Environmental and genetic (in approximately 50%) factors are responsible for the development of alcohol abuse and dependence. The main genes responsible for the risk of harmful alcohol consumption are the genes encoding the enzymes of ethanol metabolism in the human body. Ethyl alcohol is oxidized to acetaldehyde by alcohol dehydrogenases found in the liver (*ADH1B*, *ADH1C* and *ADH4*) and stomach (*ADH7*). Gastric metabolism of ethanol is able to reduce the amount of alcohol reaching the bloodstream by up to 10% of the dose taken. *ADH7* gene variations could be associated as the risk of developing alcohol abuse and dependence. **Aim of the study:** Analysis of tag SNPs in the *ADH7* gene and determination of the relationship between those variants and the risk of developing alcohol abuse and dependence in the Polish population. **Materials and methods:** Blood samples from 159 autopsies from alcohol abusers and/or addicts and 201 buccal swabs taken from controls. Genotyping was performed using the Real Time PCR method with TaqMan probes on 3 tag SNPs: rs284786, rs1154470 (within the *ADH7* gene) and rs7690269 (from the intergenic region). The obtained genotypes were randomly verified by Sanger sequencing. **Results and conclusions:** The results of the performed statistical analyses of the obtained genotypes did not confirm the relationship between the above-mentioned variants and a risk of developing problems with alcohol consumption, based on samples from the Polish population.

Key words: alcohol addiction, alcohol abuse, alcohol dehydrogenases, gastric dehydrogenase, *ADH7*

Streszczenie

Nadużywanie i uzależnienie od alkoholu zależy zarówno od czynników środowiskowych, jak i w około 50% czynników genetycznych. Głównymi genami, które są odpowiedzialne za zwiększone ryzyko rozwoju szkodliwego spożywania alkoholu są geny kodujące enzymy rozkładu etanolu w organizmie ludzkim. Alkohol etylowy jest utleniany do aldehydu octowego przez dehydrogenazy alkoholowe występujące w wątrobie (ADH1B, ADH1C i ADH4) oraz żołądka (ADH7). Metabolizm żołądkowy etanolu jest w stanie obniżyć jego ilość trafiającą do krwiobiegu nawet do 10% przyjętej dawki. Zmiany występujące w genie *ADH7* wykazują związek z ilością spożywanego alkoholu, a także ryzykiem rozwoju nadużywania i uzależnienia od tej substancji. **Cel pracy:** Analiza zmian znacznikowych w genie *ADH7* i określenie związku wariantów badanego genu z ryzykiem rozwoju nadużywania i uzależnienia od alkoholu w populacji polskiej. **Materiały i metody:** Materiał do badań stanowiła krew pobrana od 159 denatów, którzy nadużywali i/lub byli uzależnieni od alkoholu oraz 201 wymazów policzkowych od osób kontrolnych z populacji polskiej. Wykorzystując metodę Real Time PCR z sondami TaqMan wykonano genotypowanie w zakresie 3 zmian znacznikowych: rs284786, rs1154470 (w obrębie genu *ADH7*) i rs7690269 (z regionu międzygenowego). Otrzymane genotypy losowo weryfikowano sekwencjonowaniem metodą Sangera. **Wyniki i wnioski:** Analiza statystyczna otrzymanych wyników nie potwierdziła związku wybranych wariantów z ryzykiem nadużywania i uzależnienia od alkoholu.

Słowa kluczowe: kluczowe: uzależnienie od alkoholu, nadużywanie alkoholu, dehydrogenazy alkoholowe, dehydrogenaza żołądkowa, ADH7

Wprowadzenie

W wieku XVIII spożywanie alkoholu zaczęto postrzegać jako problem medyczny [1]. Nadużywanie alkoholu powoduje szereg chorób i urazów, a także wpływa negatywnie na funkcjonowanie rodzin oraz społeczeństwa [2]. Według danych Komendy Głównej Policji (KGP) w 2021 roku 8,4% ogółu wypadków drogowych spowodowały osoby będące pod wpływem alkoholu, natomiast w 18,5% utonięć ofiary spożywały alkohol przed wypadkiem [3], [4]. Znaczny odsetek podejrzanych o dokonanie zabójstw, spowodowanie uszczerbku na zdrowiu, pobicie, rozboje, kradzieże i wymuszenia rozbójnicze, gwałty, uszkodzenia mienia czy przestępstwa przeciwko funkcjonariuszom była pod wpływem alkoholu [5]. Raport WHO (sporządzony w 2016 roku) wskazuje, iż problem z nadużywaniem alkoholu ma 12,8% populacji Polski, natomiast 2,2% populacji jest uzależniona od alkoholu (według klasyfikacji ICD-10) [2].

Background

In the 18th century, alcohol consumption started to be perceived as a medical issue [1]. Alcohol abuse causes a series of diseases and injuries, and also negatively affects the functioning of families and society [2]. In 2021, according to the data of the National Police Headquarters (NPH), 8.4% of overall traffic accidents were caused by persons under the influence of alcohol, whereas, in 18.5% of drowning cases, the victims consumed alcohol prior to the incident [3], [4]. A significant percentage of people suspected of committing homicide, causing bodily harm, criminal battery, mugging, theft and extortion robbery, rape, property damage, or crime against officers were under the influence of alcohol [5]. A WHO report (prepared in 2016) indicates that alcohol abuse problem concerns 12.8% of the population of Poland, whereas 2.2% of the population is addicted to alcohol (based on ICD-10 classification) [2].

Nadużywanie i uzależnienie od alkoholu klasyfikuje się jako jednostkę chorobową o podłożu złożonym, co oznacza że zarówno zjawiska socjologiczne i psychologiczne, jak i cechy dziedziczne składają się na ich rozwój. Szacuje się, że około 50% ryzyka rozwoju nadużywania i uzależnienia od alkoholu stanowią czynniki genetyczne, natomiast na pozostałą część składają się czynniki środowiskowe oraz interakcje pomiędzy nimi a czynnikami genetycznymi [6], [7].

Dane uzyskane z licznych szerokogenomowych analiz asocjacyjnych wskazują na silny związek regionu na chromosomie 4, zawierającego geny kodujące enzymy z rodziny dehydrogenaz alkoholowych (ADH), a także *loci* dehydrogenaz aldehydowych (ALDH) z częstością występowania zaburzeń spożywania alkoholu. Produkty tych genów są zaangażowane w metabolizm alkoholu w organizmie [8]–[10]. Enzymami odpowiedzialnymi za utlenianie ponad 90% przyjętego alkoholu etylowego do aldehydu octowego są ADH1B, ADH1C, ADH4 oraz ADH7. Pierwsze trzy izoenzymy z rodziny ADH wykazują swoje działanie głównie w wątrobie, natomiast w żołądku najistotniejszym izoenzymem jest ADH7. Metabolizm żołądkowy może obniżyć biodostępność spożytego alkoholu etylowego nawet o 10% [11], [12]. Jego rola w całkowitym metabolizmie alkoholu oraz właściwości enzymatyczne ADH7 zostały szerzej opisane we wcześniejszej pracy [13].

Gen *ADH7* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 4 (4q22-4q23), gdzie wszystkie 7 genów składających się na rodzinę ADH występuje w postaci klastra rozciągającego się na około 370 kbp [14]. Region ten powstał poprzez wielokrotną duplikację genów i wiele wariantów tu występujących pozostaje w silnym sprzężeniu genetycznym [15]. W genie *ADH7* można wyróżnić 3 bloki wariantów sprzężonych, co oznacza że dziedziczą się one wspólnie [16].

Alcohol abuse and addiction are classified as a disease entity of complex background, which means that both sociological and psychological phenomena, and hereditary qualities contribute to their development. It is estimated that about 50% of the risk for alcohol abuse and addiction development constitute genetic factors, whereas environmental factors and interactions between them and the genetic ones constitute the remaining part [6], [7].

Data obtained from numerous genome-wide association studies indicate a strong connection of the region on chromosome 4 containing genes that encode alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes and also of aldehyde dehydrogenase *loci* (ALDH) with the prevalence of alcohol use disorders. The products of these genes are engaged in alcohol metabolism in the body [8]–[10]. Enzymes responsible for oxidation of more than 90% of ingested ethyl alcohol to acetaldehyde are ADH1B, ADH1C, ADH4 and ADH7. The first three isoenzymes of the ADH family demonstrate their activity mainly in the liver, while in the stomach the most relevant isoenzyme is ADH7. Gastric metabolism can reduce the bioavailability of ingested ethanol by up to 10% [11], [12]. Its role in total alcohol metabolism and the enzymatic properties of ADH7 were further described in an earlier paper [13].

The *ADH7* gene is located on the long arm of chromosome 4 (4q22-4q23), where all 7 genes constituting ADH family occur in the form of a cluster extending over about 370 kbp [14]. This region was created through multiple gene duplication and many of the variants found here remain in strong genetic linkage [15]. There are 3 blocks of linked variants in the *ADH7* gene, which means that they are inherited together [16].

Cel pracy

Za cel pracy obrano określenie udziału żołądkowego metabolizmu alkoholu w rozwoju nadużywania i uzależnienia od alkoholu w populacji polskiej, poprzez analizę częstości wariantów znacznikowych (ang. tag SNP) genu *ADH7*. Realizacja założonego celu obejmowała wyselekcjonowanie na podstawie piśmiennictwa oraz listy wariantów silnie sprzężonych genetycznie (wartości r^2 i D' w zakresie 0,95-1,00) trzech wariantów znacznikowych badanego regionu genetycznego. Każdy wybrany wariant jest zmianą polimorficzną, dwa z nich obejmują duże bloki sprzężeń w genie *ADH7* natomiast trzeci znajduje się w regionie międzygenowym, który obejmuje blok silnie sprzężonych genetycznie wariantów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu *ADH7* [17]. W tabeli 1 zawarto opis wybranych do analizy zmian polimorficznych.

The aim of the study

The aim of the study was to determine the contribution of gastric alcohol metabolism to the development of alcohol abuse and addiction in the Polish population by analyzing the frequency of tag SNPs of the *ADH7* gene. The realization of the set objective involved the selection based on the literature and a list of highly genetically linked variants (r^2 and D' values in the range of 0.95-1.00) of three tag SNPs of the genetic region under study. Each selected variant is a polymorphic change, two of which involve large linkage blocks in the *ADH7* gene, while the third one is located in the intergenic region which encompasses a block of highly genetically linked variants responsible for regulation of the *ADH7* gene expression [17]. Table 1 includes description of polymorphic variants selected for analysis.

Table I. Selected tag SNPs of ADH7 gene. Description and frequencies of variants taken from the Ensembl database

Tabela I. Wyselekcjonowane warianty znacznikowe genu ADH7. Opis i częstości wariantów pobrane z bazy Ensembl [17]

SNP	Lokalizacja / Localization	MAF (EUR-CEU) HapMap/ 1000 Genome Project Phase 3	Allele Alleles
rs284786	3' UTR	-/0,227	T/A
rs1154470	intron 1	0.323/0,328	G/A
rs7690269	region międzygenowy	0,004/0,005	T/C

MAF (EUR-CEU) – częstość rzadziej występującego allelu dla populacji mieszkańców Utah pochodzących z północnej i zachodniej Europy.

MAF (EUR-CEU) – Minor Allele Frequency for populations of Utah residents from northern and western Europe.

Materiały i metody

Na wykonanie badań uzyskano zgodę niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych działającej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie o numerze KE-0254/38/2017.

Materials and methods

The study was approved by the independent Bioethics Committee for Scientific Research at the Medical University of Lublin (no. KE-0254/38/2017).

Materiały

Grupę badaną stanowiła krew z żyły udowej pobrana podczas autopsji osób nadużywających i/lub uzależnionych od alkoholu. Wszystkie zakwalifikowane do badania osoby były polskiego pochodzenia, łącznie 159 osób, wśród których było 68% mężczyzn (n=108) oraz 32% kobiet (n=51). Grupę kontrolną stanowili ochotnicy, od których pobrano wymazy policzkowe. Wcześniej wypełnili ankietę (sporządzoną na podstawie ankiety Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego po otrzymaniu zgody na jej wykorzystanie [18]), mającą na celu weryfikację czy u danej osoby nie występują zachowania mogące świadczyć o problemach ze spożywaniem napojów alkoholowych i innych substancji odurzających oraz występowaniu chorób psychiatrycznych. Do badania włączono osoby niespokrewnione, które pochodzą z populacji polskiej i w ciągu swojego życia spożywały napoje alkoholowe. Grupa kontrolna liczyła 201 osób, w tym 48% kobiet (n=97) oraz 52% mężczyzn (n=104) i była zróżnicowana pod względem wykształcenia oraz wysokości zarobków. Żadna z ww. osób w przeszłości nie nadużywała alkoholu, ani też nie wykazywała problemów związanych z jego spożywaniem.

Izolacja materiału genetycznego i genotypowanie

Do izolacji genomowego DNA z krwi obwodowej wykorzystano zestaw Blood Mini (A&A Biotechnology), natomiast DNA z wymazów policzkowych zostało wyizolowane przy użyciu zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology) według protokołów dostarczonych przez producenta. W celu określenia genotypów próbek w zakresie wybranych zmian znacznikowych wykorzystano metodę Real Time PCR oraz zestawu TaqMan (TaqMan SNP Genotyping Assays) firmy Applied Biosystems (numery katalogowe zestawów: C__8934019_1_, C__714911_1_, C__44120970_10). Analizę przeprowadzono na aparacie 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) według profilu termicznego sugerowanego przez producenta. Przykładowy wynik genotypowania prezentuje rycina 1.

Materials

The study group consisted of blood from the femoral vein collected during autopsies of alcohol abusers and/or addicts. All of the subjects eligible for the study were of Polish descent, a total of 159 individuals including 68% males (n=108) and 32% females (n=51). The control group consisted of volunteers from whom buccal swabs were taken. They had previously completed a questionnaire (based on an American Psychiatric Association survey after receiving permission to use the same) [18]), the aim of which was verification whether a given person shows no behavior that may indicate problems with the consumption of alcoholic beverages and other intoxicating substances and the presence of psychiatric diseases. The study included unrelated individuals from the Polish population who had consumed alcoholic beverages during their lives. The control group consisted of 201 individuals, including 48% females (n=97) and 52% males (n=104), and varied in terms of education and earnings. None of the aforementioned individuals had a history of alcohol abuse or alcohol-related problems.

Isolation of genetic material and genotyping

The Blood Mini kit (A&A Biotechnology) was used to isolate genomic DNA from peripheral blood, while DNA from buccal swabs was isolated using the Sherlock AX kit (A&A Biotechnology) according to protocols provided by the manufacturer. Real Time PCR and TaqMan SNP Genotyping Assays from Applied Biosystems were used to genotype samples for selected tag SNPs (kit catalog numbers: C__8934019_1_, C__714911_1_, C__44120970_10). The analysis was conducted on a 7500 Real Time PCR System unit (Applied Biosystems) according to the thermal profile suggested by the manufacturer. Figure 1 presents an example of genotyping result.

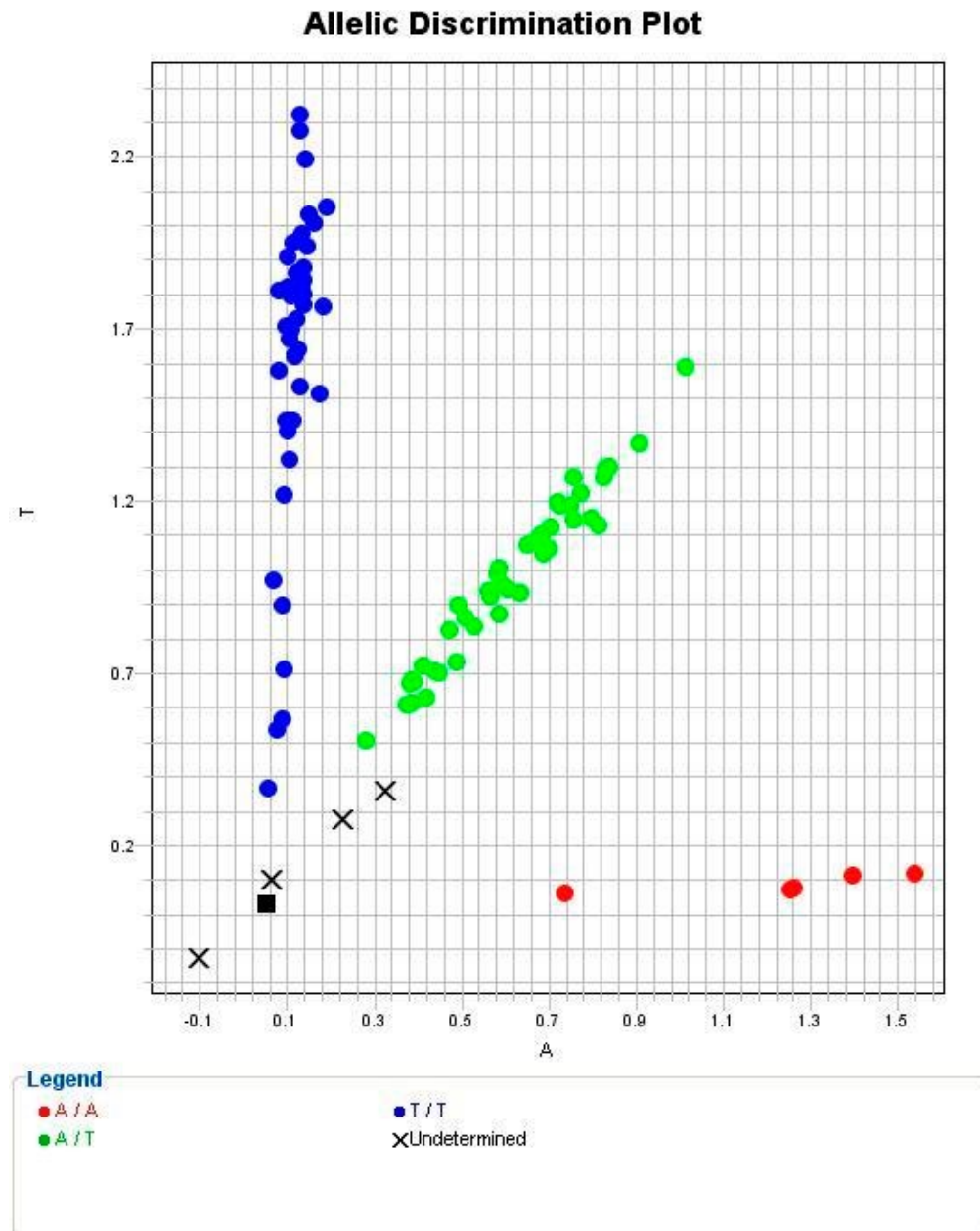


Figure 1. Allelic discrimination plot from rs284786 genotyping assay (96 samples). A/A homozygotes are marked red, heterozygotes (A/T) are green, and T/T homozygotes are blue. The “x” indicates samples that cannot be assigned to any genotype, black square is a negative control.

Rycina 1. Wykres różnicowania genotypowego w zakresie zmiany rs284786 wygenerowany po analizie 96 próbek metodą Real Time PCR. Kolorem czerwonym oznaczono homozygoty A/A, zielonym heterozygoty (A/T), natomiast niebieskim homozygoty T/T. Za pomocą “x” oznaczono próby niemożliwe do przypisania do żadnej z grup genotypowych, natomiast czarnym kwadratem kontrolę negatywną.

Część próbek poddano weryfikacji poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger, w tym próbki niemożliwe do zgenotypowania metodą Real Time PCR. Namnażanie przeprowadzono w aparacie T-Professional (Biometra) w 25 µl mieszaniny zawierającej 10 ng genomowego DNA, 2,5 µl buforu reakcyjnego bez MgCl₂ (10 x stęż.), 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM każdego startera oraz 1U polimerazy DNA Taq (Promega). Wykorzystano następujące warunki PCR: 94°C przez 3 min, następnie 30 cykli denaturacji 94°C przez 1 min, przyłączanie starterów 60°C przez 1 min i wydłużanie 72°C przez 1 min oraz wydłużanie końcowe 70°C przez 10 min. Użyto dostępnych starterów firmy Thermo Fisher Scientific dla rs1154470 (5'-GAGTGAAGTGCATCAGTCAGAAA-3' i 5'-TGACATTCTCTGAAACACCATATCCAG-3'), rs284786 (5'-ATCTGTCTCACAATAACAAGCATAAGT-3' i 5'-GGCAAATAGCCTTGTGTACCCATAT-3'), rs7690269 (5'-TTCTCCCAACAGTGAAATGATCAGTT-3' i 5'-TGTGTGCTATTTCCCTTTGATAGGCTAAT-3').

Produkty amplifikacji oczyszczano wykorzystując zestaw Microcon DNA Fast Flow (Merck Millipore), a następnie poddano cyklicznemu sekwencjonowaniu z wykorzystaniem zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems) w aparacie T-Personal (Biometra) według protokołu producenta. Przed rozdziałem elektroforetycznym produkty oczyszczano z użyciem zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology) i poddawano rozdziałowi na aparacie 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Do odczytu elektroforegramów sekwencyjnych wykorzystano program SeqScape v.3 (Applied Biosystems) oraz sekwencję referencyjną NC_000004.11 (patrz rycina 2).

Obliczenia statystyczne

Zgodność z regułą Hardy-Weinberga i rozkład genotypów w grupach każdego z wariantów sprawdzano testem prawdopodobieństwa Pearsona i Fishera (w przypadku gdy liczebność w podgrupie była mniejsza niż 5). Dodatkowo obliczono współczynnik wsobności. Do ww. wyliczeń użyto narzędzia dostępnego on-line autorstwa Tima Storma i wsp. (Instytut Genetyki Człowieka, Monachium, Niemcy) [19]. W obliczeniach przyjęto 95% przedział ufności i poziom istotności 0,05.

Part of the samples were verified by Sanger sequencing, including samples that could not be genotyped by Real Time PCR. Amplification was performed in a T-Professional apparatus (Biometra) in 25 µl of a mixture containing 10 ng of genomic DNA, 2.5 µl of MgCl₂-free reaction buffer (10 x concentration), 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, and 1U of Taq DNA polymerase (Promega). The following PCR conditions were used: 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation 94°C for 1 min, primer annealing 60°C for 1 min and extension 72°C for 1 min, and final extension 70°C for 10 min. Available primers from Thermo Fisher Scientific were used for rs1154470 (5'-GAGTGAAGTGCATCAGTCAGAAA-3' and 5'-TGACATTCTCTGAAACACCATATCCAG-3'), rs284786 (5'-ATCTGTCTCACAATAACAAGCATAAGT-3' and 5'-GGCAAATAGCCTTGTGTACCCATAT-3'), rs7690269 (5'-TTCTCCCAACAGTGAAATGATCAGTT-3' and 5'-TGTGTGCTATTTCCCTTTGATAGGCTAAT-3').

Amplification products were purified using the Microcon DNA Fast Flow kit (Merck Millipore) and then subjected to cycle sequencing using the BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems) in a T-Personal instrument (Biometra) according to the manufacturer's protocol. Prior to electrophoretic distribution, products were purified using an ExTerminator kit (A&A Biotechnology) and subjected to distribution on a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). SeqScape v.3 software (Applied Biosystems) and reference sequence NC_000004.11 were used to read the sequence electrophoregrams (see Figure 2).

Statistical analysis

Compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium and the distribution of genotypes in the groups of each variant were checked by Pearson and Fisher's probability test (when the subgroup size was less than 5). Additionally, the inbreeding coefficient was calculated. For the aforementioned calculations, an online tool by Tim Storm et al. (Institute of Human Genetics, Munich, Germany) was used [19]. The calculations assumed a 95% confidence interval and a significance level of 0.05.

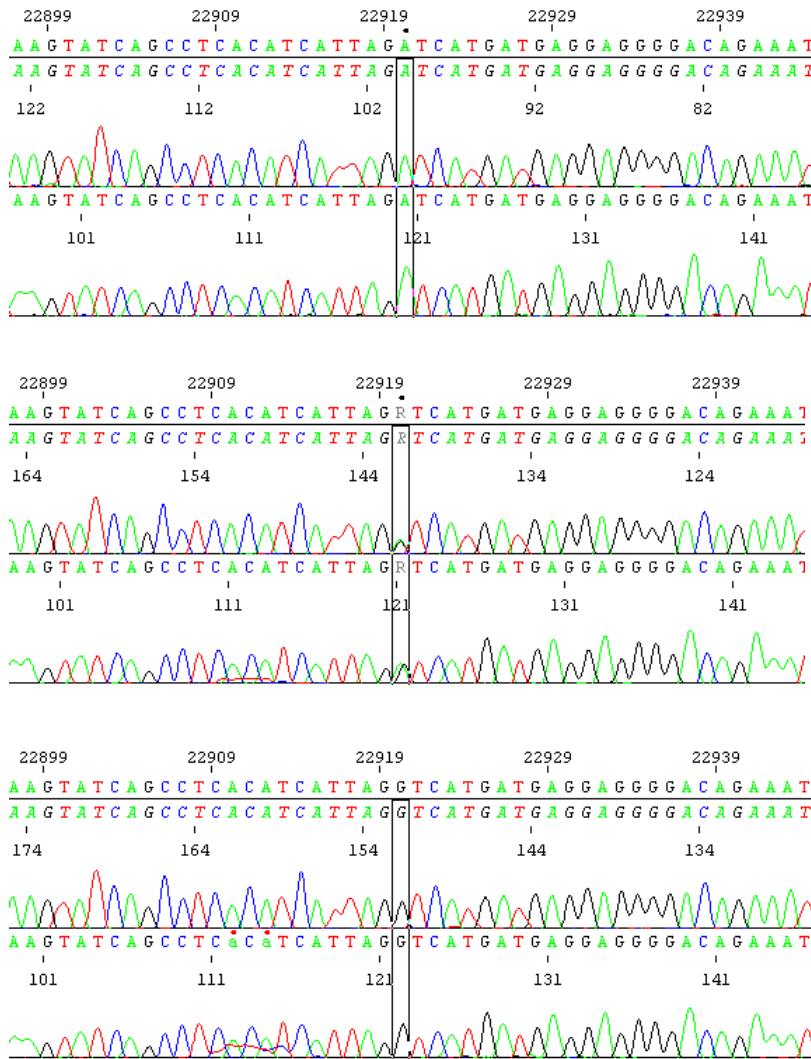


Figure 2. The sequencing results for rs 1154470 locus (marked with black box). with primers for the rs1154470 region (marked with a black box): a) alternative homozygote – AA, b) heterozygote – AG, c) reference homozygote – GG.

Rycina 2. Przykładowe wyniki sekwencjonowania z wykorzystaniem starterów obejmujących wariant rs1154470 (zaznaczony czarną ramką): a) homozygota alternatywna – AA, b) heterozygota – AG, c) homozygota referencyjna – GG.

Wyniki

Rozkład genotypów i alleli w zakresie wybranych wariantów znacznikowych genu *ADH7*, czyli rs284786, rs1154470 i rs7690269 w grupach badanej i kontrolnej oraz wyniki analiz statystycznych uzyskanych dla danego rozkładu genotypów i alleli przedstawia tabela 2. Nie wykazano odchyżeń od równowagi Hardy'ego-Weiberga oraz istotnych różnic rozkładu genotypów w grupach.

Results

Distribution of genotypes and alleles within the range of selected tag SNPs of the *ADH7* gene, i.e. rs284786, rs1154470 and rs7690269 in the study and control groups, as well as statistical analyses results obtained for a given distribution of genotypes and alleles are presented in table 2. No deviations from Hardy-Weiberg equilibrium and no significant differences in the distribution of genotypes in the groups were observed.

Table II. Distribution of the obtained genotypes and alleles in the studied groups (frequencies are given in brackets) and the results of the statistical analyses performed, the Hardy-Weinberg equilibrium test and the test of the dependence of the frequency of genotypes and alleles in the studied groups (95% confidence interval).

Tabela II. Rozkład uzyskanych genotypów i alleli w badanych grupach (w nawiasie podano ich częstości) oraz zestawienie wyników wykonanych analiz statystycznych, tj. testu równowagi Hardy’ego-Weinberga oraz testu zależności częstości występowania genotypów i alleli w badanych grupach (95% przedziału ufności).

rs284786			rs1154470			rs7690269		
Genotyp/allele Genotype/allele	Grupa badana Cases	Grupa kontrolna Controls	Genotyp/allele Genotype/allele	Grupa badana Cases	Grupa kontrolna Controls	Genotyp/allele Genotype/allele	Grupa badana Cases	Grupa kontrolna Controls
AA	6 (0,038)	21 (0,104)	AA	16 (0,101)	19 (0,095)	CT	2 (0,013)	1 (0,005)
AT	68 (0,428)	83 (0,413)	AG	71 (0,420)	79 (0,393)	TT	157 (0,987)	200 (0,995)
TT	85 (0,534)	97 (0,483)	GG	72 (0,453)	103 (0,512)			
razem	159	201	razem	159	201	razem	159	201
p	0,0565 (Pearson)		p	0,537 (Pearson)		p	0,586 (Exact)	
A	80 (0,25)	125 (0,31)	A	103 (0,32)	117 (0,29)	C	2 (0,006)	1 (0,002)
T	238 (0,75)	277 (0,69)	G	215 (0,68)	285 (0,71)	T	316 (0,994)	401 (0,998)
p	0,07959 (Pearson)		p	0,34192 (Pearson)		p	0,586 (Exact)	
HWE	F=-0,13571	F=0,03636	HWE	F=-0,01955	F=0,04759	HWE	F=-0,00633	F=-0,00249
	p=0,087027 (Pearson)	p=0,606199 (Pearson)		p=0,805254 (Pearson)	p=0,499833 (Pearson)		p=0,936391 (Pearson)	p=0,971796 (Pearson)
	p=0,137750 (Exact)	p=0,622196 (Exact)		p=0,858319 (Exact)	p=0,496365 (Exact)		p=1,000000 (Exact)	p=1,000000 (Exact)

Wyjaśnienie skrótów: p (Pearson) – wartość p dla testu χ^2 Pearsona, p (Exact) – wartość p dla dokładnego testu Fishera, F – współczynnik wsobności.

Explanation of abbreviations: p (Pearson) – p value for Pearson’s χ^2 test, p (Exact) – p value for Fisher’s exact test, F – inbreeding coefficient.

Dyskusja i wnioski

W wielu badaniach asocjacyjnych całego genu wykazano istotne znaczenie genów dehydrogenaz alkoholowych, w tym genu *ADH7* w rozwoju nadużywania i uzależnienia od alkoholu [10], [20], [21] w kontekście jednego dużego badania, w którym z powodzeniem zidentyfikowano takie geny. Jak dotąd nie powiązano w sposób powtarzalny wariantów funkcjonalnych *ADH7*, a identyfikowano głównie zmiany w obrębie intronów genu *ADH7*. Według Birley i wsp. region od 5’UTR genu *ADH7* do intronu 7 wykazuje najmocniejszy związek ze zmianami farmakokinetycznymi *in vivo* alkoholu podczas fazy absorpcyjnej. Odnotowano również wpływ wariantów tego regionu na różnice w stężeniu alkoholu we krwi i wydychanym powietrzu,

Discussion and conclusions

In numerous genome-wide association studies, vital importance of alcohol dehydrogenases genes, including the *ADH7* gene, has been demonstrated in the development of abuse and addiction to alcohol [10], [20], [21] in the context of one large study that has successfully identified such genes. So far, functional variants of *ADH7* have not been linked in a recurrent pattern, and mainly variations within the introns of the *ADH7* gene were identified. According to Birley et al., the region from 5’UTR of the *ADH7* gene to intron 7 demonstrates the strongest connection with pharmacokinetic *in vivo* changes of alcohol during the absorption phase. The effect of variants of the region on differences in blood and exhaled alcohol concentrations was also noted, par-

szczególnie w grupie pochodzenia europejskiego [16]. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Edenberga i wsp. rs284786 zlokalizowany w regionie 3'UTR jako jedyny wariant w obrębie *ADH7* wykazywał istotną zależność z fenotypem uzależnienia od alkoholu [22]. Sekwencjonowanie całych genów przeprowadzone przez zespół Penga na próbkach od rdzennych Amerykanów wykazało, że 11 zmian w obrębie 3'UTR oraz jedna zmiana w intronie 8 genu *ADH7* posiada możliwy efekt ochronny przed rozwojem fenotypów związanych z alkoholem [23]. Również analiza koreańskich próbek wskazuje na asocjacje z regionem 3' genu *ADH7* [24].

Uzyskane w naszej pracy wyniki analiz asocjacyjnych dla wariantów znacznikowych rs284786, rs1154470 i rs7690269 nie wykazały zależności pomiędzy badanymi zmianami a rozwojem nadużywania i uzależnienia od alkoholu. Z uwagi na to, że najczęściej doniesień dotyczy regionu 3'UTR, a badany wariant rs284786 nie wykazuje sprzężenia genetycznego ze wszystkimi zmianami w tym regionie, nie można wykluczyć udziału zmian obszaru 3'UTR genu *ADH7* w rozwoju nadużywania i uzależnienia od alkoholu. Uzyskany wynik potwierdził, że najlepszym rozwiązaniem byłoby sprawdzenie wszystkich zmian w zakresie badanego genu w celu ustalenia istotności statystycznej dla każdej z nich indywidualnie, a następnie wykonanie analiz funkcjonalnych, aby potwierdzić ich znaczenie w etiologii zaburzeń spożywania alkoholu.

Przedstawiane analizy wykonano na heterogenicznej grupie badanej pod względem fenotypu szkodliwego spożywania alkoholu. Jest to spowodowane ograniczoną dostępnością do szczegółowych informacji odnośnie modelu nadużywania alkoholu oraz towarzyszących zaburzeń psychicznych osób włączonych do badania. Może to prowadzić to problemów z wykrywaniem wariantów, które składają się na rozwój wyłącznie danego podfenotypu. Co więcej, czynniki genetyczne predysponujące do ww. chorób mogą różnić się w zależności od płci osób badanych a uzyskane liczebności grup badanych były niewystarczające, aby dokonać podziału ze względu na ten czynnik.

particularly in the group of European origin [16]. Whereas in the studies conducted by Edenberg et al., rs284786 localized in 3'UTR region, as the only variant within *ADH7*, demonstrated a significant correlation with alcohol addiction phenotype [22]. Whole gene sequencing conducted by the Penga et al. on samples from native Americans showed that 11 variations within 3'UTR and one variation in intron 8 of the *ADH7* gene have a possible protective effect against development of phenotypes associated with alcohol [23]. The analysis of Korean samples also indicates associations with region 3' of the *ADH7* gene [24].

Results of association analyses obtained in our work for tag SNPs rs284786, rs1154470 and rs7690269 failed to demonstrate associations between the studied variations and the development of abuse and addiction to alcohol. Given that most reports involve the 3'UTR region, and that the rs284786 variant studied does not show genetic linkage to all variations in this region, the involvement of variations in the 3'UTR region of the *ADH7* gene in the development of alcohol abuse and addiction cannot be excluded. The result obtained confirmed that it would be best to check all variations in the gene under study to determine statistical significance for each individually, and then perform functional analyses to confirm their significance in the etiology of alcohol use disorders.

The analyses presented here were performed on a heterogeneous group studied in terms of the phenotype of harmful alcohol consumption. This is due to the limited availability of detailed information regarding the pattern of alcohol abuse and accompanying mental disorders of the subjects included in the study. This may lead to problems in detecting variants that contribute exclusively to the development of a particular subphenotype. Moreover, the genetic factors predisposing to the aforementioned diseases may differ according to the sex of the subjects and the obtained numbers of the study groups were insufficient to make a division according to this factor.

Niniejszy artykuł został przygotowany na kanwie części wyników badań zamieszczonych w rozprawie doktorskiej mgr Pauliny Całki wykonanej w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Piśmiennictwo / References

- [1] Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology, *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63: 49–63, doi: 10.1079/pns2003327.
- [2] Światowa Organizacja Zdrowia, Global status report on alcohol and health 2018, World Health Organization, ISBN 978-92-4-156563-9
- [3] Serwis Statystyka Komendy Głównej Policji, Ruch drogowy, Wypadki drogowe – raporty roczne (2021), dostępne w Policja Statystyka: <https://statystyka.policja.pl/st/ruch-drogowy/76562,Wypadki-drogowe-raporty-roczne.html> [dostęp 18.10.2022].
- [4] Serwis Statystyka Komendy Głównej Policji, Utonięcia (2021), dostępne w Policja Statystyka: <https://statystyka.policja.pl/st/wybrane-statystyki/utoniecia/48247,Utoniecia-2021.html> [dostęp 18.10.2022]
- [5] Serwis Statystyka Komendy Głównej Policji, Nietrzeźwi sprawcy przestępstw, dostępne w Policja Statystyka: <https://statystyka.policja.pl/st/wybrane-statystyki/nietrzezwi-sprawcy-prz/50862,Nietrzezwi-sprawcy-przestepstw.html> [dostęp 18.10.2022].
- [6] Enoch MA. The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence, *Current Psychiatry Reports*, 2012; 14: 150–158, doi: 10.1007/s11920-011-0252-9.
- [7] Enoch MA, Albaugh BJ. Review: Genetic and environmental risk factors for alcohol use disorders in American Indians and Alaskan Natives, *American Journal on Addictions*, 2017; 26: 461–468, doi: 10.1111/ajad.12420.
- [8] Edenberg H.J, Foroud T. Genetics and alcoholism, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2013; 10: 487–494, doi: 10.1038/nrgastro.2013.86.
- [9] Sanchez-Roige S, Palmer AA, Clarke TK. Recent Efforts to Dissect the Genetic Basis of Alcohol Use and Abuse, *Biological Psychiatry*, 2020; 87: 609–618, doi: 10.1016/j.biopsych.2019.09.011.
- [10] Walters RK., Polimanti R, Jonhson EM., McClintick JM. i wsp. Transancestral GWAS of alcohol dependence reveals common genetic underpinnings with psychiatric disorders, *Nat. Neurosci.*, 2018; 21: 1656–1669, doi: 10.1038/s41593-018-0275-1.
- [11] Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Drug Metabolism Reviews Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects, *Drug Metabolism Reviews*, 2019; 51: 545–561 doi: 10.1080/03602532.2019.1679169.
- [12] Teresiński G, Buszewicz G, Fazy alkoholemii i metabolizm alkoholu, in *Medycyna sądowa. Diagnostyka sądowa*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2020, 123–133.
- [13] Całka P, Ciesielka M, Buszewicz G, Teresiński G. Zmienność żołądkowej dehydrogenazy alkoholowej a ryzyko uzależnienia od alkoholu, *Arch. Med. Sadowej Kryminol.*, 2016; 66: 172–181, doi: 10.5114/amsik.2016.66401.
- [14] Edenberg H J. The Genetics of Alcohol Metabolism Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants, *Alcohol Research and health*, 2007; 30: 5–13
- [15] Oota H, Kidd KK. Duplicated Gene Evolution of the Primate Alcohol Dehydrogenase Family, in *Post-Genome Biology of Primates, Primateology Monographs*, 2012; 149–161, doi: 10.1007/978-4-431-54011-3_9.
- [16] Birley AJ., James MR., Dickson PA., Montgomery GW. i wsp. Association of the gastric alcohol dehydrogenase gene ADH7 with variation in alcohol metabolism, *Hum. Mol. Genet.*, 2008; 17: 179–189, doi: 10.1093/hmg/ddm295.
- [17] Przeglądarka genomów Ensembl, dostępna w serwisie Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>. [dostęp 08.10.2022]
- [18] Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA), ankieta dostępna online na witrynie Collaborative Study on the Genetics of Alcohol: https://niaaagenetics.org/coga_instruments/phaseI/ssagaI/ssagai.pdfssagai.pdf [dostęp 26.10.2022]
- [19] Test odchylenia od równowagi Hardy’ego-Weinberga oraz test asocjacji dla bada typu kontrola-przypadek, dostępne w witrynie internetowej Instytutu Genetyki Człowieka Uniwersytetu Technicznego w Monachium: <https://ihg.helmholtzmuenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. [dostęp 9.01.2021]
- [20] Edenberg HJ, Foroud T. The genetics of alcoholism: Identifying specific genes through family studies, *Addiction Biology*, 2006; 11: 386–396, doi: 10.1111/j.1369-1600.2006.00035.x.
- [21] Sanchez-Roige S., Palmer AA., Fontanillas P., Elson SL. i wsp. Genome-wide association study meta-analysis of the alcohol use disorders identification test (AUDIT) in two population-based cohorts, *Am. J. Psychiatry*, 2019; 176: 107–118, doi: 10.1176/appi.ajp.2018.18040369.
- [22] Edenberg HJ., Xuei X., Chen H-J., Tian H. i wsp. Association of alcohol dehydrogenase genes with alcohol dependence: A comprehensive analysis, *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 1539–1549, doi: 10.1093/hmg/ddl073.
- [23] Peng Q., Gizer IR., Libiger O., Bizon C. i wsp. Association and ancestry analysis of sequence variants in ADH and ALDH using alcohol-related phenotypes in a Native American community sample, *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, 2014; 165: 673–683, doi: 10.1002/ajmg.b.32272.
- [24] Park BL., Kim JW., Cheong HS., Kim LH. i wsp. Extended genetic effects of ADH cluster genes on the risk of alcohol dependence: From GWAS to replication, *Hum. Genet.*, 2013; 132: 657–668, doi: 10.1007/s00439-013-1281-8.

ORCID

Paulina Całka
 Marzanna Ciesielka 0000-0002-2685-8764
 Grzegorz Teresiński 0000-0002-4184-9305

AUTOR DO KORESPONDENCJI

Paulina Całka
 Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu
 Medycznego w Lublinie
 e-mail: paulinacalka@umlub.pl

