

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Branka B. Nešić

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ČIJI
PRODUKTI SU UKLJUČENI U ANTIOKSIDATIVNE
PROCESE, INFLAMACIJU I METABOLIZAM LIPIDA SA
ALKOHOLNOM CIROZOM JETRE**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka B. Nešić

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN GENES
ENCODING PRODUCTS INVOLVED IN ANTIOXIDATIVE
PROCESSES, INFLAMMATION AND LIPID
METABOLISM WITH ALCOHOLIC LIVER CIRRHOSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

dr Ivana Grubiša, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Branka Zukić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Sofija Pavković Lučić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:_____2026. godine

Zahvalnica

Želim da izrazim veliku zahvalnost svojoj mentorki *dr Ivani Grubiši* na uloženom trudu, znanju, stručnim savetima i kontinuiranoj podršci prilikom izrade ove teze. Pre svega hvala na strpljenju i upornosti da ovaj rad bude završen.

Veliku zahvalnost dugujem i svojoj drugoj mentorki *dr Mariji Savić Veselinović* za strpljenje i korisne savete koji su bili od velikog značaja za oblikovanje ove teze.

Zahvaljujem se i članovima komisije *dr Katarini Zeljić*, *dr Branki Zukić* i *dr Sofiji Pavković Lučić* na uloženom vremenu i trudu, i dragocnim sugestijama koje su ovu disertaciju učinile kvalitetnijom.

Hvala i svim kolegama iz Laboratorije za humanu genetiku i osoblju Odeljenja za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Zvezdara na saradnji.

Hvala i kolegama iz Grupe za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetički inženjering na nesebičnom deljenju znanja i pomoći prilikom izrade disertacije.

Najveće hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci, razumevanju i ljubavi tokom ovog puta.

Posvećeno Jovani, Dimitriju i Marini

Povezanost polimorfizama gena čiji produkti su uključeni u antioksidativne procese, inflamaciju i metabolizam lipida sa alkoholnom cirozom jetre

Sažetak:

Alkoholna ciroza jetre (ACJ) je ireverzibilno oštećenje jetre koje razvija 10-20% konzumenata alkohola. Cilj disertacije bio je ispitivanje povezanosti varijanti u genima *PNPLA3* (rs738409), *TM6SF2* (rs58542926), *CYP2E1* (rs2031920), *TNF- α* (rs361525 i rs1800629) i delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena sa ACJ, s obzirom na njihovu ulogu u metabolizmu lipida, oksidativnom stresu i inflamaciji, procesima ključnim za razvoj i progresiju bolesti. Analizirani su i uticaji demografskih, biohemijskih i kliničkih karakteristika i navike konzumiranja alkohola na razvoj ACJ.

Studija je obuhvatila grupu bolesnika sa ACJ i kontrolnu grupu. Genotipizacija je urađena PCR-RFLP i multipleks PCR metodama. Poseban fokus bio je na proceni kumulativnog efekta genetičkih varijanti konstrukcijom poligenetskog skora rizika (PRS).

Nosioci manje učestalih analiziranih alela/genotipova *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α* (rs361525) imali su 2-7 puta, a osobe sa delecijama *GSTM1* i *GSTT1* do 11 puta povećan rizik za razvoj ACJ. Varijanta *TNF- α* -308 (rs1800629) nije bila asocirana sa ACJ. PRS model zasnovan na varijantama *PNPLA3* i *TM6SF2* je pokazao izuzetnu stabilnost u predviđanju bolesti i identifikaciji visokorizičnih ispitanika u našoj populaciji, pri čemu proširenje na model koji je uključio pet analiziranih varijanti nije dovelo do značajnog poboljšanja diskriminatorne sposobnosti. GG genotip *PNPLA3* bio je povezan sa povećanim rizikom za razvoj ciroze nezavisno od konzumacije alkohola, dok je prisustvo *GSTM1* i *GSTT1* gena ispoljilo protektivni efekat. Biohemijski parametri pokazali su se kao prediktori težine bolesti, a kasniji početak konzumacije alkohola (≥ 23 godine) bio je povezan sa bržim razvojem ciroze.

Dobijeni rezultati ukazuju na visoki potencijal primene genetičkih markera, PRS i kliničko-biohemijskih parametara u ranoj identifikaciji osoba sa predispozicijom za ACJ, što postavlja osnovu za personalizovani pristup bolesnicima u Srbiji.

Ključne reči: alkoholna ciroza jetre, poligeniski skor rizika, obrasci konzumiranja alkohola, *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, *TNF- α* , *GSTM1* i *GSTT1*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

Association of polymorphisms in genes encoding products involved in antioxidative processes, inflammation and lipid metabolism with alcoholic liver cirrhosis

Abstract:

Alcohol-related liver cirrhosis (ALC) is an irreversible liver damage that develops in 10-20% of alcohol consumers. The dissertation aimed to examine the association of variants in the *PNPLA3* (rs738409), *TM6SF2* (rs58542926), *CYP2E1* (rs2031920), *TNF- α* (rs361525 and rs1800629) genes and deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes with ALC, considering their role in lipid metabolism, oxidative stress and inflammation, processes key to the development and disease progression. The effects of demographic, biochemical and clinical characteristics and alcohol consumption habits on the development of ALC were also analyzed.

The study included a group of patients with ALC and a control group. Genotyping was performed using PCR-RFLP and multiplex PCR. Special focus was on assessing the cumulative effect of genetic variants by constructing a polygenic risk score (PRS).

Carriers of the less frequent alleles/genotypes of *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, and *TNF- α* (rs361525), and individuals with *GSTM1* and *GSTT1* deletions had a 2-to 11-fold increased risk for ALC development. The *TNF- α* -308 variant (rs1800629) was not associated with ALC. The PRS model based on *PNPLA3* and *TM6SF2* variants showed exceptional stability in disease prediction and in identifying high-risk subjects in our population, whereas extending it to the 5-variant model did not lead to a significant improvement in discriminatory ability. The GG genotype of *PNPLA3* was associated with an increased risk of cirrhosis development, independent of alcohol consumption, while the presence of *GSTM1* and *GSTT1* genes conferred a protective effect. Biochemical parameters proved to be predictors of disease severity, and later onset of alcohol consumption (≥ 23 years) was associated with faster development of cirrhosis.

The results indicate a high potential for the application of genetic markers, PRS, and clinical-biochemical parameters in the early identification of individuals with a predisposition to ALC, laying the foundation for a personalized approach to patients in Serbia.

Key words: alcohol-related liver cirrhosis, polygenic risk score, alcohol consumption patterns, *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, *TNF- α* , *GSTM1* and *GSTT1*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

LISTA SKRAĆENICA

- ABJ – alkoholna bolest jetre
- ACJ – alkoholna ciroza jetre
- ADH – alkoholna dehidrogenaza
- AILD – autoimune bolesti jetre (eng. *autoimmune liver diseases*)
- AK – amino kiselina
- ALDH – acetaldehid dehidrogenaza
- ALP – alkalna fosfataza
- ALT – alanin aminotransferaza
- AMA – antimitohondrijalna antitela
- ANA – antinukleusna antitela
- APOB- apolipoprotein B
- AS – alkoholna steatoza
- ASH – alkoholni steatohepatitis
- ASMA – anti – glatkomišićna antitela
- AST – aspartat aminotransferaza
- ATGL – adipozna trigliceridna lipaza (eng. *adipose triglyceride lipase*)
- AUC - površina ispod krive (eng. *area under the curve*)
- BMI – indeks telesne mase (eng. *body mass index*)
- bp – bazni par
- CGI-58 proteina (eng. *comparative gene identification-58*)
- CI – interval poverenja (eng. *confidence interval*)
- CP skor – Čajld Puov skor (eng. *Child Pugh score*)
- CYP2E1 – citohrom P-4502E1
- CYP450 – citohrom P-450
- DM – dijabetes melitus
- dNTP – deoksinukleotid trifosfat
- EDTA – etilendiamintetra–sirćetna kiselina
- ELB – pufer za lizu eritrocita (eng. *erythrocyte leasing buffer*)
- ER – endoplazmatski retikulum
- EXPERA – proširena superfamilija emopamil–vezujućih proteina (eng. *EXPanded EBP superfamily*)
- FDR – procenat lažnih otkrića (eng. *false discovery rate*)
- GGT – gama–glutamil transpeptidaza
- GSH – glutation
- GST – glutation S transferaza
- GSTM1 – glutation S-transferaza M1
- GSTT1 – glutation S-transferaza T1
- GWAS – studija asocijacije na nivou čitavog genoma (eng. *genome-wide association studies*)
- HbsAg – površinski antigen hepatitisa B
- HCC – hepatocelularni karcinom
- HCV – virus hepatitisa C
- INR – internacionalni normalizovani odnos (eng. *international normalized ratio*)
- IU/L – internacionalna jedinica / litru
- KBC – kliničko bolnički centar
- LD – neravnoteža vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*)

- LLB – pufer za lizu leukocita (eng. *leukocyte leasing buffer*)
- LPS – lipopolisaharid
- MAF – učestalost manje zastupljenog alela (eng. *Minor allele frequencies*)
- MASLD – metabolički udružena bolest masne jetre (eng. *Metabolic dysfunction - associated steatotic liver disease*)
- MEOS – mikrozomalni enzimski oksidativni sistem
- MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex*)
- MK – masne kiseline
- MSCT – multislajsna kompjuterizovana tomografija
- NAD – nikotinamid–adenin–dinukleotid
- NADH – redukovani nikotinamid–adenin–dinukleotid
- NADPH – redukovani nikotinamid–adenin–dinukleotid–fosfat
- NF- κ B – nukleusni faktor kapa B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- OKA – obrazac konzumiranja alkohola
- OR – odnos šanse (eng. *odds ratio*)
- PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*)
- RFLP – polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*)
- PGE2 – prostaglandin E2
- PNPLA3 – protein 3 koji sadrži fosfolipazni domen nalik patatinu (eng. *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*)
- PRS – poligenski skor rizika (eng. *polygenic risk score*)
- RNS – slobodne azotne vrste (eng. *reactive nitrogen species*)
- ROC kriva – kriva operativnih karakteristika prijemnika (eng. *receiver operating characteristic curve*)
- ROS – reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxygen species*)
- SD – standardna devijacija
- SNP – polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms*)
- SZO – Svetska zdravstvena organizacija
- TACE – TNF-konvertujući enzim (eng. *TNF-alpha converting enzyme*)
- TG – trigliceridi
- TGF- β – transformišući faktor rasta β (eng. *transforming growth factor β*)
- TLR4 – TLR4 receptor / receptor sličan Toll-u 4 (eng. *toll-like receptor 4*)
- TM6SF2 – član 2 superfamilije 6 transmembranskih proteina (eng. *transmembrane 6 superfamily member 2*)
- TNFR1 – receptor za faktor nekroze tumora – α
- TNF- α – faktor nekroze tumora- α (eng. *tumor necrosis factor- α*)
- VLDL – lipoprotein vrlo niske gustine (eng. *very low density lipoprotein*)
- WT – referentni alel (eng. *wild type*)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Građa i funkcija jetre.....	2
1.2. Ciroza jetre	3
1.3. Proces u osnovi patogeneze alkoholne ciroze jetre.....	4
1.3.1. Oksidacija etanola	5
1.3.2. Oksidativni stres	5
1.3.3. Inflammatory odgovor i fibrogenaza.....	6
1.4. Faktori rizika za progresiju ABJ	7
1.4.1. Genetički faktori rizika za razvoj ACJ	8
1.4.1.1. <i>PNPLA3</i>	8
1.4.1.2. <i>TM6SF2</i>	10
1.4.1.3. <i>CYP2E1</i>	11
1.4.1.4. <i>TNF-α</i>	13
1.4.1.5. <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	15
2. CILJEVI.....	18
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Ispitanici i biološki materijal.....	21
3.2. Metode za detekciju ispitivanih genetičkih varijanti.....	23
3.2.1. Izolacija genomske DNK	23
3.2.1.1. Protokol izolacije DNK metodom ispljavanja	23
3.2.1.2. Protokol izolacije DNK na koloni sa silikonskom membranom	24
3.2.2. Provera kvaliteta i koncentracije genomske DNK	24
3.2.3. Agarozna gel elektroforeza	24
3.2.4. Detekcija varijanti u genima <i>PNPLA3</i> , <i>TM6SF2</i> , <i>CYP2E1</i> i <i>TNF-α</i>	25
3.2.5. Detekcija delecija <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i> gena.....	28
3.3. Statistička obrada podataka	29
4. REZULTATI	32
4.1. Demografski parametri, obrazac konzumacije alkohola, biohemijske i kliničke karakteristike ispitanika	33
4.2. Analiza učestalosti varijanti <i>PNPLA3</i> , <i>TM6SF2</i> , <i>CYP2E1</i> i <i>TNF-α</i> gena.....	35
4.3. Analiza učestalosti i asocijacije alela <i>PNPLA3</i> , <i>TM6SF2</i> , <i>CYP2E1</i> i <i>TNF-α</i> gena sa cirozom jetre alkoholne etiologije	37

4.3.1.	Genotipovi asocirani sa cirozom jetre alkoholne etiologije	39
4.4.	Poligenski skor rizika u predikciji alkoholne ciroze jetre	41
4.4.1.	Poligenski skor rizika baziran na analiziranim polimorfizmima <i>PNPLA3</i> i <i>TM6SF2</i> gena...	41
4.4.2.	Poligenski skor rizika baziran na pet analiziranih varijanti (<i>PNPLA3</i> , <i>TM6SF2</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>TNF-α-238</i> i <i>TNF-α-308</i>).....	42
4.5.	Analiza delecija <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i> gena.....	43
4.5.1.	Analiza kombinovanih <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i> genotipova.....	46
4.6.	Analiza asocijacija genotipova sa anamnestičkim, biohemijskim i kliničkim podacima	47
4.6.1.	Obrasci konzumiranja alkohola	47
4.6.2.	Biohemijski parametri	49
4.6.3.	Kliničke karakteristike	50
4.7.	Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na težinu bolesti	51
4.7.1.	Faktori rizika i prediktori maligne alteracije kod bolesnika sa ACJ	53
5.	DISKUSIJA	57
5.1.	Demografske karakteristike i obrasci konzumiranja alkohola kod bolesnika sa ACJ	58
5.2.	Varijante u genima povezanim sa akumulacijom lipida: <i>PNPLA3</i> i <i>TM6SF2</i>	59
5.3.	Varijante u genima povezanim sa oksidativnim stresom i inflamacijom: <i>CYP2E1</i> , <i>TNF-α</i>	60
5.4.	Zajednički efekat varijanti ispitivanih gena	61
5.5.	Varijante u genima povezanim sa detoksikacijom: uloga <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	63
5.6.	Asocijacije analiziranih genotipova sa navikama konzumiranja alkohola, biohemijskim i kliničkim podacima	64
5.7.	Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na težinu bolesti	66
5.7.1.	Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na HCC.....	68
6.	ZAKLJUČCI.....	70
7.	LITERATURA	73
	PRILOZI	92

1. UVOD

Konzumiranje alkoholnih pića, kao jedno od učestalih zdravstveno rizičnih ponašanja, ima za posledicu oko 2,6 miliona smrtnih slučajeva godišnje u svetu¹. Ne postoji potpuno bezbedan nivo konzumacije alkohola, jer i male količine mogu biti povezane sa kratkoročnim ili dugoročnim rizicima po zdravlje pojedinca. Alkohol ima negativan uticaj na zdravlje zbog svojih psihoaktivnih i toksičnih efekata, kao i adiktivnog potencijala. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), u Evropi prosečna godišnja potrošnja čistog etanola po odraslom stanovniku iznosi oko 9 litara¹. SZO je predstavila globalnu strategiju za smanjenje štetne upotrebe alkohola 2010. godine². Ipak, povećanje konzumacije alkohola tokom pandemije COVID-19 se vremenski podudarilo sa povećanim brojem hospitalizacija i povećanim mortalitetom bolesnika sa alkoholnom bolešću jetre (ABJ)³. Zbog toga se predviđa i globalno povećanje broja obolelih od ABJ, dekompenzovane ciroze i porast mortaliteta vezanog za alkoholnu cirozu jetre (ACJ) i hepatocelularni karcinom (HCC)⁴ u narednim godinama.

ABJ obuhvata spektar patoloških stanja čiji je uzrok hroničan unos alkohola, od alkoholne steatoze (AS) i alkoholnog steatohepatitisa (ASH) do ACJ i HCC. Približno 21,3% ukupnog mortaliteta povezanog sa alkoholom čine ABJ. AS je prisutna kod preko 90% osoba hronično izloženih alkoholu. Kod manjeg broja osoba će doći do alkoholnog hepatitisa, a samo 10-15% osoba koje hronično konzumiraju alkohol će razviti cirozu⁵. ACJ predstavlja ireverzibilni stadijum progresivnog oštećenja jetre koji nosi visok rizik od fatalnog ishoda usled insuficijencije (otkazivanja) jetre ili razvoja HCC. Etiologija ciroze značajno varira u zavisnosti od geografskog podneblja i demografskih karakteristika. Prema podacima SZO u 2021. godini, ciroza i druge hronične bolesti jetre su bile uzrok 1,47 miliona smrtnih slučajeva, a alkohol je jedan od tri vodeća uzroka (pored virusa hepatitisa B i C)⁶. U Evropi je čak 60% slučajeva ciroze alkoholne etiologije^{6,7}. Prema zvaničnim podacima za Srbiju u periodu od 2016-2018. godine, prosečan godišnji broj smrtnih ishoda koji se mogu pripisati zloupotrebi alkoholnih pića iznosi oko 2500, od čega je 26% smrtnih ishoda usled bolesti jetre⁸.

Stvarna epidemiološka slika koja se odnosi na ABJ, uključujući i ACJ, je verovatno nepovoljnija nego što to zvanični podaci pokazuju. Razlozi za to su višestruki. Bolest se retko dijagnostikuje u ranim stadijumima. Socijalna stigma odvraća pojedince da se jave na lečenje, što dovodi do propuštanja prilika za intervencije u ranim fazama bolesti⁹. Takođe, ovo može dovesti i do nedovoljnog prepoznavanja bolesti ili kasnijeg postavljanja dijagnoze. Upotreba alkohola koji ubrzava i pogoršava bolesti jetre druge etiologije se često ne uzima u obzir u statistikama¹⁰.

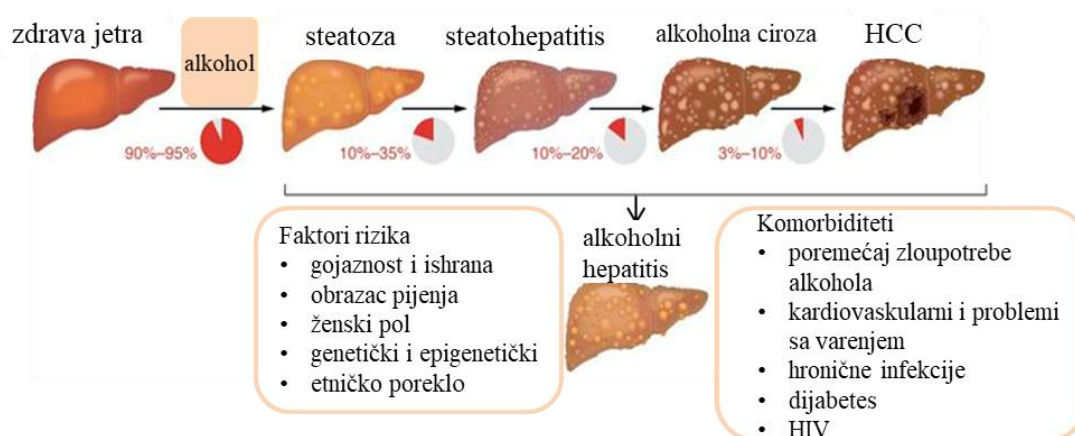
S obzirom da je ACJ ireverzibilno stanje sa visokim mortalitetom, pravovremena dijagnostika u ranim fazama oštećenja jetre je od izuzetnog značaja. Fokus na primarnu prevenciju, kroz podsticaj apstinencije i rano identifikovanje osoba koje imaju visok rizik od razvoja bolesti predstavlja ključni i najefikasniji pristup za smanjenje nepovoljne statistike i sprečavanje komplikacija koje su povezane sa ovom bolešću. Savremeni pristup prevenciji se sve više oslanja na personalizovanu medicinu, gde bi poznavanje genetičke predispozicije omogućilo procenu individualnog rizika za razvoj ciroze¹¹.

1.1. Građa i funkcija jetre

Jetra je najveći unutrašnji organ u ljudskom telu, mase 1 do 1,5 kg, što predstavlja oko 1,5-2,5% telesne mase. Smeštena je u gornjem desnom delu abdomena, neposredno ispod dijafragme. Obavijena je vezivnom kapsulom (Glisonova kapsula) koja prodire u unutrašnjost i deli jetru na

režnjeve i režnjiće (lobuluse). Parenhim jetre je primarno izgrađen od hepatocita, organizovanih u nizove koji se nazivaju hepatične ploče (Remakovi nizovi). Ovi nizovi se radijalno šire od centralne vene ka periferiji režnjića gde se nalazi venska trijada (vena porta, hepatična arterija i žučni kanal). Između ploča se nalaze široki kapilari (sinusoidi). Mreža retikularne strome izgrađena od kolagena pruža strukturni oslonac hepatocitima i održava prohodnost sinusoida unutar lobulusa. Pored hepatocita, u jetri su prisutne i Kupferove ćelije (specijalizovani makrofagi), zvezdaste (Itove) ćelije (zadužene za skladištenje masti i vitamina A), endotelske ćelije sinusoidnih kapilara i gradivne komponente drugih tkiva (vezivnog, mišićnog i nervnog), što omogućava integritet i regulaciju organa. Specifičnost jetre je portalni krvotok - krv bogata nutrijentima i apsorbovanim materijama iz digestivnog trakta direktno dospeva u jetru venom porta. Ovde se ti nutrijenti metabolisu, a štetne materije detoksikuju u hepatocitima pre nego što prečišćena krv nastavi put u opštu cirkulaciju. Istovremeno, hepatociti stvaraju žuč koja se sistemom kanalića odvodi u žučnu kesu i dalje u creva radi emulgovanja masti¹².

Osnovne funkcije jetre su skladištenje hranljivih i eliminacija štetnih materija. U njoj se odigravaju brojni anabolički i katabolički procesi, i zbog toga se smatra „centralnom laboratorijom“ organizma. Jetra igra glavnu ulogu u metabolizmu lipida i lipoproteina. Značajan deo slobodnih masnih kiselina dospeva u jetru svakog dana, gde se vrši njihova oksidacija ili esterifikacija u trigliceride (TG). U uslovima gladovanja favorizovana je oksidacija radi dobijanja energije, dok povećanje esterifikacije vodi ka steatozi (patološko nakupljanje viška masti, tzv. „masna jetra“), stanju koje odlikuje povećano skladištenje TG u citoplazmi hepatocita u velikim lipidnim vakuolama koje zauzimaju mesto drugih organela¹³.



Slika 1. Stadijumi u hroničnoj bolesti jetre uzrokovane konzumacijom alkohola. Preuzeto iz¹⁴, modifikovano.

1.2. Ciroza jetre

Ciroza jetre se može klasifikovati na osnovu kombinacije etioloških i morfoloških kriterijuma. Na osnovu makroskopskih obeležja razlikuju se tri oblika ciroze jetre: mikronodularna, makronodularna i mešovita. Prema etiologiji, najčešći uzročnici su: virusni (hepatitis B, C ili D), alkohol, metabolički (hemohromatoza, Wilsonova bolest, deficit α -1 antitripsina), dugotrajnaolestaza (oslabljeni ili obustavljeni protok žuči iz jetre), autoimune bolesti jetre, toksini i medikamenti. Kod 5 do 10% obolelih se dijagnostikuje kriptogena ciroza, gde uzrok ostaje nepoznat, koja se često povezuje sa faktorima rizika kao što su gojaznost, dijabetes ili hipertrigliceridemija¹⁵.

Ciroza je patološki definisan entitet asociran sa spektrom karakterističnih manifestacija. Stadijumi oštećenja jetre koji prethode cirozi su steatoza i fibroza (formiranje ožilnog tkiva) (Slika 1). Osnovno patološko obeležje ciroze predstavlja ireverzibilna hronična povreda parenhima jetre, praćena difuznom fibrozom. Ove promene nastaju kao posledica nekroze hepatocita, kolapsa retikularne potporne strome, nakupljanja vezivnog tkiva i formiranja regenerativnih čvorova koji narušavaju normalan krvotok i dovode do portalne hipertenzije. Centralni mehanizam fibrogeneze je aktivacija zvezdastih ćelija, koje se pod uticajem citokina, prvenstveno transformišućeg faktora rasta β (eng. *transforming growth factor β* , TGF- β), transformišu u miofibroblaste i počinju da produkuju kolagen tip I, čije prekomerno nakupljanje dovodi do fibroze i ciroze jetre¹⁶.

Klinička prezentacija ciroze zavisi od stepena hepatocelularne insuficijencije i težine portalne hipertenzije. Hepatocelularna insuficijencija se manifestuje žuticom (ikterusom), edemima i koagulopatijom. Portalna hipertenzija dovodi do pojave variksa (proširenih vena) jednjaka i želuca, splenomegalije (patološko uvećanje slezine) i hipersplenizma (preaktivna slezina) i ascitesa (nakupljena tečnost u peritonealnoj šupljini)¹⁷.

Tok bolesti obuhvata kompenzovanu i dekompenzovanu fazu. Kompenzovana faza bolesti obično traje 3 do 5 godina, dominiraju diskretni znaci hepatocelularnog oštećenja: palmarni eritem (crvenilo), paukoliki angiomi (benigno proširenje krvnog suda kože koje liči na pauka), parotidno bubrenje (parotidomegalija). Bolesnici u kompenzovanoj fazi su uglavnom bez subjektivnih tegoba, a funkcionalna sposobnost jetre je očuvana i ne zahtevaju posebnu terapiju. Pojava ascitesa ili perifernih edema označava prelazak u dekompenzovanu fazu bolesti, koju dodatno karakteriše prisustvo ikterusa, gubitak apetita i telesne mase, često subfebrilne temperature zbog bakterijemije (Gram-negativne), *foetor hepaticus* (tzv. „zadah jetre”, karakterističan zadah koji imaju oboleli), periferni edemi, epistaksa (krvaranje iz nosa). Česte komplikacije uznapredovale bolesti su spontani bakterijski peritonitis (infekcija trbušne maramice), hepatična encefalopatija (poremećaj funkcije mozga usled bolesti jetre), hepatorenalni sindrom (funkcionalna bubrežna insuficijencija nastala usled bolesti jetre), kao i razvoj HCC-a¹⁵.

U lečenju bolesnika sa ACJ je najvažnije proceniti da li se radi o kompenzovanoj ili dekompenzovanoj fazi bolesti. Prognoza je određena stepenom hepatocelularne insuficijencije. U lečenju ACJ je najvažniji prekid unosa alkohola, jer nastavak konzumiranja vodi daljoj fibrogenezi i dekompenzaciji, a apstinencija utiče i na smanjenje stepena portalne hipertenzije¹⁸. U dekompenzovanoj fazi terapija je usmerena na lečenje komplikacija hepatocelularne insuficijencije, dok za bolesnike u terminalnoj fazi bolesti nema odgovarajuće terapije, jedina mogućnost koja bolesniku daje šansu da preživi jeste transplantacija jetre¹⁴.

1.3. Procesi u osnovi patogeneze alkoholne ciroze jetre

ACJ je kompleksno oboljenje koje nastaje kao posledica više međusobno povezanih procesa patogeneze, uključujući povećanu akumulaciju TG, oksidativni stres uzrokovan metabolizmom etanola i inflamaciju. Hipoteza „dva udarca“ (eng. *two-hit hypothesis*) za nastanak fibroze kod ACJ, ali i drugih ABJ objašnjava progresiju bolesti kroz dva povezana procesa. „Prvi udarac“ predstavlja akumulacija masti u hepatocitima (steatoza) do koje dolazi zbog direktnog toksičnog dejstva alkohola i metaboličkih promena (kao što je disfunkcija proteina 3 koji sadrži fosfolipazni domen nalik patatinu, PNPLA3). Ovako izmenjena jetra postaje osetljiva na „drugi udarac“, koji uključuje oksidativni stres, inflamatorne citokine i lipidnu peroksidaciju. Interakcijom ova „dva udarca“ dolazi do hronične inflamacije, apoptoze i nekroze hepatocita i aktivacije zvezdastih ćelija jetre, koje sintetišu i deponuju elemente vezivnog tkiva u perisinusoidni prostor, što rezultira fibrozom jetre^{19,20}.

1.3.1. Oksidacija etanola

Primarni izvor toksičnih metabolita i reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS), neophodnih za inicijalno oštećenje jetre i dalju progresiju do ciroze, jeste metabolizam etanola. Metabolizam etanola u hepatocitima predstavlja centralni događaj u patogenezi alkoholne lezije jetre. Nakon konzumacije, alkohol ulazi u krvotok i primarno se metaboliše u želucu i proksimalnom delu duodenuma, a 90% alkohola dospeva direktno u jetru preko portne vene²¹. Postoje tri metabolička puta alkohola u jetri: prvi uključuje alkoholnu dehidrogenazu (ADH), drugi je preko mikrozomalnog enzimskog oksidativnog sistema (MEOS), tačnije citohroma P-450 2E1 (CYP2E1) i treći je uz pomoć katalaza²². Ovi enzimi imaju ulogu u oksidaciji alkohola pri čemu stvaraju njegove štetne metabolite, a utiču i na brzinu eliminacije etanola iz organizma.

Primarni metabolički put etanola se odvija u citoplazmi hepatocita pod dejstvom ADH koja katalizuje oksidaciju etanola u acetaldehid, visoko reaktivni i toksičan intermedijarni metabolit. Acetaldehid se potom u mitohondrijama oksiduje u acetat uz pomoć aldehyd-dehidrogenaze (ALDH). Značajan deo acetaldehida generisanog u jetri se putem žuči izlučuje u creva gde se dalje oksidacija odvija uz pomoć crevnih ALDH²³. Posledica akumulacije acetaldehida nakon konzumacije alkohola izaziva neprijatne fiziološke reakcije, kao što su crvenilo lica, tahikardija, mučnina, glavobolja i mamurluk narednog dana, i značajno povećava rizik od razvoja ABJ i ACJ.

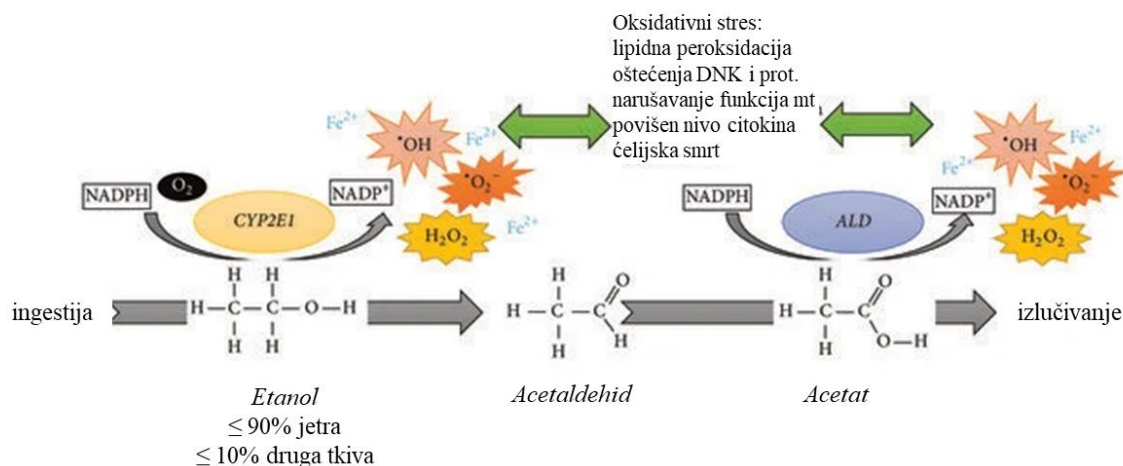
Drugi metabolički put alkohola uključuje oksidaciju posredstvom enzima CYP2E1, koji je lociran u membranama glatkog endoplazmatičnog retikuluma (ER). Kao i ADH, ovaj enzim katalizuje oksidaciju etanola u acetaldehid koristeći molekularni kiseonik i NADPH kao kofaktore. Osnovna karakteristika CYP2E1 je njegova inducibilnost, do veće ekspresije dolazi u uslovima hronične konzumacije velikih količina alkohola, kada su drugi putevi metabolizma etanola zasićeni. Povećanje koncentracije CYP2E1 povećava brzinu oksidacije etanola i eliminaciju alkohola iz organizma. Sa druge strane, ovaj proces prati povećanje proizvodnje acetaldehida i ROS-a, uključujući hidroksietil radikale, hidroksiradikale i superoksidne anjone²⁴ (Slika 2). Alkohol dodatno smanjuje nivoe glutationa (GSH) inhibicijom enzima potrebnih za njegovu sintezu i podsticanjem njegovog izlučivanja vezivanjem za acetaldehid.

Put metabolizma alkohola koji uključuje katalazu nema značajnu ulogu u metabolizmu alkohola u jetri. Katalaza u peroksizomima može učestvovati i u oksidaciji etanola u acetaldehid u prisustvu sistema koji generiše H₂O₂, kao što su NADPH oksidaze ili ksantin oksidaze²⁵. Ekspresija katalaza može biti povećana u uslovima dugotrajne konzumacije alkohola, naročito u uslovima povišenog oksidativnog stresa. Ovaj enzim ima značajnu ulogu u metabolizmu etanola u mozgu i smatra se da acetaldehid nastao ovim putem pojačava dejstvo alkohola, kao i toleranciju na alkohol²⁶.

1.3.2. Oksidativni stres

Nakon delovanja ovih enzimskih sistema, akumulirane ROS i acetaldehid predstavljaju inicijalni događaj za razvoj oksidativnog stresa, što predstavlja jedan od glavnih mehanizama oštećenja jetre²⁷. Oksidativni stres nastaje usled narušene ravnoteže između povećane produkcije ROS i iscrpljivanja antioksidativnih kapaciteta jetre, naročito značajnog smanjivanja količine GSH. U uslovima značajno povećane produkcije ROS, rezerve GSH se ubrzano troše na njihovu neutralizaciju, dok se istovremeno acetaldehid vezuje za molekule glutaciona gradeći konjugate koji su rastvorljivi u vodi, čime je omogućeno njegovo izlučivanje. Naročito se smanjuje nivo GSH u mitohondrijama zato što alkohol blokira proteine koji transportuju GSH iz citoplazme u mitohondrije²⁸. ROS direktno putem lipidne peroksidacije masnih kiselina u membranama

hepatocita, narušavaju integritet ćelije i funkciju mitohondrija²⁹. Alkohol dodatno utiče na smanjenje nivoa GSH inhibicijom unosa cisteina u hepatocite, i na taj način zaustavlja sintezu novog glutathiona, kao i smanjenjem aktivnosti glutamat-cistein ligaze, enzima koji vrši ligaciju glutamtata i cisteina. Takođe, u uslovima oksidativnog stresa posredovanog CYP2E1 troše se rezerve NADPH, čime se onemogućava redukcija oksidovanog GSH i vraćanje u njegovu aktivnu formu²¹. Kritični pad nivoa GSH direktno utiče na funkciju glutation-S-transferaza (GST), porodice enzima zaduženih za konjugaciju i detoksikaciju acetaldehida.



Slika 2. Oksidativni stres kao posledica oksidacije etanola posredstvom CYP2E1. Preuzeto iz³⁰, modifikovano.

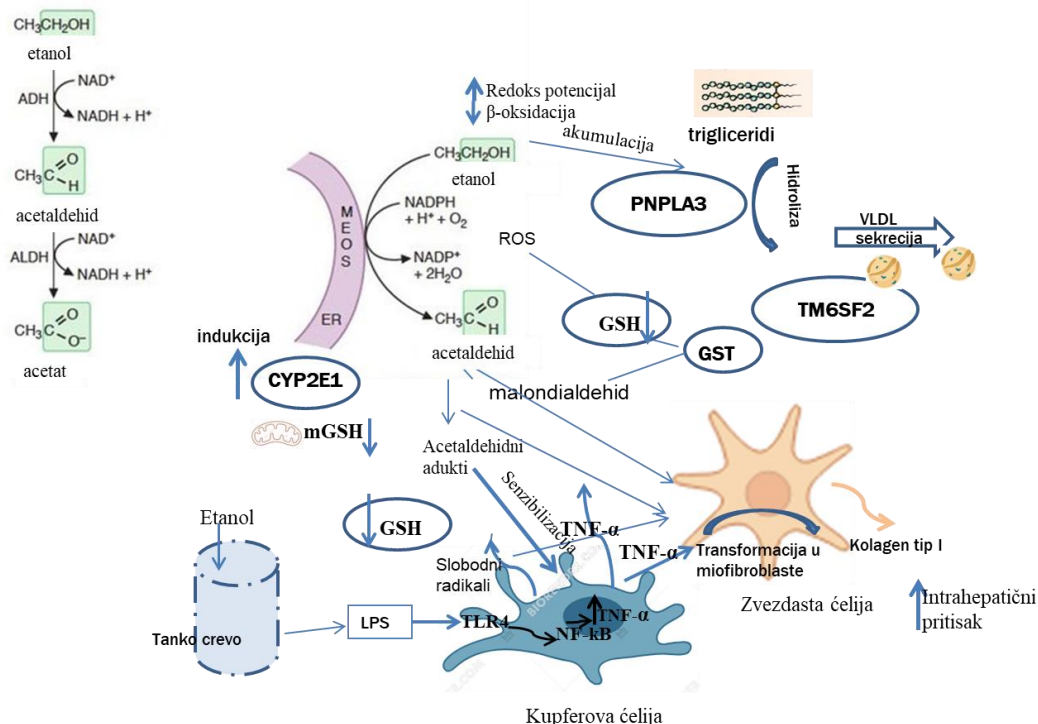
U reakcijama oksidacije etanola stvara se H^+ koji vrši redukciju nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD) do NADH i na taj način se povećava redoks potencijal u jetri (Slika 2)³¹. Povećani redoks potencijal inhibira oksidaciju slobodnih masnih kiselina i istovremeno dolazi do smanjene sinteze lipoproteina i povećane lipolize u adipocitima perifernog i viscelarnog masnog tkiva. Ovo rezultira povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji i njihovim povećanim influsom u hepatocite. Dodatno je i glukoneogeneza inhibirana u uslovima povećanog redoks potencijala što dovodi do akumulacije TG u hepatocitima³². Pored ovih procesa, ulogu u akumulaciji lipida i progresiji oštećenja igra i PNPLA3 koji funkcioniše kao hidrolipaza, a čija izmenjena varijanta dovodi do gubitka hidrolitičke funkcije, što direktno sprečava razgradnju masnih kapljica i promoviše steatozu³³ (Slika 3).

Drugi protein koji dodatno doprinosi zadržavanju TG u hepatocitima je član 2 superfamilije 6 transmembranskih proteina (eng. *transmembrane 6 superfamily member 2*, TM6SF2), koji ima ulogu u transportu lipoproteina veoma male gustine (eng. *very low density lipoprotein*, VLDL) iz hepatocita, a varijanta TM6SF2 rs58542926 koja dovodi do gubitka funkcije ovog proteina onemogućava pravilno pakovanje i transport VLDL-a³⁴ (Slika 3).

1.3.3. Inflamatorni odgovor i fibrogeza

Visokoreaktivni acetaldehid, nastao oksidacijom etanola, ima visok afinitet prema nukleofilnim grupama proteina i nukleinskih kiselina sa kojima gradi stabilne acetaldehidne adukte. Vezivanjem za aminokiseline (AK) strukturno modifikuje proteine citoskeleta, narušavajući njihovu funkciju i ćelijski transport. Ovako modifikovani proteini deluju kao neoantigeni i aktiviraju humoralni i celularni imunski odgovor, podstičući limfocite i Kupferove ćelije da oslobađaju citokine. Acetaldehid reaguje i sa DNK formirajući adukte koji ometaju replikaciju i reparaciju, što

vodi ka apoptozi i genotoksičnosti³⁵. Formiranjem acetaldehidnih adukata transformišu primarno metaboličko oštećenje u hronični inflamatorni proces. U takvim uslovima, uneti alkohol povećava permeabilnost crevne barijere, što dovodi do porasta nivoa endotoksina lipopolisaharida (LPS) u serumu. Portnom cirkulacijom LPS dospeva do jetre gde vezivanjem za TLR4 (eng. *toll-like receptor 4*) receptore aktivira već senzibilisane Kupferove ćelije, koje počinju sa pojačanom sekrecijom proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18), ROS i reaktivnih azotnih vrsta (eng. *reactive nitrogen species*, RNS) što regrutuje neutrofile i dodatno iscrpljuje rezerve GSH³⁶. Ovi citokini, naročito faktor nekroze tumora- α (eng. *tumor necrosis factor*, TNF- α) direktno indukuje apoptozu hepatocita aktivacijom kaspazne kaskade³⁷. Akumulacija gvožđa u makrofagima dodatno potencira peroksidaciju. Ovim procesima se zatvara *circulus vitiosus*: apoptoza i nekroza hepatocita direktno stimulišu transformaciju zvezdastih ćelija u miofibroblaste (Slika 3).



Slika 3. Molekularni mehanizmi u osnovi patogeneze ACJ. *Circulus vitiosus* alkoholne ciroze jetre. Ova shema je napravljena uz korišćenje BioRender.com (pristupljeno 1.12.2025.).

Specifičnost ACJ se ogleda u tome što acetaldehid može i direktno bez posrednika da stimuliše zvezdaste ćelije na pojačanu ekspresiju gena za kolagen tip I³⁸. Ovi aktivirani miofibroblasti proizvode komponente ekstracelularnog matriksa, što dovodi do stvaranja vezivnog tkiva i njegovog deponovanja u perisinusoidni prostor. Ovaj proces dovodi do kapilarizacije sinusoida i stvaranja regenerativnih nodulusa i na taj način se povećava mehanički otpor protoku krvi kroz jetru. Dodatno, aktivirane zvezdaste ćelije i oštećeni endotel smanjuju sintezu vazodilatatora, a povećavaju sekreciju vazokonstriktora, što doprinosi još većem skoku intrahepatičnog pritiska, što za rezultat ima razvoj portalne hipertenzije¹⁶. Portalna hipertenzija dalje vodi ka formiranju kolateralnog krvotoka, pojave variksa jednjaka i ascitesa.

1.4. Faktori rizika za progresiju ABJ

Hronično i prekomerno konzumiranje alkohola je jedan od vodećih uzroka bolesti jetre u zapadnom svetu, naročito u Evropi^{6,7}. Alkohol i štetni produkti njegovog metabolizma su jedan od

glavnih uzroka produžene inflamacije jetre, koja može postepeno dovesti do progresije bolesti od masne jetre, alkoholnog hepatitisa do ciroze i HCC-a.

U Dionisos studiji, koja je proučavala prevalenciju bolesti jetre u opštoj populaciji i uticaj alkohola na jetru, zaključeno je da je rizik za razvoj bolesti jetre u direktnoj zavisnosti od količine unetog alkohola. Pored ukupne doze, značajni faktori rizika su konzumacija van obroka kao i mešanje različitih vrsta alkoholnih pića³⁹. Rizik za progresiju bolesti se povećava sa dnevnim unosom većim od 30 g čistog etanola, što okvirno odgovara unosu većem od tri standardna pića za muškarce i dva za žene⁴⁰.

Žene su podložnije oštećenju jetre u odnosu na muškarce pri konzumaciji istih količina alkohola. Ovaj fenomen je posledica manje količine želudačne alkoholne dehidrogenaze, niže aktivnosti alkoholne dehidrogenaze u jetri, smanjenog udela vode u telu, manje ukupne mase tela i veličine same jetre, kao i manje količine aldehid dehidrogenaze u jetri⁴¹.

Godine života su jedan od značajnih faktora rizika za cirozu. Sa starenjem dolazi do progresivnog pada normalnih fizioloških i ćelijskih funkcija, pa smanjena sposobnost jetre da održi homeostazu dovodi do povećane osetljivosti na stres, bilo da je on izazvan unutrašnjim (povišen oksidativni stres), bilo spoljašnjim faktorima (toksini iz spoljašnje sredine)⁴².

Gojaznost, insulinska rezistencija i dijabetes tip II putem svojih inflamatornih i metaboličkih mehanizama dovode do promena u nivou adipokina (hormona u masnom tkivu) i značajno ubrzavaju progresiju od steatoze do fibroze jetre⁴³. Loš nutritivni status, promene u sastavu crevne mikrobiote, povećana intestinalna permeabilnost kao i konzumiranje duvana mogu dodatno povećati inflamaciju i ubrzati fibrogenezu u jetri^{44,45}. Koegzistirajuća oboljenja jetre, naročito virusni hepatitis, dodatno povećavaju rizik za pojavu ACJ⁴⁶.

Na težinu i ispoljavanje simptoma bolesti jetre alkoholne etiologije utiče i etnička pripadnost, što je najverovatnije posledica razlika u učestalosti pojedinih genetičkih varijanti koje su povezane sa povećanim rizikom za razvoj ove bolesti⁴⁷.

Iako je alkohol direktan hepatotoksin, sama izloženost velikim količinama alkohola, dužina perioda izlaganja njegovim štetnim produktima i obrasci konzumiranja, nisu dovoljan uslov za progresiju ABJ do ACJ i HCC-a^{48,49}. Individualni rizik za razvoj ciroze je uslovljen složenom interakcijom genetičkih, metaboličkih, imunoloških, inflamatornih faktora kao i faktora životne sredine. Multifaktorijalna priroda bolesti otežava pravovremenu identifikaciju osoba sa visokim rizikom za ACJ.

1.4.1. Genetički faktori rizika za razvoj ACJ

Presudnu ulogu u patogenezi ACJ imaju genetičke varijante čiji su produkti uključeni u homeostazu lipida i integritet ćelijskih membrana. Poseban značaj se pridaje porodici lipidnih hidrolaza sa domenom nalik patatinu, koje regulišu hidrolizu triglicerida, fosfolipida i retinil-estara.

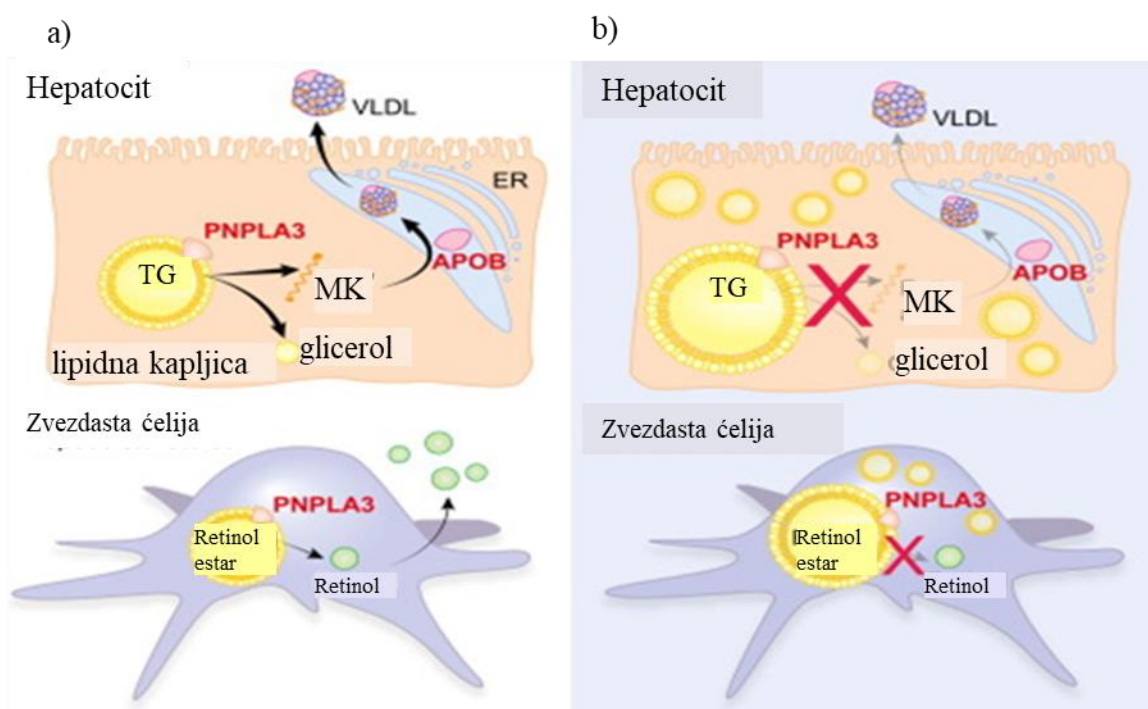
1.4.1.1. *PNPLA3*

PNPLA3 (adiponutrin) je kodiran *PNPLA3* genom, lociranom na dugom kraku hromozoma 22 (22q13.31). Ovaj protein se primarno eksprimira u jetri, pretežno hepatocitima, kao i u masnom tkivu. Ekspresija *PNPLA3* je regulisana nutritivnim i metaboličkim faktorima, poput glukoze i insulina, pri čemu aktivacija promotorskog regiona direktno zavisi od koncentracije glukoze⁵⁰. U uslovima gladovanja, ekspresija gena je smanjena, dok je ishrana bogata ugljenim hidratima i

akumulacija lipida u hepatocitima podstiču^{51,52}. Dostupnost masnih kiselina, poput oleinske i palmitinske, povećava intracelularni nivo PNPLA3 proteina u ćeliji prvenstveno putem posttranskripcijske stabilizacije, a ne putem regulacije ekspresije gena⁵³.

PNPLA3 se sastoji od 481 AA-e, N-terminalni deo sadrži domen nalik patatinu koji je katalitički domen enzima, karakteriše ga serin lipazni motiv (katalitički dimer Ser-Asp). Katalitički domen se sastoji od β -ploče u sendviču između dva α -heliksa ($\alpha\beta\alpha$), Ser je smešten u nukleofilnom „laktu“ nakon β -ploče, a pre α -heliksa. Oko serinskog nukleofila se nalazi nekoliko hidrofobnih AA što verovatno pomaže vezivanju supstrata⁵⁴. C-terminalni domen sadrži hidrofobnu sekvencu koja omogućava vezivanje za membrane lipidnih kapljica i ER-a⁵⁵, kao i za interakciju sa aktivatorima poput CGI-58 proteina (eng. *comparative gene identification-58*)⁵⁶.

PNPLA3 je multifunkcionalni enzim koji ispoljava lipaznu aktivnost prema TG i retinil-estrima, dok prema fosfolipidima pokazuje aciltransferaznu aktivnost⁵⁷. Ovaj protein je lokalizovan na površini lipidnih kapljica i u glatkom ER-u, a njegova primarna uloga se ogleda u održavanju lipidne homeostaze unutar hepatocita⁵⁸. Pored uloge u metabolizmu lipida učestvuje i u metabolizmu i skladištenju retinola (vitamina A), koji se deponuje u zvezdastim ćelijama u obliku retinil-estara, pretežno kao retinil-palmitat. U ovim ćelijama PNPLA3 deluje kao retinil-ester hidrolaza, omogućavajući mobilizaciju retinola, što direktno utiče na njihovu aktivaciju i početak transformacije u miofibroblaste. Ipak, nije poznato da li je gubitak retinola uzrok, posledica ili samo marker aktivacije zvezdastih ćelija i oštećenja jetre⁵³.



Slika 4. Uloga PNPLA3 u metabolizmu lipida u jetri. a) U prisustvu funkcionalne varijante PNPLA3 učestvuje u razgradnji TG u lipidnim kapljicama hepatocita i omogućava mobilizaciju masnih kiselina za sintezu i sekreciju VLDL čestica putem ApoB. U zvezdastim ćelijama jetre, PNPLA3 učestvuje u metabolizmu retinil-estara. b) U prisustvu varijante p.Ile148Met PNPLA3 dolazi do smanjene lipolitičke aktivnosti i akumulacije TG u hepatocitima, uz poremećen izvoz lipida putem VLDL. Istovremeno, dolazi do zadržavanja retinil-estara u zvezdastim ćelijama, što doprinosi njihovoj aktivaciji i razvoju fibroze jetre.

Skraćenice: TG – trigliceridi, MK – masne kiseline, ER – endoplazmatični retikulum, APOB – apolipoprotein B, VLDL – lipoprotein vrlo niske gustine. Preuzeto iz⁵⁹, modifikovano.

Varijanta rs738409 (c.444C>G) je polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP), koji predstavlja zamenu citozina (C) guaninom (G) u egzonu 3, što dovodi do supstitucije izoleucina metioninom na poziciji 148 (p.Ile148Met) u katalitičkom domenu proteina. Varijanta PNPLA3 148Met pokazuje smanjen afinitet za TG, ostaje „zaglavljen“ na površini lipidnih kapljica i ometa pristup drugim lipazama, prvenstveno lipazi ATGL (adipozna trigliceridna lipaza), što dovodi do akumulacije lipida u ćeliji uz poremećen izvoz lipida putem VLDL čestica⁵⁷. Osim smanjene lipolitičke aktivnosti, ova varijanta ispoljava i lipogena svojstva, kroz povećanu aciltransferaznu aktivnost. U zvezdastim ćelijama 148Met ne vrši funkciju retinil-ester hidrolaze, čime se smanjuje oslobađanje retinola iz ćelija, što predstavlja signal za transformaciju zvezdastih ćelija u miofibroblaste, sekreciju elemenata ekstracelularnog matriksa poput kolagena tip I, čime se stvara ožiljno tkivo u jetri. Gubitak triaciglicerol-hidrolazne aktivnosti, kao i gubitak retinol-esterazne aktivnosti PNPLA3 ima za posledicu intracelularnu retenciju lipida i razvoj hepatične steatoze (Slika 4).

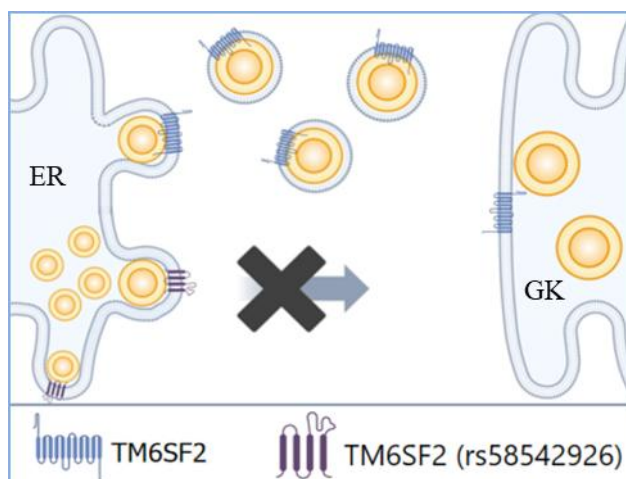
Nosioci varijante PNPLA3Met imaju povećan rizik od steatoze, kao i od progresije inicijalne povrede parenhima jetre ka cirozi i HCC-u. Inicijalna asocijacija ove varijante sa povećanom količinom masti u jetri je uočena u studiji koja se bavila steatotskom bolešću jetre povezanom sa metaboličkom disfunkcijom (eng. *metabolic dysfunction - associated steatotic liver disease*, MASLD)⁶⁰. Ova varijanta je asocirana i sa spektrom bolesti jetre različitih etiologija: ABJ⁶¹, ACJ⁶², sa steatozom i cirozom kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C⁶³, sa uznapredovalom fibrozom kod HCV pozitivnih i bolesnika sa HCV/HIV koinfekcijom⁶⁴ i sa fibrozom kod bolesnika sa naslednom hemohromatozom⁶⁵.

1.4.1.2. *TM6SF2*

Pored *PNPLA3*, rezultati studija asocijacije na nivou čitavog genoma (eng. *genome - wide association studies*, GWAS) su pokazali da je varijanta *TM6SF2* rs58542926 (c.499C>T) značajno asocirana sa ABJ⁶⁶. *TM6SF2* je lociran na kratkom kraku hromozoma 19 (19p13.11), sastoji se od 10 egzona i kodira protein od 377 AK-a. Ekspirira se u jetri (pretežno u hepatocitima), tankom crevu i bubrezima. U uslovima ishrane bogate mastima, i u prisustvu palmitinske kiseline dolazi do povećane ekspresije *TM6SF2* kao kompenzatornog mehanizma⁶⁷.

TM6SF2 je transmembranski protein lokalizovan u ER i Goldžijevom aparatu, gde učestvuje u lipidaciji VLDL partikula⁶⁸. *In silico* modeli ukazuju da ovaj protein ima heliks-petlja-heliks strukturu sa 10 transmembranskih segmenata. Petlje okrenute ka unutrašnjoj strani (lumen) ER zajednički formiraju visoko konzervirani EXPERA domen (eng. *EXPanded EBP superfamily*, proširena superfamilija emopamil-vezujućih proteina), koji karakteriše klaster negativno naelektrisanih AK. *TM6SF2* čine 2 ovakva domena, koji interaguju sa sadržajem VLDL čestica u nastajanju, pri čemu negativno naelektrisane AK pomažu u privlačenju i orijenataciji lipida ili proteina poput apolipoproteina B (ApoB). U okviru EXPERA domena nalazi se katalitičko mesto 3β-hidroksisteroid-8,7-izomeraze, enzima koji učestvuje u biosintezi holesterola konverzijom dvostruke veze sa pozicije 8 na poziciju 7⁶⁹.

TM6SF2 usmerava TG i holesterol ka ApoB skeletu, a svojom enzimskom funkcijom lokalno doprinosi sintezi holesterola, neophodnog za stabilnost VLDL partikula. Na ovaj način omogućava pakovanje velike količine TG u VLDL partikulu. Nakon uspešne lipidacije, VLDL čestica postaje hidrofobna i stabilna, te prelazi u Goldži aparat na dalju obradu i sekreciju u krvotok. Slični procesi se odvijaju i u enterocitima, gde *TM6SF2* učestvuje u lipidaciji hilomikrona.



Slika 5. Uloga TM6SF2 u hepatocitima. Dok funkcionalan TM6SF2 omogućava efikasan transport VLDL čestica iz ER u Goldži kompleks, izmenjeni protein uzrokuje zadržavanje lipidnih kapljica u ER čime se narušava sekrecija VLDL iz hepatocita što doprinosi akumulaciji lipida u jetri. Skraćenice: ER–endoplazmatični retikulum, GK–Goldži kompleks. Preuzeto iz⁷⁰, modifikovano.

Varijanta *TM6SF2* c.499C>T dovodi do supstitucije glutamata lizinom na poziciji 167 (p.Glu167Lys), što za posledicu ima gubitak funkcije proteina. Ova promena dovodi do pogrešnog savijanja proteina, što ga čini nestabilnim i zbog toga podleže bržoj intracelularnoj degradaciji. *In silico* model je pokazao da navedena varijanta narušava strukturu EXPERA domena, tako što je negativno naelektrisan glutamat zamenjen pozitivno naelektrisanim lizinom, čime se menjaju elektrostatička svojstva ovog domena⁷¹. Bržom intracelularnom degradacijom se smanjuje koncentracija TM6SF2 u ER što direktno remeti proces lipidacije i stvaranja zrelih VLDL partikula⁷², i dovodi do poremećenog izlučivanja VLDL čestica i akumulacije neiskorišćenih lipida u hepatocitima (Slika 5). Kao direktna posledica toga dolazi do razvoja steatoze i fibroze jetre, kod hroničnog unosa alkohola, gde je sinteza TG već pojačana usled promene redoks potencijala. Defekt u izvozu lipida uzrokovan ovom varijantom dramatično ubrzava progresiju iz obične steatoze u steatohepatitis i cirozu. Istovremeno, nosioci ove varijante imaju niže nivoe LDL holesterola i TG u cirkulaciji, što im paradoksalno pruža kardioprotektivni efekat (imaju niži rizik od ateroskleroze i koronarne bolesti)⁷³.

Nosioci ove varijante imaju povećan rizik za čitav spektar bolesti jetre, MASLD⁷⁴, ACJ⁶⁶, steatozu kod hronične infekcije HCV-om⁷⁵, HCC⁷⁶ i za razvoj ciroze kod bolesnika sa hemohromatozom⁷⁷.

Značajan je i efekat epistaze između *PNPLA3* i *TM6SF2*. Dok *PNPLA3* utiče na remodelovanje i hidrolizu unutarćelijskih lipidnih kapljica, *TM6SF2* reguliše sekreciju VLDL partikula. Osobe koje su istovremeno nosioci rizičnih alela u obe varijante imaju kumulativno veći rizik za razvoj težih i progresivnijih oblika bolesti jetre⁷⁸⁻⁸¹.

1.4.1.3. *CYP2E1*

Citohrom P450 (CYP450) predstavlja superfamiliju hem–tiolatih proteina koji učestvuju u oksidativnom metabolizmu različitih ksenobiotika i endogenih supstrata. Ključni enzim za oksidaciju etanola u acetaldehid pri hroničnom unosu velikih količina alkohola, kada je put preko ADH zasićen, je CYP2E1²⁴. U uslovima umerene konzumacije alkohola ovim putem se metaboliše oko 5-10 % alkohola.

Gen *CYP2E1* je lociran na dugom kraku hromozoma 10 (10q26.3), sastoji se od 9 egzona i 8 introna i kodira enzim od 493 AK-e. Ekspirira se u jetri (pretežno hepatocitima, mada ga ima i u Kupferovim ćelijama), bubrezima, plućima i mozgu. Ekspresija *CYP2E1* je kompleksna, reguliše se kako na nivou transkripcije, tako i na posttranslacionom nivou. Regulisana je endogenim i egzogenim faktorima, a varijante u promotorskom regionu predstavljaju jedan od ključnih regulatornih mehanizama ekspresije. Oni utiču na bazni nivo enzima prisutnog u jetri, pre bilo kog spoljašnjeg uticaja. S obzirom na ulogu *CYP2E1* u metabolizmu ketona, stanja koja modifikuju metabolizam lipida i dovode do povišenog nivoa ketonskih tela, kao što su dijabetes, kratkotrajno gladovanje, gojaznost i MASLD, mogu modifikovati njegovu ekspresiju. Takođe, hormoni mogu modifikovati njegovu ekspresiju. Insulin deluje kao inhibitor na posttranslacionom nivou tako što ubrzava njegovu degradaciju, dok hormon rasta i glukagon učestvuju u finom podešavanju nivoa transkripcije u zavisnosti od energetskog statusa u organizmu⁸².

CYP2E1 je inducibilan enzim, njegova koncentracija se značajno povećava u prisustvu etanola (i do 10 puta), acetona, paracetamola, nekih anestetika i nitrozamina (iz duvanskog dima). Naročito značajan mehanizam regulacije je stabilizacija proteina. U prisustvu supstrata, npr. etanola, nakon vezivanja za *CYP2E1*, etanol štiti enzim od proteazomske degradacije, tako da povećanje nivoa enzima nije posledica samo povećane sinteze novih proteina, već i produženja polživota postojećih⁸³.

Kao i ostali članovi porodice citohroma P450, *CYP2E1* poseduje konzerviranu tercijarnu strukturu, sastoji se od 12 α -heliksa i 4 β -ploče koje čine osnovni skelet proteina. U enzimu se nalazi hem centar za koji je vezano gvožđe koje služi za prenos elektrona i oksidaciju supstrata. Aktivno mesto je veoma malo, zatvoreno i izrazito hidrofobno. Mala zapremina aktivnog mesta je delom uzrokovana izoleucinom na poziciji 115, čiji se bočni lanac pruža iznad hema. Unutar aktivnog mesta na poziciji 303 je treonin koji vodoničnim vezama pozicionira supstrat iznad atoma gvožđa u hemu. Aktivno mesto je povezano sa spoljašnjim delom proteina pristupnim kanalom, pristup je regulisan fenilalaninom na poziciji 478 koji deluje kao „kapija“, pomeranjem omogućava / sprečava ulazak supstrata. U okolini aktivnog mesta se nalaze i male šupljine koje mogu pomagati u prilagođavanju različitih supstrata. N-terminalni deo preko hidrofobnog α -heliksa ima funkciju u usidranju proteina u membrane ER i mitohondrija⁸⁴.

U ćeliji je *CYP2E1* primarno lociran u membrani ER, ali ga ima i u mitohondrijama. Osim u metabolizmu etanola, učestvuje i u metabolizmu acetona, benzena, paracetamola i raznih prokarcinogena. *CYP2E1* odlikuje visok stepen labave povezanosti katalitičkog ciklusa (eng. *uncoupling*). To je proces u kome enzim troši NADPH i kiseonik za produkciju ROS umesto za oksidaciju etanola⁸⁵. Ovaj proces predstavlja važan mehanizam nastanka oksidativnog stresa i oštećenja ćelija (Slika 2).

Varijanta *CYP2E1* c.-1054C>T, rs2031920 se nalazi u neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) sa drugom varijantom u promotorskom regionu *CYP2E1* gena rs3813867, c.-1293G>C. Ove varijante modifikuju vezivanje transkripcionih faktora. T alel (c2 alel) rs2031920 je u nekim studijama^{86,87} povezan sa značajnim uticajem na pojačanu transkripcionu aktivnost što rezultuje povećanom sintezom *CYP2E1* i njegovom većom stabilnošću u ER, što utiče na povećanje ukupnog nivoa *CYP2E1* u hepatocitima²⁷. Nosioi c2 alela pokazuju veću katalitičku efikasnost u oksidaciji etanola, što prati i dramatično povećanje proizvodnje ROS⁸⁸. Kod hroničnih konzumenata alkohola koji su nosioci ove varijante, indukcija *CYP2E1* je dvostruko potencirana, kako samim etanolom tako i genetičkom predispozicijom. U ovim okolnostima dolazi do kritičnog nivoa oksidativnog stresa koji prevazilazi kapacitete GSH, ubrzavajući lipidnu peroksidaciju i nekrozu hepatocita. Rezultati studija asocijacije su kontradiktorni kada je u pitanju asocijacija ove varijante

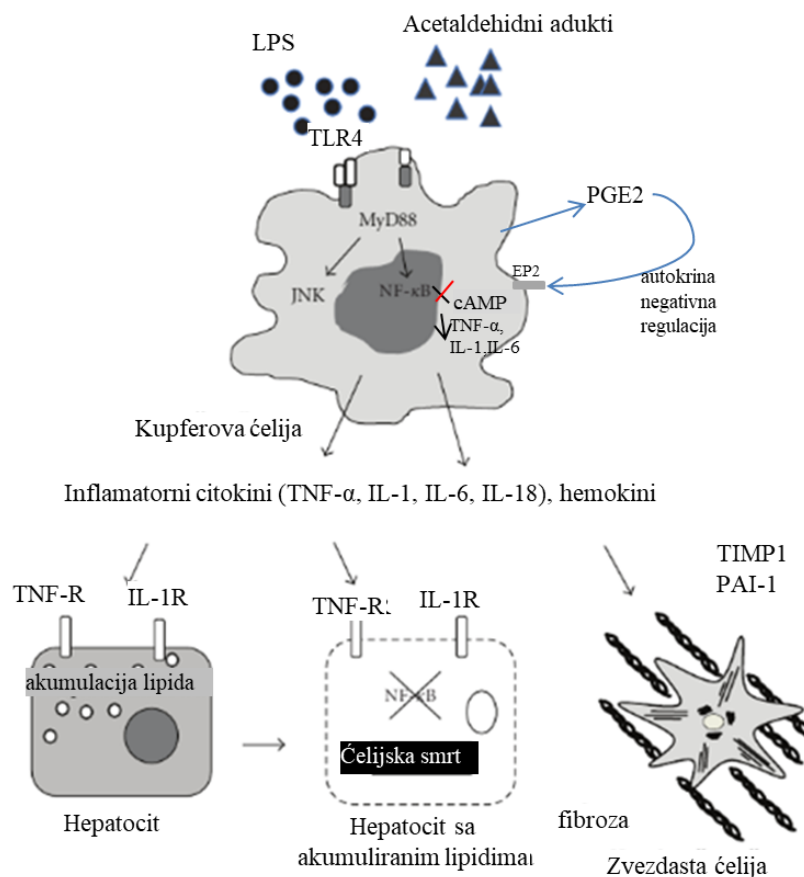
sa ABJ i ACJ. Jedan broj studija je utvrdio postojanje asocijacije^{89,90}, dok druge nisu⁹¹. Meta-analiza Zeng i sar. iz 2013. godine ukazuje na povezanost ove varijante sa ABJ, ali ne i sa ACJ, a najverovatniji uzroci kontradiktornih rezultata su različito etničko poreklo ispitanika, mala učestalost c2 alela u populaciji, kao i ograničeni broj ispitanika u studijama⁸⁶.

1.4.1.4. *TNF- α*

Citokini su signalni molekuli imunskog sistema koji imaju ulogu u diferencijaciji, proliferaciji, apoptozi, i drugim ćelijskim događajima koji su važni za procese imunskog odgovora i inflamacije⁹². Uglavnom ih proizvode ćelije imunskog sistema, ali i drugi tipovi ćelija kao što su epidermalne ćelije, epitelne ćelije creva i fibroblasti.

TNF- α je citokin sa plejotropnim efektom koji primarno proizvode makrofagi, ali i aktivirani T-limfociti⁹³. On je proinflamatorni citokin uključen u inicijaciju i održavanje inflamatornog odgovora u jetri⁹⁴.

Gen koji kodira TNF- α lociran je na kratkom kraku hromozoma 6 (6p21.3) unutar lokusa glavnog kompleksa histokompatibilnosti, MHC III (eng. *major histocompatibility complex*, MHC)⁹³. Ekspresija ovog gena je regulisana na transkripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou. U Kupferovim ćelijama, regulacija ekspresije TNF- α je specifična zbog stalne izloženosti antigenima iz portalne krvi. Ove ćelije su primarni senzori za LPS iz creva. Hronični unos alkohola povećava permeabilnost intestinalne barijere, što dovodi do kontinuiranog prelaska LPS u portalnu cirkulaciju, održavajući Kupferove ćelije u stanju stalne aktivacije. Vezivanje LPS aktivira intraćelijske puteve (MyD88 signalni put) koji vode do aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B, koji ulazi u jedro i direktno pokreće transkripciju TNF- α ⁹⁵. Takođe, Kupferove ćelije nakon stimulacije luče prostaglandin E2 (PGE2), koji se vezuje za sopstvene receptore na ćeliji i preko porasta cAMP-a doprinosi negativnoj regulaciji transkripcije TNF- α ⁹⁶ (Slika 6). Ovaj zaštitni mehanizam sprečava prekomernu produkciju TNF- α i masovnu nekrozu hepatocita.



Slika 6. Signalni putevi regulacije ekspresije *TNF-α* u Kupferovim ćelijama i kaskadni efekat na druge ćelije jetre. Aktivacija Kupferovih ćelija LPS-om i acetaldehidnim aduktima pokreće NF-κB signalni put i produkciju proinflamatornih citokina, dok PGE2 vrši autokrinu regulaciju putem cAMP. Ovi medijatori dalje indukuju akumulaciju lipida i apoptozu hepatocita, kao i aktivaciju zvezdastih ćelija. Preuzeto iz⁹⁷ modifikovano.

Važan regulator translacije je p38 MAPK put koji ima ključnu ulogu u stabilizaciji iRNK *TNF-α* i povećanju efikasnosti translacije⁹⁸. U uslovima hroničnog unosa alkohola, nivo MKP-1 (DUSP1), fosfataze koja deaktivira p38 MAPK, opada, smanjena je inhibicija p38 MAPK i dolazi do nekontrolisano visoke produkcije *TNF-α*⁹⁹. Ovi signalni putevi koji regulišu preživljavanje, proliferaciju i apoptozu koje aktivira *TNF-α* dodatno doprinose kompleksnosti njegove uloge u patogenezi bolesti jetre. Pored direktnog citotoksičnog efekta na hepatocite, *TNF-α* ima ključnu ulogu u aktivaciji zvezdastih ćelija da započnu transformaciju u miofibroblaste. Ovim putem *TNF-α* direktno povezuje hroničnu inflamaciju sa progresijom fibroze i razvojem ACJ. IL-10 blokira sintezu *TNF-α* ako je ćelija izložena IL-10 pre izlaganja endotoksinu¹⁰⁰.

TNF-α se sastoji od tri identične subjedinice spojene nekovalentnim vezama koje grade homotrimer konusnog oblika, što mu omogućava istovremeno vezivanje za tri receptora. Svaka subjedinica se sastoji od dve upakovane β-ploče, od kojih je svaka izgrađena od 8 antiparalelnih β-lanaca koji formiraju karakterističnu topologiju rolata (eng. *jellyroll*), uz N-terminalni dodatak sa tri pomoćna β-lanca. Spoljašnja ploča je bogata hidrofilnim reziduama, dok je unutrašnja hidrofobna i sadrži C-terminalni segment, blizu centralne ose simetrije. *Jellyroll* ima klinasti oblik sa širokom bazom i uskim vrhom, što podseća na proteine virusnih kapsida¹⁰¹. Za biološku aktivnost *TNF-α* mora formirati homotrimer, koji je stabilan pri visokim koncentracijama, dok pri veoma niskim koncentracijama disocira u neaktivne monomere¹⁰². Protein postoji u transmembranskoj i solubilnoj formi. Sintetiše se kao membranski propeptid (pro-*TNF-α*), koji se pod dejstvom *TNF-α*

konvertujućeg enzima (eng. *TNF- α converting enzyme*, TACE) obrađuje do solubilne forme koja onda može delovati na susedne i udaljene ćelije¹⁰³. TACE istovremeno reguliše i dostupnost TNF receptora na površini ćelije, čime dodatno modulira biološku aktivnost ovog citokina negativnom povratnom spregom¹⁰⁴.

Efekti TNF- α su posredovani preko dva tipa receptora, TNFR1 koji je stalno prisutan na površini većine sisarskih ćelija sa jedrom i TNFR2 koji je prisutan na hematopoetskim ćelijama. TNFR1 receptor prepoznaju obe forme TNF- α i preko intracelularnog domena smrti (DD) uz kooperaciju sa adapternim proteinima aktivira kaspaze što rezultira apoptozom⁹³. Ukoliko u signalizaciji preko TNFR1 posreduje TNFR2 aktivira se NF- κ B koji reguliše transkripciju gena za antiapoptotske proteine i citokine. TNFR2 aktivira samo transmembranska forma TNF- α , on nema DD, ali preko adapternog proteina aktivira signalni put koji aktivira NF- κ B i dalje apoptotske procese¹⁰⁵.

Transkripcija TNF- α je podložna značajnoj modulaciji usled prisustva bialelnih varijanti u promotorskom regionu. Među najproučavanijim su dve supstitucije guanina u adenin (c.-308G>A i c.-238G>A) na pozicijama -238 i -308 u odnosu na start transkripcije. Ove varijante mogu doprineti interindividualnim razlikama u nivou produkcije TNF- α ¹⁰⁶. Varijanta -308A najčešće se dovodi u vezu sa povećanom produkcijom TNF- α ^{106,107}, dok se za varijantu -238A u literaturi mogu naći oprečne informacije o efektu na ekspresiju: neki autori su povezali ovu varijantu sa povećanom¹⁰⁸, a drugi sa smanjenom ekspresijom¹⁰⁹. Oprečni nalazi prethodnih studija su verovatno posledica različitih tipova ćelija u kojima je proučavan efekat, u limfocitima ova varijanta dovodi do smanjene ekspresije, a u Kupferovim ćelijama do povećane, što potvrđuju merenja ekspresije *TNF- α* kao odgovor na stimulaciju LPS¹¹⁰.

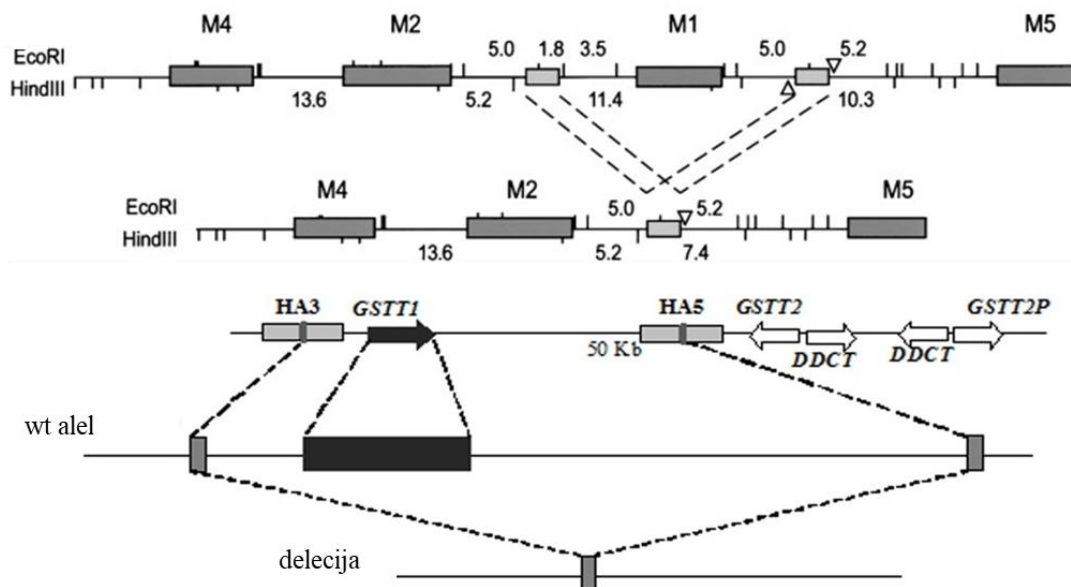
S obzirom da je A alel *TNF- α* -308 povezan sa povećanom ekspresijom *TNF- α* , očekivano bi bilo da bude asociran i sa većim rizikom za ACJ, što nije potvrđeno u dosadašnjim studijama¹¹¹⁻¹¹³. Kada su u pitanju druge bolesti jetre, neke studije su pokazale da je ova varijanta povezana sa većim rizikom za HCC^{114,115} dok su druge pokazale da je ova asocijacija prisutna samo u azijskim populacijama, dok nije zabeležena u evropskim populacijama¹¹⁶. Ova varijanta je asocirana i sa stepenom fibroze i cirozom kod bolesnika sa HCV¹¹⁷ i sa rizikom za autoimune bolesti jetre (AILD)¹¹⁸. Varijanta *TNF- α* -238A je povezana sa povećanim rizikom za ACJ^{112,119,120}, MASLD¹²¹ i HCC-om, ali samo u azijskim populacijama¹¹⁵, dok u AILD ima protektivni efekat¹¹⁸.

1.4.1.5. *GSTM1* i *GSTT1*

Proces enzimske detoksikacije alkohola i njegovih produkata odvija se u tri međusobno povezane faze u jetri. U fazi I dolazi do oksidacije etanola aktivnošću CYP2E1, pri čemu nastaju reaktivni intermedijeri i ROS. U fazi II se detoksikuju reaktivni metaboliti konjugacijom sa GSH, čime se smanjuje njihova reaktivnost i povećava rastvorljivost. U fazi III se konjugati nastali u fazi II putem aktivnog transporta izbacuju iz hepatocita i izlučuju u žuč ili putem cirkulacije u bubrege kako bi bili eliminisani iz organizma. Ključnu ulogu u fazi II imaju GST, koje katalizuju konjugaciju GSH sa elektrofilnim jedinjenjima, uključujući produkte lipidne peroksidacije. GST su citosolni enzimi prisutni u većini tkiva, a u jetri čine oko 10% svih solubilnih proteina i imaju važnu ulogu u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa.

Među 8 klasa GST enzima (α , μ , π , θ , σ , ζ , ω i κ), najviše su proučavani enzimi iz klase mi (μ) i teta (θ) kodirani genima *GSTM1* i *GSTT1* za koje su karakteristični delecioni polimorfizmi. *GSTM1* je deo većeg klastera gena iz porodice *GSTM* koji su locirani jedan pored drugog na kratkom kraku hromozoma 1 (1p13.3). *GSTM1* ima 8 egzona i u klasteru je okružen genima

GSTM2, *GSTM3*, *GSTM4* i *GSTM5*. Visoka homologija sa susednim genima je razlog česte delecije *GSTM1* usled nejednake homologne rekombinacije (Slika 7). Osobe bez ijedne kopije ovog gena, sa kompletnom delecijom imaju genotip *GSTM1*0* (nulti genotip) i nemaju funkcionalni enzim, dok osobe sa jednom ili dve kopije ovog gena imaju funkcionalni protein. *GSTM1*0* je veoma čest u populacijama evropskog porekla, njegova učestalost ide do 50%¹²².



Slika 7. Mehanizam nastanka delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena. a) klaster *GSTM* gena. Isprekidane linije ilustruju proces homologne rekombinacije između ponovljenih sekvenci koja dovodi do delecije. b) klaster *GSTT* gena, prikazan je nastanak wt alela i *GSTT1*0* alela usled nejednake rekombinacije, isprekidane linije prikazuju mesto gubitka gena. Preuzeto iz^{123, 124}, modifikovano.

GSTT1 je lociran na dugom kraku hromozoma 22 (22q11.23), sastoji se od 5 egzona i deo je teta klastera koji uključuje i *GSTT2* gen. Visoka homologija između ova dva gena (dele 55% identičnosti nukleotidne sekvence) je uzrok čestih delecija, slično kao i u slučaju *GSTM1* (Slika 7). Učestalost *GSTT1*0* genotipa varira među populacijama, kod Evropljana je oko 15-25%, dok je u nekim azijskim populacijama znatno viša, i do 40-50%¹²². Osobe sa ovim genotipom nemaju enzim, što ih čini osjetljivijim na oštećenja izazvana specifičnim toksinima.

Iako pripadaju različitim klasama, oba enzima (*GSTM1* i *GSTT1*) imaju sličnu osnovnu strukturu. Oba enzima su homodimeri, dva identična polipeptida koji su čvrsto povezana. Svaki monomer ima dva domena: visoko konzervirani N-terminalni domen (G mesto) za koji se vezuje molekul GSH i visoko varijabilni C-terminalni domen (H mesto) koji formira džep za vezivanje hidrofobnih supstrata. Razlike u AK sastavu H mesta omogućavaju vezivanje različitih supstrata i određuju koje supstance će detoksikovati koji enzim¹²⁵. *GSTM1* poseduje specifičnu proteinsku petlju (Mu-petlja) koja delimično prekriva aktivno mesto i omogućava vezivanje većih i kompleksnijih molekula. Struktura *GSTM1* je prilagođena širokom spektru različitih toksina. Kod *GSTT1* je aktivno mesto otvoreno i pristupačno za manje molekule.

U uslovima hronične konzumacije alkohola dolazi do iscrpljivanja GSH i smanjenja efikasnosti faze II, dok istovremena indukcija CYP2E1 pojačava produkciju ROS. Odsustvo funkcionalnih *GSTM1* i/ili *GSTT1* enzima, može dodatno smanjiti kapacitet detoksikacije i doprineti akumulaciji oštećenja na ćelijskim membranama i proteinima u hepatocitima. Ova

neravnoteža između pojačane faze I i oslabljene faze II predstavlja važan mehanizam u razvoju ACJ.

Uprkos jasnom biološkom mehanizmu, dosadašnje studije o povezanosti delecija *GSTM1* i *GSTT1* sa rizikom od ACJ dale su nedosledne rezultate. Dok neka istraživanja potvrđuju povećan rizik kod nosilaca nultih genotipova¹²⁶, druga ne nalaze značajnu asocijaciju^{91,127}. Najveći rizik za progresiju bolesti (npr. od steatoze ka cirozi) često imaju osobe sa delecijom oba ova gena (nedostatak i *GSTM1* i *GSTT1* enzima)^{127,128}.

2. CILJEVI

Osnovni cilj ove disertacije je otkrivanje potencijalnih molekularnih biomarkera koji bi omogućili identifikaciju bolesnika sa visokim rizikom za razvoj ACJ pre ireverzibilnih oštećenja jetre, što bi doprinelo preciznijoj prognozi i optimizaciji terapijskog pristupa. Predmet proučavanja doktorske disertacije su izabrane varijante gena, čiji su produkti uključeni u antioksidativne procese, inflamaciju i metabolizam lipida i drugih faktora rizika u razvoju i progresiji alkoholne ciroze jetre.

Kao gen čiji produkt može doprineti oksidativnom stresu odabran je *CYP2E1*, dok su za analizu antioksidativne i detoksikacione uloge izabrani *GSTM1* i *GSTT1*. Pored njih, analizirane su i varijante gena za *TNF- α* (kao markeri inflamacije), kao i *PNPLA3* i *TM6SF2* čiji su produkti uključeni u regulaciju metabolizma lipida.

Pojedinačni ciljevi doktorske disertacije su:

1. utvrđivanje učestalosti alela i genotipova odabranih varijanti *CYP2E1*, *TNF- α* , *PNPLA3*, *TM6SF2*, *GSTM1* i *GSTT1* gena kod grupe bolesnika sa ACJ i u kontrolnoj grupi ispitanika;
2. poređenje učestalosti alela i genotipova analiziranih genskih varijanti između grupe bolesnika sa ACJ i kontrolne grupe;
3. ispitivanje povezanosti alela i genotipova sa navikama konzumacije alkohola, demografskim, kliničkim i biohemijskim podacima bolesnika;
4. analiza asocijacije alelskih varijanti ili genotipova ispitivanih polimorfizama pojedinačnih gena *CYP2E1*, *TNF- α* , *PNPLA3*, *TM6SF2*, *GSTM1* i *GSTT1* sa rizikom za razvoj ACJ, kao i konstrukcija modela poligenetskog skora rizika (eng. *Polygenic risk score*, PRS) radi procene kumulativnog efekta ispitivanih genskih varijanti na razvoj ACJ;
5. identifikacija genetičkih (polimorfizmi navedenih gena) i negenetičkih faktora (demografski podaci, navike konzumiranja alkohola, klinički i biohemijski parametri) koji značajno doprinose težini kliničke slike i brzini razvoja bolesti kod bolesnika sa ACJ.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici i biološki materijal

Ovo istraživanje obuhvatilo je 118 bolesnika kojima je dijagnostikovana alkoholna ciroza jetre u periodu od 2015. do 2018. godine u Centru za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničko bolničkog centra (KBC) Zvezdara, Beograd. Prosečna starost bolesnika bila je 58,6 godina, a većina bolesnika bila je muškog pola (104/118). Dijagnoza ciroze jetre postavljena je standardnim kliničkim, laboratorijskim, endoskopskim i ultrasonografskim procedurama, kao i histopatološkim analizama.

Svim bolesnicima je uzeta anamneza radi identifikacije ranih simptoma bolesti, prikupljanja informacija o pridruženim patološkim stanjima i navikama konzumiranja alkohola. Bolesnici su podvrgnuti fizičkom pregledu koji je uključivao palpatornu procenu veličine i konzistencije jetre, pregled kože i abdomena radi utvrđivanja postojanja žutice, paukolikih angioma, ascitesa i proširenih vena na prednjem trbušnom zidu (znak portalne hipertenzije). Dipitrenove kontraktуре (zadebljanje palmarne fascije), parotidomegalija i ginekomastija su ukazivali na alkoholnu etiologiju, dok su Asterixis (lepršavi tremor) i poremećaj ponašanja znakovi hepatične encefalopatije.

Bolesnicima su urađene i biohemijske analize kojima su analizirani standardni biohemijski parametri funkcije jetre (hepatogram), koji obuhvataju aktivnost aminotransferaza: aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT); markereolestaze: alkalnu fosfatazu (ALP) i gama-glutamil transpeptidazu (GGT) i pokazatelje sintetske funkcije jetre: albumine, bilirubin i inernacionalni normalizovani odnos (INR) koji je mera brzine koagulacije.

Ezofagogastroduodenoskopija je sprovedena radi detektovanja i stepenovanja varkoziteta jednjaka i želuca i portne hipertenzivne gastropatije kao indirektnih pokazatelja portne hipertenzije. Rađen je i ultrazvučni pregled abdomena radi otkrivanja ascitesa i skrininga na eventualne fokalne lezije. Bolesnicima kod kojih je postojala sumnja na maligni proces u jetri urađena je multislajsna kompjuterizovana tomografija (eng. *multi-slice computed tomography*, MSCT).

Za procenu težine insuficijencije jetre korišćen je Čajld Puov (eng. *Child Pugh*, CP) bodovni sistem, koji uključuje 3 laboratorijska (nivo serumskog bilirubina i albumina, kao i vrednost protrombinskog kompleksa) i 2 klinička (prisustvo ili odsustvo hepatitne encefalopatije i ascitesa) nalaza. Ovim bodovnim sistemom može se pouzdano proceniti stanje i prognoza bolesnika sa ACJ, kao i razvoj komplikacija. Na osnovu broja bodova, težina insuficijencije je klasifikovana kao stepen A (5 do 6 bodova), stepen B (7 do 9) i stepen C (preko 9 bodova). Step A se odnosi na blago, step B na umereno, a step C na teško oštećenje jetre. Očekivano preživljavanje za bolesnike sa CP A je 15-20, sa CP B 4-14 i sa CP C 1-3 godine¹²⁹. Bolesnici sa CP A su bolesnici u kompenzovanoj fazi bolesti. Način bodovanja u CP sistemu prikazan je u Tabeli 1.

Nakon postavljanja dijagnoze, bolesnik, osoba iz pratnje ili medicinsko osoblje su popunili upitnik koji se odnosi na navike vezane za obrasce konzumiranja alkoholnih pića (OKA). Prikupljene su informacije o starosti osobe pri početku konzumiranja alkoholnih pića, vrsti pića koje najčešće konzumira (kategorije nisu isključivale jedna drugu) i broju alkoholnih pića koje dnevno konzumiraju. Prosečna dnevna konzumacija alkohola više od 2 standardna pića dnevno za žene i više od 3 standardna pića dnevno za muškarce je definisana kao rizična konzumacija alkohola. Jedno standardno piće je čaša piva (250 ml 5 % etanola), čaša vina (100 ml 13 % etanola) ili čašica žestokog alkoholnog pića (30 ml 40 % etanola) i ekvivalentna je 10 g etanola. Prosečna dnevna konzumacija u gramima je izračunata množenjem zapremine pića sa jačinom alkohola i

faktorom konverzije (0,789)¹³⁰. Godine aktivne konzumacije alkohola su izračunate od samoprijavljenog početka konzumacije do dijagnoze ACJ.

Bolesnici sa hepatitisom B i C, kao i bolesnici sa autoimunim i metaboličkim bolestima jetre nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem. Isključivanje obolelih druge etiologije izvršeno je na osnovu rezultata seroloških i biohemijskih testova. Virusni hepatitis je isključen skriningom na površinski antigen hepatitisa B (HbsAg), anti-HBc ukupna antitela i anti-HCV antitela. Autoimune bolesti jetre su isključene na osnovu negativnih nalaza na antinukleusna antitela (ANA), anti-glatkomišićnih antitela (ASMA) i antimitohondrijalnih antitela (AMA), zajedno sa normalnim vrednostima za nivo serumskih imunoglobulina. Metaboličke bolesti jetre su detektovane na osnovu određivanja serumskog gvožđa, feritina, saturacije transferina i ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa (TIBC) (za isključivanje hemohromatoze), serumskog ceruloplazmina i ekstrakcije bakra iz urina (za Vilsonovu bolest) i određivanjem nivoa serumskog α 1-antitripsina (za deficijenciju α 1-antitripsina). Sumnja naolestatsku, lekovima indukovanu i kriptogenu bolest jetre je utvrđivana na osnovu istorije bolesti i biohemijskih nalaza.

Tabela 1. Tabela bodovanja za *Child Pugh* klasifikaciju

Broj bodova	1	2	3
Encefalopatija	odsutna	kontrolisana lekovima	slabo kontrolisana
Ascites	odsutan	kontrolisan lekovima	slabo kontrolisan
Bilirubin (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albumin (g/dl)	<3,5	2,8-3,5	<2,8
INR	<1,7	1,7-2,2	>2,2

INR, internacionalni normalizovani odnos

Kontrolna grupa sastojala se od 131 osobe koje su bili dobrovoljni davaoci krvi ili osobe koje su se javljale na redovne sistematske preglede, a koje u proseku konzumiraju manje od jednog standardnog pića dnevno ili su se izjasnile kao apstinenti. Ispitanici nisu imali kliničke i laboratorijske manifestacije bolesti jetre, kao ni druga hronična patološka stanja. Kontrolna grupa je po polu i godinama starosti usaglašena sa grupom bolesnika.

Za procenu asocijacije delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena sa razvojem ACJ korišćeni su i podaci dobijeni genotipizacijom kontrolne grupe od 182 ispitanika, iz istraživanja koje je prethodno sprovedeno u Odseku za humanu genetiku KBC Zvezdara¹³¹.

Nakon potpisivanja pristanka za učestvovanje u studiji i popunjavanja upitnika o navikama vezanim za konzumiranje alkohola, svim ispitanicima je uzorkovana periferna krv za potrebe studije. Krv je uzimana u vakutajnerima zapremine 5ml sa antikoagulantom EDTA. Krv ispitanika je čuvana na +4°C najduže 5 dana, odnosno na -20°C duži vremenski period.

Ispitanici međusobno nisu bili u krvnom srodstvu i svi su istog etničkog porekla (srpskog). Studija je odobrena od strane Etičkog odbora KBC Zvezdara (Br. odobranja 8-6-2018 od 1.6.2018. godine).

3.2. Metode za detekciju ispitivanih genetičkih varijanti

Genomska DNK ispitanika je izolovana iz limfocita periferne krvi, a genotipizacija je rađena na dva načina: analizom dužine restrikcionih fragmenata dobijenih metodama lančane reakcije polimeraze i polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. *polimerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP) u *CYP2E1*, *TNF- α* , *PNPLA3* i *TM6SF2* genima, i multipleks PCR metodom za delecije *GSTM1* i *GSTT1*. Eksperimentalni deo studije urađen je u Odseku za humanu genetiku KBC Zvezdara.

3.2.1. Izolacija genomske DNK

DNK je izolovana metodom isoljavanja ili upotrebom komercijalnog kita za izolaciju DNK *GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit* (Thermo Scientific, SAD). Metode su korišćene alternativno u zavisnosti od raspoloživosti hemikalija u laboratoriji u trenutku prijema uzorka. Metoda isoljavanja je izabrana zbog svoje jednostavnosti i netoksičnosti. Zasniva se na upotrebi visokih koncentracija soli koje razdvajaju DNK od proteina¹³². Početna liza limfocita se vrši puferom za lizu u prisustvu proteinaze K, DNK se oslobađa u prisustvu saturisanog rastvora soli i precipitira etanolom i zatim rastvara u redestilovanoj vodi.

GeneJET kit je namenjen za brzo izolovanje visoko prečišćene genomske DNK iz različitih uzoraka. Princip rada je sledeći: početna digestija uzorka u prisustvu proteinaze K, uz dodavne RNAze A za oslobađanje od RNK, zatim vezivanje DNK za silikonsku membranu kolonica, ispiranje različitim puferima i finalno eluiranje prečišćene DNK sa membrane.

3.2.1.1. Protokol izolacije DNK metodom isoljavanja

1. U mikrotubi pomešati 300 μ l krvi sa 700 μ l ELB (eng. *erythrocyte leasing buffer*, 10,95% saharoza, 0,01 M tris–HCl pH=7,5, 0,01 % Triton X, 0,005 M MgCl₂), promešati nastavkom;
2. Centrifugirati 30 s na 14000 rpm na sobnoj temperaturi i odliti supernatant;
3. Talog rastvoriti sa dodatnih 1000 μ l ELB;
4. Centrifugirati 30 s na 14000 rpm na sobnoj temperaturi, odliti supernatant i osušiti tubicu;
5. Resuspendovati talog u 300 μ l LLB-a (eng. *leukocyte leasing buffer*, 0,01 M tris–HCl pH=8,0, 0,4 M NaCl, 0,002 M Na₂EDTA, pH=8);
6. Dodati 20 μ l 10 % SDS-a i 20 μ l proteinaze K (1 mg/ml) i izmešati na vorteksu;
7. Inkubirati 30 minuta na 56°C;
8. Nakon inkubacije dodati 120 μ l 5 M NaCl, izmešati na vorteksu;
9. Centrifugirati 3 minuta na 14000 rpm;
10. Prebaciti supernatant u novu mikrotubu i naliti sa 1 ml apsolutnog etanola, dobro izmešati okretanjem tube;
11. Centrifugirati 2 minuta na 14000 rpm;
12. Odliti supernatant i DNK talog prelići sa 1 ml 70 % etanola, dobro izmešati okretanjem tube;
13. Centrifugirati 2 minuta na 14000 rpm;
14. Odliti supernatant, ostaviti mikrotubu 10 minuta na 37°C da se talog osuši;
15. Talog resuspendovati u 100 μ l destilovane vode;
16. Mikrotubu sa rastvorenim DNK čuvati na –20°C.

3.2.1.2. Protokol izolacije DNK na koloni sa silikonskom membranom

Izolacija DNK na koloni vršena je prema uputstvu proizvođača:

1. U mikrotubu sipati 200 µl krvi, 20 µl proteinaze K i 400 µl litičkog rastvora, promešati na vorteksu;
2. Inkubirati 10 min na 56°C;
3. Dodati 200 µl etanola (96-100 %) i resuspendovati pipetom;
4. Suspenziju prebaciti na GeneJET Genomic DNA Purification kolonu smeštenu u kolekcionu mikrotubu, centrifugirati 1 min na 8000 rpm;
5. Baciti kolekcionu mikrotubu, a kolonu prebaciti u novu kolekcionu mikrotubu;
6. Dodati 500 µl pufera za ispiranje I (eng. *wash buffer I*);
7. Centrifugirati 1 min na 10000 rpm;
8. Baciti kolekcionu mikrotubu i kolonu prebaciti u novu;
9. Dodati 500 µl *wash buffer II*;
10. Centrifugirati 3 min na 14000 rpm
11. Baciti kolekcionu mikrotubu i kolonu prebaciti u novu mikrotubu;
12. Centrifugirati 1 min na 14000 rpm;
13. Baciti kolekcionu mikrotubu i kolonu prebaciti u sterilnu mikrotubu (1,5 ml);
14. Dodati 200 µl elucionog pufera na sredinu membrane i inkubirati 2 min na sobnoj temperaturi;
15. Centrifugirati 1 min na 10000 rpm;
16. Baciti kolonu, a izolovanu DNK čuvati na –20°C.

3.2.2. Provera kvaliteta i koncentracije genomske DNK

U cilju određivanja količine uzorka neophodne za uspešnu PCR reakciju određivana je koncentracija genomske DNK u uzorku kao i njena čistoća nakon izolacije. Kvalitet izolata proveravan je na 1% agaroznom gelu, a koncentracija izolovane DNK (ng/µl) određivana je direktnim očitavanjem sa spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf, Nemačka).

3.2.3. Agarozna gel elektroforeza

Agaroz predstavlja inertni prirodni polisaharid koji se pri zagrevanju do ključanja u odgovarajućem puferu (najčešće 1xTBE) potpuno rastvara, a hlađenjem se polimeri umrežavaju i formiraju gel–matriks sa uniformnim porama. Veličina ovih pora zavisi od koncentracije agaroze u rastvoru. Kada se gel potopi u pufer i izloži električnom polju, molekuli koji su nanesheni na gel (npr. DNK) se kreću kroz gel. DNK, kao negativno naelektrisan molekul, migrira ka anodi. Brzina kretanja molekula u gelu i efikasnost razdvajanja DNK fragmenata zavisi od jačine strujnog polja, od veličine molekula, tj. veličine fragmenata (kraći fragmenti se brže kreću), od koncentracije gela, tj. veličine pora (% agaroze rastvorene u puferu). Veličina fragmenata se određuje u odnosu na komercijalne markere (eng. *ladder*) koji sadrže fragmente DNK različite ali definisane dužine.

Za elektroforezu su korišćeni:

- 10xTBE pufer (Tris–Borna kiselina–EDTA, ddH₂O);
- Agaroz (TopVision™ LM GQ Agarose, Fermentas, Litvanija)
- Boja za gel – GreenSafe Premium (NZY Tech, Portugal)
- Boja za elektroforezu (6x DNA Loading Dye, Fermentas, Litvanija)
- DNK marker (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder, 100–1500 bp, Fermentas, Litvanija)

Postupak:

1. U stakleni erlenmajer sipa se agarozna i 1xTBE pufer u zavisnosti od potrebne koncentracije gela i veličine kadice za elektroforezu, a po uputstvu proizvođača;
2. Erlenmajer se poklopi aluminijumskom folijom i zagreva na magnetnoj mešalici do ključanja;
3. Nakon ključanja, rastvor je bistar i hladi se do približno 50°C–60°C, kada se u njega stavlja 5–10 µl GreenSafe boje za gel, naliva se u kalup za gel i ostavlja da se hladi i polimeriše;
4. Polimerisani gel se sa kadicom stavlja u aparat za elektroforezu (BlueMarine 200, Serva Electrophoresis GmbH, Nemačka), nalivaju se uzorci DNK (10 µl) pomešani sa bojom za gel (2 µl), gel se potom naliva puferom i uključuje elektroforeza na željenoj jačini struje;
5. Analiza gela se vrši izlaganjem gela UV svetlu ($\lambda=254$ nm) u transiluminatoru UVsolo (Biometra, Nemačka).

U našoj studiji kvalitet genomske DNK se određivao na 1 % agaroznom gelu, dok su se PCR produkti analizirali na 3 % gelu. Za vizualizaciju DNK korišćen je netoksični interkalirajući agens (*GreenSafe* boja) koji emituje fluorescenciju pod UV svetlom, pri čemu je intenzitet emitovane svetlosti proporcionalan količini DNK u odgovarajućoj traci.

3.2.4. Detekcija varijanti u genima *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α*

Genotipizacija za *PNPLA3* (c.444C>G), *TM6SF2* (c.499C>T), *CYP2E1* (c.-1054C>T) i *TNF- α* (c.-308G>A, c.-238G>A) gene rađena je PCR-RFLP metodom. Ova metoda se zasniva na amplifikaciji željenog regiona DNK u kome je nukleotidna promena od interesa, a koja je u okviru sekvence koju prepoznaje restrikcioni enzim (endonukleaza). Na osnovu dužine fragmenata koji nastanu nakon reakcije endonukleaze i DNK matrice može se odrediti genotip. Anotacija varijanti izvršena je prema nomenklaturi Društva za varijacije humanog genoma (eng. *Human genome variation society*, HGVS)¹³³, koristeći referentni sklop genoma GRCh38¹³⁴. Navedene pozicije nukleotida predstavljaju tradicionalno obeležavanje prihvaćeno u literaturi radi usklađenosti sa specifičnim mestima prepoznavanja restrikcionih enzima.

Komponente PCR reakcione smeše i njihove finalne koncentracije (ukupna zapremina 50 µl) prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Komponente PCR smeše za detekciju varijanti u *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α* genima

Komponente	Finalna koncentracija
10xPCR pufer	1x
MgCl ₂	2 mM
Svaki dNTP	0,2 mM
Uzvodni (eng. <i>forward</i>) primer	0,5 µM
Nizvodni (eng. <i>reverse</i>) primer	0,5 µM
Taq polimeraza	1,5 U
0,2µg DNK	5 µl

U Tabeli 3 su navedeni parovi prajmera koji su korišćeni za umnožavanje sekvenci u okviru kojih se nalaze ispitivane varijante za navedene gene.

Tabela 3. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju varijanti u genima *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α*

Genetička varijanta	Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3'	Referenca
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	PNPLA3_F	TGGGCCTGAAGTCCGAGGGT	135
	PNPLA3_R	CCGACACCAGTGCCCTGCAG	
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	TM6SF2_F	ACGGGGAAAGTTCAGGCACATTG	136
	TM6SF2_R	CCTGGGCAGCATGGTGA AACC	
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	5B-F	CCAGTCGAGTCTACATTGTCA	137
	5B-R	TTCATTCTGTCTTCTAACTGG	
<i>TNF-α</i> c.-238G>A (rs361525)	TNF α _238_F	ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG	138
	TNF α _238_R	AGAAGACCCCCCTCGGAACC	
<i>TNF-α</i> c.-308G>A (rs1800629)	TNF α _308_F	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	139
	TNF α _308_R	TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	

F – uzvodni prajmer, R – nizvodni prajmer

PCR amplifikacija je rađena u PCR aparatu TGradient thermo cycler (Biometra GmbH, Nemačka). Temperaturni profil PCR reakcija obuhvatao je:

- inicijalnu denaturaciju na 94°C/2 min,
 - denaturaciju 94°C/34 s,
 - hibridizaciju prajmera na Ta/30 s,
 - elongaciju na 72°C/30 s;
 - finalnu elongaciju na 72°C/5 min.
- } 35 ciklusa

Temperature hibridizacije prajmera sa DNK matricom (eng. *annealing temperature*, Ta) su navedene u Tabeli 4.

Tabela 4. Temperature hibridizacije za amplifikaciju genskih fragmenata

Genska varijanta	Ta	35 ciklusa
<i>PNPLA3</i>	66°C	
<i>TM6SF2</i>	62°C	
<i>CYP2E1</i>	55°C	
<i>TNF-α-238</i>	62°C	
<i>TNF-α-308</i>	62°C	

Ta – temperatura hibridizacije

Uspešnost PCR reakcije je proveravana pozitivnim kontrolnim uzorcima, a odsustvo kontaminacije negativnim kontrolnim uzorcima (uzorci bez DNK). PCR produkti su analizirani horizontalnom gel elektroforezom na 3 % agaroznom gelu.

Nakon potvrde uspešnosti amplifikacije, uzorci su tretirani odgovarajućim restrikcionim enzimom prema originalnom uputstvu proizvođača (New England Biolabs, SAD). Reakciona smeša za digestiju za svaki restrikcioni enzim, sadržala je 1 μ l odgovarajućeg restrikcionog enzima, 10 μ l PCR produkta, 22 μ l pufera i 17 μ l dH₂O. U Tabeli 5 prikazane su dužine PCR produkata, korišćeni restrikcioni enzimi, uslovi restrikcije i dužine fragmenata koje odgovaraju određenom genotipu.

Tabela 5. Pregled dužina PCR produkata, uslova restrikcije i dužina restrikcionih fragmenata

Gen (varijanta)	Dužina PCR produkta (bp)	Restrikcioni enzim	Temperatura (°C) i trajanje inkubacije	Dužina restrikcionih fragmenata (bp)	Referenca
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	333	BseGI (BtsCI)	37°C 15 min (50°C 15 min)	C: 200 + 133	135
				G: 333	
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	429	Hpy118I	37°C 1 h	C: 178+033+85	136
				T: 251+178	
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	413	RsaI	37°C 15 minuta	c1: 352+61	137
				c2: 413	
<i>TNF-α -238</i> c.-238G>A (rs361525)	152	MspI	37°C 15-30 minuta	G: 133+19	138
				A: 152	
<i>TNF-α -308</i> c.-308G>A (rs1800629)	107	NcoI	37°C 15-30 minuta	G: 87+20	139
				A: 107	

Nakon digestije produkti su razdvajani na horizontalnoj gel elektroforezi na 3% agaroznom gelu. Genotipovi analiziranih uzoraka određivani su na osnovu dužine produkata digestije.

3.2.5. Detekcija delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena

Za detekciju delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena korišćena je multipleks PCR metoda, koja se bazira na istovremenoj amplifikaciji više različitih delova DNK u jednoj reakciji. To se postiže dodavanjem više setova prajmera (specifičnih za različite sekvence DNK) u jednu reakcionu smešu. Pošto su ispitivane kompletne delecije gena, osim prajmera za *GSTM1* i *GSTT1*, kao interna kontrola uspešnosti PCR reakcije korišćen je i set prajmera za β -globin. Sekvence prajmera i očekivane dužine produkata su prikazane u Tabeli 6. U *GSTM1* genu ovim prajmerima se umnožava deo egzona 4, intron 4 i deo egzona 5 i tako su odabrani da se ne vezuju za gene iz iste porodice koji dele visoku homologiju sa *GSTM1*. Prajmeri za *GSTT1* se specifično vezuju za unutrašnju sekvencu gena koja obuhvata egzon 2, koji je specifičan za *GSTT1* i razlikuje ga od *GSTT2* gena. Pre PCR reakcija napravljen je miks prajmera tako da je finalna koncentracija svakog prajmera bila 2 μ M. PCR reakcija se odvijala u smeši finalne zapremine 20 μ l, sastojala se od 10 μ l 2x master miksa (Multiplex PCR Master Mix, Qiagen®, Nemačka), 2 μ l miksa prajmera, 2 μ l DNK i 6 μ l dH₂O.

Temperaturni profil PCR reakcija obuhvatao je:

- inicijalnu denaturaciju na 94°C/5 min,
 - denaturaciju 94°C/2 min
 - hibridizaciju prajmera 59°C/1 min
 - elongaciju na 72°C/1 min
 - finalnu elongaciju na 72°C/10 min.
- } 35 ciklusa

Tabela 6. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida za detekciju delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena

Gen	Naziv prajmera	Sekvenca 5’-3’	Dužina produkta (bp)	Referenca
<i>GSTM1</i>	GSTM1-F	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	215	140
	GSTM1-R	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G		
<i>GSTT1</i>	GSTT1-F	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	480	
	GSTT1-R	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA		
<i>β-globin</i>	PCO3	ACACA ACTGTGTTCAACTAGC	110	
	PCO4	CAACTTCATCCACGTTCCACC		

F – uzvodni prajmer, R – nizvodni prajmer

PCR produkti su razdvajani horizontalnom gel elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Prisustvo delecija je utvrđivano odsustvom odgovarajuće trake na gelu, kao kontrola uspešnosti PCR reakcije služila je traka od 110 bp koja odgovara delu gena za β -globin. Ovom metodom se identifikuju samo kompletne delecije, dok nije moguće razlikovati homozigotne nosioce aktivnih gena od heterozigotnih nosilaca delecije, s obzirom na to da oba genotipa daju pozitivan signal u vidu trake na gelu.

3.3. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci su statistički obrađeni i rezultati prikazani u vidu tabela i grafikona. Diskretne (kategorijske) promenljive su prikazane kao broj i procenat. Za utvrđivanje razlika u učestalosti i distribuciji diskretnih promenljivih između grupa korišćeni su Pirsonov χ^2 kvadrat (χ^2) test i Fišerov egzaktni test.

Kontinuirane varijable su prikazane merama centralne tendencije: za varijable sa normalnom raspodelom korišćena je srednja vrednost sa standardnom devijacijom, dok su za varijable koje odstupaju od normalne raspodele prikazane medijana sa interkvartilnim rasponom (25.-75. percentil). Za svaku varijablu je proveravana normalna raspodela Kolmogorov–Smirnovim testom i grafičkim metodama. Razlike između grupa su testirane Studentovim t–testom ili ANOVA testom za varijable sa normalnom raspodelom, dok su za ostale varijable razlike testirane neparametarskim testovima (Man–Vitnijev U test i Kruškal–Volis test). Veličina efekta je kvantifikovana upotrebom Klifove delte i površinom ispod krive (eng. *area under the receiver operating curve*, *AUC*) sa 95% intervalom poverenja procenjenim metodom ponovnog uzorkovanja (eng. *bootstrap*) sa 5000 ponovljenih uzorkovanja implementirana u Pythonu korišćenjem biblioteka SciPy i pandas. Za ispitivanje veza između varijabli korišćen je Pirsonov test korelacije.

Učestalost alela i genotipova su određene metodom direktnog brojanja. Pirsonov χ^2 test i Fišerov egzaktni test su korišćeni za testiranja razlika u distribuciji alela i genotipova između grupa. U slučajevima retkih genotipova testiranja su vršene korišćenjem dominantnog genetičkog modela, odnosno nosioci heterozigotnih genotipova i homozigotni nosioci ređeg alela su grupisani zajedno i analizirani u odnosu na homozigotne nosioce učestalijeg alela. Za analizu asocijacije genetičkih varijanti kao i poligenskog skora rizika (PRS) sa rizikom za ACJ korišćena je binarna logistička regresija, čiji su rezultati prikazani kao količnik verovatnoće (eng. *odds ratio*, OR) sa 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval*, CI). U slučajevima retkih genotipova korišćena je Firtova logistička regresija. Svi količnici verovatnoće su korigovani za pol i godine. Za svaku ispitivanu varijantu ispitano je da li distribucija genotipova prati Hardy-Vajnbergovu ravnotežu upotrebom χ^2 testa.

Poligenski skorovi rizika su izračunati pomoću softvera R v.4.3.0 prema formuli:

$$f_{\beta}(x) = \left(\sum_{i=1}^n \beta_i \cdot g(x_i) \right) / \left(\sum_{i=1}^n \beta_i \right).$$

Za svaki od ispitivanih gena x_i vrednost predstavlja broj bodova koji je dodeljen na osnovu genotipa. Broj bodova je dodeljivan po sledećem principu:

- nosiocima dva referentna alela dodeljeno je 0 bodova ($g(x_i)=0$),
- heterozigotnim nosiocima alela asociranog sa pojavom alkoholne ciroze dodeljeno je 0,5 bodova ($g(x_i)=0.5$),
- ispitanici sa dve kopije alela asociranog sa pojavom alkoholne ciroze dobili su 1 bod ($g(x_i)=1$).

Dodeljene vrednosti su zatim pomnožene β koeficijentom, koji je mera relativnog doprinosa alela riziku za ACJ. Na taj način se dobija ponderisana vrednost za ispitivani gen, zbir svih tih ponderisanih vrednosti predstavlja individualni PRS¹⁴¹. β koeficijenti za varijante su preuzeti iz PGS kataloga koji je pretraživan za termin alkoholna ciroza jetre ili su izvedeni iz vrednosti količnika verovatnoće iz meta studija i studija asocijacije za varijante koje nisu obuhvaćene katalogom. Parametri korišćeni za izračunavanje skorova rizika prikazani su u Tabeli 7. Za standardizaciju i tumačenje skorova vrednosti su korigovane u Z-skorove (srednja vrednost=0, SD=1). U regresionim analizama koje se odnose na PRS koji je uključio pet analiziranih varijanti korišćene su standardizovane vrednosti, što predstavlja promenu rizika po jednoj standardnoj

devijaciji. Razlika u distribuciji PRS-a između kontrolnih ispitanika i bolesnika sa ACJ testirana je neparametarskim Wilcoxon testom. Kvalitet modela procenjen je pomoću AUC sa 95% intervalom poverenja. Interna validacija je urađena bootstrap metodom sa 10000 ponovljenih uzorkovanja radi procene optimizma i dobijanja optimizmom korigovane AUC. Kalibracije modela su procenjene na osnovu nagiba kalibracije i Hosmer – Lemešou testa adekvatnosti modela. Optimalna granična vrednost (eng. *Cut-off*) utvrđena je pomoću Joudenovog indeksa, uz prikaz odgovarajućih vrednosti senzitivnosti i specifičnosti. Razlike između AUC vrednosti konstruisanih PRS modela testirane su DeLongovim testom za korelisane ROC krive.

Za procenu faktora rizika za teže oštećenje jetre i malignu alteraciju kod bolesnika sa ACJ korišćena je logistička regresiona analiza, sa 95% intervalom povenja (95% CI). U multivarijantnu regresiju uključene su i prethodno poznate pretpostavke.

Za analizu brzine dekompenzacije ciroze primenjena je Kaplan–Majerova (KM) metoda, pri čemu su bolesnici podeljeni prema medijani uzrasta u kom su počeli konzumiranje alkoholnih pića. Statistička značajnost razlika između KM krivih je procenjena log-rank testom.

Tabela 7. Parametri korišćeni za izračunavanje poligenkog skora rizika

SNP_ID	Gen	Alel sa efektom	Referentni alel	Koeficijent β	Referenca
rs2031920 c.-1054C>T	<i>CYP2E1</i>	T (c2)	C (c1)	1,547563	90
rs361525 c.-238G>A	<i>TNF-α</i>	A	G	0,3852624	112
rs1800629 c.-308G>A	<i>TNF-α</i>	A	G	-0,00246	142-144
rs738409 c.444C>G	<i>PNPLA3</i>	G	C	0,19895	142-144
rs58542926 c.499C>T	<i>TM6SF2</i>	T	C	0,186567	142-144
rs366631	<i>GSTM1</i>	M1*0	aktivni	1,308333	145
rs17856199	<i>GSTT1</i>	T1*0	aktivni	0,69	145

SNP – polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*), ID – identifikator (eng. *identifier*)

Problem moguće greške usled višestrukog testiranja rešen je primenom *Benjamini-Hochberg* (B–H) procedure za kontrolu stope lažnih otkrića (eng. *False discovery rate*, FDR). Prag statističke značajnosti postavljen je na $FDR \leq 0,05$, dok je sekundarni prag definisan kao $FDR < 0,1$. Značajnost rezultata zadržana nakon B-H procedure potvrđuje stabilnost identifikovanih asocijacija i minimizira mogućnost dobijanja lažno pozitivnih nalaza usled višestrukog testiranja.

Statističke analize urađene su korišćenjem programa SPSS v.20 (*IBM SPSS Inc., Chicago, USA*), R 4.3.0 i Python. Svi testovi su bili dvostrani (nedirekcioni) sa pragom značajnosti $p < 0,05$.

4. RESULTATI

4.1. Demografski parametri, obrazac konzumacije alkohola, biohemijske i kliničke karakteristike ispitanika

Ovom studijom je obuhvaćeno 118 bolesnika sa cirozom jetre alkoholne etiologije. Njihove karakteristike su prikazane u Tabeli 8.

Tabela 8. Karakteristike obolelih

Karakteristike	
pol (muškarci/žene), N	104/14
starost pri dijagnozi ACJ, godine $\pm$ SD	58,65 $\pm$ 9,58
starost pri početku konzumiranja, godine $\pm$ SD	23 (19-30)
godine aktivne konzumacije alkohola	34,54 $\pm$ 10,98
prosečna dnevna konzumacija etanola (g)	72 (56-90)
pivo, N (%)	82 (69,5)
tip alkoholnog pića vino, N (%)	25 (21,2)
žestoka pića, N (%)	87 (73,7)
dijabetes, N (%)	32 (27,1)
A, N (%)	18 (15,3)
Child-Pugh skor B, N (%)	47 (39,8)
C, N (%)	53 (44,9)
ascites, N (%)	84 (71,2)
ezofagealni variksi, N (%)	71 (60,2)
hepatitna encefalopatija, N (%)	63 (53,4)
HCC, N (%)	10 (8,5)
AST, IU/l	68,5 (43,5-113)
ALT, IU/l	36 (22-54,25)
ALP, IU/l	117 (79,75-156,5)
GGT, IU/l	128 (70-261,25)
albumin g/l	28 (25-32,25)
bilirubin μ M/l	43,7 (21,35-90,8)
INR	1,5 (1,3-1,8)

Kategorijske promenljive su predstavljene kao brojnost (u zagradi učestalost u %), kontinuirane promenljive su predstavljene u zavisnosti od raspodele koju imaju kao srednja vrednost $\pm$ SD (za promenljive sa normalnom raspodelom) ili kao medijana (opseg) za promenljive čija raspodela odstupa od normalne. Skraćenice: N – broj ispitanika, SD – standardna devijacija; IU/l – internacionalne jedinice/l; AST – aspartat amino-transferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama glutamil transferaza; INR – internacionalni normalizovani odnos

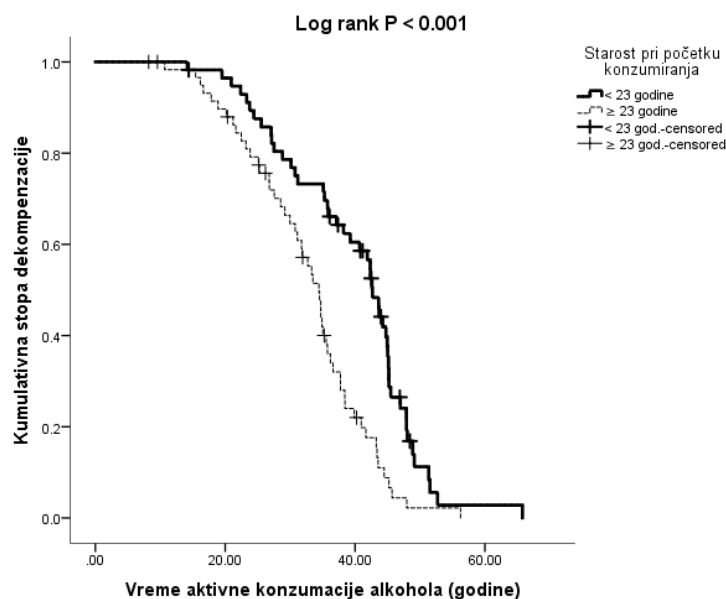
Ispitanici sa alkoholnom cirozom jetre su većinom bili muškog pola, bilo je 7 puta više muškaraca nego žena, a prosečna starost svih bolesnika sa ACJ je bila 58,6 godina. Medijana godina života u vreme početka konzumiranja alkoholnih pića bila je 23 godine i u proseku su bolesnici konzumirali alkohol 34,5 godine pre nego što je postavljena dijagnoza. Medijana dnevnog unosa alkohola bila je 72 g, najveći broj ispitanika je konzumirao rakiju ili druga žestoka pića. Najveći broj bolesnika (44,9 %) imao je tešku insuficijenciju jetre (*Child Pugh* skor C), a kod 8,5 % bolesnika je došlo i do maligne alteracije.

Bolesnici koji su imali više od 23 godine pri početku konzumiranja alkohola pokazali su bržu progresiju do ciroze ($r(118) = -0,513$, $p < 0,001$). Nije pronađena značajna korelacija dnevne

količine konzumiranog alkohola sa godinama aktivne konzumacije pre dijagnoze ACJ, kao ni sa godinama života bolesnika pri početku konzumiranja. Bolesnici koji su konzumirali žestoka pića (isključivo ili u kombinaciji sa drugim vrstama alkohola), dnevno su unosili veće količine etanola (rpb = 0,262, n = 116, p = 0,004).

U daljoj analizi procenili smo uticaj godina života pri početku konzumiranja alkoholnih pića na vreme za koje će kod ispitanika doći do dekompenzacije ciroze tako što smo podelili bolesnike u dve podgrupe prema medijani uzrasta na početku konzumiranja alkohola. Prvu grupu su činili bolesnici koji su počeli da konzumiraju alkohol sa manje od 23 godine, dok su drugu činili bolesnici koji su počeli da konzumiraju alkohol sa 23 i više godina. Dekompenzacija ciroze je odabrana kao događaj, jer predstavlja ključnu kliničku prekretnicu koja direktno utiče na prognozu. Pored toga, ona je objektivniji pokazatelj od same dijagnoze i omogućava preciznije definisanje vremena do pojave prvih ozbiljnih komplikacija.

Kaplan-Majerova analiza (Slika 8) je pokazala da je kod bolesnika koji su počeli sa konzumacijom alkohola pre 23. godine dekompenzacija nastupila značajno kasnije u poređenju sa onima koji su počeli sa konzumacijom sa 23 ili više godina (log-rank p < 0,001). Prosečno vreme do dekompenzacije u prvoj grupi iznosilo je 42,7 godina (95% CI = 40,7–44,6), dok je u drugoj grupi ono bilo 34,4 godine (95% CI = 32,1–36,8). Bolesnici kod kojih nije došlo do dekompenzacije (po 9 bolesnika u svakoj grupi), odnosno oni koji su ostali u okviru CP A grupe, tretirani su kao ispitanici bez zabeleženog događaja (cenzurisana zapažanja).



Slika 8. Kumulativna stopa dekompenzacije u zavisnosti od godina života na početku konzumacije alkohola. Kumulativna stopa dekompenzacije ciroze kod bolesnika koji su počeli sa konzumacijom alkohola pre 23. godine života (puna linija) u poređenju sa onima koji su počeli u 23. godini ili kasnije (isprekidana linija).

Kontrolna grupa je po polu i starosti usaglašena sa grupom bolesnika, odnosno nije bilo značajne razlike među grupama po navedenim karakteristikama. Demografske karakteristike ispitanika prikazane su u Tabeli 9.

Tabela 9. Demografske karakteristike ispitanika uključenih u studiju

	Bolesnici N=118	Kontrolna grupa N=131	p
Pol, N (%)			0,540 ^a
ženski	14 (11,95)	19 (14,5)	
muški	104 (88,1)	112 (85,5)	
Starost (godine), srednja vrednost ± SD	58,6 ± 9,6	58,40 ± 10,78	0,846 ^b

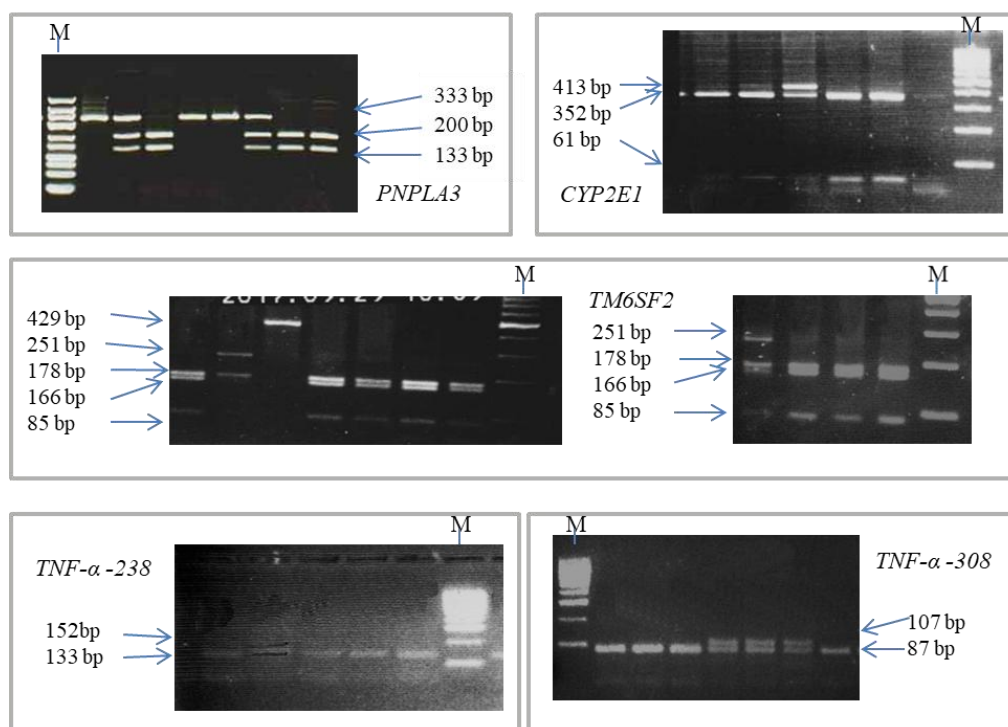
Testovi koji su korišćeni za testiranje razlika među grupama: ^a Pirsonov χ^2 test; ^b Studentov t-test.

Skraćenice: N – broj ispitanika; p – verovatnoća SD – standardna devijacija.

U grupi kontrolnih ispitanika su takođe u većini bili muškarci (85,5%), što se nije značajno razlikovalo u odnosu na ACJ grupu ($\chi^2(1, N = 249) = 0,376, p = 0,540$). Prosečna starost ispitanika u kontrolnoj grupi bila je 58,4 godine, u rasponu od 30-87 godina, a u grupi bolesnika 58,6 godina, u rasponu od 32-80 godina u trenutku ispitivanja. Ova razlika takođe nije bila značajna, ($t(247) = -0,19; p = 0,846$).

4.2. Analiza učestalosti varijanti *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α* gena

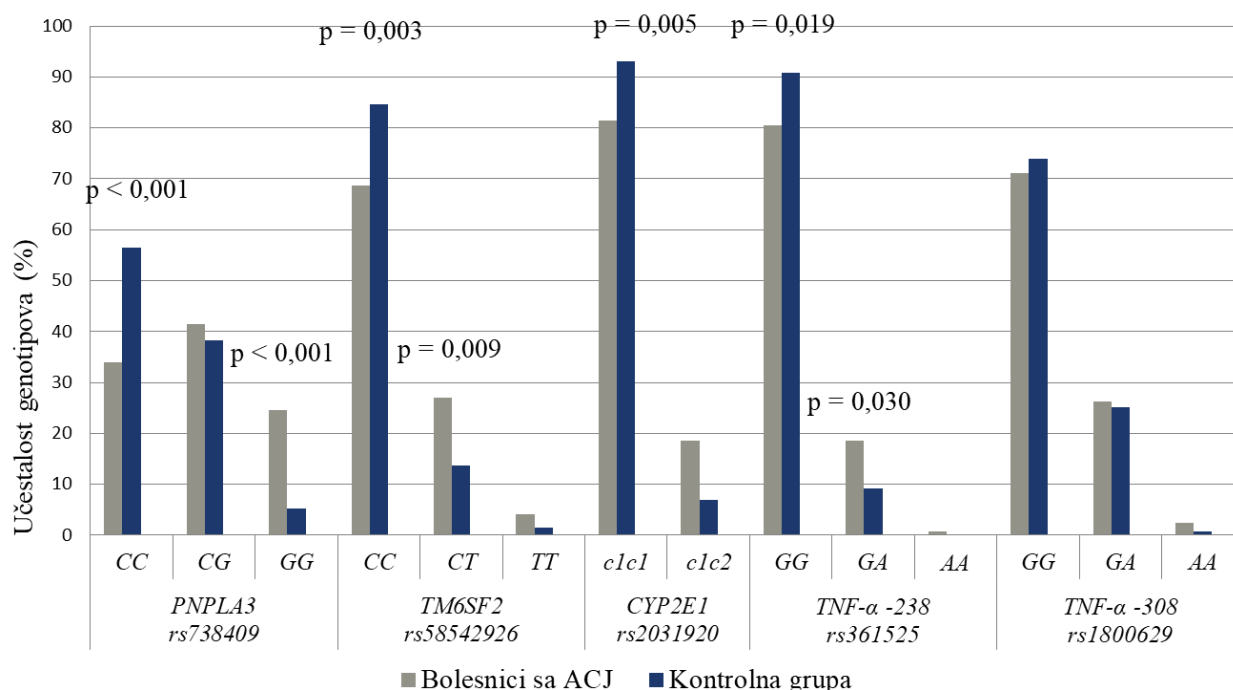
Korišćenjem PCR-RFLP metode je ispitano prisustvo 5 genetičkih varijanti. Na Slici 9 su prikazani profili fragmenata nakon digestije restrikcionim enzimima. Genotipizacijom bolesnika sa alkoholnom cirozom jetre i kontrolnih ispitanika utvrđena je raspodela genotipova i alela za varijante u genima *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α* . Na osnovu raspodele analiziranih genotipova utvrđeno je da su ACJ i kontrolna grupa u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži za sve ispitivane genetičke varijante. Raspodela genotipova ispitivanih varijanti prikazana je na Slici 10.



Slika 9. Detekcija ispitivanih genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom.

- a) Prisustvo samo fragmenta od 333 bp odgovara GG genotipu, 333 bp, 200 bp i 133 bp CG genotipu, a 200 bp i 133 bp CC genotipu *PNPLA3*. b) Fragmenti od 413 bp, 352 bp i 61 bp odgovaraju c1/c2

genotipu, a 352 bp i 61 bp c1/c1 genotipu *CYP2E1*. c) Fragment od 251 bp i 178 bp odgovaraju TT genotipu, 178 bp, 166 bp i 85 bp CC genotipu, a 251 bp, 178 bp, 166 bp i 85 bp odgovaraju CT genotipu *TM6SF2*. d) Prisustvo fragmenata od 152 bp i 133 bp odgovaraju GA genotipu, a fragment od 133 bp GG genotipu *TNF- α* -238. e) Fragmenti od 107 bp i 87 bp odgovaraju GA genotipu, a samo fragment od 87 bp GG genotipu. Za procenu dužine dobijenih fragmenata korišćen je DNK molekularni marker (M) od 100-1500 bp (*DNA Ladder*, *Fermentas*, Litvanija), a u analizi *PNPLA3* *Hyper ladder*TM 25 bp (*Bioline*, UK).



Slika 10. Učestalosti genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u grupi bolesnika i kontrolnoj grupi. Za ispitivanje razlika između ACJ i kontrolne grupe korišćen je Pearsonov χ^2 test i Fišerov egzaktni test u slučajevima retkih genotipova. U slučaju AA genotipa *TNF- α* -238 nije primenjen test zato što je ovaj genotip detektovan kod samo jednog bolesnika. Sve p vrednosti $< 0,05$ su ostale značajne nakon *Benjamini-Hochberg* korekcije za višestruka testiranja (B-H FDR = 5%).

Za gen *PNPLA3* i ispitivane varijante c.444C>G raspodela genotipova je bila sledeća: CC genotip ima 33,9% bolesnika i 56,5% ispitanika iz kontrolne grupe, dok je 24,6% bolesnika i 5,3% ispitanika iz kontrolne grupe je imalo genotip GG. Za oba genotipa su se ispitivane grupe značajno razlikovale (CC: $\chi^2(1, N = 249) = 12,763$; $p < 0,001$; GG: ($\chi^2(1, N = 249) = 18,568$; $p < 0,001$). Heterozigotni genotip CG je bio najčešći kod obolelih, čak 41,5% njih su nosioci ovog genotipa, dok je u kontrolnoj grupi utvrđen kod 38,2% ispitanika, ali se ove dve grupe nisu značajno razlikovale ($\chi^2(1, N = 249) = 0,292$; $p = 0,589$).

Genotip CC gena *TM6SF2* varijante c.499C>T je najčešće zastupljen genotip i u grupi bolesnika (68,6%) i u kontrolnoj grupi (84,7%), ali se učestalost razlikovala između ovih grupa ($\chi^2(1, N = 249) = 9,104$; $p = 0,003$). Heterozigotni genotip CT utvrđen je kod 27,1% bolesnika i 13,7% kontrolnih ispitanika između kojih je takođe bilo značajne razlike ($\chi^2(1, N = 249) = 6,923$; $p = 0,009$). Pet bolesnika (4,2%) ima TT genotip, a u kontrolnoj grupi detektovana su samo dva ispitanika (1,5%) sa ovim genotipom, rezultati Fišerovog testa su pokazali da ne postoji značajna razlika između grupa ($p = 0,261$).

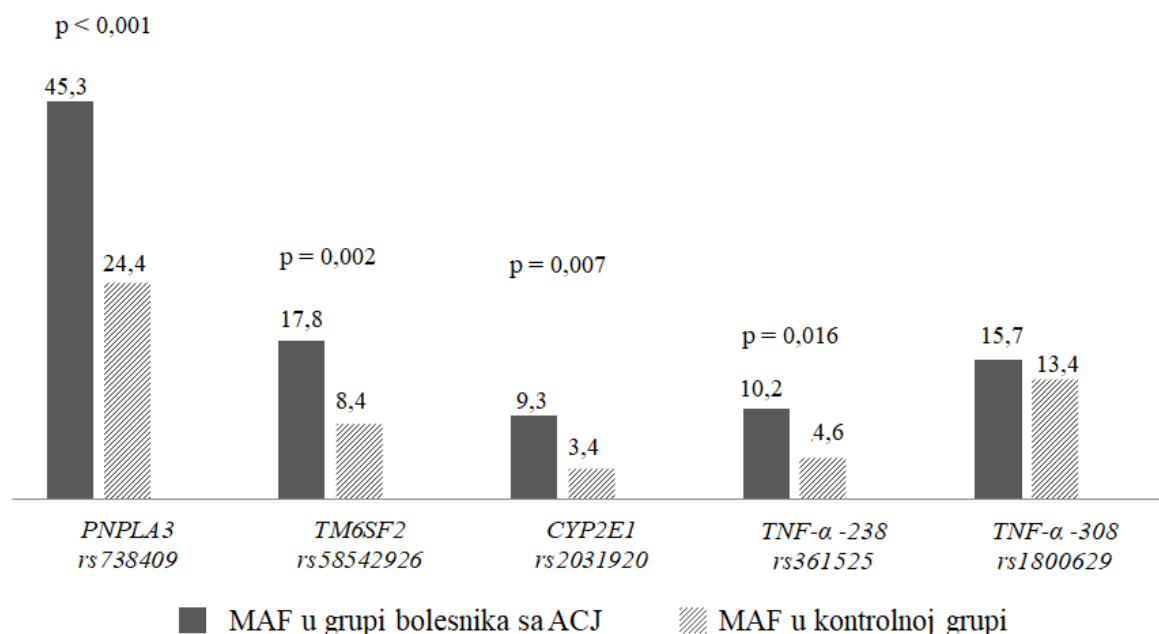
Genotip c1/c1 varijante *CYP2E1* c.-1054C>T je najčešći i u grupi bolesnika (81,4%) i u kontrolnoj grupi (93,1%), genotip c1/c2 prisutan je kod 18,6% bolesnika sa cirozom i kod 6,9% ispitanika iz kontrolne grupe, a ove dve grupe se značajno razlikuju ($\chi^2(1, N = 249) = 7,895$; $p = 0,005$). Genotip c2/c2 nije detektovan ni kod jednog ispitanika.

Genotip GG varijante *TNF- α* c.-238G>A ima 80,5% bolesnika i 90,8% ispitanika iz kontrolne grupe. Učestalosti ovog genotipa između ovih grupa su bile značajno različite ($\chi^2(1, N = 249) = 5,485$; $p = 0,019$). Učestalost genotipa GA bila je značajno veća u grupi bolesnika (18,6%) u odnosu na kontrolnu grupu (9,2%) ($\chi^2(1, N = 249) = 4,736$; $p = 0,030$). U kontrolnoj grupi nije bio prisutan AA genotip ove varijante, a detektovan je samo jedan nosilac AA genotipa u grupi bolesnika.

Učestalost genotipova varijante *TNF- α* c.-308G>A nije se značajno razlikovala između grupe bolesnika i kontrolne grupe. Genotip GG ima 71,2% ispitanika iz grupe bolesnika i 74% iz kontrolne grupe, te razlika nije bilo ($\chi^2(1, N = 249) = 0,256$, $p = 0,613$), kao i u slučaju heterozigotnog genotipa GA koji je bio prisutan kod 26,3% bolesnika i 25,2% kontrolnih ispitanika ($\chi^2(1, N = 249) = 0,038$; $p = 0,846$). Genotip AA ove varijante utvrđen je kod 4 ispitanika, 3 (2,5%) iz grupe bolesnika i jednog (0,8%) iz kontrolne grupe, Fišerov test je pokazao da ne postoji značajna razlika između grupa ($p = 0,348$).

4.3. Analiza učestalosti i asocijacije alela *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1* i *TNF- α* gena sa cirozom jetre alkoholne etiologije

Učestalosti manje zastupljenog alela (eng. *Minor allele frequencies*, MAF) ispitivanih varijanti je prikazan za obe grupe da bi se identifikovale značajne razlike u učestalostima alela, odnosno potencijalni faktori rizika za razvoj ACJ (Slika 11). Da bismo ispitali koji aleli nose rizik za razvoj ciroze jetre alkoholne etiologije uradili smo seriju logističkih regresija.



Slika 11. Učestalost MAF u grupi bolesnika i kontrolnoj grupi. Razlike u učestalostima između grupa ispitane su Pirsonovim χ^2 testom. Razlika je smatrana značajnom ukoliko je $p < 0,05$. Nakon korekcije za višestruka testiranja (B-H, FDR = 5%) sve razlike u distribuciji alela između grupa su ostale značajne osim u slučaju varijante *TNF- α* -308.

U tabeli 10 prikazani su količnici verovatnoće, intervali poverenja i p vrednosti za sve ispitivane varijante za poređenje grupe bolesnika sa kontrolnom grupom. Analiza je pokazala da je G alel *PNPLA3* c.444C>G detektovan kod 45,3% bolesnika i kod 24,4% zdravih ispitanika. Ova razlika u frekvencijama je bila značajna ($\chi^2(1, N = 498) = 24,081$; $p < 0,001$). Nosioци ovog alela imaju 2,56 puta veći rizik za razvoj alkoholne ciroze jetre u odnosu na nosioce C alela.

Takođe je nađena i značajna razlika u distribuciji alela varijante *TM6SF2* c.499C>T između grupa. Alel T *TM6SF2* je detektovan kod 17,8% bolesnika i 8,4% ispitanika kontrolne grupe ($\chi^2(1, N = 498) = 9,795$; $p = 0,002$). Nosioци ovog alela imali su 2,34 puta veći rizik za razvoj ciroze.

Kada je u pitanju varijanta *CYP2E1* c.-1054C>T, alel (c2) je dva puta češće prisutan u grupi bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2(1, N = 498) = 7,371$; $p = 0,007$), i nosioци ovog alela su pokazali skoro tri puta veći rizik za razvoj ciroze jetre alkoholne etiologije u odnosu na nosioce C alela ($p = 0,010$).

Rezultati testiranja su pokazali da je alel A varijante *TNF-α* c.-238G>A češće prisutan u grupi bolesnika (9,3%) u odnosu na kontrolnu grupu (3,4%). Ova razlika u frekvencijama je bila značajna ($\chi^2(1, N = 498) = 5,784$; $p = 0,016$). Nosioци ovog alela imaju 2,4 puta veći rizik od razvoja bolesti u odnosu na nosioce G alela ($p = 0,016$).

Analiza vezana za varijantu *TNF-α* c.-308G>A je pokazala da je distribucija alela A ujednačena među grupama (15,7%, odnosno, 13,4%). Razlika u distribuciji nije značajna ($\chi^2(1, N = 498) = 0,540$, $p = 0,462$) i ovaj alel ne doprinosi riziku za oboljevanje (OR = 1,2; 95%CI = 0,73–1,99; $p = 0,467$).

Tabela 10. Asocijacija analiziranih alela sa cirozom jetre alkoholne etiologije

Genetička varijanta	Alel	OR*	95% CI	p
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	C	standard		
	G	2,56	1,74–3,74	<0,001
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	C	standard		
	T	2,34	1,35–4,06	0,002
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	c1	standard		
	c2	2,85	1,28–6,32	0,010
<i>TNF-α</i> c.-238G>A (rs361525)	G	standard		
	A	2,42	1,18–4,98	0,016
<i>TNF-α</i> c.-308G>A (rs1800629)	G	standard		
	A	1,20	0,73–1,99	0,467

*OR je korigovan za pol i godine

OR – količnik verovatnoće; 95%CI – 95% interval poverenja za količnik verovatnoće; p – verovatnoća.

Vrednosti koje su zadržale značajnost nakon B–H korekcije sa FDR = 5% su naglašene.

Nakon uvedene korekcije za višestruka testiranja (B–H, FDR=5%) asocijacije između ispitivanih alela i ACJ su ostale značajne.

4.3.1. Genotipovi asocirani sa cirozom jetre alkoholne etiologije

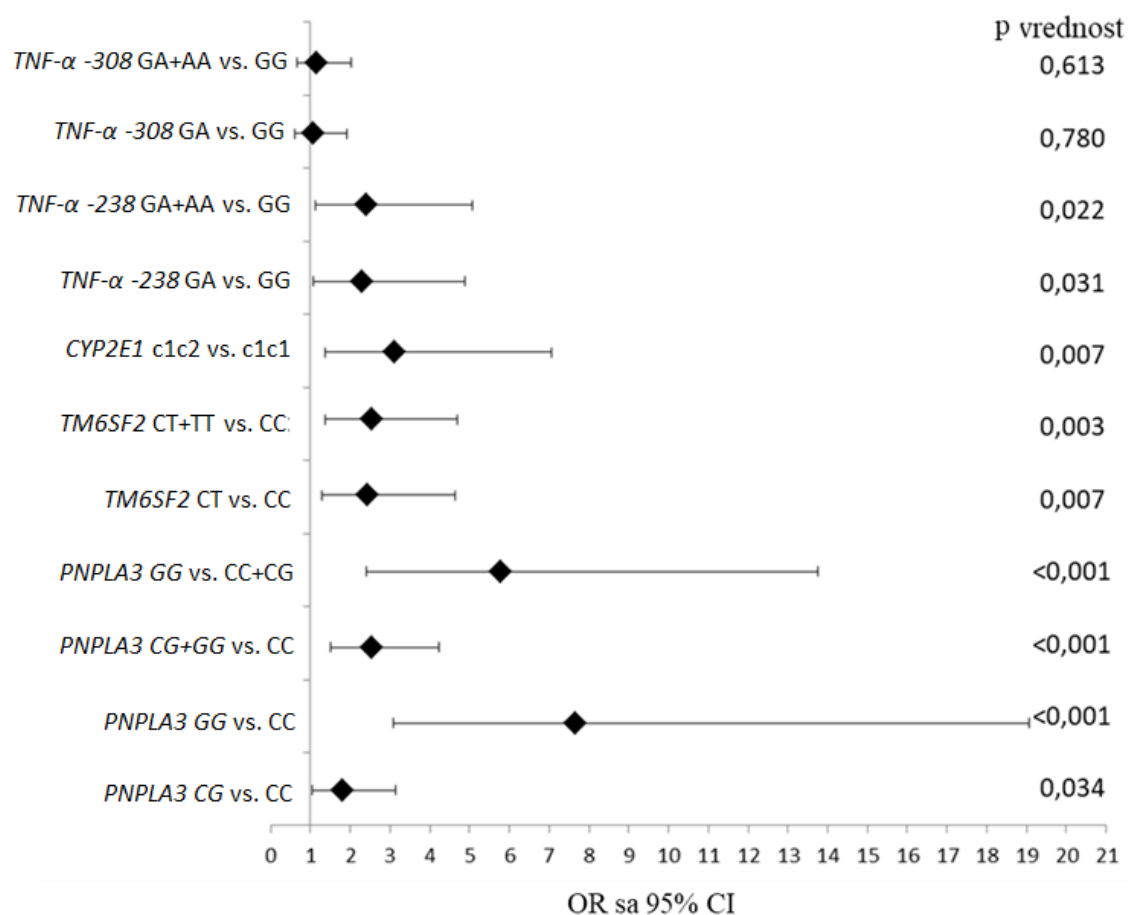
Na osnovu rezultata binarnih logističkih regresija prikazanih na Slici 12, može se zaključiti da nosioci CG genotipa *PNPLA3* imaju 1,8 puta veći rizik za razvoj bolesti u odnosu na nosioce CC genotipa (OR = 1,82; 95%CI = 1,05–3,17; $p = 0,034$), dok je za nosioce GG genotipa taj rizik čak 7,6 puta veći (OR = 7,64; 95%CI = 3,06–19,07; $p < 0,001$). Testiran je dominantni model koji je pokazao da nosioci CG/GG genotipova imaju 2,5 puta veći rizik za ACJ u poređenju sa nosiocima CC genotipa (CG/GG vs. CC: OR = 2,54; 95%CI = 1,51–4,26; $p < 0,001$), kao i recesivni model nasleđivanja čiji rezultati su pokazali da homozigotni nosioci ređeg alela imaju 5,7 puta veći rizik za razvoj ACJ u odnosu na nosioce CC/CG genotipova (GG vs. CC/CG: OR = 5,73; 95%CI 2,4–13,7; $p < 0,001$).

Nosioci CT genotipa *TM6SF2* su imali 2,43 puta veću šansu za razvoj alkoholne ciroze jetre u poređenju sa nosiocima CC genotipa (OR=2,43; 95%CI=1,27–4,63; $p = 0,007$). Pošto je nosioca TT genotipa bilo samo 7, primenjen je dominantni genetički model, uzeti zajedno CT+TT ispoljavaju 2,5 puta veći rizik u odnosu na nosioce CC genotipa (OR=2,52; 95%CI=1,36–4,66; $p = 0,003$).

Rezultati analize su pokazali da nosioci c1/c2 genotipa *CYP2E1* imaju 3 puta veći rizik za razvoj alkoholne ciroze jetre u poređenju sa nosiocima c1/c1 genotipa (OR = 3,11; 95%CI = 1,37–7,06; $p = 0,007$).

Genotip GA varijante *TNF- α* –238 je takođe pozitivno asociran sa razvojem ciroze (OR = 2,30; 95%CI = 1,08–4,88; $p = 0,031$). Primenjen je dominantni genetički model za ovu varijantu (GA+AA vs GG). Rezultati su pokazali da genotipovi GA+AA nose 2,4 puta veći rizik za razvoj bolesti u odnosu na nosioce GG genotipa (OR = 2,40; 95%CI = 1,14–5,07; $p = 0,022$).

Rezultati regresije za varijantu *TNF- α* -308 su pokazali da nema asocijacije između ove varijante i alkoholne ciroze jetre (GA vs. GG: OR=1,08; 95%CI=0,16–1,91; $p = 0,780$ i GA+AA vs. GG: OR=1,15; 95%CI=0,66–2,02; $p = 0,613$).



Slika 12. Asocijacija genotipova analiziranih polimorfizama gena sa cirozom jetre alkoholne etiologije. Procenjeni OR za svaki genotip predstavljen je simbolom $\blacklozenge$. Linijama je predstavljen 95% interval poverenja za odgovarajuću OR vrednost. Vrednost OR veća od 1 predstavlja pozitivnu asocijaciju. OR čiji 95% interval poverenja ne uključuje vrednost 1 smatra se značajnim ($p < 0,05$). Sve vrednosti koje su inicijalno pokazale značajnost su ostale značajne i posle primenjene B–H procedure sa FDR = 5%.

Na osnovu rezultata univarijantnih binarnih logističkih regresija napravljen je regresioni model u koji su uključene genetičke varijante koje su pokazale značajnu asocijaciju sa alkoholnom cirozom, kao i pol i starost ispitanika. Selekcija varijabli koje ostaju u modelu vršena je *backward Wald*–ovom metodom i rezultati su prikazani u Tabeli 11.

U multivarijantnoj regresionoj analizi identifikovani su sledeći prediktori za razvoj alkoholne ciroze jetre: genotip GG *PNPLA3* čiji nosioci imaju 8 puta veći rizik za cirozu u odnosu na nosioce CC genotipa, genotipovi CT+TT varijante *TM6SF2* sa rizikom od 2,4, genotip c1/c2 varijante *CYP2E1* koji povećava rizik 3 puta svojim nosiocima. Genotipovi GA+AA varijante *TNF-α* -238 su zadržani u modelu iako nisu ostali značajan prediktor. Genotip CG varijante *PNPLA3* takođe nije ostao značajan u modelu.

Tabela 11. Genetički prediktori alkoholne ciroze jetre

Ispitivani gen	Genotip	OR	95% CI	p
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	CG	1,663	0,933-2,963	0,084
	GG	8,016	3,150-20,40	<0,001
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	CT+TT	2,408	1,25-4,65	0,009
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	c1/c2	2,96	1,23-7,08	0,015
<i>TNF-α</i> c.-238G>A (rs361525)	GA+AA	2,09	0,93-4,70	0,075

OR – količnik verovatnoće; 95%CI – 95% interval poverenja za količnik verovatnoće; p – verovatnoća

4.4. Poligenski skor rizika u predikciji alkoholne ciroze jetre

Na osnovu β koeficijenata prikazanih u Tabeli 7 izračunat je poligenski skor rizika za sve ispitanike. Konstrukciji PRS smo pristupili hijerarhijski. Prvo smo konstruisali i testirali model zasnovan na polimorfizmima sa najvišim stepenom dokaza u literaturi koji je uključivao polimorfizme *PNPLA3* i *TM6SF2* gena, a potom smo ispitali da li uključivanje još tri analizirana polimorfizma sa manjim pojedinačnim efektima nudi precizniju stratifikaciju bolesnika.

4.4.1. Poligenski skor rizika baziran na analiziranim polimorfizmima *PNPLA3* i *TM6SF2* gena

Konstruisan je PRS sa dva gena i rizik za razvoj ACJ je procenjen poređenjem skorova između grupa. Srednji PRS u grupi bolesnika sa ACJ je bio 0,32, dok je u kontrolnoj grupi bio 0,167 ($p = 1,8 \times 10^{-7}$) (slika 13a).

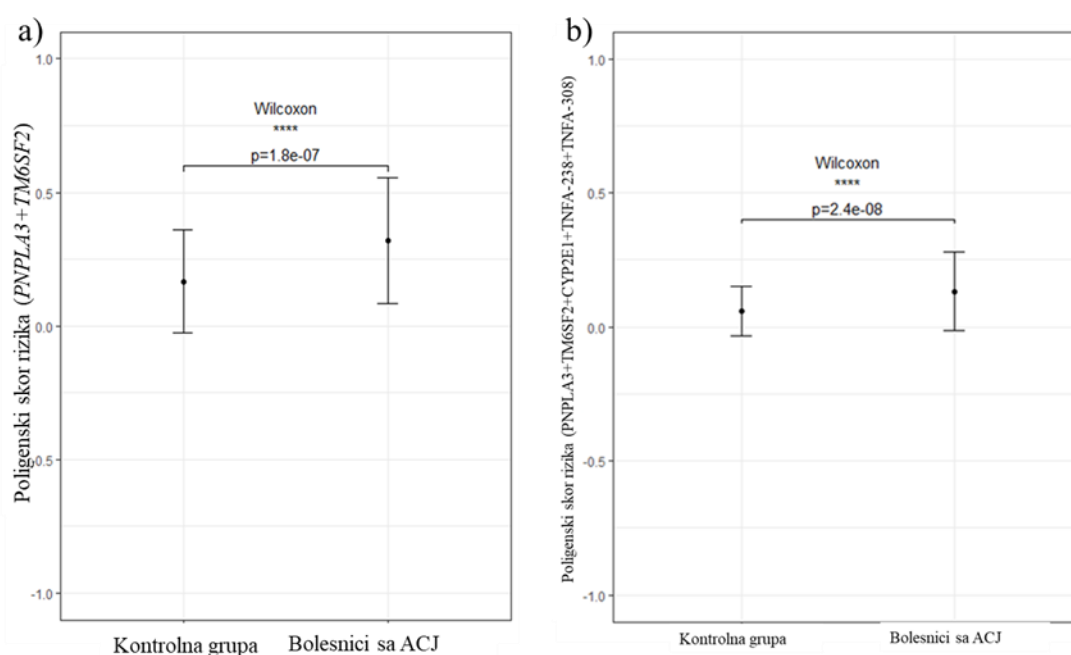
Ispitanici su podeljeni na osnovu tercilne raspodele vrednosti PRS-a, čime je omogućeno grupisanje ispitanika u kategorije niskog, srednjeg i visokog rizika, radi preciznije analize gradacije genetičkog opterećenja u ispitivanoj populaciji. U grupu niskog rizika su svrstani ispitanici sa PRS = 0, koji predstavljaju homozigotne nosioce više zastupljenog alela (wt, *wild type* genotip) za oba testirana gena. Grupu srednjeg rizika čine ispitanici sa PRS > 0 i $\leq 0,26$, dok su pripadnici grupe visokog rizika imali PRS > 0,26.

Pripadnici grupe visokog rizika imali su skoro 7 puta veći rizik za razvoj ACJ u odnosu na pripadnike grupe niskog rizika ($p < 0,001$) (tabela 12). Model je pokazao umerenu sposobnost diskriminacije sa AUC = 0,684 (95% CI = 0,617-0,750). Interna validacija sa 1000 ponovljenih uzorkovanja dala je AUC korigovanu za optimizam od 0,684 (95% CI = 0,616-0,745), što je ukazalo na minimalno preprilagođavanje (eng. *Overfitting*) i visoku stabilnost modela. Nagib kalibracije od 1,360 ukazao je na blago potprilagođavanje (eng. *Underfitting*), dok je Hosmer–Lemešov test pokazao izvrsno slaganje između posmatranih i predviđenih rizika ($\chi^2 = 3,441$; $p = 0,904$).

Tabela 12. Rizik za alkoholnu cirozu jetre na osnovu PRS modela dva analizirana polimorfizma u *PNPLA3* i *TM6SF2* genima

Grupa rizika	Skor	Beta±SD	OR*	95% C.I.	p
niski, N=94	0		standard		
srednji, N=87	$> 0 \leq 0,26$	0,549±0,313	1,731	0,937-3,199	0,080
visoki, N=68	$> 0,26$	1,903±0,360	6,707	3,313-13,581	$< 0,001$

OR je korigovan za pol i godine. Prag od 0,26 predstavlja graničnu vrednost prve tercile empirijske distribucije poligenskog skora rizika (PRS). Ispitanici sa PRS = 0 su nosioci wt genotipa za obe testirane varijante. Skraćenice: PRS – poligenski skor rizika, OR – količnik verovatnoće, N - broj ispitanika, Beta - logOR, 95%CI – 95% interval poveranja, p – verovatnoća.



Slika 13. Poređenje poligenskog skora rizika između bolesnika sa alkoholnom cirozom jetre i kontrolne grupe.

- a) PRS baziran na analiziranim varijantama 2 gena (*PNPLA3* i *TM6SF2*); b) PRS baziran na 5 analiziranih varijanti (*PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, *TNF-α-238* i *TNF-α-308*). Srednje vrednosti PRS-a su obeležene simbolom „•“, linijama je predstavljena standardna devijacija. Skraćenice: PRS – poligenski skor rizika; ACJ – alkoholna ciroza jetre.

4.4.2. Poligenski skor rizika baziran na pet analiziranih varijanti (*PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, *TNF-α-238* i *TNF-α-308*)

Konstruisan je model PRS u koji su pored *PNPLA3* i *TM6SF2* uključene i varijante u *CYP2E1*, *TNF-α-238* i *TNF-α-308*. Srednja vrednost PRS-a koji je uključio pet analiziranih varijanti bila je značajno viša kod bolesnika sa ACJ (0,133) nego u kontrolnoj grupi (0,058) ($p = 2,406 \times 10^{-8}$), kao što je prikazano na Slici 13b.

Radi procene veze između PRS-a koji je uključio pet analiziranih varijanti i rizika za ACJ upotrebljena je logistička regresija. U modelu korigovanom za pol i starost, standardizovani PRS

bio je značajno povezan sa ACJ, gde se rizik za razvoj ciroze povećava 1,984 puta za povećanje skora od jedne standardne devijacije. Zatim smo ispitanike podelili na osnovu vrednosti PRS-a koji je uključio pet analiziranih varijanti u tri grupe rizika, ujednačene veličine i izračunali smo korigovani količnik verovatnoće, OR i njegov 95% interval poverenja za razvoj ACJ.

Tabela 13. Rizik za alkoholnu cirozu jetre na osnovu vrednosti PRS-a koji je uključio pet analiziranih varijanti

Model		Skor	Beta ± SD	OR* (95% CI)	p
kontinuirani		Za 1 SD povećanja PRS	0,685±0,163	1,984 (1,440–2,732)	< 0,001
kategorički	Grupa rizika				
	niski, N=74	≤0		standard	
	srednji, N=88	>0 ≤ 0,0832	0,999±0,345	2,714 (1,380–5,340)	0,004
	visoki, N=87	> 0,0832	1,881±0,357	6,560 (3,256–13,217)	< 0,001
	p za trend				< 0,001

*OR je korigovan za starost i pol. Grupu niskog rizika čine ispitanici sa PRS manjim ili jednakim 0; grupu srednjeg rizika čine ispitanici koji imaju vrednost PRS veću od 0 i manju od 0,0832; grupu visokog rizika čine ispitanici sa vrednostima PRS većim od 0,0832. Skraćenice: SD – standardna devijacija; OR – količnik verovatnoće; 95%CI – 95% interval poverenja za količnik verovatnoće; p – verovatnoća, N – broj ispitanika

Rezultati su pokazali da postoji značajan gradijent rizika između grupa ($p_{\text{trend}} < 0,001$). U poređenju sa referentnom grupom (grupa niskog rizika), rizik za cirozu je bio 2,7 puta veći u grupi umerenog rizika ($p = 0,004$) i 6,56 puta veći u grupi visokog rizika ($p < 0,001$).

U daljoj analizi smo pomoću ROC analize ispitali koliku moć diskriminacije između bolesnika i kontrolnih ispitanika ima PRS koji je uključio pet analiziranih varijanti. Rezultati ROC analize pokazuju da postoji 70,5% verovatnoća da će ispitanik sa ACJ imati veći PRS u poređenju sa osobom iz opšte populacije ($AUC = 0,705 \pm 0,033$). To ukazuje da PRS koji uključuje pet analiziranih varijanti diskriminiše bolesne i zdrave ispitanike ($p < 0,001$). Za graničnu vrednost u ovoj analizi odabrana je vrednost od 0,418 koja je imala najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti. Interna validacija sprovedena na 1000 ponovljenih uzorkovanja dala je AUC korigovanu za optimizam od 0,685. Nagib kalibracije od 1,03 i Hosmer–Lemešov test adekvatnosti modela ukazali su na odlično poklapanje između predviđenog i posmatranog rizika.

PRS koji je uključio pet analiziranih varijanti je pokazao nešto veću diskriminatornu moć ($AUC = 0,705$) u odnosu na model sa dve varijante ($AUC = 0,684$). Međutim, ova razlika nije bila značajna ($p = 0,654$). Uzeti zajedno, ovi nalazi sugerišu da model sa pet varijanti zadržava visoku stabilnost uz trend poboljšanja diskriminacije.

4.5. Analiza delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena

Za direktnu detekciju delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena korišćena je multipleks PCR metoda. Genotipizacija je urađena za 114 bolesnika sa alkoholnom cirozom i 80 osoba iz kontrolne grupe. Zbog visoke učestalosti ovih delecija u opštoj populaciji, rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja pridodati su i rezultati za 182 ispitanika koji su dobijeni u prethodnom istraživanju u

istoj laboratoriji, istom metodom¹³¹. Demografske karakteristike ispitanika su prikazane u Tabeli 14.

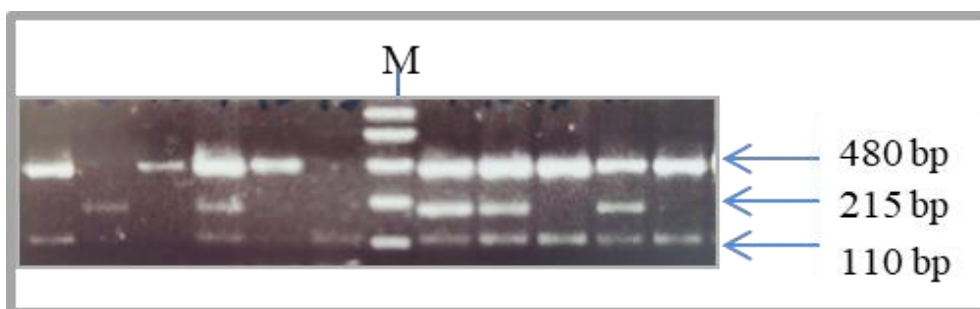
Tabela 14. Demografske karakteristike ispitanika kojima su određivani *GSTM1* i *GSTT1* genotipovi

	Bolesnici N=114	Kontrolna grupa N=262	p
Pol, N (%)			0,794 ^a
ženski	12 (10,5)	30 (11,5)	
muški	102 (89,5)	232 (88,5)	
Starost (godine), srednja vrednost ± SD	58,23 ± 9,1	58,56 ± 8,5	0,736 ^b

N – broj ispitanika; p – verovatnoća; SD – standardna devijacija. Testovi koji su korišćeni za testiranje razlika među grupama: ^a Pirsonov χ^2 test; ^b Studentov t–test

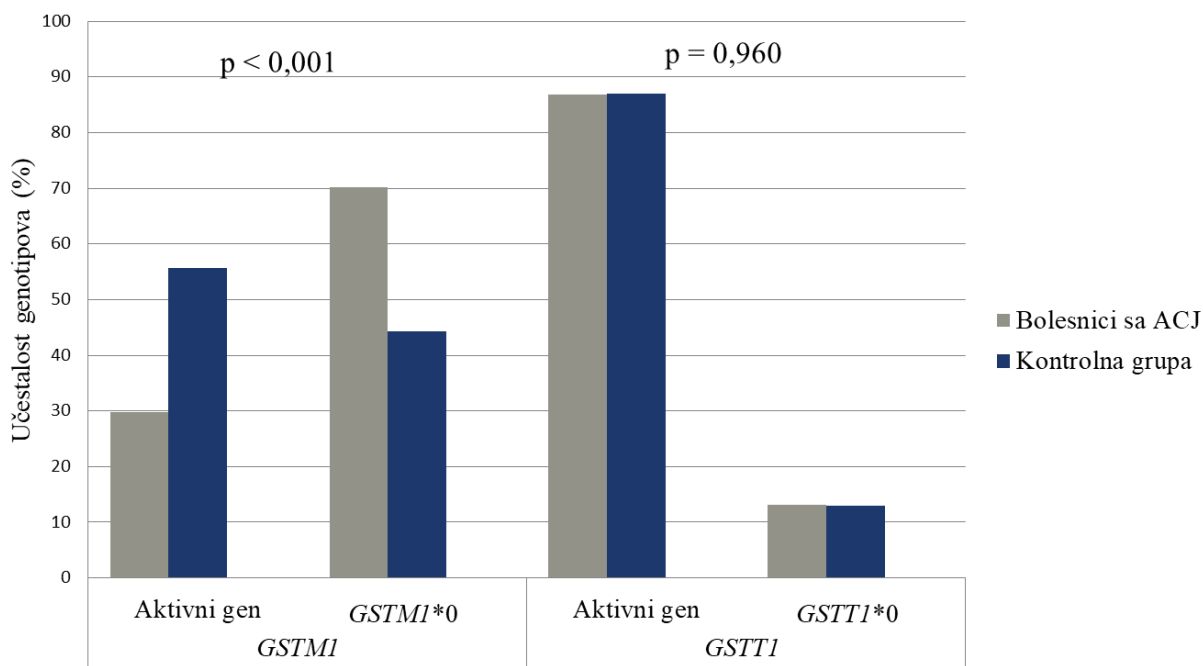
U ovo istraživanje je bilo uključeno osam puta više muškaraca nego žena. Prosečna starost ispitanika u grupi bolesnika je bila 58,23 godine, a u kontrolnoj grupi 58,56. Nije bilo značajne razlike između grupa po pitanju udela polova i starosti ispitanika ($\chi^2(1, N = 376) = 0,068$; $p = 0,794$; $t(374) = 0,338$, $p = 0,736$) (Tabela 14.).

Na Slici 14. su prikazani profili fragmenata nakon digestije restrikcionim enzimima.



Slika 14. Detekcija delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena multipleks PCR metodom. Prisustvo amplifikata od 480 bp označava da je *GSTT1* gen prisutan, amplifikat od 215 bp označava prisustvo *GSTM1* gena, a amplifikat od 110 bp odgovara delu gena za β -globin i služi kao kontrola uspešnosti PCR-a. Za procenu dužine DNK produkata korišćen je DNK marker (M) sa rasponom od 100–2000 bp (*Easy Ladder*TM, *Bioline*, UK).

Distribucija *GSTM1* i *GSTT1* genotipova po grupama prikazana je na Slici 15. Da bismo ispitali da li ovi genotipovi doprinose riziku za pojavu ACJ izračunali smo količnik verovatnoće, OR i njegov 95% interval poverenja koristeći binarnu logističku regresiju. OR je korigovan za pol i godine ispitanika (Tabela 15).



Slika 15. Učestalost analiziranih *GSTM1* i *GSTT1* genotipova u ACJ i kontrolnoj grupi. Aktivni gen se odnosi na bar jednu kopiju gena; *0 se odnosi na deleciju obe kopije gena. Razlike u učestalosti su testirane Pirsonovim χ^2 testom, $p < 0,005$ se smatra značajnim.

GSTM1 delecioni genotip (*GSTM1**0) je prisutan kod čak 70,2% bolesnika sa alkoholnom cirozom jetre, dok je u kontrolnoj grupi bio prisutan kod 44,3% ispitanika. Ova razlika u distribuciji je bila značajna ($\chi^2(1, N = 376) = 21,354, p < 0,001$). Nosioци ovog genotipa su imali skoro tri puta veću šansu da razviju ACJ u odnosu na ispitanike koji imaju makar jednu kopiju ovog gena (OR = 2,996; 95% CI = 1,85-4,74, $p < 0,0001$). Distribucija *GSTT1**0 genotipa je bila ujednačena između bolesnih i zdravih ispitanika (13,2 naspram 13,0%; $\chi^2(1, N = 376) = 0,002, p = 0,960$), bez rizika od oboljevanja za nosioce *GSTT1**0 (OR = 1,02, 95% CI = 0,53–1,95). Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Asocijacija *GSTM1* i *GSTT1* genotipova sa rizikom za ACJ

Gen / genotip	OR*	95% CI	p
<i>GSTM1</i>			
aktivni ("++" ili "+/-")	standard		
<i>GSTM1</i> *0 ("--")	2,996	1,87–4,81	<0,001
<i>GSTT1</i>			
aktivni ("++" ili "+/-")	standard		
<i>GSTT1</i> *0 ("--")	1,02	0,53–1,96	0,95

*Količnik verovatnoće (OR) je korigovan za pol i godine.

Aktivni se odnosi na bar jednu kopiju gena; *0 se odnosi na deleciju obe kopije gena. N – broj ispitanika; OR – količnik verovatnoće; 95%CI – 95% interval poverenja za količnik verovatnoće; p – verovatnoća.

4.5.1. Analiza kombinovanih *GSTM1* i *GSTT1* genotipova

Na osnovu broja aktivnih gena podelili smo ispitanike u tri grupe: na one koje imaju 2 aktivna gena (nosioci aktivnog genotipa i u *GSTM1* i *GSTT1*), one koje imaju jedan aktivan gen (nosioci aktivnog genotipa u jednoj od dve ispitivane varijante) i grupu bez aktivnog gena (sa delecijama i *GSTM1* i *GSTT1* gena). Osobe sa jednim aktivnim genom su imale dva puta veći rizik za cirozu u odnosu na one kod kojih nisu detektovane delecije ($p = 0,007$), dok su nosioci duple delecije bili u 11 puta većem riziku za cirozu ($p < 0,001$). Rezultati su prezentovani u Tabeli 16.

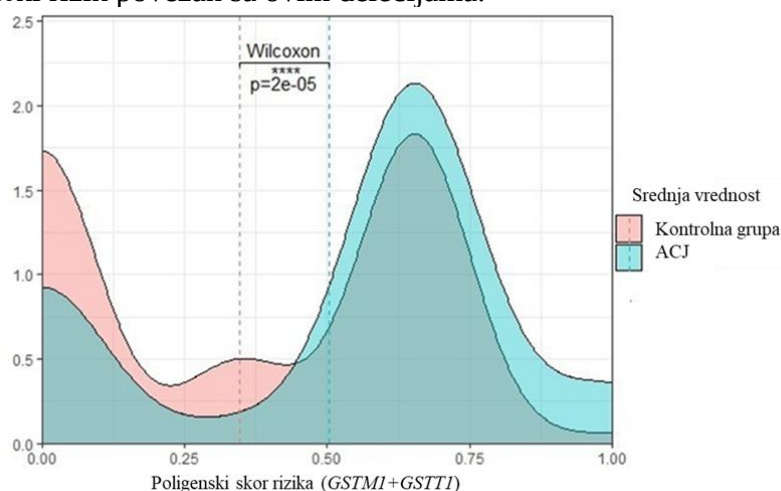
Tabela 16. Asocijacija kombinovanih *GSTM1* i *GSTT1* genotipova sa rizikom za ACJ

Broj aktivnih gena (<i>GSTM1/GSTT1</i>)	OR*	95% CI	p
2	standard		
1	1,97	1,22–3,23	0,007
0	11,21	3,30–38,14	<0,001

*Količnik verovatnoće (OR) je korigovan za pol i godine

2 aktivna gena se odnosi na nosioce "+/+" ili "+/-" genotipa u obe ispitivane varijante (i *GSTM1* i *GSTT1*), 1 aktivni gen se odnosi na individue kod kojih je detektovana delecija u jednoj od varijanti, 0 aktivnih gena se odnosi na duplu deleciju ("--" genotip u obe varijante). Skraćenice: OR – količnik verovatnoće; 95%CI – 95% interval poverenja za količnik verovatnoće; p – verovatnoća.

Rizik za ACJ, kad je u pitanju kombinacija *GST* delecija je analiziran i konstrukcijom PRS-a. Analizirane varijante ocenjene su vrednostima 0 i 1 (vrednost 1 dodeljena u slučaju delecije, a vrednost 0 nosiocima aktivnog gena) i zatim su ocene pojedinačnih genotipova pomnožene sa β vrednostima dobijenim iz studije asocijacije. Srednja vrednosti PRS-a je bila značajno viša u grupi bolesnika sa ACJ ($0,50 \pm 0,33$) u odnosu na kontrolnu grupu ($0,35 \pm 0,31$). Skorovi između grupe obolelih i kontrolne grupe su poređeni *Wilcoxon* testom. Distribucija PRS-ova se značajno razlikovala između grupa ($p = 2 \times 10^{-5}$). ACJ grupa je pokazala pomeranje udesno ka višim vrednostima PRS-a u poređenju sa ispitanicima iz kontrolne grupe, što ukazuje na povećan kumulativni genetički rizik povezan sa ovim delecijama.



Slika 16. Distribucija PRS-a *GSTM1* + *GSTT1* delecija između kontrolne i ACJ grupe. Bolesnici sa ACJ (plavo) su imali značajno više vrednosti PRS-a nego ispitanici iz kontrolne grupe (roze) (*Wilcoxon* test, $p = 2 \times 10^{-5}$). Na x-osi su prikazane vrednosti PRS-a (0–1), na y-osi gustina, isprekidane linije označavaju srednje vrednosti za svaku grupu.

4.6. Analiza asocijacija genotipova sa anamnestičkim, biohemijskim i kliničkim podacima

U daljoj analizi ispitali smo povezanost genetičkih varijanti sa OKA, laboratorijskim i kliničkim podacima. Bolesnici su podeljeni u grupe na osnovu genotipova za svaku analiziranu varijantu posebno.

4.6.1. Obrasci konzumiranja alkohola

Prosečna dnevna količina unetog alkohola značajno se razlikovala u zavisnosti od genotipa *PNPLA3*, pri čemu su nosioci CC genotipa konzumirali najveće količine alkohola u poređenju sa nosiocima CG i GG genotipa ($\chi^2(2) = 12,734$, $p = 0,002$). Ova razlika je ostala značajna i nakon B-H korekcije za višestruko testiranje.

Bolesnici sa aktivnim *GSTM1* genom, kao i nosioci dva aktivna gena (*GSTM1* i *GSTT1*) su konzumirali značajno veću količinu alkohola u poređenju sa bolesnicima sa deletiranim *GSTM1* genom kao i sa onima sa jednim ili dva deletirana gena ($U = 985$, $p = 0,019$ i $\chi^2(2) = 7,436$, $p = 0,024$).

Vreme u kom su bolesnici konzumirali velike količine alkohola bilo je značajno duže kod bolesnika sa delecijom *GSTT1* gena u poređenju sa onima koji su imali bar jednu kopiju ovog gena ($t(112) = 2,786$, $p = 0,006$). U pogledu vrste pića, nosioci *GSTM1* aktivnog genotipa češće su konzumirali pivo nego nosioci *GSTM1*0* genotipa ($\chi^2(1, N = 114) = 4,778$; $p = 0,029$).

Starost pri započinjanju konzumacije alkohola bila je slična u svim grupama. Za *CYP2E1*, *TNF- α* i *TM6SF2* varijante nije bilo razlika u obrascima konzumiranja alkohola.

Tabela 17. Obrasci konzumiranja alkohola obolelih od ACJ u zavisnosti od genotipova

Varijanta	Genotip	Starost pri početku konzumiranja	Godine aktivne konzumacije (SD)	Količina alkohola (g/dan)	Vrsta pića		
					pivo	vino	žestoka pića
<i>PNPLA3</i>	CC	23,5 (19,2-30)	35,1 (11,2)	80 (60-100)	29 (72,5)	9 (22,5)	32 (80)
c.444C>G	CG	23 (19-28)	33,7 (11)	60 (37-75)	33 (67,3)	10 (20,4)	34 (69,9)
(rs738409)	GG	21 (18-25)	35 (11)	74 (48-100)	20 (69)	6 (20,7)	21 (72,4)
p		0,446	0,774	0,002*	0,766	0,969	0,518
<i>TM6SF2</i>	CC	22 (19-27,5)	34,6 (10,6)	72 (48-90)	57 (70,4)	21 (25,9)	61 (75,3)
c.499C>T	CT+TT	25 (18,5-30)	34,5 (12)	70 (51,5-95)	27 (73)	4 (10,8)	26 (70,3)
(rs58542926)							
p		0,541	0,953	0,702	0,722	0,088	0,564
<i>CYP2E1</i>	c1/c1	23 (19-30)	34,5 (11,1)	72 (60-99)	68 (70,8)	22 (22,9)	72 (75)
c.-1054C>T	c1/c2	20,5 (18-30)	34,9 (11,7)	74,5 (39-85,5)	16 (72,7)	3 (13,6)	15 (68,2)
(rs2031920)							
p		0,455	0,881	0,555	0,860	0,402	0,512
<i>TNF-α -238</i>	GG	22 (19-30)	34,9 (11,1)	72 (55-90)	67 (70,5)	19 (20)	71 (74,7)
c.-238G>A	GA+AA	21 (19-30)	33,2 (11,9)	60 (40-90)	17 (73,9)	6 (26,1)	16 (69,6)
(rs361525)							
p		0,83	0,52	0,697	0,748	0,522	0,613
<i>TNF-α -308</i>	GG	21 (19-25,8)	34,7 (11,6)	72 (51-99)	62 (73,8)	17 (20,2)	64 (76,2)
c.-308G>A	GA+AA	34,7 (10,2)	34,3 (10,2)	73 (39-84)	22(64,7)	8 (23,5)	23 (67,6)
(rs1800629)							
p		0,155	0,894	0,572	0,323	0,692	0,340
<i>GSTM1</i>	aktivni	22,5 (19-26,5)	35,2 (10,5)	82,5(60-114)	29 (85,3)	7 (20,6)	27 (79,4)
rs366631	<i>GSTM1</i> *0	22,5 (18-30)	34,3 (9,8)	68,5 (50-83)	52 (65)	17 (21,3)	60 (75)
p		0,78	0,63	0,019	0,029	0,937	0,612
<i>GSTT1</i>	aktivni	22 (19-30)	33,6 (9,8)	72 (60-90)	72 (72,7)	20 (20,2)	74 (74,7)
rs17856199	<i>GSTT1</i> *0	23 (18-26)	41,1 (8,7)	60 (48-96)	9 (60)	4 (26,7)	13 (86,7)
p		0,970	0,006	0,664	0,311	0,516	0,312
<i>GSTM1/</i>	2	22,5 (19-26,3)	34,4 (10,2)	95(60-115,5)	25 (83,3)	6 (20)	25 (83,3)
<i>GSTT1</i>	1	22 (18-30)	33,8 (10)	72 (51,5-80)	51 (69,9)	15 (20,5)	51 (69,9)
	0	23 (18-30)	40,7 (7,8)	60 (48-100)	5 (45,5)	3 (27,3)	11 (100)
p		0,967	0,093	0,024	0,056	0,866	0,052

Kategorijske promenljive su predstavljene kao brojnost (%), kontinuirane promenljive su predstavljene u zavisnosti od raspodele koju imaju kao srednja vrednost ($\pm$ SD) za promenljive sa normalnom raspodelom ili kao medijana (opseg) za promenljive čija raspodela odstupa od normalne. Brojevi 2, 1 i 0 se odnose na broj aktivnih gena u kombinovanim genotipovima *GSTM1/GSTT1*. Razlike između grupa testirane su χ^2 testom i Fišerovim egzaktnim testom (za kategorijske varijable), za kontinuirane varijable korišćeni su Studentov t-test i ANOVA, Man-Vitnijev U test i Kruškal-Volis test (za poređenja između genotipova *PNPLA3* i u slučaju kombinovanog genotipa *GSTM1/GSTT1*). Posle *Benjamini-Hochberg* korekcije za višestruko testiranje sa FDR = 10% jedino je p* ostala značajna.

Skraćenice: SD - standardna devijacija, FDR (eng. *false discovery rate*)- procenat lažnih otkrića.

4.6.2. Biohemijski parametri

U daljoj analizi ispitali smo povezanost genotipova analiziranih genetičkih varijanti sa biohemijskim laboratorijskim nalazima.

Tabela 18. Biohemijski parametri poređeni između genotipova

Varijanta	Genotip	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	GGT IU/L	Albumini g/L	Bilirubin μmol/L	INR
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	CC	63 (36,8-119)	30,5 (21,3-41,5)	120,5 (78,3-157)	141 (71-226)	29 (26-32,8)	42,7 (22,4-88,4)	1,5 (1,3-1,8)
	CG	59 (41-100)	35 (22,5-57,5)	110 (79,5-154,5)	120 (54,5-301,8)	27 (25-32,5)	43,8 (20,2-111,4)	1,5 (1,3-1,7)
	GG	84 (51,5-127)	47 (32-72)	115 (76-171,5)	131 (84-392)	27 (24-32)	40,8 (21,3-90,5)	1,4 (1,3-1,8)
p		0,277	0,017	0,958	0,555	0,465	0,907	0,897
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	CC	66 (42-111,5)	36 (22-50)	122 (81,5-159,5)	124 (70,5-249)	28 (24,5-34,5)	40,8 (22,2-90)	1,4 (1,3-1,7)
	CT+TT	69 (43-119)	36 (22,5-58,5)	106 (74-155,5)	135 (62,5-296)	27 (24,5-34,5)	51,4 (20,3-94,5)	1,5 (1,2-1,8)
	p	0,717	0,587	0,483	0,778	0,958	0,715	0,477
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	c1/c1	70 (45,3-112)	36 (24-53,3)	117 (81,3-157,5)	127,5 (68,5-297,3)	27 (24-31)	44,45 (25,9-96,6)	1,5 (1,3-1,8)
	c1/c2	47,5 (30,5-117)	36 (15,5-62,3)	117 (76,3-157,8)	144 (73-231,5)	32 (27-37,3)	23,5 (16,7-87,3)	1,4 (1,1-1,7)
	p	0,224	0,868	0,967	0,844	0,015	0,029	0,061
<i>TNF-α</i> -238 c.-238G>A (rs361525)	GG	66 (42-102)	35 (24-51)	117 (82-150)	121 (67-253)	27 (24-32)	43,6 (21,1-90,1)	1,5 (1,3-1,7)
	GA+AA	97 (44-135)	39 (14-58)	126 (74-175)	163 (95-292)	29 (27-35)	43,9 (25,8-121)	1,5 (1,3-1,8)
	p	0,311	0,962	0,476	0,167	0,052	0,285	0,432
<i>TNF-α</i> -308 c.-308G>A (rs1800629)	GG	67 (44-101)	35 (24-44,8)	120 (81,3-157,3)	124,5 (67,3-225,4)	27 (24-30)	43,9 (22,1-93,6)	1,5 (1,3-1,8)
	GA+AA	70,5 (39,5-151,3)	41 (18,8-70,5)	106 (77,8-157,3)	44,5 (77-443,8)	31,5 (26-37)	38,6 (20,1-88,9)	1,5 (1,2-1,8)
	p	0,304	0,255	0,787	0,249	0,007	0,456	0,835
<i>GSTM1</i> (rs366631)	aktivni	73 (34,7-98,3)	28 (19,7-42)	106,5 (78,5-132,3)	142,5 (57,7-224,7)	27 (23,7-30,5)	37,5 (20,1-70,3)	1,5 (1,3-1,8)
	<i>GSTM1</i> * 0	68,5 (45-121,5)	36 (24-55,7)	126 (86,7-165,3)	123 (74,8-297,3)	28 (25-32)	51,9 (22,7-97,9)	1,5 (1,3-1,8)
	P	0,354	0,099	0,101	0,649	0,436	0,136	0,781
<i>GSTT1</i> (rs17856199)	aktivni	72 (45-116)	36 (23-51)	118 (84-158)	125 (71-292)	27 (24-31)	48,4 (23,5-96,3)	1,5 (1,3-1,8)
	<i>GSTT1</i> *0	44 (29-102)	25 (19-42)	126 (74-163)	154 (47-227)	30 (25-36)	25,8 (18,3-49,4)	1,4 (1,3-1,6)
	p	0,095	0,215	0,844	0,844	0,190	0,112	0,131
<i>GSTM1/GSTT1</i>	2	82 (43-99,5)	33 (20-42,8)	106,5 (75,8-132,3)	142,5 (58,8-239,5)	26,5 (23,8-30,5)	38,8 (24,2-84,5)	1,5 (1,3-1,8)
	1	66 (43,5-121)	35 (22,5-57,5)	124 (93-166,5)	122 (75-295,5)	28 (25-31)	52,4 (22-98)	1,5 (1,3-1,8)
	0	58 (38-120)	36 (20-54)	129 (56-163)	197 (47-253)	32 (25-36)	32,2 (22,8-92,3)	1,5 (1,3-1,6)
p		0,963	0,775	0,133	0,970	0,370	0,627	0,664

Promenljive su predstavljene kao medijana (opseg). Razlike između grupa testirane su Man-Vitnijevim U testom i Kruškal-Voliss testom (za poređenja između genotipova *PNPLA3* i u slučaju kombinovanog genotipa *GSTM1/GSTT1*). Brojevi 2, 1 i 0 se odnose na broj aktivnih gena u kombinovanim genotipovima *GSTM1/GSTT1*. Nakon korekcije za višestruko testiranje (*Benjamini-Hochberg*), nijedna razlika nije ostala statistički značajna. Skraćenice: IU/L – interancionalna jedinica/l; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama glutamil transferaza; INR – inernacionalni normalizovani odnos.

Uočena je tendencija porasta vrednosti ALT sa povećanjem broja G alela *PNPLA3* gena ($p = 0,017; \eta^2 = 0,053$), što ukazuje na mali do umereni efekat, ali ova razlika nije ostala statistički značajna nakon Benjamini-Hochberg korekcije.

Nivoi serumskog albumina bili su viši kod nosilaca *CYP2E1* c1/c2 genotipa ($U = 0,760, p = 0,015$) u odnosu na nosioce c1/c1 genotipa, Klifova delta je ukazala na umereni negativan efekat ($\delta = -0,33; 95\% \text{ CI} = 0,58, -0,06$). Takođe su i nosioci *TNF- α* -308 GA ili AA genotipa imali povišen nivo serumskih albumina ($U = 973, p = 0,0068$); veličina efekta je bila umerena sa Klifovom deltom $\delta = -0,32$ ($95\% \text{ CI} = -0,54, -0,09$). Nosioci A alela *TNF- α* -238 su takođe imali viši nivo albumina, samo što je razlika bila na granici značajnosti ($U = 807,5, p = 0,052$). Klifova delta je ukazala na umereni efekat ($\delta = -0,26; 95\% \text{ CI} = -0,49, -0,01$).

Nivoi ukupnog bilirubina bili su viši kod nosilaca *CYP2E1* c1/c1 genotipa ($U = 1371, p = 0,029$), sa umerenom veličinom efekta (Klifova $\delta = 0,30; 95\% \text{ CI} = 0,018-0,566$).

Sve testirane razlike imale su mali do umereni efekat. Međutim, nakon korekcije za višestruko testiranje, nijedna od navedenih razlika nije ostala statistički značajna. Ostali laboratorijski parametri se nisu značajno razlikovali između genotipskih podgrupa.

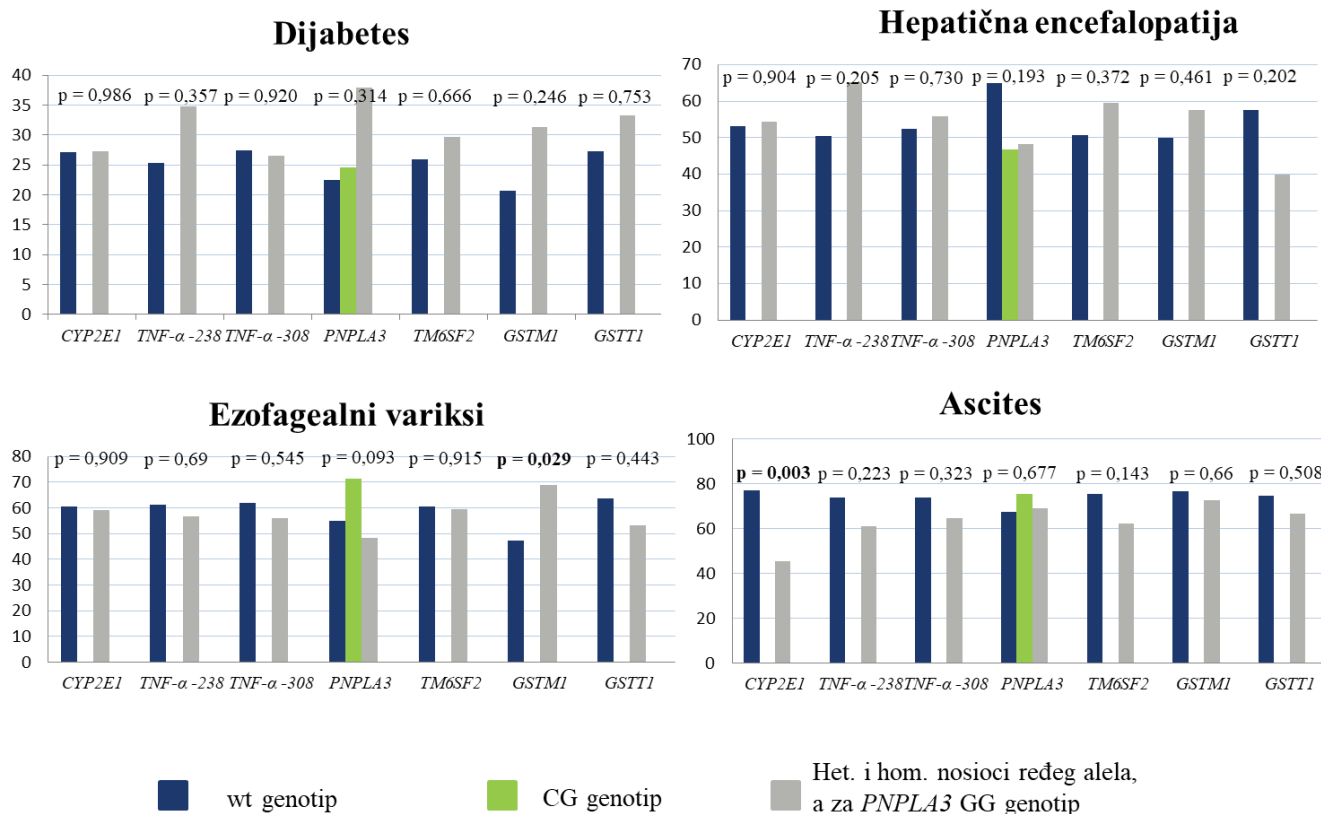
4.6.3. Kliničke karakteristike

Analizom povezanosti kliničkih karakteristika sa genotipovima varijanti obuhvaćenim ovim istraživanjem dobijeni su rezultati prikazani na Slici 17. Nije bilo značajne razlike u prisustvu dijabetesa i encefalopatije između genotipskih podgrupa.

Prisutna je korelacija između *GSTM1**0 genotipa sa težinom portne hipertenzije indirektno procenjene kroz stepen težine varikoziteta jednjaka ($\chi^2(1, N = 114) = 4,779, p = 0,029$). Ova razlika nije ostala značajna posle Benjamini-Hochberg korekcije za višestruka testiranja.

Kod nosilaca c1/c1 genotipa *CYP2E1* je češće registrovan ascites u poređenju sa nosiocima c1/c2 genotipa ($\chi^2(1, N = 118) = 8,729; p = 0,003$).

Za ostale varijante nisu uočene razlike u kliničkim karakteristikama između podgrupa.



Slika 17. Kliničke karakteristike bolesnika sa ACJ u odnosu na genotipove analiziranih varijanti. Za sve varijante testiran je dominantni model nasleđivanja, osim u slučaju *PNPLA3*, gde je testiran aditivni model nasleđivanja. Na y-osi predstavljen je procenat bolesnika određenog genotipa kod kojih je prisutna odgovarajuća klinička karakteristika. Posle *Benjamini-Hochberg* korekcije sa FDR=10%, samo je vrednost $p = 0,003$ ostala značajna. Skraćenice: wt – wild type, het – heterozigot, hom – homozigot.

4.7. Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na težinu bolesti

Većina bolesnika (84,7 %) uključenih u ovu studiju imala je dekompenzovanu cirozu jetre (*Child Pugh* B i C). Karakteristike bolesnika u odnosu na težinu bolesti su prikazane u Tabeli 19. Nije bilo značajne razlike u težini CP skora u odnosu na pol i starost pacijenata.

Nije bilo razlike u karakteristikama vezanim za konzumiranje alkohola između grupa. U našoj kohorti nismo utvrdili da količina alkohola, dužina ili uzrast kada je započeta konzumacija kao ni vrsta preferiranog alkoholnog pića značajno utiču na progresiju ciroze.

Analizom biohemijskih parametara uočene su određene razlike između grupa. Bolesnici sa dekompenzovanom cirozom (CP skor B ili C) imali su značajno niže vrednosti alanin-aminotransferaza u odnosu na bolesnike klasifikovane u CP A ($U = 637$, $p = 0,049$), kao i značajno više vrednosti alkalne fosfataze ($U = 445$, $p = 0,001$). Nakon *Benjamini-Hochberg* korekcije razlika u nivou ALT nije ostala značajna. Nije uočena značajna razlika u vrednostima AST i GGT. Prisustvo dijabetesa nije uticalo na težinu ciroze.

Genotip c1/c2 *CYP2E1* je bio češće prisutan u grupi bolesnika sa kompenzovanom u odnosu na bolesnike sa dekompenzovanom cirozom ($\chi^2(1, N = 118) = 9,321$; $p = 0,002$). Genotip *GSTT1**0 je bio češće zastupljen u grupi bolesnika sa kompenzovanom cirozom, iako razlika u učestalosti nije bila značajna ($p = 0,088$). Raspodela genotipova varijanti *PNPLA3*, *TM6SF2*, *TNF- α* -238 i -308 i *GSTM1* bila je ujednačena u obe grupe.

Tabela 19. Karakteristike bolesnika sa ACJ u odnosu na težinu bolesti

Karakteristike		CP klasa B i C	CP klasa A	p
pol muški/ženski		89 (89)/11 (11)	15 (83,3)/3 (16,7)	0,447
starost pri dijagnozi ACJ, godine		58,8 $\pm$ 9,3	57,5 $\pm$ 11,1	0,581
Obrasci konzumiranja alkohola				
starost pri početku konzumiranja, godine		23 (19-28,3)	23,5 (18-31)	0,406
godine aktivne konzumacije alkohola		35,1 $\pm$ 10,5	31,3 $\pm$ 13,1	0,172
prosečna dnevna konzumacija etanola (g)		72 (60-90)	75,5 (35,3-97,5)	0,522
pivo		72 (72)	10 (62,5)	0,438
vrsta alkoholnog pića vino		23 (23)	2 (12,5)	0,517
žestoka pića		73 (73)	14 (87,5)	0,214
Biohemijski parametri funkcije jetre				
AST (IU/L)		71,5 (45-111,7)	45,5 (29,7-127,5)	0,221
ALT(IU/L)		35 (22,3-46,5)	56 (21,5-73,3)	0,049
ALP (IU/L)		122,5 (88,3-161)	72,5 (64-109,3)	0,001
GGT(IU/L)		124,5 (70,3-275,8)	169 (53-311,5)	0,881
Kliničke karakteristike				
dijabetes		28 (28)	4 (22,2)	0,776
Genetičke varijante				
<i>PNPLA3</i>				
c.444C>G	CC/CG/GG	34 (34)/42 (42)/24 (24)	6(33,3)/7 (38,9)/5 (27,8)	0,939
(rs738409)				
<i>TM6SF2</i>				
c.499C>T	CC/CT+TT	70 (70)/30 (30)	11 (61,1)/7 (38,9)	0,454
(rs58542926)				
<i>CYP2E1</i>				
c.-1054C>T	(c1/c1)/(c1/c2)	86 (86)/14 (14)	10 (55,6)/8 (44,4)	0,002
(rs2031920)				
<i>TNF-α</i> -238				
c.-238G>A	GG/GA+AA	81 (81)/19 (19)	14 (77,8)/4 (22,2)	0,751
(rs361525)				
<i>TNF-α</i> -308				
c.-308G>A	GG/GA+AA	74 (74)/26 (26)	10 (55,6)/8 (44,4)	0,112
(rs1800629)				
<i>GSTM1</i>				
(rs366631)	aktivni/ <i>GSTM1</i> *0	31 (31)/69 (69)	3 (21,4)/11 (61,1)	0,549
<i>GSTT1</i>				
(rs17856199)	aktivni/ <i>GSTT1</i> *0	89 (89)/11 (11)	10 (71,4)/4 (28,6)	0,088*

Kategorijske promenljive su predstavljene kao brojnost (%), kontinuirane promenljive su predstavljene u zavisnosti od raspodele koju imaju kao srednja vrednost $\pm$ SD (za promenljive sa normalnom raspodelom) ili kao medijana (opseg) za promenljive čija raspodela odstupa od normalne. Razlike između grupa su testirane χ^2 testom ili Fišerovim egzaktnim testom za kategorijske varijable (obeleženi sa *) u slučajevima retkih genotipova i Studentovim t-testom ili Man–Vitnijevim U testom za kontinuirane varijable. Naznačene p vrednosti su ostale značajne i posle B-H korekcije sa FDR=5% i FDR=10%.

Skraćenice: SD – standardna devijacija; IU/L – internacionalna jedinica/l; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama glutamil transferaza; INR – internacionalni normalizovani odnos.

Na osnovu navedenih rezultata odabrane su varijable koje su korišćene u multivarijabilnom modelu za predikciju dekompenzacije, a to su prisustvo c1/c2 genotipa *CYP2E1*, koncentracije enzima ALT i ALP. U multivarijabilni model smo uključili i godine bolesnika, pol, dnevni unos alkohola i godine starosti u kojima je bolesnik počeo da konzumira alkohol zbog njihove potencijalne uloge kao „zbunjujućih“ (eng. *confounding*) faktora.

Multivarijabilna regresiona analiza (Tabela 20) je pokazala da su nosioci c1/c2 genotipa u značajno manjem riziku od dekompenzacije (OR = 0,118; 95% CI = 0,028-0,509; p = 0,004). S druge strane rizik za teže oblike bolesti bio je povezan sa nižim vrednostima ALT (OR = 0,977; 95% CI = 0,958-0,996; p = 0,017) i višim vrednostima ALP (OR = 1,021; 95% CI = 1,004-1,038; p = 0,017).

Tabela 20. Prediktori težine ciroze jetre

Parametar	OR*	95 % CI	p
<i>CYP2E1</i> (c1/c2 vs. c1/c1)	0,118	0,028-0,509	0,004
ALT	0,977	0,958-0,996	0,017
ALP	1,021	1,004-1,038	0,017

*OR je kontrolisan za pol, godine starosti, dnevnu konzumaciju alkohola i godine aktivne konzumacije. Nakon B-H korekcije sa FDR = 5% ostaje značajna samo vrednost p = 0,004 koja se odnosi na c1/c2 genotip *CYP2E1*, a sa FDR=10% sve tri p vrednosti zadržavaju značajnost. Skraćenice: OR – količnik verovatnoće, 95 % CI – 95 % interval poverenja, p – verovatnoća, ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza

4.7.1. Faktori rizika i prediktori maligne alteracije kod bolesnika sa ACJ

Kod 10 bolesnika je došlo do progresije bolesti i razvili su HCC. Osim ovih 10 bolesnika sa HCC-om, kod još osam bolesnika su dijagnostikovana različita maligna obolenja: karcinom debelog creva je dijagnostikovano kod dva bolesnika, kod dva je dijagnostikovano karcinom rektuma, kod jednog bolesnika je dijagnostikovano karcinom pankreasa, kod jednog karcinom pluća, jednog tumor nadbubrežnih žlezda i jednog karcinom kostiju.

U daljoj analizi procenjen je uticaj demografskih, OKA, genetičkih i kliničkih faktora na dalju progresiju bolesti, odnosno pojavu maligne alteracije. Poređeni su bolesnici kod kojih je došlo do razvoja HCC i onih kod kojih nije zabeležen HCC (pregled karakteristika je prikazan u Tabeli 21). HCC je dijagnostikovano kod 10 bolesnika. Nije prisutna korelacija između analiziranih demografskih, OKA i kliničkih parametara i HCC.

Tabela 21. Karakteristike bolesnika sa HCC i bolesnika sa ACJ bez HCC

	HCC N=10	ALC bez HCC N=108	p
pol muški/ženski, N (%)	9 (90)/1 (10)	95(88)/13 (12)	1,000
starost pri dijagnozi ALC, godine ± SD	61,07±6,6	58,42± 9,8	0,407
Obrasci konzumiranja alkohola			
starost pri početku konzumiranja, godine	20 (18,5-30)	23 (19-30)	0,634
godine aktivne konzumacije alkohola	37,3±6,5	34,3±11,3	0,223
prosečna dnevna konzumacija etanola (g)	77,5 (55-122,75)	72 (53,3-90)	0,292
vrsta alkoholnog pića	pivo	75 (69,4)	1,000
	vino	24 (22,2)	0,687
	žestoka pića	80 (74,1)	0,709
Biohemijski parametri funkcije jetre			
AST (IU/l)	68,5 (36-88,3)	68,5 (44,3-119)	0,384
ALT(IU/l)	44,5 (23,5-81)	35 (22-52,7)	0,277
ALP (IU/l)	120,5 (96,5-140,3)	116 (77-157,5)	0,514
GGT(IU/l)	151 (62,7-276,5)	124,5 (70,3-277,8)	0,889
albumin (g/l)	28 (20-32,7)	28 (25-32,8)	0,667
bilirubin (μmol/l)	32,9 (17,3-44,1)	45,9 (21,5-92,2)	0,143
INR	1,37 (1,18-1,54)	1,5 (1,3-1,8)	0,144
Kliničke karakteristike			
dijabetes N (%)	4 (40)	28 (25,9)	0,456
Child-Pugh klasa	A, N (%)	16 (14,8)	0,649
	B, N (%)	42 (38,9)	0,492
	C, N (%)	50 (46,3)	0,509
ascites	6 (60)	78 (72,2)	0,471
ezofagealni variksi	5 (50)	66 (61,1)	0,492
hepatična encefalopatija	6 (60)	57 (52,8)	0,749

Kategorijske promjenljive su predstavljene kao brojnost (%), kontinuirane promjenljive su predstavljene u zavisnosti od raspodele koju imaju kao srednja vrednost ± SD (za promjenljive sa normalnom raspodelom) ili kao medijana (opseg) za promjenljive čija raspodela odstupa od normalne. Razlike između grupa su testirane χ^2 testom ili Fišerovim egzaktnim testom za kategorijske varijable i Studentovim t-testom ili Man-Vitnijevim U testom za kontinuirane varijable.

Skraćenice: N – broj ispitanika; SD – standardna devijacija; IU/l – interancionalna jedinica/l; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama glutamil transferaza; INR – internacionalni normalizovani odnos.

U slučaju testiranih genetičkih varijanti, prisutna je razlika u distribuciji G alela *PNPLA3* gena, koji je prisutan kod 70% bolesnika sa HCC u odnosu na 43% bolesnika kod kojih nije došlo do progresije ACJ do HCC, ova razlika je bila značajna ($\chi^2(1, N = 236) = 5,362$; $p = 0,021$), dok u distribuciji genotipova nije bilo razlike između grupa ($\chi^2(2, N = 118) = 4,721$; $p = 0,094$). Takođe je značajna razlika u distribuciji *GSTM1*0* genotipa, koji je bio češći kod bolesnika bez HCC ($p = 0,007$). Distribucija kombinovanih genotipova *GSTM1/GSTT1* gena se razlikovala između poređenih grupa

($\chi^2(2, N = 114) = 6,773$; $p = 0,034$). Distribucija genotipova i alela ostalih analiziranih gena se nije razlikovala između ovih grupa. Učestalosti genotipova i alela kod bolesnika sa HCC i bez HCC-a su prikazane u Tabeli 22.

Tabela 22. Učestalost genotipova i alela ispitivanih genetičkih varijanti u grupi bolesnika sa ACJ sa HCC i bolesnika sa ACJ bez HCC

Genetička varijanta	Učestalost genotipova, N (%)				Učestalost alela, N (%)			
		HCC	ACJ bez HCC	p	Ale l	HCC	ACJ bez HCC	p
<i>PNPLA3</i> c.444C>G (rs738409)	CC	1 (10)	39 (36,1)	0,094	C	6 (30)	123 (57)	0,021
	CG	4 (40)	46 (41,7)		G	14 (70)	93 (43)	
	GG	5 (50)	23 (22,2)					
<i>TM6SF2</i> c.499C>T (rs58542926)	CC	9 (90)	72 (66,7)	0,168	C	19 (95)	175 (81)	0,216
	CT	1 (10)	31 (28,7)		T	1 (5)	41 (19)	
	TT	0 (0)	5 (4,6)					
<i>CYP2E1</i> c.-1054C>T (rs2031920)	c1c1	8 (80)	88 (81,5)	1	c1	18 (90)	196 (90,7)	1
	c1c2	2 (20)	20 (18,5)		c2	2 (10)	20 (9,3)	
<i>TNF-α</i> c.-238 G>A (rs361525)	GG	9 (90)	86 (79,6)	0,684	G	19 (95)	193 (89,4)	0,702
	GA	1 (10)	21 (19,5)		A	1 (5)	23 (10,6)	
	AA	0 (0)	1 (0,9)					
<i>TNF-α</i> c.-308G>A (rs1800629)	GG	9 (90)	75 (69,4)	0,277	G	18 (90)	181 (83,8)	0,748
	GA	0 (0)	31 (28,7)		A	2 (10)	35 (16,2)	
	AA	1 (10)	2 (1,9)					
<i>GSTM1</i> (rs366631)	aktivni	7 (70)	27 (25,9)	0,007*				
	GSTM1*0	3 (30)	77 (74,1)					
<i>GSTT1</i> (rs17856199)	aktivni	9 (90)	90 (83,3)	1				
	GSTT1*0	1 (10)	14 (13)					
<i>GSTM1/</i> <i>GSTT1</i>	2	6 (60)	24 (23,1)	0,034				
	1	4 (40)	69 (66,3)					
	0	0 (0)	11 (10,6)					

Promenljive su predstavljene kao brojnost (%), razlike između grupa su testirane χ^2 testom ili Fišerovim egzaktnim testom. Nakon B-H korekcije sa FDR = 5% nijedna p vrednost nije ostala značajna, dok je sa FDR=10% naznačena (p*) vrednost zadržala značajnost. Skraćenice: N – broj ispitanika, HCC –hepatocelularni karcinom, ACJ – alkoholna ciroza jetre, p – verovatnoća.

U cilju identifikovanja faktora povezanih sa pojavom maligne alteracije kod bolesnika sa ACJ, sprovedene su Firtove logističke regresije zbog malog broja detektovanih genotipova, a i malog broja pozitivnog ishoda (HCC). Varijable za koju je Firth regresija mogla da produkuje OR sa 95% CI je G alel *PNPLA3*, za *GSTM1*0* gornja granica 95%CI je težila ∞ . G alel *PNPLA3* gena nije bio značajno asociran sa HCC-om kod bolesnika sa ACJ (OR = 2,088; 95% CI = 0,758-5,747; p = 0,118) (Tabela 23).

Tabela 23. Asocijacija ispitivanih alela i genotipova sa malignom alteracijom

Genetička varijanta	Alel	OR* (95% CI) HCC vs. ACJ	p
<i>PNPLA3</i>	G vs. C	2,088 (0,758-5,747)	0,118

OR* je korigovan za godine i pol. Skraćenice: OR - količnik verovatnoće, p - verovatnoća

5. DISKUSIJA

Rizična konzumacija alkoholnih pića je direktan uzrok oštećenja jetre. Ukupna prevalenca bolesti jetre alkoholne etiologije u opštoj populaciji je 4,8%¹⁴⁶. Alkohol primarno dovodi do hronične inflamacije jetre, koja progresivno napreduje od masne jetre do alkoholnog steatohepatitisa, kod 10-20% obolelih do ciroze i kod 3-10% obolelih do HCC-a¹⁹. Mali broj bolesnika koji razviju cirozu sugerise da individualni faktori, uključujući genetičku varijabilnost, imaju važnu ulogu u moduliranju rizika za ACJ¹⁴⁷.

Alkoholna ciroza jetre je kompleksno oboljenje koje uključuje više procesa patogeneze: oksidativni stres (kao posledicu metabolizma etanola), inflamaciju i povećanu akumulaciju triglicerida u jetri¹⁴⁸. Metabolizam etanola remeti redoks balans, što za posledicu ima akumulaciju triglicerida u hepatocitima. Genetičke varijante *PNPLA3* i *TM6SF2* rezultiraju modifikovanim proteinima koji ometaju metabolizam masti i formiranje i transport VLDL-a iz ćelije, na taj način ubrzavaju oštećenje jetre^{43,149}. Pri hroničnoj konzumaciji velikih količina alkohola, kada je ADH put zasićen, dolazi do indukcije CYP2E1, što za posledicu ima pojačano generisanje ROS. ROS nastale ovim putem direktno napadaju akumulirane lipide, vrše lipidnu peroksidaciju stvarajući nusproizvode koji dodatno oštećuju jetru¹⁵⁰. Odbrana jetre je kompromitovana jer alkohol iscrpljuje nivo GSH i blokira njegov transport u mitohondrije, čime se drastično smanjuje efikasnost GST u detoksikaciji⁸². Istovremeno se aktiviraju i proinflamatorni signalni putevi, uključujući povećanu sintezu TNF- α od strane Kupferovih ćelija, što dalje oštećuje hepatocyte, dovodi do hronične upale i fibroze, vodeći ka cirozi i riziku od maligne alteracije¹⁵¹.

Ova studija predstavlja prvo istraživanje koje je ispitivalo povezanost odabranih polimorfizama u genima *PNPLA3*, *TM6SF2*, *CYP2E1*, *TNF- α* , *GSTM1* i *GSTT1* sa ACJ u grupi bolesnika iz Srbije, kao i njihov zajednički efekat kroz konstrukciju poligenskih skorova rizika. Poseban doprinos rada ogleda se u integraciji genetičkih, kliničkih i faktora povezanih sa OKA u cilju procene rizika za progresiju bolesti. Takođe, prvi put je analiziran uticaj različitih faktora na brzinu dekompenzacije u grupi bolesnika iz Srbije.

5.1. Demografske karakteristike i obrasci konzumiranja alkohola kod bolesnika sa ACJ

Incidenca oboljevanja od ABJ je četiri puta veća kod muškaraca nego kod žena, uprkos tome, mortalitet je češći kod žena¹⁴. Precizni mehanizmi koji uzrokuju disbalans među polovima i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Žene brže razvijaju oštećenja jetre zbog niže aktivnosti gastrične ADH, što dovodi do većeg procenta alkohola koji direktno dospeva u krvotok i jetru i ubrzava oštećenje hepatocita. Dodatno, žene imaju manji udeo vode u telu i veći procenat masnog tkiva, zbog čega je pri unosu iste količine koncentracija alkohola u krvi i tkivima kod žena veća u odnosu na muškarce. Takođe, fizički manja jetra kod žena je dodatno opterećena istom količinom toksina¹⁵². Iako biološki faktori predisponiraju žene za ABJ, više žena apstinira tokom života i manje su sklone socijalno problematičnim oblicima ponašanja¹⁵³. Takođe, zbog socijalne stigme, žene se ređe javljaju na lečenje. Navedeni podaci su u skladu sa rezultatima ovog istraživanja, gde je zabeležena velika disproporcija u učestalosti polova od skoro 7,5 puta manje žena sa ACJ u odnosu na muškarce.

Rezultati su pokazali da je kod bolesnika koji su počeli da konzumiraju alkohol sa više od 23 godine života, do dekompenzacije dolazilo za kraće vreme izloženosti velikim količinama alkohola u odnosu na one koji su počeli da piju pre 23. godine. Ovo bi moglo da odražava grešku u selekciji bolesnika, s obzirom na to da bolesnici koji kasnije počnu sa konzumiranjem alkohola već ulaze u

životno doba u kom je prevalenca bolesti jetre i komorbiditeta prirodno viša, odnosno raste sa godinama¹⁵⁴. Sa starenjem se smanjuje i sposobnost regeneracije tkiva i dolazi do fiziološkog pada aktivnosti enzimskih sistema koji učestvuju u metabolizmu alkohola, što jetru čini osjetljivom na oštećenja i podložnijom fibrozi izazvanoj alkoholom, što daljom progresijom bolesti dovodi do ciroze jetre^{155,156}. Takođe, raniji početak konzumacije alkohola može biti povezan sa dugotrajnom adaptacijom metaboličkih puteva, tako da je potrebno više vremena do prvih znakova dekompenzacije¹⁵⁷. Studije^{158,159} su potvrdile da je kasniji početak konzumiranja alkohola povezan sa ubrzanom progresijom bolesti, što je u skladu i sa dobijenim rezultatima u ovom istraživanju.

5.2. Varijante u genima povezanim sa akumulacijom lipida: *PNPLA3* i *TM6SF2*

Varijanta *PNPLA3* rs738409 je prvobitno povezana sa MASLD⁶⁰, zatim su usledile studije koje su ovu varijantu povezale sa čitavim spektrom bolesti jetre. Tako je ova varijanta povezana sa nastankom bolesti jetre alkoholne etiologije^{61,160}, sa cirozom⁶² i sa hepatocelularnim karcinomom¹⁶¹. Takođe je povezana i sa povećanim rizikom za steatozu i fibrozu kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom B i C⁶³. Objašnjenje za širok spektar bolesti sa kojima je ova varijanta *PNPLA3* gena povezana leži u funkciji ovog proteina u metabolizmu lipida u jetri. Izmenjeni *PNPLA3* protein prvenstveno dovodi do poremećaja metabolizma lipidnih kapljica u hepatocitima, kroz smanjenu lipolitičku aktivnost i inhibiciju ATGL-zavisne lipolize, što dovodi do akumulacije TG u jetri i povećane lipotoksičnosti¹⁶². *PNPLA3* takođe modifikuje i opšti odgovor jetre na hroničnu povredu. Kod nosilaca G alela dolazi do akumulacije lipotoksičnih molekula što stimuliše zvezdaste ćelije. One se onda transformišu u miofibroblaste, luče kolagen tip I i proteine ekstracelularnog matriksa i dovode do fibroze jetre¹⁶³. Ovi rezultati ukazuju da *PNPLA3* može imati centralnu ulogu u patogenezi različitih oblika bolesti jetre, što je u skladu i sa rezultatima naše studije koji potvrđuju snažan uticaj *PNPLA3* rs738409 na razvoj ACJ.

Naši rezultati potvrđuju asocijaciju CG i GG genotipa *PNPLA3* sa ACJ. Nosioци ovih genotipova imaju skoro 2 puta (CG), odnosno preko 7 puta (GG) veći rizik za razvoj ciroze u poređenju sa nosiocima CC genotipa. Uočen efekat doze G alela sugerise da je ova varijanta jedan od najznačajnijih prediktora ciroze jetre. Slični rezultati su pokazani i u drugim studijama^{76,164,165}, dok su rezultati nekih studija pokazali nešto niži rizik od ACJ^{66,166}. Razlike u jačini asocijacije su najverovatnije posledica različitog porekla, faktora sredine i karakteristika bolesti¹⁶⁷. U novoj meta analizi Yang i Cheng¹⁶⁷ su pokazali da heterogenost među studijama koje su se bavile asocijacijom ove varijante i alkoholne ciroze najverovatnije potiče od različite etničke pripadnosti ispitanika, kao i razlike u kontrolnim grupama. Neke studije su kao kontrolnu grupu koristile bolesnike sa ABJ^{61,160}, neke su koristile alkoholičare bez bolesti jetre¹⁶⁸, a neke zdrave ispitanike^{62,76}. Rezultati naše studije su pokazali da postoji značajna razlika u učestalosti G alela *PNPLA3* između grupe obolelih i kontrolne grupe, nosioci ovog alela imaju oko 2,5 puta povećan rizik za cirozu. Učestalost G alela u kontrolnoj grupi je u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži i u skladu sa podacima koji se odnose na evropske populacije^{169,170}. Iz navedenog proizilazi da je *PNPLA3* snažan genetički marker za cirozu u našoj populaciji.

Druga varijanta koja je odgovorna je za akumulaciju masti u jetri je *TM6SF2* rs58542926. Ova varijanta je povezana sa ACJ⁶⁶, sa MASLD¹⁷¹, kao i sa HCC-om⁸⁰. Širok spektar bolesti sa kojima je povezana ova varijanta pokazuje da je *TM6SF2* važan genetički faktor u poremećaju metabolizma lipida, što je u skladu i sa našim rezultatima koji ukazuju na značajan uticaj ove varijante na ukupan

rizik od ACJ. *TM6SF2* ima važnu ulogu u pravilnom pakovanju i transportu VLDL iz hepatocita⁶⁸. U slučaju rs58542926 dolazi do gubitka funkcije proteina, blokade transporta VLDL-a iz ćelije, što za posledicu ima akumulaciju TG u hepatocitima¹⁷², čime se stvara citotoksično okruženje koje pogoduje progresiji fibroze kod osoba koje su izložene štetnim efektima alkohola. Istovremeno prisustvo T alela *TM6SF2* je asocirano sa smanjenim nivoom holesterola u krvi kod nosilaca i zbog toga se smatra da ima kardioprotektivnu ulogu¹⁷³. Rezultati naše studije pokazuju da je rizik od obolevanja od ciroze 2,5 puta veći kod nosilaca CT ili TT u odnosu na nosioce CC genotipa, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora^{66,76}. Učestalost ređeg alela (T) u kontrolnoj grupi se uklapa u evropski prosek¹⁷⁴. U našoj studiji je ovaj alel bio više nego dvostruko češći u grupi obolelih i povećavao rizik za cirozu 2,3 puta. Efekat *TM6SF2* rs58542926 varijante treba oprezno tumačiti zbog veoma malog broja detektovanih TT genotipova, čija je učestalost u evropskim populacijama niska.

5.3. Varijante u genima povezanim sa oksidativnim stresom i inflamacijom: *CYP2E1*, *TNF-α*

U leziji jetre primarnu ulogu imaju produkti metabolizma etanola, koji se primarno metaboliše pod dejstvom alkoholne dehidrogenaze u citoplazmi hepatocita. U uslovima hroničnog unošenja velikih količina alkohola, aktivira se drugi put metabolizma preko enzima *CYP2E1*²¹. Ovim putem nastaje značajna količina ROS-a koji dovode do lipidne peroksidacije, oštećenja ćelijskih membrana i povećanja oksidativnog stresa. Rezultati prethodnih studija koje su istraživale povezanost *CYP2E1* c.-1054C>T sa ACJ su kontradiktorni – jedan broj studija je utvrdio povezanost^{89,90}, dok druge nisu⁹¹. Kasnija meta-analiza je pokazala povezanost ove varijante sa ABJ, ali ne i sa ACJ⁸⁶. Ove kontradiktornosti mogu biti posledica relativno malog broja i različitog porekla ispitanika u studijama. Ipak, povezanost ove varijante sa cirozom je biološki verovatna s obzirom na to da alkohol značajno indukuje aktivaciju metaboličkog puta *CYP2E1*²¹. Alel c2 je povezan sa povećanom transkripcionom aktivnošću *CYP2E1* što povećava oksidativni stres i oštećuje hepatocite, što predstavlja ključni mehanizam u razvoju ACJ¹⁷⁵. Uprkos neujednačenim rezultatima prethodnih studija, u našoj studiji smo utvrdili da nosioci c2 alela promotorske varijante *CYP2E1* imaju oko tri puta povećan rizik za ACJ, naglašavajući značaj oksidativnog stresa u patogenezi ove bolesti.

Hronična izloženost alkoholu povećava permeabilnost creva, što dovodi do porasta LPS u serumu koji se vezuje za TLR4 receptor na površini Kupferovih ćelija. Ovim putem dolazi do aktivacije transkripcionog faktora NF-κB, koji zatim povećava transkripciju *TNF-α*. Istovremeno, ROS, nastale kao produkti metabolizma alkohola, direktno stimulišu Kupferove ćelije da otpuštaju citokine¹⁷⁶. *TNF-α* je centralni medijator inflamacije jetre, pokreće apoptozu hepatocita, aktivira zvezdaste ćelije i podstiče fibrozu¹⁷⁷.

Rezultati naše studije su pokazali da nosioci A alela *TNF-α* -238 imaju 2,4 puta veći rizik za ACJ, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora¹²⁰. Varijacije u regulatornim delovima gena mogu značajno uticati na promenu ekspresije i na taj način doprineti intenzitetu inflamatornog odgovora¹⁷⁸. U literaturi se mogu naći oprečne informacije o efektu varijante *TNF-α* -238 na ekspresiju, neki autori su povezali ovu varijantu sa povećanom¹⁰⁸, a drugi sa smanjenom ekspresijom¹⁰⁹. Oprečni nalazi prethodnih studija su verovatno posledica različitih tipova ćelija u kojima je proučavan efekat. U Kupferovim ćelijama ova varijanta dovodi do povećane ekspresije, a u limfocitima do smanjene, što može objasniti uočenu povezanost A alela sa ACJ u našoj studiji. U funkcionalnoj studiji u kojoj je merena ekspresija *TNF-α* kao odgovor na stimulaciju LPS pokazano je da A alel *TNF-α* -238 povećava transkripcionu aktivnost¹¹⁰. Varijanta *TNF-α* -238 je povezana i sa drugim bolestima jetre, kao što je

MASLD¹⁷⁹, a u autoimunim bolestima jetre ima protektivni efekat¹¹⁸, što ističe značaj ove varijante u inflamatornom odgovoru u širem spektru bolesti jetre.

U našoj studiji nismo uočili povezanost alela -308A sa ACJ, što je u skladu sa nalazima drugih autora¹¹¹⁻¹¹³. Imajući u vidu da alel -308A povećava ekspresiju *TNF-α* na isti način kao i -238A^{106, 107}, bilo bi očekivano da bude asociran sa većim rizikom za cirozu. Ova nelogičnost može biti posledica LD sa HLA genima, sa kojima je u istom haplotipskom bloku¹⁸⁰, etničke varijabilnosti ili relativno male učestalosti A alela, pa studije sa skromnim brojem ispitanika ne mogu da detektuju asocijaciju. Naši rezultati vezani za *TNF-α* ističu značaj testiranja više varijanti u okviru istog gena, jer promotorske varijante ne moraju obavezno imati isti biološki efekat¹⁸¹.

5.4. Zajednički efekat varijanti ispitivanih gena

Prevenција oboljenja jetre alkoholne etiologije primarno podrazumeva smanjenje konzumiranja alkoholnih pića na populacionom nivou, što predstavlja svojevrsan javnozdravstveni i društveni izazov. Rana identifikacija osoba sa povećanim rizikom za oboljevanje od ACJ je od izuzetnog značaja, jer je kliničko iskustvo pokazalo da predočavanje individualnog rizika od bolesti značajno povećava verovatnoću prestanka konzumiranja alkohola¹⁸². Najefikasniji način da se sprovede prevencija zahteva prethodno prepoznavanje osoba kod kojih je rizik za cirozu visok. U tom kontekstu rezultati ove studije ukazuju da genetički podaci mogu doprineti boljem prepoznavanju pojedinaca koji su u visokom riziku pre pojave kliničkih manifestacija bolesti.

U ispitivanju zajedničkog efekta ispitivanih genetičkih varijanti koristili smo dva pristupa. Prvo smo konstruisali multivarijabilni regresioni model koji je uključivao genetičke varijante koje su pokazale značajnu asocijaciju sa ACJ, pol i starost ispitanika. Rezultati ove analize su pokazali da su tri varijante značajni nezavisni prediktori ciroze, potvrđujući da rizik za cirozu nije uslovljen samo efektima pojedinačnih varijanti, već da na rizik utiče više faktora i njihove međusobne interakcije. *PNPLA3* je ostao najsnažniji prediktor rizika za ACJ, gde GG genotip povećava rizik čak 8 puta u poređenju sa referentnim CC genotipom. U modelu CG genotip nije imao značaj, što znači da je u našoj ispitivanoj grupi za maksimalni rizik neophodno prisustvo oba varijantna alela. Takođe *TM6SF2* varijanta se pokazala kao značajna u modelu, gde je rizik za cirozu kod nosilaca CT+TT genotipova bio povećan skoro 2,5 puta, što naglašava koliko poremećaj u metabolizmu i transportu lipida utiče na ukupni rizik u nastanku ciroze. Rezultati su pokazali i da nosioci c1/c2 genotipa *CYP2E1* imaju skoro tri puta veći rizik za cirozu u odnosu na osobe c1/c1 genotipa, što ukazuje da c2 alel verovatno kroz pojačanu ekspresiju *CYP2E1* i tim putem pojačano generisanje oksidativnog stresa daje značajan doprinos bolesti. U modelu se zadržao i *TNF-α* -238 (GA+AA), iako je doprinos ove varijante izgubio značaj ($p = 0,075$). Ovi nalazi pokazuju da pojedinačne varijante imaju snažan efekat, ali da njihova kombinacija pruža potpuniju sliku individualnog rizika, što direktno opravdava primenu PRS pristupa u našem istraživanju.

Poligenski skor rizika „sabira“ efekte više genetičkih varijanti povezanih sa određenim stanjem ili bolešću, gde svaka varijanta u relativno maloj meri doprinosi ukupnom riziku¹⁸³. Radi procene kombinovanog genetičkog doprinosa varijanti analiziranih u ovom istraživanju konstruisana su dva PRS modela. Inicijalni model koji je uključivao polimorfizme *PNPLA3* i *TM6SF2* gena je pokazao zadovoljavajuću diskriminatornu moć ($AUC = 0,684$) i veliku stabilnost, potvrđujući da mali broj genetičkih varijanti sa velikim efektom čini dobru osnovu za procenu rizika. U daljoj analizi

konstruisan je model u koji su uključene još tri varijante (*CYP2E1*, *TNF- α* -238 i *TNF- α* -238) i sposobnost modela da identifikuje osobe u visokom riziku je procenjen putem AUC vrednosti. Njena vrednost je iznosila 0,705, a nakon korekcije za optimizam 0,685, što ukazuje na umerenu preciznost predviđanja, a nivo diskriminacije je u skladu sa rezultatima prethodno publikovanih PRS modela za ACJ¹⁸⁴. Ovakav rezultat govori o tome da mali broj varijanti sa velikim efektom nosi najveći deo prediktivne snage modela.

U konstrukciju PRS smo uključili i varijantu *TNF- α* -308, bez obzira što nije pokazala značajnu asocijaciju sa ACJ. Ovakav pristup je odabran zbog toga što neke varijante, iako same nisu asocirane sa bolešću, mogu doprineti ukupnoj prediktivnoj vrednosti modela¹⁸¹. Prosečne vrednosti PRS koji je uključio dve, odnosno pet analiziranih varijanti su bile značajno više u grupi bolesnika u poređenju sa kontrolnom grupom, što potvrđuje kumulativni efekat ovih varijanti na podložnost bolesti. Podela pacijenata u tri kategorije rizika na osnovu vrednosti PRS-a sa dve varijante pokazala je da su ispitanici iz grupe visokog rizika imali sedam puta veći rizik za ACJ u odnosu na ispitanike koji su nosioci referentnog genotipa za oba analizirana gena. Kada smo podelili ispitanike u tri grupe rizika (niskog, srednjeg i visokog) na osnovu vrednosti PRS koji je uključio pet analiziranih varijanti, rezultati su pokazali da postoji jasan gradijent rizika za oboljevanje, pri čemu se rizik sukcesivno povećavao, te su pripadnici grupe srednjeg i visokog rizika imali 2,7 do 6 puta veći rizik u odnosu na referentnu grupu (niskog rizika). Ovi nalazi ukazuju da PRS omogućava identifikaciju bolesnika kod kojih je rizik značajno povećan i koji zahtevaju intenzivniji pristup prevenciji i lečenju.

Druge studije su uključile širi panel genetičkih varijanti zajedno sa kliničkim i/ili laboratorijskim parametrima^{184,186,187}. Rezultati studije Whitfield i saradnika pokazali su da se dodavanjem dijabetesa modelu zasnovanom na 3 genetičke varijante poboljšava prepoznavanje osoba sa ACJ među konzumentima alkohola¹⁸⁴. U narednoj studiji iste grupe autora, ispitivan je model sa proširenim panelom genetičkih varijanti (20), indeksom telesne mase (eng. *body mass index*, BMI) i dijabetesom i rezultati su pokazali malo poboljšanje AUC vrednosti u identifikaciji osoba u riziku od razvoja ACJ¹⁸⁶. U poređenju sa ovim studijama, naši rezultati pokazuju da i modeli sa malim brojem varijanti mogu postići stabilnu prediktivnu vrednost, što je od posebnog značaja za potencijalnu kliničku primenu zbog jednostavnije implementacije.

Za razliku od pristupa u navedenim studijama, naši modeli su uključivali relativno mali broj genetičkih varijanti, godine pri dijagnozi i pol ispitanika. Zbog odabira kontrolne grupe, u koju su uključene osobe bez hroničnih patoloških stanja i koji su bili ili apstinenti ili konzumenti < 1 pića dnevno, u model nisu uključeni dijabetes ili neka od varijabli vezanih za OKA kao „zbunjujući“ faktori. Podaci o BMI nisu bili dostupni za sve ispitanike, pa ni ova varijabla nije mogla biti uključena u model. Ovo ograničenje verovatno doprinosi umerenoj snazi diskriminacije modela i ukazuje da bi integracija kliničkih i drugih faktora dodatno unapredila njegovu prediktivnu moć. Njihova najveća vrednost je u mogućnosti rane identifikacije osoba sa povećanom genetičkom predispozicijom, čak i pre pojave kliničkih simptoma ili pre početka rizičnih obrazaca konzumiranja alkoholnih pića. U tom kontekstu, PRS bi mogao imati važnu ulogu u stratifikaciji populacije na grupe rizika, što bi pomoglo u sprovođenju preventivnih mera.

Razvoj skora rizika koji bi ušao u rutinsku kliničku praksu, kada su u pitanju kompleksna oboljenja kao što je ACJ je izazovan poduhvat¹⁸⁸. To bi zahtevalo kvantifikaciju doprinosa riziku faktora koji su povezani sa konzumiranjem alkohola, pridruženih stanja i bolesti, laboratorijskih,

kliničkih, kao i demografskih karakteristika¹⁴¹. Svakako bi integracija PRS sa postojećim kliničkim i laboratorijskim parametrima unapredila preciznost procene rizika i omogućila personalizovani pristup bolesnicima. Osobe sa visokim PRS bi bili kandidati za intenzivnije praćenje, uključivanje u programe odvikavanja od alkohola, kao i za češći skrining na komplikacije, uključujući i HCC. Kod osoba iz grupe niskog rizika klinički pristup mogao bi biti manje intenzivan, sa naglaskom na promene životnog stila. Važno je istaći da se zbog PRS ne smeju zanemariti ostali faktori rizika, već ga treba posmatrati kao komplementarno sredstvo koje doprinosi finoj stratifikaciji rizika. Umerene vrednosti AUC u našoj studiji ukazuju da genetički modeli nisu dovoljni sami po sebi za donošenje kliničkih odluka, ali da u kombinaciji sa drugim parametrima mogu imati značajnu ulogu u skrining procedurama. Ovakav pristup je u skladu sa savremenim konceptima personalizovane medicine, gde se odluke o prevenciji i lečenju zasnivaju na integraciji raznorodnih podataka¹⁸⁹.

Ovom studijom nisu u potpunosti istražene interakcije između genetičkih i sredinskih faktora, što bi se moglo poboljšati uključivanjem osoba sa rizičnim OKA bez znakova bolesti jetre u kontrolnu grupu. Iako izbor ove metodologije ograničava generalizaciju rezultata, izabrali smo je kako bi se obezbedila jasna procena povezanosti genotipova sa ACJ u klinički jasno definisanoj populaciji. Zbog ovih ograničenja, ove rezultate treba smatrati inicijalnim, kao dokaz koncepta, a ne kao klinički alat. Da bi PRS imao širu primenu neophodna je validacija u većim nezavisnim kohortama, kao i standardizacija metodologije za konstrukciju i interpretaciju PRS.

Uvođenje PRS u rutinsku kliničku praksu podrazumeva da on podjednako dobro predviđa rizik u različitim etničkim grupama. Većina PRS skorova se zasniva na GWAS studijama u kojima većinu ispitanika čine osobe evropskog porekla, što ograničava primenu postojećih skorova u drugim populacijama zbog genetičkih razlika i nedovoljne zastupljenosti u istraživanjima¹⁹⁰. Da bi se ova ograničenja prevazišla neophodne su reprezentativnije genetičke studije koje podrazumevaju podjednako učešće svih etničkih grupa.

Naši modeli koji su zasnovani na genetičkim profilima u srpskoj populaciji mogu značajno unaprediti ranu skrining dijagnostiku u populaciji osoba koje hronično konzumiraju velike količine alkohola u Srbiji. Uprkos svim navedenim ograničenjima, PRS predstavlja obećavajući alat koji bi u budućnosti mogao imati značajnu ulogu u ranoj dijagnostici, prevenciji i personalizovanom pristupu lečenju ACJ.

5.5. Varijante u genima povezanim sa detoksikacijom: uloga *GSTM1* i *GSTT1*

ROS, koje nastaju kao posledica metabolizma alkohola putem lipidne peroksidacije, oštećuju hepatocite. Antioksidativni enzimi iz grupe GST neutralizuju produkte lipidne peroksidacije i vrše detoksikaciju ROS putem nukleofilne konjugacije redukovano GSH sa elektrofilnim toksinima¹⁹¹. Intracelularni rezervoar GSH funkcioniše kao pufer u detoksikaciji reaktivnih produkata. Koncentracija GSH je ograničavajući faktor u reakcijama konjugacije tokom oksidativnog stresa i zato njegov deficit povećava osetljivost hepatocita na toksične metabolite etanola¹⁹². Delecije *GST* gena (*GSTM1**0 i *GSTT1**0 genotipovi) uzrokuju odsustvo enzimske aktivnosti, čime se narušava redoks ravnoteža i intenzivira oštećenje jetre uzrokovano ROS¹⁹³.

Rezultati naše studije ukazuju da nosioci *GSTM1**0 genotipa imaju 3 puta veći rizik za ACJ u odnosu na one sa bar jednom kopijom ovog gena. Rezultati dosadašnjih studija su kontradiktorni, neki

su u saglasnosti sa našim rezultatima^{126,194}, a neke studije nisu pronašle asocijaciju između *GSTM1*0* i *ACJ*¹²⁷. Nije bilo razlike u učestalosti *GSTT1*0* genotipa između *ACJ* i kontrolne grupe u našem istraživanju, što sugerise da ovaj genotip pojedinačno ne doprinosi riziku za *ACJ*, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora^{91,126}. Ipak, postoje i studije sa oprečnim rezultatima, gde je utvrđena asocijacija ovog genotipa sa *ACJ*¹²⁷. U tom kontekstu, rezultati naše studije doprinose razrešenju dileme ukazujući da delecija *GSTM1* ima značajan efekat u našoj populaciji, dok delecija *GSTT1* nije povezana sa rizikom za razvoj *ACJ*.

Rezultati su pokazali da deficit *GST* enzima ima kumulativni efekat na rizik od razvoja *ACJ*. Analiza kombinovanih genotipova (*GSTM1/GSTT1*) je ukazala na veliki porast rizika sa odsustvom gena za *GST*, pri čemu prisustvo jedne delecije duplira rizik, dok dvostruki nulti genotip povećava verovatnoću razvoja *ACJ* preko 11 puta. Povećan rizik za *ACJ* kod nosilaca dvostrukog nultog genotipa, koji potvrđuju i rezultati drugih autora^{127,128} se može pripisati značajno smanjenom antioksidativnom kapacitetu. U uslovima visoke koncentracije ROS, karakterističnim za alkoholnu cirozu jetre, kod osoba sa deficitom *GST* dolazi do kolapsa redoks homeostaze¹⁹⁵. Dodatnu potvrdu ovih nalaza pružaju i rezultati analize PRS-a koji je obuhvatio ove dve varijante. Značajno viša srednja vrednost PRS kod bolesnika i uočljivo „pomeranje udesno“ distribucije skora u ovoj grupi, ukazuju na to da genetičko opterećenje modifikuje individualnu predispoziciju za cirozu. Dok standardna analiza identifikuje kategorije rizika, PRS omogućava preciznije kvantifikovanje kumulativnog efekta.

Postoji velika varijabilnost u učestalosti alela *GST* gena u različitim populacijama, što sugerise da etnička pripadnost može značajno uticati na rizik od bolesti¹⁹⁶. U populaciji Srbije, nekoliko studija je analiziralo učestalost *GSTM1*0* i *GSTT1*0* genotipova i njihovu asocijaciju sa različitim patologijama. Rezultati ovih studija su pokazali da je *GSTM1*0* genotip asociiran sa infarktom miokarda¹⁹⁷, sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom kod bolesnika na dijalizi¹⁹⁴. Kod bolesnika sa epitelijalnim tumorom jajnika, *GSTM1*0* genotip nije bio asociiran sa bolešću, dok je prisustvo bar jedne kopije *GSTT1* gena češće kod obolelih¹⁹⁹. Dvostruki nulti genotip, kao i *GSTM1*0* su povezani sa rizikom za ateroskleroza¹⁴⁰. Učestalost delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena u kontrolnoj grupi je u skladu sa rezultatima drugih studija koje su sprovedene u Srbiji. Asocijacija *GSTM1*0* i *GSTT1*0* genotipova sa različitim oboljenjima u populaciji Srbije, ukazuje da deficit *GST* može predstavljati zajednički mehanizam narušene redoks homeostaze, koji značajno modifikuje individualni rizik za različite hronične bolesti i inflamatorna stanja u našoj populaciji.

5.6. Asocijacije analiziranih genotipova sa navikama konzumiranja alkohola, biohemijskim i kliničkim podacima

U ovoj studiji je analizirana povezanost testiranih genetičkih varijanti sa OKA, laboratorijskim i kliničkim karakteristikama bolesnika. Bolesnici su podeljeni u grupe na osnovu genotipova za svaku analiziranu varijantu posebno.

Rezultati analize karakteristika u vezi sa konzumiranjem alkohola su pokazali da se prosečna dnevna količina alkohola značajno razlikovala između nosilaca različitih genotipova *PNPLA3*. Nosioci CC genotipa su konzumirali najveće količine alkohola u poređenju sa nosiocima CG i GG genotipova. Ovaj nalaz pokazuje da su nosioci jednog ili dva G alela podložniji razvoju ciroze, čak i pri unosu manjih količina alkohola, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija^{61,62}.

Kada su u pitanju *GSTM1* i *GSTT1* varijante, rezultati su pokazali da su nosioci aktivnog *GSTM1* gena, kao i nosioci kombinovanog genotipa sa oba aktivna gena (*GSTM1* i *GSTT1*) konzumirali veće količine alkohola u odnosu na bolesnike kod kojih je prisutna delecija jednog ili oba gena. Ovi nalazi su biološki utemeljeni i pokazuju da prisustvo aktivnih GST enzima obezbeđuje efikasniji antioksidativni odgovor i detoksikaciju reaktivnih produkata nastalih kao posledica metabolizma alkohola²⁰⁰. Ovo doprinosi boljoj toleranciji organizma na štetne efekte velikih količina alkohola, smanjujući rizik za oštećenje jetre, dok, nasuprot tome, osobe sa deletiranim genima za *GST* mogu biti osetljivije na oksidativni stres²⁰¹.

Rezultati su pokazali da su nosioci *GSTT1**0 genotipa u dužem periodu intenzivno konzumirali alkohol u odnosu na one koji su imali aktivni *GSTT1*. Ovaj nalaz sugerise da, uprkos potencijalno smanjenom antioksidativnom kapacitetu, ove osobe mogu biti izložene štetnom dejstvu alkohola u produženom periodu, što doprinosi progresiji oštećenja jetre i ukazuje na interindividualnu varijabilnost u riziku i kompleksnost ACJ.

U našem istraživanju analizirane varijante *CYP2E1*, *TNF-α* i *TM6SF2* nisu bile povezane sa razlikama u navikama vezanim za konzumiranje alkohola. Iako su ove varijante povezane sa metabolizmom alkohola, inflamatornim odgovorom i patogeneom ACJ, ovi rezultati ukazuju da ove varijante nisu povezane sa navikama u konzumiranju alkohola u ispitivanoj grupi bolesnika.

Ovi nalazi ukazuju da genetička predispozicija može modifikovati individualnu osetljivost na alkohol, tako da razvoj bolesti ne zavisi samo od količine unetog alkohola i dužine ekspozicije njegovim toksičnim efektima, već i od bioloških karakteristika pojedinca.

Iako su uočene razlike između određenih genotipskih podgrupa u izmerenim vrednostima biohemijskih parametara funkcije jetre, većina ovih nalaza je imala malu do umerenu snagu efekta i nije ostala statistički značajna nakon korekcije za višestruko testiranje, što ukazuje na ograničenu snagu ovih asocijacija.

Rezultati su pokazali da postoji trend porasta vrednosti ALT sa povećanjem broja G alela *PNPLA3* gena. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima drugih studija^{202,203} i potvrđuju povezanost ove varijante sa većim stepenom oštećenja hepatocita i progresijom bolesti jetre. Međutim, umerena snaga efekta i gubitak statističke značajnosti posle B-H korekcije sugerise da je efekat *PNPLA3* na biohemijske markere oštećenja jetre u našoj grupi pacijenata ograničen ili pod uticajem drugih faktora. Iako je ALT visoko senzitivna i specifičan marker oštećenja jetre, tačan mehanizam kojim *PNPLA3* utiče na nivo ALT još nije u potpunosti razjašnjen²⁰⁴. Potencijalno objašnjenje ovog fenomena leži u akumulaciji masti u jetri uzrokovanoj izmenjenim proteinom, što dovodi do nekroze hepatocita i inflamacije³³.

Neočekivano, serumski nivoi albumina bili su povišeni kod nosilaca manje zastupljenog alela u *CYP2E1* i *TNF-α* -308, dok je kod nosilaca A alela *TNF-α* -238 uočena granična značajnost. Ovi rezultati su u suprotnosti sa očekivanim efektima povećanog oksidativnog stresa i proinflamatorne uloge *TNF-α*, koji obično imaju supresivni efekat na sintezu albumina u jetri^{205,206}. Naši nalazi sugerisu da uticaj ispitivanih varijanti na sintezu albumina može biti indirektan, modifikovan epistazom i stadijumom bolesti, te ih treba interpretirati sa oprezom. Neophodna je potvrda ovih nalaza u većim kohortama.

Nosioci *CYP2E1*c1/c1 genotipa imali su više vrednosti bilirubina u odnosu na nosioce c1/c2 genotipa, što je u suprotnosti sa rezultatima prethodnih studija²⁰⁷. Prisustvo c2 alela povezano je sa povećanom ekspresijom *CYP2E1*, odnosno, povećanim oksidativnim stresom u hepatocitima, očekivano bi bilo da nivo antioksidanasa bude viši u toj grupi. S obzirom na to da bilirubin ima antioksidativna svojstva i smatra se endogenim zaštitnim faktorom od oksidativnog stresa i inflamacije²⁰⁸, niži nivoi bilirubina kod nosilaca c2 alela mogu ukazivati na iscrpljivanje antioksidativnog kapaciteta usled hroničnog oksidativnog opterećenja. Razlike u nivou bilirubina između dve grupe mogu odražavati poremećenu redoks ravnotežu kod nosilaca c2 alela⁸². Naš nalaz sugerise da povećana aktivnost *CYP2E1* može dovesti do dugotrajnog oksidativnog stresa koji prevazilazi antioksidativne mehanizme, što može biti povezano sa smanjenom sintezom bilirubina. Ovo ukazuje da ova varijanta ne utiče samo na inicijalni rizik za oštećenje jetre, već ima ulogu i u progresiji oštećenja hepatocita.

Ukupno posmatrano, rezultati pokazuju da testirane varijante mogu imati ograničen uticaj na biohemijske parametre kod bolesnika sa ACJ. Mali do umereni efekat i gubitak značajnosti nakon korekcije za višestruka testiranja govore u prilog tome da ove rezultate treba tumačiti sa oprezom. Testirane genetičke varijante verovatno imaju indirektan uticaj na biohemijske parametre, koji su pod snažnijim uticajem stadijuma bolesti i individualnih razlika u metabolizmu.

Rezultati analize povezanosti testiranih varijanti sa kliničkim karakteristikama i komplikacijama ACJ su pokazali da nema razlika u prisustvu dijabetesa i hepatične encefalopatije između genotipskih podgrupa, što ukazuje da testirane varijante verovatno nemaju uticaj na razvoj ovih komplikacija ili je njihov uticaj zanemarljiv u odnosu na druge faktore rizika.

Kod nosilaca *GSTM1**0 genotipa je češće bila prisutna portalna hipertenzija indirektno procenjena na osnovu stepena varikoziteta jednjaka, što se može objasniti smanjenim kapacitetom detoksikacije reaktivnih metabolita i povećanim oksidativnim stresom u hepatocitima u odsustvu aktivnog *GSTM1*. Intenzivniji oksidativni stres i progresija fibroze povećavaju intrahepatični vaskularni otpor, što dovodi do izražene portalne hipertenzije²⁰⁹.

Rezultati su pokazali da su nosioci c1/c1 genotipa *CYP2E1* češće prezentovali ascites u poređenju sa nosiocima c1/c2 genotipa. Pošto nije zabeležena razlika u prisustvu portalne hipertenzije između ove dve podgrupe, a prisutni su niži nivoi albumina u serumu kod nosilaca c1/c1 genotipa verovatno je da je dominantni mehanizam nastanka ascitesa vezan za pad koloidno-osmotskog pritiska usled narušene sintetske funkcije jetre²¹⁰. U skladu sa prethodnim podacima, bolesnici iz ove podgrupe su značajno ređe klasifikovani u CP A u poređenju sa nosiocima c1/c2 genotipa. Ukupno gledano u našoj kohorti genotip c1/c1 je povezan sa težom kliničkom slikom, odnosno dekompenzacijom, bez obzira što se c2 alel povezuje sa intenzivnijim oksidativnim stresom.

5.7. Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na težinu bolesti

Brojne studije^{211,212} su pokušale da razviju klasifikacioni sistem za težinu bolesti jetre koji bi obuhvatio stepen oštećenja jetre i dao predikciju prognoze bolesti na osnovu kliničkih i laboratorijskih parametara. *Child-Pugh* bodovni sistem se najčešće koristi u svakodnevnoj praksi upravo zbog svoje jednostavnosti²¹³. U ovoj studiji, analizirali smo uticaj demografskih faktora, OKA, genetičkih i kliničkih karakteristika na težinu ciroze jetre. Većina ispitanika (84,7%) uključenih u ovo istraživanje

je imala dekompenzovanu cirozu jetre (*Child-Pugh B i C*), što ukazuje da se bolest najčešće dijagnostikuje tek nakon pojave komplikacija. Ovo je u skladu sa nalazima drugih autora koji ukazuju da se većina bolesnika prvi put javi lekaru tek u dekompenzovanoj fazi bolesti, naročito ako je bolest alkoholne etiologije²¹⁴. Rezultati su pokazali da ne postoji značajna razlika u visini CP skora u odnosu na pol i starost ispitanika, iako su godine starosti jedan od glavnih faktora rizika kako za cirozu, tako i za progresiju bolesti¹⁵⁶.

U našoj grupi bolesnika, karakteristike vezane za konzumaciju alkohola nisu imale uticaja na progresiju bolesti. Iako bi se očekivalo da veća količina unetog alkohola i duža ekspozicija njegovom štetnom dejstvom doprinose težem obliku bolesti u našoj kohorti, ti faktori nisu bili od značaja. Ovakav nalaz se verovatno može objasniti činjenicom da su svi bolesnici konzumirali velike količine alkohola u dugom vremenskom periodu, pa su individualna osetljivost na štetne produkte alkohola uslovljena genetičkim faktorima i metaboličke razlike među bolesnicima bile od većeg značaja za progresiju bolesti²¹⁵. Iako rezultati drugih autora sugerišu da su godine u kojima je počela konzumacija alkohola značajan prediktor težine ciroze²¹⁶, u našoj studiji takva povezanost nije potvrđena, već su godine starosti pacijenata na početku konzumacije bile značajne samo za brzinu dekompenzacije, ali ne i samu težinu bolesti.

Rezultati su pokazali da su vrednosti ALT u serumu bile značajno niže u grupi bolesnika sa dekompenzovanom cirozom, što se može objasniti patofiziološkim promenama koje nastaju u kasnijim fazama bolesti, kada dolazi do značajnog smanjenja funkcionalne mase hepatocita i samim tim smanjenja oslobađanja enzima, kao što je ALT, u krvotok²¹⁷. Nasuprot tome, vrednosti ALP bile su značajno više u grupi bolesnika sa dekompenzovanom cirozom, što može ukazati na progresivnuolestazu i inflamaciju žučnih puteva, što je česta prateća pojava teškog oboljenja jetre²¹⁸. Ovi nalazi su potvrđeni i multivarijabilnom logističkom regresijom, gde su se ovi parametri pokazali kao prediktori dekompenzacije nezavisno od demografskih i karakteristika vezanih za konzumaciju alkohola. Niže vrednosti ALT (za 1 IU/L) povećavaju rizik od dekompenzacije za oko 3%, dok više vrednosti ALP povećavaju verovatnoću dekompenzacije za oko 2%. Razlika u nivou ALT u serumu nije ostala značajna nakon primene B-H procedure za korekciju na višestruko testiranje sa pragom od 10% lažnih otkrića. Nije bilo razlike u vrednostima AST i GGT između grupa.

U našoj grupi bolesnika prisustvo dijabetesa nije bilo povezano sa težinom bolesti, što je u suprotnosti sa opštim konsenzusom da je dijabetes značajan faktor za progresiju ciroze^{219,220}. Naš nalaz može biti posledica toga što je većina bolesnika uključenih u studiju sa dekompenzovanom cirozom, odnosno, mali broj bolesnika u drugoj grupi, što ograničava mogućnost detekcije značajnih razlika. Takođe, ciroza dovodi do pojave hepatogenog dijabetesa koji se može javiti kao posledica, a ne uzrok težih formi bolesti²²¹.

Rezultati su pokazali da je genotip c1/c2 *CYP2E1* bio češće detektovan kod bolesnika sa kompenzovanom cirozom u odnosu na c1/c1 genotip i u daljoj analizi je potvrđena njegova protektivna uloga u progresiji bolesti (OR: 0,118). Iako je c2 alel povezan sa povećanom ekspresijom *CYP2E1*, odnosno većim oksidativnim stresom i većim rizikom za cirozu u našoj populaciji, ovi rezultati mogu ukazivati da u kontekstu težih formi bolesti ovaj alel ne mora nužno voditi ka bržoj dekompenzaciji. Verovatnije je da složene interakcije drugih metaboličkih puteva modifikuju dalju progresiju bolesti. Ipak neophodno je naglasiti da ovakvi rezultati mogu biti posledica asimetrije između grupe bolesnika sa kompenzovanom i onih sa dekompenzovanom cirozom i zato ih treba tumačiti sa oprezom.

U našoj grupi bolesnika sa ACJ ostale analizirane genetičke varijante nisu bile povezane sa težinom ciroze. S obzirom da smo utvrdili asocijaciju većine ovih varijanti sa rizikom za razvoj ciroze, moguće je da, iako doprinose riziku za nastanak bolesti, nemaju značajnu ulogu u daljoj progresiji.

5.7.1. Prediktivna vrednost ispitivanih parametara u odnosu na HCC

Bolesnici sa ACJ koji nastave sa konzumacijom alkohola imaju povećan rizik za dalju progresiju ciroze, malignu alteraciju, pre svega razvoj hepatocelularnog karcinoma. Acetaldehid koji nastaje metabolizmom etanola je snažan kancerogen i odgovoran je za nastanak ne samo HCC nego i drugih karcinoma koji su indukovani alkoholom²²². Međutim, rizik za HCC je prisutan i kod bolesnika sa ACJ koji prestanu sa konzumacijom alkohola, kao i kod bolesnika sa bolestima jetre druge etiologije i kod osoba bez prethodne bolesti jetre²²³. Kod bolesnika sa ACJ, kumulativni petogodišnji rizik za HCC je 3-9%²²⁴, zato je važan redovni skrining ovih bolesnika. Identifikacija bolesnika sa ACJ koji su u povećanom riziku za malignu alteraciju bi bila od velikog značaja i pomogla bi u dijagnozi bolesti u ranim fazama. Poznavanje genetičkih varijanti i drugih faktora koji modifikuju ukupni rizik za HCC bi omogućilo efikasniju kontrolu bolesti. U našoj grupi bolesnika sa ACJ kod deset osoba je došlo do maligne alteracije (HCC), kod još 8 bolesnika su dijagnostikovani različiti tumori, uključujući karcinom debelog creva, rektuma, pankreasa, pluća, tumor nadbubrežnih žlezda i kostiju. Pojava ovih malignih oboljenja je u skladu sa prethodnim epidemiološkim studijama koje pokazuju da bolesnici sa hroničnim oboljenjima jetre i dugotrajnom izloženosti štetnim efektima alkohola imaju povećan rizik ne samo za karcinom jetre već i za širok spektar drugih maligniteta²²⁵.

U analizi potencijalnih faktora rizika za progresiju ciroze do HCC, u našoj grupi pacijenata nisu utvrđene značajne povezanosti demografskih, OKA i kliničkih parametara sa pojavom ovog malignog tumora. Ovakvi rezultati su najverovatnije posledica malog broja ispitanika koji su razvili HCC u ovoj studiji, što smanjuje mogućnost za detekciju standardnih faktora rizika, kao što su starost bolesnika ili dugotrajna izloženost velikim količinama alkohola²²⁶.

Kada su u pitanju genetičke varijante koje su bile predmet ovog istraživanja, rezultati su pokazali da postoji slaba pozitivna korelacija između G alela *PNPLA3* i pojave HCC, dok je povezanost između GG genotipa i HCC bila na granici značajnosti. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima drugih studija koje su obuhvatale veći broj ispitanika i utvrdile da je ova varijanta snažan nezavisni prediktor za pojavu HCC, naročito kod ABJ^{161,227,228}. Ova varijanta, pored toga što dovodi do poremećaja metabolizma lipida i akumulacije triglicerida u jetri, indukuje hronični oksidativni stres i podstiče promene u ekstracelularnom matriksu, stvarajući mikrosredinu koja omogućava hepatocitima malignu transformaciju²²⁹. Iako je broj bolesnika sa HCC u našoj studiji mali, naši nalazi su u skladu sa prethodnim studijama i nagoveštavaju da *PNPLA3* može imati ulogu u riziku od maligne alteracije i u našoj populaciji.

Rezultati su takođe pokazali da su nosioci aktivnog gena za *GSTM1* bili značajno češće zastupljeni u grupi bolesnika sa HCC-om, nego u grupi bez HCC-a, što predstavlja neočekivani rezultat, s obzirom na antioksidativnu ulogu GST-aza. Rezultati drugih studija su pokazali da je *GSTM1*0* asociran sa rizikom za HCC u azijskim populacijama, dok u kavkaskim nije²³⁰. Takođe je utvrđeno da je povećana ekspresija *GSTM1* povezana sa većim metastatskim potencijalom, što može omogućiti tumorskim ćelijama bolju adaptaciju na oksidativni stres, što može biti objašnjenje i našeg nalaza²³¹. Neki autori ukazuju na povećan rizik od kancerogeneze kod osoba sa smanjenim

antioksidativnim i detoksikujućim kapacitetom²³², a drugi sugerišu da odsustvo pojedinih enzima može dovesti do promena u metaboličkim putevima i na taj način modifikovati individualni rizik od karcinoma²³³. *In silico* analizom utvrđena je strukturna homologija između GSTM1 i GSTM2 enzima, gde se ukupna aktivnost GST nije menjala bez obzira na *GSTM1* genotip, čime je i potvrđeno da se odsustvo GSTM1 kompenzuje prekomernom ekspresijom *GSTM2* gena²³⁴. Sve prethodno rečeno ukazuje na kompleksnost antioksidativnih mehanizama, što navodi da je neophodno analizirati veći broj varijanti u različitim genima uključenim u ove procese radi dobijanja preciznije slike o individualnom riziku za nastanak karcinoma. Za ostale analizirane varijante nije bilo razlike u učestalostima između dve grupe. Ukupno gledano ovakvi rezultati nagoveštavaju da genetičke varijante mogu predstavljati potencijalni prediktivni faktor za HCC, kod bolesnika koji već imaju ACJ. Dalja istraživanja koja bi uključila širi panel genetičkih varijanti u poligenski skor rizika i veći broj bolesnika sa HCC bi omogućila raniju identifikaciju bolesnika sa ACJ koji imaju predispoziciju za malignu alteraciju, što bi značajno doprinelo personalizovanom pristupu njihovom praćenju i lečenju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Varijante rs738409 u genu *PNPLA3*, rs58542926 u genu *TM6SF2*, rs2031920 u genu *CYP2E1* i rs361525 u genu *TNF- α* -238 identifikovane su kao značajni markeri rizika i imaju potencijalnu vrednost kao deo genetičkog panela za procenu rizika za razvoj ACJ, pri čemu se *PNPLA3* GG genotip izdvaja kao najznačajniji nezavisni prediktor.
2. Delecija *GSTM1* gena se takođe izdvaja kao značajan marker rizika za razvoj ACJ, koji je povećan u kombinaciji sa delecijom *GSTT1* gena, što potvrđuje važnost kumulativnog efekta poremećaja oksidativne zaštite u etiologiji ACJ.
3. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da konstrukcija PRS modela predstavlja pouzdan pristup za stratifikaciju individua prema riziku za razvoj ACJ. Dobijeni rezultati ukazuju da integracija dva analizirana gena (*PNPLA3* i *TM6SF2*) u okviru PRS pristupa može doprineti preciznoj proceni individualne predispozicije za razvoj ACJ i unaprediti razumevanje genetičke osnove interindividualnih razlika u susceptibilnosti i progresiji bolesti. Takođe, otvara mogućnost primene PRS u personalizovanom pristupu identifikaciji i praćenju bolesnika sa povećanim rizikom za ACJ u kliničkoj praksi.
4. Potrebno je testirati PRS model na većim, multicentričnim kohortama uz uključivanje dodatnih varijanti, kao i drugih karakteristika bolesnika kako bi se povećala preciznost predviđanja i stabilnost modela u različitim populacijama pre uvođenja u kliničku praksu.
5. Klinička progresija i dekompenzacija su pod uticajem metaboličkih faktora (ALT i ALP), dok je c1/c2 genotip *CYP2E1* identifikovan kao protektivni faktor u progresiji ACJ, ovo ukazuje na značaj ranog praćenja i kontrole biohemijskih parametara u kliničkoj praksi.
6. Dobijeni rezultati ukazuju da genetički faktori imaju veoma značajnu, ali ne i isključivu ulogu u nastanku, progresiji i kliničkoj manifestaciji ACJ. Prisustvo GG genotipa *PNPLA3* izdvojilo se kao najsnažniji genetički faktor rizika za razvoj bolesti nezavisno od količine konzumiranog alkohola, dok su *GSTM1* i *GSTT1* geni pokazali protektivni efekat u kontekstu tolerancije na alkohol. Istovremeno, ograničena povezanost ispitivanih varijanti sa analiziranim biohemijskim parametrima i pojedinim komplikacijama bolesti ukazuje da varijabilnost kliničke slike ACJ zavisi od metaboličkih i drugih individualnih faktora.
7. Nalazi koji povezuju c1/c1 genotip *CYP2E1* sa ascitesom, deleciju *GSTM1* gena sa portalnom hipertenzijom i GG genotip *PNPLA3* i aktivni *GSTM1* genotipa sa HCC-om dodatno sugerišu da genetičke varijante mogu doprineti razlikama u toku i komplikacijama bolesti, ali da same po sebi nisu dovoljne za potpuno objašnjenje kliničkog fenotipa. Poseban značaj imaju metabolički parametri ALT i ALP kao pokazatelji progresije i dekompenzacije bolesti, što ukazuje na značaj ranog praćenja biohemijskih parametara u kliničkoj praksi. Početak konzumiranja alkohola posle 23. godine života je jedini faktor koji je imao uticaj na brzinu dekompenzacije ciroze u našoj kohorti.
8. Sveukupno, rezultati ove disertacije potvrđuju potencijal integracije genetičkih, ali i kliničko-biohemijskih pokazatelja u unapređenju procene rizika i individualizovanog pristupa

bolesnicima sa ACJ, ali i ukazuju na potrebu za daljim validacionim studijama na većim i multicentričnim kohortama pre uvođenja u kliničku praksu.

7. LITERATURA

1. World Health Organization (2024). Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/377960>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. World Health Organization (2010). Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241599931>.
3. Åberg F, Jiang ZG, Cortez-Pinto H, Männistö V. Alcohol-associated liver disease-Global epidemiology. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2024;80(6):1307-22. <https://doi.org/10.1097/hep.0000000000000899>.
4. Julien J, Ayer T, Tapper EB, Barbosa C, Dowd WN, Chhatwal J. Effect of increased alcohol consumption during COVID-19 pandemic on alcohol-associated liver disease: A modeling study. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2022;75(6):1480-90. <https://doi.org/10.1002/hep.32272>.
5. Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* (London, England). 1995;346(8981):987-90. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)91685-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)91685-7).
6. Huang DQ, Terrault NA, Tacke F, Glud LL, Arrese M, Bugianesi E, Loomba R. Global epidemiology of cirrhosis - aetiology, trends and predictions. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2023;20(6):388-98. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00759-2>.
7. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*. 2023;79(2):516-37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>.
8. Marinković I. Estimates of alcohol-related mortality in Serbia (2016-2018). *Stanovništvo*. 2020;58(1):89-111. <https://doi.org/10.2298/STNV2001089M>.
9. Schomerus G, Leonhard A, Manthey J, Morris J, Neufeld M, Kilian C, Speerforck S, Winkler P, Corrigan PW. The stigma of alcohol-related liver disease and its impact on healthcare. *Journal of hepatology*. 2022;77(2):516-24. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.04.026>.
10. Schult A, Stokkeland K, Ericzon BG, Hultcrantz R, Franck J, Stål P, Castedal M. Alcohol and drug use prior to liver transplantation: more common than expected in patients with non-alcoholic liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2019;54(9):1146-54. <https://doi.org/10.1080/00365521.2019.1656772>.
11. Raghavan RP, Alexander KT, Sadasivan S, Parmar C, Kathirvel M. Genetic Variants in Liver Cirrhosis: Classifications, Mechanisms, and Implications for Clinical Practice. *Journal of personalized medicine*. 2026;16(1). <https://doi.org/10.3390/jpm16010029>.
12. Tabibian JH, LaRusso NF. Liver and Bile. *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00047-7>.
13. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(1):177-97. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.
14. Mackowiak B, Fu Y, Maccioni L, Gao B. Alcohol-associated liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2024;134(3). <https://doi.org/10.1172/jci176345>.
15. Sharma B, S. J. Cirrhosis. *StatPearls* [Internet] [Updated 2022 Oct 31]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482419/>.
16. Chung R, Podolsky D. Ciroza jetre i komplikacije. *Harisonova načela Interne medicine*. 15 ed. Beograd: Braunwald E, eds. Bard – Fin. ; 2004. p. 2: 1754 – 67.
17. Vučelić B, Brkić T. Ciroza jetre. In: Vrhovac B FI, Jaksic B., editor. *Interna medicina*. Zagreb: Naprijed; 2003. p. 952- 9.
18. Hofer BS, Simbrunner B, Hartl L, Jachs M, Bauer DJM, Balcar L, Paternostro R, Schwabl P, Semmler G, Scheiner B, Staettermayer AF, Trauner M, Mandorfer M, Reiberger T. Alcohol

- Abstinence Improves Prognosis Across All Stages of Portal Hypertension in Alcohol-Related Cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2023;21(9):2308-17.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2022.11.033>.
19. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1572-85. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002>.
 20. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38 Suppl 1:S38-53. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00429-4).
 21. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clinics in liver disease*. 2012;16(4):667-85. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>.
 22. Liu T, Zhang F, Feng Y, Han P, Gao Y. Alcohol-Metabolizing Enzymes, Liver Diseases and Cancer. *Seminars in liver disease*. 2025;45(1):99-113. <https://doi.org/10.1055/a-2551-3320>.
 23. Fu Y, Mackowiak B, Lin YH, Maccioni L, Lehner T, Pan H, Guan Y, Godlewski G, Lu H, Chen C, Wei S, Feng D, Paloczi J, Zhou H, Pacher P, Zhang L, Kunos G, Gao B. Coordinated action of a gut-liver pathway drives alcohol detoxification and consumption. *Nature metabolism*. 2024;6(7):1380-96. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01063-2>.
 24. Osna NA, Rasineni K, Ganesan M, Donohue TM, Jr., Kharbanda KK. Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2022;12(6):1492-513. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.05.004>.
 25. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2006;29(4):245-54. PMID: 17718403; PMCID: PMC6527027.
 26. Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current drug abuse reviews*. 2008;1(1):3-8. <https://doi.org/10.2174/1874473710801010003>.
 27. Harjumäki R, Pridgeon CS, Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158221>.
 28. Fernandez-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(4):1247-52. <https://doi.org/10.1172/jci114008>.
 29. Ali H, Assiri MA, Shearn CT, Fritz KS. Lipid peroxidation derived reactive aldehydes in alcoholic liver disease. *Current opinion in toxicology*. 2019;13:110-7. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.003>.
 30. García-Suástegui WA, Ramos-Chávez LA, Rubio-Osornio M, Calvillo-Velasco M, Atzin-Méndez JA, Guevara J, Silva-Adaya D. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:4680732. <https://doi.org/10.1155/2017/4680732>.
 31. Zhu H, Jia Z, Misra H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *Journal of digestive diseases*. 2012;13(3):133-42. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2011.00569.x>.
 32. You M, Arteel GE. Effect of ethanol on lipid metabolism. *Journal of hepatology*. 2019;70(2):237-48. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.037>.
 33. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepatic medicine : evidence and research*. 2017;9:55-66. <https://doi.org/10.2147/hmer.S125718>.

34. Borén J, Adiels M, Björnson E, Matikainen N, Söderlund S, Rämö J, Ståhlman M, Ripatti P, Ripatti S, Palotie A, Mancina RM, Hakkarainen A, Romeo S, Packard CJ, Taskinen MR. Effects of TM6SF2 E167K on hepatic lipid and very low-density lipoprotein metabolism in humans. *JCI insight*. 2020;5(24). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.144079>.
35. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2010;3(3):178-85. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12288>.
36. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cellular & molecular immunology*. 2021;18(1):45-56. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>.
37. Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, Czaja MJ. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(1):705-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.705>.
38. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(47):17756-72. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17756>.
39. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, Saveria Crocè L, Sasso F, Pozzato G, Cristianini G, Brandi G. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut*. 1997;41(6):845-50. <https://doi.org/10.1136/gut.41.6.845>.
40. EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *Journal of hepatology*. 2018;69(1):154-81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.018>.
41. Carlini LE, Fernandez AC, Mellinger JL. Sex and gender in alcohol use disorder and alcohol-associated liver disease in the United States: A narrative review. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2026;83(1):178-94. <https://doi.org/10.1097/hep.0000000000000905>.
42. Tenchov R, Sasso JM, Wang X, Zhou QA. Aging Hallmarks and Progression and Age-Related Diseases: A Landscape View of Research Advancement. *ACS chemical neuroscience*. 2024;15(1):1-30. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00531>.
43. Meroni M, Longo M, Rametta R, Dongiovanni P. Genetic and Epigenetic Modifiers of Alcoholic Liver Disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123857>.
44. Dukić M, Radonjić T, Jovanović I, Zdravković M, Todorović Z, Krašnik N, Arandelović B, Mandić O, Popadić V, Nikolić N, Klačnja S, Manojlović A, Divac A, Gačić J, Brajković M, Oprić S, Popović M, Branković M. Alcohol, Inflammation, and Microbiota in Alcoholic Liver Disease. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043735>.
45. Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184568>.
46. Llamas-Falcón L, Shield KD, Gelovany M, Hasan OSM, Manthey J, Monteiro M, Walsh N, Rehm J. Impact of alcohol on the progression of HCV-related liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2021;75(3):536-46. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.04.018>.
47. Levy R, Catana AM, Durbin-Johnson B, Halsted CH, Medici V. Ethnic differences in presentation and severity of alcoholic liver disease. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2015;39(3):566-74. <https://doi.org/10.1111/acer.12660>.
48. Ding C, Ng Fat L, Britton A, Im PK, Lin K, Topiwala A, Li L, Chen Z, Millwood IY, Bell S, Mehta G. Binge-pattern alcohol consumption and genetic risk as determinants of alcohol-related liver disease. *Nature communications*. 2023;14(1):8041. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43064-x>.
49. Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *Journal of hepatology*. 2015;62(1 Suppl):S38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.006>.

50. Rae-Whitcombe SM, Kennedy D, Voyles M, Thompson MP. Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;402(4):767-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.106>.
51. Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, Revett T, Shih HH, Liu W, Paulsen JE, Gimeno RE. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *Journal of lipid research*. 2005;46(11):2477-87. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500290-JLR200>.
52. Hoekstra M, Li Z, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ, Kuiper J. The expression level of non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly influenced by hepatic lipid status. *Journal of hepatology*. 2010;52(2):244-51. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.004>.
53. Stickel F, Hampe J, Trépo E, Datz C, Romeo S. PNPLA3 genetic variation in alcoholic steatosis and liver disease progression. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2015;4(3):152-60. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.04>.
54. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *Journal of lipid research*. 2006;47(9):1940-9. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600185-JLR200>.
55. Lulić AM, Katalinić M. The PNPLA family of enzymes: characterisation and biological role. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2023;74(2):75-89. <https://doi.org/10.2478/aiht-2023-74-3723>.
56. Yang A, Mottillo EP, Mladenovic-Lucas L, Zhou L, Granneman JG. Dynamic interactions of ABHD5 with PNPLA3 regulate triacylglycerol metabolism in brown adipocytes. *Nature metabolism*. 2019;1(5):560-9. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0066-3>.
57. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6706-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064501>.
58. Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Pnpla3^{I148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;61(1):108-18. <https://doi.org/10.1002/hep.27242>.
59. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. *Journal of hepatology*. 2016;65(2):399-412. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.011>.
60. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemliadis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2008;40(12):1461-5. <https://doi.org/10.1038/ng.257>.
61. Tian C, Stokowski RP, Kershenobich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nature genetics*. 2010;42(1):21-3. <https://doi.org/10.1038/ng.488>.
62. Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, Ouziel R, Quertinmont E, Vercruysse V, Amininejad L, Deltenre P, Le Moine O, Devière J, Franchimont D, Moreno C. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *Journal of hepatology*. 2011;55(4):906-12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.028>.
63. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Rametta R, Colombo M, Fargion S. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;53(3):791-9. <https://doi.org/10.1002/hep.24123>.

64. Kiatbumrung R, Chuaypen N, Payungporn S, Avihingsanon A, Tangkijvanich P. The Association of PNPLA3, COX-2 and DHCR7 Polymorphisms with Advanced Liver Fibrosis in Patients with HCV Mono- Infection and HCV/HIV Co-Infection. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(8):2191-7. <https://doi.org/10.22034/apjcp.2018.19.8.2191>.
65. Valenti L, Maggioni P, Piperno A, Rametta R, Pelucchi S, Mariani R, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S. Patatin-like phospholipase domain containing-3 gene I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in hereditary hemochromatosis. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(22):2813-20. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i22.2813>.
66. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, Brosch M, Rosendahl J, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, McQuillin A, Frank J, Kiefer F, Schreiber S, Lieb W, Soyka M, Semmo N, Aigner E, Datz C, Schmelz R, Brückner S, Zeissig S, Stephan AM, Wodarz N, Devière J, Clumeck N, Sarrazin C, Lammert F, Gustot T, Deltenre P, Völzke H, Lerch MM, Mayerle J, Eyer F, Schafmayer C, Cichon S, Nöthen MM, Nothnagel M, Ellinghaus D, Huse K, Franke A, Zopf S, Hellerbrand C, Moreno C, Franchimont D, Morgan MY, Hampe J. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nature genetics*. 2015;47(12):1443-8. <https://doi.org/10.1038/ng.3417>.
67. Li ZY, Wu G, Qiu C, Zhou ZJ, Wang YP, Song GH, Xiao C, Zhang X, Deng GL, Wang RT, Yang YL, Wang XL. Mechanism and therapeutic strategy of hepatic TM6SF2-deficient non-alcoholic fatty liver diseases via in vivo and in vitro experiments. *World journal of gastroenterology*. 2022;28(25):2937-54. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i25.2937>.
68. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, Silveira A, Franco-Cereceda A, Hamsten A, Eriksson P, van't Hooft F. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(24):8913-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323785111>.
69. Sanchez-Pulido L, Ponting CP. TM6SF2 and MAC30, new enzyme homologs in sterol metabolism and common metabolic disease. *Frontiers in genetics*. 2014;5:439. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00439>.
70. Kumar G, Shah YR, Shahzad A, Jameel K, Guevara-Lazo D, Khan NA, Dahiya DS, Gangwani MK, Ravichandran R, Patel R, Hayat U, Thandassery RB. Genetic predeterminants and recent advancements in steatotic liver disease: A roadmap toward precision hepatology. *World journal of hepatology*. 2025;17(11):111576. <https://doi.org/10.4254/wjh.v17.i11.111576>.
71. Al-Nakeb M, Haep N. TM6SF2 in Hepatic Lipid Metabolism and Chronic Liver Disease. *Livers*. 2026;6(2):17. <https://doi.org/doi:10.3390/livers6020017>.
72. Prill S, Caddeo A, Baselli G, Jamialahmadi O, Dongiovanni P, Rametta R, Kanebratt KP, Pujia A, Pingitore P, Mancina RM, Lindén D, Whatling C, Janefeldt A, Kozyra M, Ingelman-Sundberg M, Valenti L, Andersson TB, Romeo S. The TM6SF2 E167K genetic variant induces lipid biosynthesis and reduces apolipoprotein B secretion in human hepatic 3D spheroids. *Scientific reports*. 2019;9(1):11585. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47737-w>.
73. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, Motta BM, Kaminska D, Rametta R, Grimaudo S, Pelusi S, Montalcini T, Alisi A, Maggioni M, Kärjä V, Borén J, Kälälä P, Di Marco V, Xing C, Nobili V, Dallapiccola B, Craxi A, Pihlajamäki J, Fargion S, Sjöström L, Carlsson LM, Romeo S, Valenti L. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;61(2):506-14. <https://doi.org/10.1002/hep.27490>.
74. Fairfield CJ, Drake TM, Pius R, Bretherick AD, Campbell A, Clark DW, Fallowfield JA, Hayward C, Henderson NC, Joshi PK, Mills NL, Porteous DJ, Ramachandran P, Semple RK, Shaw

- CA, Sudlow CLM, Timmers P, Wilson JF, Wigmore SJ, Harrison EM, Spiliopoulou A. Genome-Wide Association Study of NAFLD Using Electronic Health Records. *Hepatology communications*. 2022;6(2):297-308. <https://doi.org/10.1002/hep4.1805>.
75. Coppola N, Rosa Z, Cirillo G, Stanzone M, Macera M, Boemio A, Grandone A, Pisaturo M, Marrone A, Adinolfi LE, Sagnelli E, Miraglia del Giudice E. TM6SF2 E167K variant is associated with severe steatosis in chronic hepatitis C, regardless of PNPLA3 polymorphism. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(8):1959-63. <https://doi.org/10.1111/liv.12781>.
76. Falletti E, Cussigh A, Cmet S, Fabris C, Toniutto P. PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2016;48(1):69-75. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.09.009>.
77. Buch S, Sharma A, Ryan E, Datz C, Griffiths WJH, Way M, Buckley TWM, Ryan JD, Stewart S, Wright C, Dongiovanni P, Fracanzani A, Zwerina J, Merle U, Weiss KH, Aigner E, Krones E, Dejaco C, Fischer J, Berg T, Valenti L, Zoller H, McQuillin A, Hampe J, Stickel F, Morgan MY. Variants in PCSK7, PNPLA3 and TM6SF2 are risk factors for the development of cirrhosis in hereditary haemochromatosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2021;53(7):830-43. <https://doi.org/10.1111/apt.16252>.
78. Wang X, Liu Z, Wang K, Wang Z, Sun X, Zhong L, Deng G, Song G, Sun B, Peng Z, Liu W. Additive Effects of the Risk Alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population. *Frontiers in genetics*. 2016;7:140. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00140>.
79. Raksayot M, Chuaypen N, Khlaiphuengsin A, Pinjaroen N, Treeprasertsuk S, Poovorawan Y, Tanaka Y, Tangkijvanich P. Independent and additive effects of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on the development of non-B, non-C hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology*. 2019;54(5):427-36. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-01533-x>.
80. Stickel F, Buch S, Nischalke HD, Weiss KH, Gotthardt D, Fischer J, Rosendahl J, Marot A, Elamly M, Casper M, Lammert F, McQuillin A, Zopf S, Spengler U, Marhenke S, Kirstein MM, Vogel A, Eyer F, von Felden J, Wege H, Buch T, Schafmayer C, Braun F, Deltenre P, Berg T, Morgan MY, Hampe J. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. 2018;113(10):1475-83. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0041-8>.
81. Chen L, Du S, Lu L, Lin Z, Jin W, Hu D, Jiang X, Xin Y, Xuan S. The additive effects of the TM6SF2 E167K and PNPLA3 I148M polymorphisms on lipid metabolism. *Oncotarget*. 2017;8(43):74209-16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18474>.
82. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(5):723-38. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004>.
83. Lu Y, Cederbaum AI. Cytochrome P450s and Alcoholic Liver Disease. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(14):1502-17. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180410091511>.
84. Porubsky PR, Meneely KM, Scott EE. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(48):33698-707. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805999200>.
85. Zhukov A, Ingelman-Sundberg M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *The Biochemical journal*. 1999;340 (Pt 2)(Pt 2):453-8. <https://doi.org/10.1042/bj3400453>.

86. Zeng T, Guo FF, Zhang CL, Song FY, Zhao XL, Xie KQ. Roles of cytochrome P4502E1 gene polymorphisms and the risks of alcoholic liver disease: a meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(1):e54188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054188>.
87. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *Journal of biochemistry*. 1991;110(4):559-65. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123619>.
88. Jiang Y, Zhang T, Kusumanchi P, Han S, Yang Z, Liangpunsakul S. Alcohol Metabolizing Enzymes, Microsomal Ethanol Oxidizing System, Cytochrome P450 2E1, Catalase, and Aldehyde Dehydrogenase in Alcohol-Associated Liver Disease. *Biomedicines*. 2020;8(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8030050>.
89. Grove J, Brown AS, Daly AK, Bassendine MF, James OF, Day CP. The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype. *Pharmacogenetics*. 1998;8(4):335-42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199808000-00007>.
90. Khan AJ, Husain Q, Choudhuri G, Parmar D. Association of polymorphism in alcohol dehydrogenase and interaction with other genetic risk factors with alcoholic liver cirrhosis. *Drug and alcohol dependence*. 2010;109(1-3):190-7. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.01.010>.
91. Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, Ryan P, Roberts-Thomson IC. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2002;17(2):177-82. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02670.x>.
92. Li L, Li X, Zhang F. The pivotal role of cytokines in liver disease pathogenesis and therapeutic potential. *Frontiers in immunology*. 2025;16:1694582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1694582>.
93. Abbas K. Abul, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed., updated ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. 564 p.
94. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006;290(4):G583-9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00422.2005>.
95. Mak KM, Shekhar AC. Lipopolysaccharide, arbiter of the gut-liver axis, modulates hepatic cell pathophysiology in alcoholism. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2025;308(3):975-1004. <https://doi.org/10.1002/ar.25562>.
96. Fennekohl A, Sugimoto Y, Segi E, Maruyama T, Ichikawa A, Püschel GP. Contribution of the two Gs-coupled PGE2-receptors EP2-receptor and EP4-receptor to the inhibition by PGE2 of the LPS-induced TNFalpha-formation in Kupffer cells from EP2-or EP4-receptor-deficient mice. Pivotal role for the EP4-receptor in wild type Kupffer cells. *Journal of hepatology*. 2002;36(3):328-34. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00277-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00277-x).
97. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology research and practice*. 2010;2010:362847. <https://doi.org/10.1155/2010/362847>.
98. Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):41930-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107181200>.
99. Boutros T, Nantel A, Emadali A, Tzimas G, Conzen S, Chevet E, Metrakos PP. The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and*

- the American Society of Transplant Surgeons. 2008;8(12):2558-68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02420.x>.
100. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T, Noguchi R, Yoshiji H, Fujimoto M, Fukui H. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:495156. <https://doi.org/10.1155/2013/495156>.
 101. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):184-95. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::Aid-jemt2>3.0.Co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::Aid-jemt2>3.0.Co;2-h).
 102. O'Connell J, Porter J, Kroeplien B, Norman T, Rapecki S, Davis R, McMillan D, Arakaki T, Burgin A, Fox Iii D, Ceska T, Lecomte F, Maloney A, Vugler A, Carrington B, Cossins BP, Bourne T, Lawson A. Small molecules that inhibit TNF signalling by stabilising an asymmetric form of the trimer. *Nature communications*. 2019;10(1):5795. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13616-1>.
 103. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729-33. <https://doi.org/10.1038/385729a0>.
 104. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(1):49-62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.
 105. Medler J, Kucka K, Wajant H. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2): An Emerging Target in Cancer Therapy. *Cancers*. 2022;14(11). <https://doi.org/10.3390/cancers14112603>.
 106. Mahto H, Tripathy R, Meher BR, Prusty BK, Sharma M, Deogharia D, Saha AK, Panda AK, Das BK. TNF- α promoter polymorphisms (G-238A and G-308A) are associated with susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and *P. falciparum* malaria: a study in malaria endemic area. *Scientific reports*. 2019;9(1):11752. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48182-5>.
 107. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(4):562-6. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.4.562>.
 108. Valenti L, Pulixi E, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Maggioni M, Orsatti A, Gianni C, Fargion S. TNFalpha genotype affects TNFalpha release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 2005;43(6):944-50. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.035>.
 109. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Maerker-Hermann E, Hoehler T. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *The Journal of investigative dermatology*. 2000;114(6):1180-3. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00001.x>.
 110. Kiss-Toth E, Harlock E, Lath D, Quertermous T, Wilkinson JM. A TNF variant that associates with susceptibility to musculoskeletal disease modulates thyroid hormone receptor binding to control promoter activation. *PloS one*. 2013;8(9):e76034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076034>.
 111. Chen D, Liu JL, Liu Y, Zhu J, Wang SW. Lack of an association between -308G>A polymorphism of the TNF- α gene and liver cirrhosis risk based on a meta-analysis. *Genetics and molecular research : GMR*. 2011;10(4):2765-74. <https://doi.org/10.4238/2011.November.8.2>.
 112. Marcos M, Gómez-Munuera M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ. Tumor necrosis factor polymorphisms and alcoholic liver disease: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. 2009;170(8):948-56. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp236>.
 113. Zhao YY, Xiao M, Zhang CL, Xie KQ, Zeng T. Associations between the tumor necrosis factor- α gene and interleukin-10 gene polymorphisms and risk of alcoholic liver disease: A meta-

- analysis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2016;40(4):428-39. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.10.007>.
114. Feng H, Kuai JH, Zhang MY, Wang GC, Shi YJ, Zhang JY. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G > A polymorphism alters the risk of hepatocellular carcinoma in a Han Chinese population. *Diagnostic pathology*. 2014;9:199. <https://doi.org/10.1186/s13000-014-0199-3>.
 115. Wungu CDK, Ariyanto FC, Prabowo GI, Soetjipto, Handajani R. Association between five types of Tumor Necrosis Factor- α gene polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *BMC cancer*. 2020;20(1):1134. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07606-6>.
 116. Wei Y, Liu F, Li B, Chen X, Ma Y, Yan L, Wen T, Xu M, Wang W, Yang J. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and hepatocellular carcinoma risk: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56(8):2227-36. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1617-y>.
 117. Moreira ST, Silva GF, de Moraes CF, Grotto RM, de Moura Campos Pardini MI, Bicalho Mda G, Moliterno RA. Influence of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms on the degree of liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Meta gene*. 2016;9:90-6. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.04.003>.
 118. Li S, Huang X, Zhong H, Chen Z, Peng Q, Deng Y, Qin X. Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) genetic polymorphisms and the risk of autoimmune liver disease: a meta-analysis. *Journal of genetics*. 2013;92(3):617-28. PMID: 24371186.
 119. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, González-Sarmiento R. -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2005;29(11):1928-31. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000187595.19324.ca>.
 120. Zheng M, Li J, Fang W, Luo L, Ding R, Zeng H, Luo H, Lin X, Duan C. The TNF- α rs361525 and IFN- γ rs2430561 polymorphisms are associated with liver cirrhosis risk: a comprehensive meta-analysis. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1129767. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129767>.
 121. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122(2):274-80. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.31065>.
 122. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2001;10(12):1239-48. PMID: 11751440.
 123. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(6):3517-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3517>.
 124. Rezende Santos A, Lopes M, Lima de F, Teixeira RLDF, Noel Suffys P. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. In: Mahboub B, Vats MG, editors. *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*. London: IntechOpen; 2013. <https://doi.org/10.5772/54984>.

125. Ylva Ivarsson aBM. Combinatorial Protein Chemistry in Three Dimensions: A Paradigm for the Evolution of Glutathione Transferases with Novel Activities. In: Awasthi YC, editor. *The Toxicology of Glutathione Transferases*. Boca Raton, FL: Taylor&Francis Group; 2007. p. 47-71.
126. Marcos M, Pastor I, Chamorro AJ, Ciria-Abad S, González-Sarmiento R, Laso FJ. Meta-analysis: glutathione-S-transferase allelic variants are associated with alcoholic liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;34(10):1159-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04862.x>.
127. Ladero JM, Martínez C, García-Martin E, Fernández-Arquero M, López-Alonso G, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, Agúndez JA. Polymorphisms of the glutathione S-transferases mu-1 (GSTM1) and theta-1 (GSTT1) and the risk of advanced alcoholic liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2005;40(3):348-53. <https://doi.org/10.1080/00365520510012109>.
128. Mekuria AN, Seyoum T, Alemayehu DH, Abebe M, Nedi T, Abula T, Gong YY, Engidawork E. Copy Number Variation in the GSTM1 and GSTT1 Genes and the Risk of Liver Cirrhosis in Eastern Ethiopia. *The application of clinical genetics*. 2023;16:171-9. <https://doi.org/10.2147/tacg.S435852>.
129. Tisoris A, Marlar CA. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. *StatPearls* [Internet]. Updated 2023 Mar 13 ed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542308/>.
130. World Health Organization. (2000). *International guide for monitoring alcohol consumption and related harm*. Geneva: World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/66529>.
131. Grubiša Ivana. Genetički markeri oksidativnog stresa kod bolesnika sa manifestnim dijabetesom tipa 2 i aterosklerozom [Doktorska disertacija]. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2013. Dostupno na: <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/2076>.
132. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
133. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human mutation*. 2016;37(6):564-9. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>.
134. Schneider VA, Graves-Lindsay T, Howe K, Bouk N, Chen HC, Kitts PA, Murphy TD, Pruitt KD, Thibaud-Nissen F, Albracht D, Fulton RS, Kremitzki M, Magrini V, Markovic C, McGrath S, Steinberg KM, Auger K, Chow W, Collins J, Harden G, Hubbard T, Pelan S, Simpson JT, Threadgold G, Torrance J, Wood JM, Clarke L, Koren S, Boitano M, Peluso P, Li H, Chin CS, Phillippy AM, Durbin R, Wilson RK, Flicek P, Eichler EE, Church DM. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome research*. 2017;27(5):849-64. <https://doi.org/10.1101/gr.213611.116>.
135. Enssle, J., & Weylandt, K. H. (2021). Secure and Optimized Detection of PNPLA3 rs738409 Genotype by an Improved PCR–Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *BioTechniques*, 70(6), 345–349. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0163>.
136. Urzua A, Mezzano G, Brahm J, Poniachik J, Miranda J, Caceres DD, Carreno L, Venegas M. TM6SF2 rs58542926 Polymorphism is not Associated With Risk of Steatosis or Fibrosis in Chilean Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon*. 2017;17(4):e12307. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.44365>.
137. Sameer AS, Nissar S, Qadri Q, Alam S, Baba SM, Siddiqi MA. Role of CYP2E1 genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population. *Human genomics*. 2011;5(6):530-7. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-6-530>.
138. Mossböck G, Renner W, El-Shabrawi Y, Faschinger C, Schmut O, Wedrich A, Zimmermann C, Weger M. TNF-alpha -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian

- patients with exfoliation glaucoma. *Molecular vision*. 2009;15:518-22. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19279689; PMCID: PMC2654045.
139. Yapijakis C, Serefoglou Z, Vylliotis A, Nkenke E, Derka S, Vassiliou S, Avgoustidis D, Neukam FW, Patsouris E, Vairaktaris E. Association of polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Alpha and Beta genes with increased risk for oral cancer. *Anticancer research*. 2009;29(6):2379-86. PMID: 19528505.
 140. Grubisa I, Otasevic P, Vucinic N, Milicic B, Jozic T, Krstic S, Milasin J. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are strong risk factors for atherogenesis in a Serbian population. *Genetics and molecular biology*. 2018;41(1):35-40. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0034>.
 141. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome medicine*. 2020;12(1):44. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00742-5>.
 142. The Polygenic Score (PGS) Catalog. Available online: [Internet]. [cited 8th May 2025]. Available from: <https://www.pgscatalog.org/score/PGS000704>.
 143. Sinnott-Armstrong N, Tanigawa Y, Amar D, Mars N, Benner C, Aguirre M, Venkataraman GR, Wainberg M, Ollila HM, Kiiskinen T, Havulinna AS, Pirruccello JP, Qian J, Shcherbina A, Rodriguez F, Assimes TL, Agarwala V, Tibshirani R, Hastie T, Ripatti S, Pritchard JK, Daly MJ, Rivas MA. Genetics of 35 blood and urine biomarkers in the UK Biobank. *Nature genetics*. 2021;53(2):185-94. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00757-z>.
 144. Lambert SA, Wingfield B, Gibson JT, Gil L, Ramachandran S, Yvon F, Saverimuttu S, Tinsley E, Lewis E, Ritchie SC, Wu J, Cánovas R, McMahon A, Harris LW, Parkinson H, Inouye M. Enhancing the Polygenic Score Catalog with tools for score calculation and ancestry normalization. *Nature genetics*. 2024;56(10):1989-94. <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01937-x>.
 145. Ghobadloo SM, Yaghmaei B, Bakayev V, Goudarzi H, Noorinayer B, Rad FH, Samiy S, Aghabozorghi S, Zali MR. GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms in patients with cryptogenic liver cirrhosis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2004;8(4):423-7. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2004.02.005>.
 146. Niu X, Zhu L, Xu Y, Zhang M, Hao Y, Ma L, Li Y, Xing H. Global prevalence, incidence, and outcomes of alcohol related liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2023;23(1):859. <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15749-x>.
 147. Scott E, Anstee QM. Genetics of alcoholic liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical medicine (London, England)*. 2018;18(Suppl 2):s54-s9. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-s54>.
 148. Mandrekar P, Mandal A. Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease. *Clinics in liver disease*. 2024;28(4):647-61. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2024.06.005>.
 149. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1728-44.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.037>.
 150. Zakhari S, Neuman M, Seitz HK. The role of cytochrome P4502E1 in ethanol mediated diseases: a narrative update. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2025;60(3). <https://doi.org/10.1093/alcalc/agaf014>.
 151. Tan HK, Yates E, Lilly K, Dhanda AD. Oxidative stress in alcohol-related liver disease. *World journal of hepatology*. 2020;12(7):332-49. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i7.332>.
 152. Vatsalya V, Byrd ND, Stangl BL, Momenan R, Ramchandani VA. Influence of age and sex on alcohol pharmacokinetics and subjective pharmacodynamic responses following intravenous alcohol exposure in humans. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2023;107:144-52. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2022.08.010>.

153. McCaul ME, Roach D, Hasin DS, Weisner C, Chang G, Sinha R. Alcohol and Women: A Brief Overview. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2019;43(5):774-9. <https://doi.org/10.1111/acer.13985>.
154. Georgieva M, Xenodochidis C, Krasteva N. Old age as a risk factor for liver diseases: Modern therapeutic approaches. *Experimental gerontology*. 2023;184:112334. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112334>.
155. Murayama R, Horisawa K, Miura S, Taniguchi S, Shu J, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, Ishigami K, Suzuki A. Differential Effects of Liver Regeneration on Aging-Related Changes in Gene Expression and Metabolic Function. *Aging cell*. 2025;24(10):e70197. <https://doi.org/10.1111/acer.70197>.
156. Williams SN, Ding WX. The impact of aging on liver health and the development of liver diseases. *Hepatology communications*. 2025;9(10). <https://doi.org/10.1097/hc9.0000000000000808>.
157. Ramirez T, Li YM, Yin S, Xu MJ, Feng D, Zhou Z, Zang M, Mukhopadhyay P, Varga ZV, Pacher P, Gao B, Wang H. Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by downregulating sirtuin 1 expression. *Journal of hepatology*. 2017;66(3):601-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.004>.
158. Yeung EW, Spsychala KM, Miller AP, Otto JM, Deak JD, Kim H, Gilder DA, Ehlers CL, Wilhelmsen KC, Gizer IR. Effects of genetic risk for alcohol dependence and onset of regular drinking on the progression to alcohol dependence: A polygenic risk score approach. *Drug and alcohol dependence*. 2022;230:109117. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.109117>.
159. Mischitelli M, Spagnoli A, Abbatecola A, Codazzo C, Giacomelli M, Parisse S, Mancina RM, Rotondo C, Attilia F, Ginanni Corradini S, Ferri F. New Diagnostic and Prognostic Models for the Development of Alcoholic Cirrhosis Based on Genetic Predisposition and Alcohol History. *Biomedicine*. 2023;11(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082132>.
160. Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, Schafmayer C, Braun F, Hinrichsen H, Günther R, Arlt A, Seeger M, Müller S, Seitz HK, Soyka M, Lerch M, Lammert F, Sarrazin C, Kubitz R, Häussinger D, Hellerbrand C, Bröring D, Schreiber S, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Datz C, Krawczak M, Wodarz N, Völzke H, Hampe J. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;53(1):86-95. <https://doi.org/10.1002/hep.24017>.
161. Trepo E, Guyot E, Ganne-Carrie N, Degre D, Gustot T, Franchimont D, Sutton A, Nahon P, Moreno C. PNPLA3 (rs738409 C>G) is a common risk variant associated with hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(4):1307-8. <https://doi.org/10.1002/hep.25518>.
162. Witzel HR, Schwittai IMG, Hartmann N, Mueller S, Schattenberg JM, Gong XM, Backs J, Schirmacher P, Schuppan D, Roth W, Straub BK. PNPLA3(I148M) Inhibits Lipolysis by Perilipin-5-Dependent Competition with ATGL. *Cells*. 2022;12(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010073>.
163. Castanho Martins M, Dixon ED, Lupo G, Claudel T, Trauner M, Rombouts K. Role of PNPLA3 in Hepatic Stellate Cells and Hepatic Cellular Crosstalk. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2025;45(4):e16117. <https://doi.org/10.1111/liv.16117>.
164. Falletti E, Fabris C, Cmet S, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Fornasiere E, Bignulin S, Fumolo E, Bignulin E, Pirisi M, Toniutto P. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(8):1137-43. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02534.x>.

165. Nischalke HD, Berger C, Luda C, Berg T, Müller T, Grünhage F, Lammert F, Coenen M, Krämer B, Körner C, Vidovic N, Oldenburg J, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis. *PloS one*. 2011;6(11):e27087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027087>.
166. Rosendahl J, Tönjes A, Schleinitz D, Kovacs P, Wiegand J, Ruffert C, Jesinghaus M, Schober R, Herms M, Grützmann R, Schulz HU, Stickel F, Werner J, Bugert P, Blüher M, Stumvoll M, Böhm S, Berg T, Wittenburg H, Mössner J, te Morsche R, Derikx M, Keim V, Witt H, Drenth JP. A common variant of PNPLA3 (p.I148M) is not associated with alcoholic chronic pancreatitis. *PloS one*. 2012;7(1):e29433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029433>.
167. Yang S, Cheng A. Association between PNPLA3 rs738409 and susceptibility to etiology-specific liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC medical genomics*. 2026;19(1):2. <https://doi.org/10.1186/s12920-025-02278-2>.
168. Peregud DI, Baronets VY, Lobacheva AS, Ivanov AS, Arisheva OS, Garmash IV, Kobalava ZD, Pirozhkov SV, Terebilina NN. PNPLA3 rs738409 associates with alcoholic liver cirrhosis but not with serum levels of IL6, IL10, IL8 or CCL2 in the Russian population. *Annals of hepatology*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.08.065>.
169. The 1000 Genomes Project Consortium. A Global Reference for Human Genetic Variation. *Nature*. 2015; 526(7571): 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
170. Kozlitina J, Sookoian S. Global Epidemiological Impact of PNPLA3 I148M on Liver Disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2025;45(3):e16123. <https://doi.org/10.1111/liv.16123>.
171. Kocas-Kilicarslan ZN, Cetin Z, Faccioli LAP, Motomura T, Amirneni S, Diaz-Aragon R, Florentino RM, Sun Y, Pla-Palacin I, Xia M, Miedel MT, Kurihara T, Hu Z, Ostrowska A, Wang Z, Constantine R, Li A, Taylor DL, Behari J, Soto-Gutierrez A, Tafaleng EN. Polymorphisms Associated With Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease Influence the Progression of End-Stage Liver Disease. *Gastro hep advances*. 2024;3(1):67-77. <https://doi.org/10.1016/j.gastha.2023.09.011>.
172. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, Vogt TF, Hobbs HH, Cohen JC. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2014;46(4):352-6. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>.
173. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Seminars in liver disease*. 2015;35(3):270-90. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562947>.
174. Balcar L, Scheiner B, Urheu M, Weinberger P, Paternostro R, Simbrunner B, Semmler G, Willheim C, Pinter M, Ferenci P, Trauner M, Reiberger T, Stättermayer AF, Mandorfer M. The impact of transmembrane 6 superfamily 2 (TM6SF2) rs58542926 on liver-related events in patients with advanced chronic liver disease. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2023;55(8):1072-80. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2023.02.012>.
175. Stickel F, Osterreicher CH. The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2006;41(3):209-24. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agl011>.
176. Nowak AJ, Relja B. The Impact of Acute or Chronic Alcohol Intake on the NF-κB Signaling Pathway in Alcohol-Related Liver Disease. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249407>.

177. Scarlata GGM, Colaci C, Scarcella M, Dallio M, Federico A, Boccuto L, Abenavoli L. The Role of Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of Alcoholic Liver Disease. *Diseases* (Basel, Switzerland). 2024;12(4). <https://doi.org/10.3390/diseases12040069>.
178. Hoang Nguyen KH, Le NV, Nguyen PH, Nguyen HHT, Hoang DM, Huynh CD. Human immune system: Exploring diversity across individuals and populations. *Heliyon*. 2025;11(2):e41836. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41836>.
179. Wang JK, Feng ZW, Li YC, Li QY, Tao XY. Association of tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphism at sites -308 and -238 with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(4):670-6. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06978.x>.
180. Abdou AM, Gao X, Cozen W, Cerhan JR, Rothman N, Martin MP, Davis S, Schenk M, Chanock SJ, Hartge P, Carrington M, Wang SS. Human leukocyte antigen (HLA) A1-B8-DR3 (8.1) haplotype, tumor necrosis factor (TNF) G-308A, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2010;24(5):1055-8. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.17>.
181. Yuan J, Tong Y, Wang L, Yang X, Liu X, Shu M, Li Z, Jin W, Guan C, Wang Y, Zhang Q, Yang Y. A compendium of genetic variations associated with promoter usage across 49 human tissues. *Nature communications*. 2024;15(1):8758. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53131-6>.
182. Kann AE, Jepsen P, Madsen LG, Crooks C, Fleming K, Christensen AI, Lau CJ, West J, Askgaard G. Motivation to Reduce Drinking and Engagement in Alcohol Misuse Treatment in Alcohol-Related Liver Disease: A National Health Survey. *The American journal of gastroenterology*. 2022;117(6):918-22. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001616>.
183. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nature reviews Genetics*. 2018;19(9):581-90. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0018-x>.
184. Whitfield JB, Schwantes-An TH, Darlay R, Aithal GP, Atkinson SR, Bataller R, Botwin G, Chalasani NP, Cordell HJ, Daly AK, Day CP, Eyer F, Foroud T, Gleeson D, Goldman D, Haber PS, Jacquet JM, Liang T, Liangpunsakul S, Masson S, Mathurin P, Moirand R, McQuillin A, Moreno C, Morgan MY, Mueller S, Müllhaupt B, Nagy LE, Nahon P, Nalpas B, Naveau S, Perney P, Pirmohamed M, Seitz HK, Soyka M, Stickel F, Thompson A, Thursz MR, Trépo E, Morgan TR, Seth D. A genetic risk score and diabetes predict development of alcohol-related cirrhosis in drinkers. *Journal of hepatology*. 2022;76(2):275-82. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.10.005>.
185. Chatterjee N, Shi J, García-Closas M. Developing and evaluating polygenic risk prediction models for stratified disease prevention. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(7):392-406. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.27>.
186. Schwantes-An TH, Whitfield JB, Aithal GP, Atkinson SR, Bataller R, Botwin G, Chalasani NP, Cordell HJ, Daly AK, Darlay R, Day CP, Eyer F, Foroud T, Gawrieh S, Gleeson D, Goldman D, Haber PS, Jacquet JM, Lammert CS, Liang T, Liangpunsakul S, Masson S, Mathurin P, Moirand R, McQuillin A, Moreno C, Morgan MY, Mueller S, Müllhaupt B, Nagy LE, Nahon P, Nalpas B, Naveau S, Perney P, Pirmohamed M, Seitz HK, Soyka M, Stickel F, Thompson A, Thursz MR, Trépo E, Morgan TR, Seth D. A polygenic risk score for alcohol-associated cirrhosis among heavy drinkers with European ancestry. *Hepatology communications*. 2024;8(6). <https://doi.org/10.1097/hc9.0000000000000431>.
187. Ghouse J, Sveinbjörnsson G, Vujkovic M, Seidelin AS, Gellert-Kristensen H, Ahlberg G, Tragante V, Rand SA, Brancale J, Vilarinho S, Lundegaard PR, Sørensen E, Erikstrup C, Bruun MT, Jensen BA, Brunak S, Banasik K, Ullum H, Verweij N, Lotta L, Baras A, Mirshahi T, Carey DJ, Kaplan DE, Lynch J, Morgan T, Schwantes-An TH, Dochtermann DR, Pyarajan S, Tsao PS, Laisk T, Mägi R, Kozlitina J, Tybjærg-Hansen A, Jones D, Knowlton KU, Nadauld L, Ferkingstad E, Björnsson

- ES, Ulfarsson MO, Sturluson Á, Sulem P, Pedersen OB, Ostrowski SR, Gudbjartsson DF, Stefansson K, Olesen MS, Chang KM, Holm H, Bundgaard H, Stender S. Integrative common and rare variant analyses provide insights into the genetic architecture of liver cirrhosis. *Nature genetics*. 2024;56(5):827-37. <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01720-y>.
188. Maamari DJ, Abou-Karam R, Fahed AC. Polygenic Risk Scores in Human Disease. *Clinical chemistry*. 2025;71(1):69-76. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvae190>.
189. Delpierre C, Lefèvre T. Precision and personalized medicine: What their current definition says and silences about the model of health they promote. Implication for the development of personalized health. *Frontiers in sociology*. 2023;8:1112159. <https://doi.org/10.3389/fsoc.2023.1112159>.
190. Duncan L, Shen H, Gelaye B, Meijsen J, Ressler K, Feldman M, Peterson R, Domingue B. Analysis of polygenic risk score usage and performance in diverse human populations. *Nature communications*. 2019;10(1):3328. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11112-0>.
191. Potęga A. Glutathione-Mediated Conjugation of Anticancer Drugs: An Overview of Reaction Mechanisms and Biological Significance for Drug Detoxification and Bioactivation. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2022;27(16). <https://doi.org/10.3390/molecules27165252>.
192. Georgiou-Siafis SK, Tsiftoglou AS. The Key Role of GSH in Keeping the Redox Balance in Mammalian Cells: Mechanisms and Significance of GSH in Detoxification via Formation of Conjugates. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2023;12(11). <https://doi.org/10.3390/antiox12111953>.
193. Zhu Y, Yang JH, Hu JP, Qiao M. Association of glutathione S-transferases (GSTT1, GSTM1 and GSTP1) genes polymorphisms with nonalcoholic fatty liver disease susceptibility: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2022;101(38):e30803. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000030803>.
194. Khan AJ, Ruwali M, Choudhuri G, Mathur N, Husain Q, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Mutation research*. 2009;664(1-2):55-63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.02.009>.
195. Zhang H, Wu X, Xiao Y, Chen M, Li Z, Wei X, Tang K. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1, and evaluation of oxidative stress in patients with non-small cell lung cancer. *European journal of medical research*. 2014;19(1):67. <https://doi.org/10.1186/s40001-014-0067-3>.
196. Polimanti R, Carboni C, Baesso I, Piacentini S, Iorio A, De Stefano GF, Fuciarelli M. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: functional inter-ethnic differences in detoxification systems. *Gene*. 2013;512(1):102-7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.113>.
197. Zivkovic M, Bubic M, Kolakovic A, Dekleva M, Stankovic G, Stankovic A, Djuric T. The association of glutathione S-transferase T1 and M1 deletions with myocardial infarction. *Free radical research*. 2021;55(3):267-74. <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1931166>.
198. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Djukic T, Coric V, Jakovljevic J, Ivanisevic J, Pljesa S, Jelic-Ivanovic Z, Mimic-Oka J, Dimkovic N, Simic T. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(1):202-12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs369>.
199. Pljesa I, Berisavac M, Simic T, Pekmezovic T, Coric V, Suvakov S, Stamatovic L, Matic M, Gutic B, Milenkovic S, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A. Polymorphic expression of glutathione transferases A1, M1, P1 and T1 in epithelial ovarian cancer: a Serbian case-control study.

Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology. 2017;22(1):72-9. PMID: 28365938.

200. Tsermpini EE, Plemenitaš Ilješ A, Dolžan V. Alcohol-Induced Oxidative Stress and the Role of Antioxidants in Alcohol Use Disorder: A Systematic Review. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2022;11(7). <https://doi.org/10.3390/antiox11071374>.

201. Sadasivam N, Kim YJ, Radhakrishnan K, Kim DK. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2022;27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103159>.

202. Chambers JC, Zhang W, Sehmi J, Li X, Wass MN, Van der Harst P, Holm H, Sanna S, Kavousi M, Baumeister SE, Coin LJ, Deng G, Gieger C, Heard-Costa NL, Hottenga JJ, Kühnel B, Kumar V, Lagou V, Liang L, Luan J, Vidal PM, Mateo Leach I, O'Reilly PF, Peden JF, Rahmioglu N, Soininen P, Speliotes EK, Yuan X, Thorleifsson G, Alizadeh BZ, Atwood LD, Borecki IB, Brown MJ, Charoen P, Cucca F, Das D, de Geus EJ, Dixon AL, Döring A, Ehret G, Eyjolfsson GI, Farrall M, Forouhi NG, Friedrich N, Goessling W, Gudbjartsson DF, Harris TB, Hartikainen AL, Heath S, Hirschfield GM, Hofman A, Homuth G, Hyppönen E, Janssen HL, Johnson T, Kangas AJ, Kema IP, Kühn JP, Lai S, Lathrop M, Lerch MM, Li Y, Liang TJ, Lin JP, Loos RJ, Martin NG, Moffatt MF, Montgomery GW, Munroe PB, Musunuru K, Nakamura Y, O'Donnell CJ, Olafsson I, Penninx BW, Pouta A, Prins BP, Prokopenko I, Puls R, Ruukonen A, Savolainen MJ, Schlessinger D, Schouten JN, Seedorf U, Sen-Chowdhry S, Siminovich KA, Smit JH, Spector TD, Tan W, Teslovich TM, Tukiainen T, Uitterlinden AG, Van der Klauw MM, Vasani RS, Wallace C, Wallaschowski H, Wichmann HE, Willemssen G, Würtz P, Xu C, Yerges-Armstrong LM, Abecasis GR, Ahmadi KR, Boomsma DI, Caulfield M, Cookson WO, van Duijn CM, Froguel P, Matsuda K, McCarthy MI, Meisinger C, Mooser V, Pietiläinen KH, Schumann G, Snieder H, Sternberg MJ, Stolk RP, Thomas HC, Thorsteinsdottir U, Uda M, Waeber G, Wareham NJ, Waterworth DM, Watkins H, Whitfield JB, Witteman JC, Wolffenbuttel BH, Fox CS, Ala-Korpela M, Stefansson K, Vollenweider P, Völzke H, Schadt EE, Scott J, Jarvelin MR, Elliott P, Kooner JS. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nature genetics*. 2011;43(11):1131-8. <https://doi.org/10.1038/ng.970>.

203. Viitasalo A, Pihlajamäki J, Lindi V, Atalay M, Kaminska D, Joro R, Lakka TA. Associations of I148M variant in PNPLA3 gene with plasma ALT levels during 2-year follow-up in normal weight and overweight children: the PANIC Study. *Pediatric obesity*. 2015;10(2):84-90. <https://doi.org/10.1111/ijpo.234>.

204. Dai G, Liu P, Li X, Zhou X, He S. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity: A meta-analysis. *Medicine*. 2019;98(7):e14324. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000014324>.

205. Wang L, Yuan H, Bian P, Yuan J, Yu Y. A study on the correlation between albumin-to-alkaline phosphatase ratio and the severity of pelvic inflammatory disease. *Frontiers in medicine*. 2025;12:1728185. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1728185>.

206. Tabata F, Wada Y, Kawakami S, Miyaji K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021;10(4). <https://doi.org/10.3390/antiox10040503>.

207. García-Bañuelos J, Panduro A, Gordillo-Bastidas D, Gordillo-Bastidas E, Muñoz-Valle JF, Gurrola-Díaz CM, Sánchez-Enríquez S, Ruiz-Madrigal B, Bastidas-Ramírez BE. Genetic polymorphisms of genes coding to alcohol-metabolizing enzymes in western Mexicans: association of CYP2E1*c2/CYP2E1*5B allele with cirrhosis and liver function. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2012;36(3):425-31. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01617.x>.

208. Čepelak I, Dodig S, Pavić I. Bilirubin - new insights into an old molecule. *Biochemia medica*. 2025;35(2):020501. <https://doi.org/10.11613/bm.2025.020501>.
209. Boyer-Diaz Z, Morata P, Aristu-Zabalza P, Gibert-Ramos A, Bosch J, Gracia-Sancho J. Oxidative Stress in Chronic Liver Disease and Portal Hypertension: Potential of DHA as Nutraceutical. *Nutrients*. 2020;12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092627>.
210. Heybe MA, Mehta KJ. Role of albumin infusion in cirrhosis-associated complications. *Clinical and experimental medicine*. 2024;24(1):58. <https://doi.org/10.1007/s10238-024-01315-1>.
211. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *Journal of hepatology*. 2005;42 Suppl(1):S100-7. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.11.015>.
212. Ruf A, Dirchwolf M, Freeman RB. From Child-Pugh to MELD score and beyond: Taking a walk down memory lane. *Annals of hepatology*. 2022;27(1):100535. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100535>.
213. Akarapatima K, Chang A, Prateepchaiboon T, Pungpipattrakul N, Songjamrat A, Pakdeejit S, Rattanasupar A, Piratvisuth T. Predictive Outcomes Using Child-Turcotte-Pugh and Albumin-Bilirubin Scores in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Transarterial Chemoembolization. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2022;53(4):1006-13. <https://doi.org/10.1007/s12029-021-00743-6>.
214. Schwarz M, Schwarz C, Burghart L, Pfisterer N, Bauer D, Hübl W, Mandorfer M, Gschwantler M, Reiberger T. Late-stage presentation with decompensated cirrhosis is alarmingly common but successful etiologic therapy allows for favorable clinical outcomes. *PloS one*. 2023;18(8):e0290352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290352>.
215. Kendrick S, Day C. Natural history and factors influencing the course of alcohol-related liver disease. *Clinical liver disease*. 2013;2(2):61-3. <https://doi.org/10.1002/cld.145>.
216. Burza MA, Molinaro A, Attilia ML, Rotondo C, Attilia F, Ceccanti M, Ferri F, Maldarelli F, Maffongelli A, De Santis A, Attali AF, Romeo S, Ginanni Corradini S. PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant and age at onset of at-risk alcohol consumption are independent risk factors for alcoholic cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(4):514-20. <https://doi.org/10.1111/liv.12310>.
217. Youssef EM, Wu GY. Subnormal Serum Liver Enzyme Levels: A Review of Pathophysiology and Clinical Significance. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2024;12(4):428-35. <https://doi.org/10.14218/jcth.2023.00446>.
218. Torkadi PP, Apte IC, Bhute AK. Biochemical Evaluation of Patients of Alcoholic Liver Disease and Non-alcoholic Liver Disease. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29(1):79-83. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0310-7>.
219. Liu TL, Trogdon J, Weinberger M, Fried B, Barritt ASt. Diabetes Is Associated with Clinical Decompensation Events in Patients with Cirrhosis. *Digestive diseases and sciences*. 2016;61(11):3335-45. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4261-8>.
220. Castera L, Cusi K. Diabetes and cirrhosis: Current concepts on diagnosis and management. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2023;77(6):2128-46. <https://doi.org/10.1097/hep.000000000000263>.
221. Contreras-Zentella ML, Hernández-Espinosa LC, Hernández-Muñoz R. Oxidative Stress in Liver Metabolic Dysfunction and Diseases, with a Focus on Hepatogenic Diabetes: Effect of Alcohol Consumption. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2025;14(12). <https://doi.org/10.3390/antiox14121494>.
222. Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2014;55(2):77-91. <https://doi.org/10.1002/em.21824>.

223. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* (London, England). 2018;391(10127):1301-14. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30010-2).
224. Huang DQ, Mathurin P, Cortez-Pinto H, Loomba R. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2023;20(1):37-49. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00688-6>.
225. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, Pelucchi C, Galeone C, Bellocco R, Negri E, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *British journal of cancer*. 2015;112(3):580-93. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.579>.
226. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American journal of epidemiology*. 2002;155(4):323-31. <https://doi.org/10.1093/aje/155.4.323>.
227. Ghouse J, Gellert-Kristensen H, O'Rourke CJ, Seidelin AS, Thorleifsson G, Sveinbjörnsson G, Tragante V, Konkwo C, Brancale J, Vilarinho S, Eyrich TM, Ahlberg G, Bundgaard JS, Rand SA, Lundegaard PR, Sørensen E, Mikkelsen C, Træholt J, Erikstrup C, Dinh KM, Bruun MT, Jensen BA, Bay JT, Brunak S, Banasik K, Ullum H, Laisk T, Mägi R, Nadauld LD, Knowlton KU, Knight S, Gluud LL, Vistisen K, Björnsson ES, Ulfarsson MO, Sulem P, Holm H, Pedersen OB, Ostrowski SR, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Stefansson K, Lassen U, Pommergaard HC, Hillingsø JG, Andersen JB, Bundgaard H, Stender S. Genome-wide meta-analysis identifies nine loci associated with higher risk of hepatocellular carcinoma development. *JHEP reports : innovation in hepatology*. 2025;7(9):101485. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101485>.
228. Huang DQ, Zhang Z, Dorajoo R, Khor CC, Pham YT, Wang R, Behari J, Yuan JM, Koh WP, Luu HN. PNPLA3 Genotype and Clinical Factors Impact Hepatocellular Carcinoma Risk: Findings From a Prospective Cohort Study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2026. <https://doi.org/10.1111/apt.70532>.
229. Nischalke HD, Lutz P, Bartok E, Krämer B, Langhans B, Frizler R, Berg T, Hampe J, Buch S, Datz C, Stickel F, Hartmann G, Strassburg CP, Nattermann J, Spengler U. The PNPLA3 I148M variant promotes lipid-induced hepatocyte secretion of CXC chemokines establishing a tumorigenic milieu. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2019;97(11):1589-600. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01836-3>.
230. Li S, Xue F, Zheng Y, Yang P, Lin S, Deng Y, Xu P, Zhou L, Hao Q, Zhai Z, Wu Y, Dai Z, Chen S. GSTM1 and GSTT1 null genotype increase the risk of hepatocellular carcinoma: evidence based on 46 studies. *Cancer cell international*. 2019;19:76. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0792-3>.
231. Lu Y, Zhou J, Zhang J, Wang Z, Yu Y, Miao M, Yao Q. Dual roles of glutathione S-transferase mu 1 in the development and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019;120:109532. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109532>.
232. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine*. 2010;49(11):1603-16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
233. Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao Y, Ho YS, Reddi AR, Holmgren A, Arnér ES. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiological reviews*. 2016;96(1):307-64. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>.
234. Bhattacharjee P, Paul S, Banerjee M, Patra D, Banerjee P, Ghoshal N, Bandyopadhyay A, Giri AK. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Scientific reports*. 2013;3:2704. <https://doi.org/10.1038/srep02704>.

PRILOZI

Prilog 1 Odluka etičkog odbora KBC „Zvezdara“ o saglasnosti za sprovođenje istraživanja u okviru doktorske teze

»Zvezdara« - University Medical Center

Office for Human Research Protections 1

Zvezdara University Medical Center IRB 1 - Medical, No IRB00009457, IORG0007877

Approved by Federalwide Assurance - FWA00006109

Etički odbor je konstituisan i funkcioniše u skladu sa načelima ICH-GCP i lokalnom zakonskom regulativom.

Dimitrija Tucovića 161, 11000 Belgrade, Serbia

Tel: +381 11 30 88 672, fax: +381 11 30 88 673, e-mail: etikain@mts.rs

Members of the Ethics Board:

Prof. Dr. Nebojša Despotović, Cardiologist, Chairman LEC
Prof. dr. Nataša Marković-Nikolić, Cardiologist, member
Prof. dr. Teodora Beljić-Živković, Endocrinologist, member
Dr. Srdjan Marković, Gastroenterologist, member
Ass. dr. Radoslav Aščerić, Surgery, member
Nenad Radić, Lawyer, external member
Slavko Babić, Lawyer, external member
Suzana Nedelkov, Bachelor economist, Secretary LEC

ODLUKA ETIČKOG ODBORA

Glavni istraživač: Branka Nešić

U petak, 01.06.2018.g održana je sednica Etičkog odbora kojoj su prisustvovali: Prof. dr. Nebojša Despotović, predsednik Etičkog odbora; Prof. dr. Teodora Beljić-Živković, član; Ass. dr. Radoslav Aščerić, član; Dr. Srdjan Marković, član; Slavko Babić, dipl.pravnik, eksterni član, Nenad Radić, dipl.pravnik, eksterni član. Sednici iz opravdanih razloga nije prisustvovala Prof. Dr. Nataša Marković-Nikolić, podpredsednik Etičkog odbora.
Zapisničar: dipl.ecc, Suzana Nedelkov, Sekretar Etičkog odbora.

Branka Nešić, dipl. molekularni biolog i fiziolog, zaposlena na radnom mestu Genetičar na Odeljenju za humanu genetiku i prenatalnu dijagnostiku u KBC „Zvezdara“, dostavila je molbu za odobrenje sprovođenja ispitivanja na temu: **“Povezanost polimorfizma CYP2E1, TNFa, PNPLA3, TM6SF2 i GST gena sa alkoholnom cirozom jetre”**.

Navedeno istraživanje će se sprovesti u cilju izrade doktorske disertacije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Mentor za izradu doktorske disertacije je Prof. dr. Petar Svorcan dok je komentor dr. Ivana Grubiša, molekularni biolog i fiziolog, naučni saradnik.

Studijom će biti obuhvaćeno oko 100 pacijenata kod kojih je na Odeljenju za gastroenterologiju KBC „Zvezdara“ dijagnostikovana alkoholna ciroza jetre. Kontrolnu grupu će predstavljati takodje 100 pacijenata, bez kliničkih manifestacija bolesti jetre koji konzumiraju manje od 10g alkohola dnevno. Predviđeno je da ispitanici popunjavaju upitnik o količini, vrsti i vremenu početka konzumiranja alkohola, a od dijagnostičkih procedura biće urađene laboratorijske genetske analize.

Uz Molbu koja sadrži detaljno obrazloženje istraživanja sa metodologijom i ciljevima istog, na uvid i razmatranje dostavljena je i sledeća dokumentacija:

- Informisani pristanak za pacijente,
- Demografski upitnik
- Saglasnost Načelnika Odeljenja za gastroenterologiju i hepatologiju
- Saglasnost Načelnika Službe za laboratorijsku dijagnostiku

Pored Predsednika i gore navedenih članova Etičkog odbora sednici je prisustvovao i glavni istraživač koji je predstavio i do detalja obrazložio sve aspekte predmetnog kliničkog istraživanja.

Nakon svog izlaganja Glavni istraživač nije učestvovao u daljem radu Etičkog odbora prilikom odlučivanja i glasanja o sprovođenju ovog kliničkog istraživanja.

Lokalni Etički odbor koji je konstituisan i radi po načelima i principima ICH-GCP, predmetno kliničko istraživanje ocenio je etički podobnim i odobrio sprovođenje istog.

Datum: 01.06.2018.g

Predsednik Etičkog odbora
Prof. dr. Nebojša Despotović



BIOGRAFIJA AUTORA

Branka B. Nešić, rođena 2.7.1981. godine u Beogradu, diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2008. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena genetika. Eksperimentalni deo diplomskog rada pod nazivom: „Detekcija mikroorganizama u uzorcima obolelih od apeksnog parodontitisa“ uradila je u laboratoriji u okviru Katedre za biologiju i humanu genetiku Stomatološkog fakulteta UB, gde je nastavila sa volonterskim radom i posle diplomiranja. Dalji volonterski rad nastavila je na Vojnomedicinskoj akademiji, u Laboratoriji za citogenetiku, gde se bavila citogenetičkom i molekularnom dijagnostikom hromozomopatija u hematologiji.

Od 2009. godine je bila zaposlena u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum“, gde je obavlja poslove citogenetičara u prenatalnoj i postnatalnoj dijagnostici. Godine 2014. prelazi u Laboratoriju za humanu genetiku i prenatalnu dijagnostiku, Kliničko bolničkog centra „Zvezdara“, gde se bavila molekularnom dijagnostikom, prenatalnom i postnatalnom citogenetičkom dijagnostikom, a bila je i član genetičkog prenatalnog savetovališta u okviru Bolnice za ginekologiju i akušerstvo KBC „Zvezdara“.

Specijalističke akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisuje 2014. završava odbranom specijalističkog rada pod nazivom „Povezanost varijante rs738409 gena PNPLA3 sa alkoholnom cirozom jetre“. Doktorske studije upisuje 2015. godine na istom fakultetu. Od 2019. godine obavlja poslove analitičara podataka u *ZRx Outcomes Research Inc.*, Kanada i radila kao spoljni saradnik na pripremi i realizaciji međunarodnih projekata za *European Forensic Agency*. Autor je tri rada u međunarodnim časopisima, i 10 saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima. Trenutno živi i radi u Grčkoj. Majka je troje dece.

Prilog 2. Izjava o autorstvu

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бранка Нешић

број индекса Б3050/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност полиморфизама гена чији продукти су укључени у антиоксидативне процесе, инфламацију и метаболизам липида са алкохолном цирозом јетре

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2026.

Бранка Нешић

Prilog 3. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранка Нешић

Број индекса Б3050/2015

Студијски програм Биологија; модул Генетика

Наслов рада Повезаност полиморфизама гена чији продукти су укључени у антиоксидативне процесе, инфламацију и метаболизам липида са алкохолном цирозом јетре

Ментор др Ивана Грубиша, др Марија Савић Веселиновић

Потписани/а _____

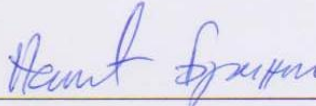
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2026.



Prilog 4. Izjava o korišćenju

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Повезаност полиморфизама гена чији продукти су укључени у антиоксидативне процесе, инфламацију и метаболизам липида са алкохолном цирозом јетре

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2026.

Вант Бркић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.