

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.Т. Дьяконова, Н.И. Павлова, Н.А. Соловьева,
М.А. Варламова, Т.Н. Александрова, Х.А. Куртанов

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СВЯЗИ ГЕНА *SLC6A3* С НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ В ЯКУТИИ

DOI 10.25789/УМЖ.2018.64.01

УДК 575.176

Изучена связь гена *SLC6A3* rs27072 с никотиновой зависимостью у курящего населения, проживающего в Якутии. Анализ ассоциации полиморфизма rs27072 гена *SLC6A3* с никотиновой зависимостью свидетельствовал об отсутствии статистически значимых отличий между носителями различных генотипов не только в обследуемой группе в целом, но и отдельно у мужчин и женщин. Вероятно, это обусловлено малым объемом выборки и трудностью определения статуса курения при помощи только анкетирования.

Ключевые слова: курение, никотиновая зависимость, ген *SLC6A3*, Якутия, полиморфизм.

The relationship of the gene *SLC6A3* rs27072 with nicotine addiction in the smoking population living in Yakutia was under study. Analysis of the polymorphism association of *SLC6A3* rs27072 with nicotine addiction testified the absence of statistically significant differences between carriers of different genotypes, not only in the study group as a whole, but also separately in men and women. Probably, this is due to the small sampling and difficulties in determining the status of smoking using only questionnaires.

Keywords: smoking, nicotine addiction, *SLC6A3* gene, Yakutia, polymorphism.

Введение. Курение сигарет является распространенным фактором риска более чем двух десятков заболеваний. Курение наносит вред практически всем системам человеческого организма и является привычкой, от которой можно избавиться. Курение табака вызывает психологическую и физиологическую зависимость и, кроме того, тесно связано с социальными и культурными факторами. Несмотря на широко признанные риски, около трети взрослого населения мира продолжают курить табак [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), употребление табака ежегодно приводит почти к 6 млн случаев смерти, из которых более 5 млн происходят среди потребителей табака. На рис.1 представлена распространенность курения в мире. Как видно, наибольшая распространенность курения отмечается в странах Азии [2].

Также среди некурящих людей более 600 000 подвергаются воздействию вторичного табачного дыма. По оценке ВОЗ, табак содержит более 7000 химических соединений, 60 из которых являются известными или предполагаемыми канцерогенами, т.е. вызывают в клетках организма изме-

нения, приводящие к развитию раковых заболеваний, а 250 обладают доказанным цитотоксическим действием. Одиннадцать веществ, содержащихся в табачном дыме (2-нафтиламин, 4-аминобифенил, бензол, винилхлорид, этиленоксид, мышьяк, бериллий, соединения никеля, хром, кадмий и полоний-210), Международное агентство по изучению рака относит к первой группе канцерогенных веществ (т.е. с доказанным канцерогенным воздействием) [2].

Предполагается существование центрального патофизиологического механизма поддержания зависимости от психоактивных веществ под генетическим контролем. Этот механизм независимо от конкретного вида психоактивного вещества вызывает нейробиохимические изменения у будущего больного еще до встречи с психоактивными веществами, также к этому отно-

сится никотиновая зависимость, что и определяет биологическую базу собственно предрасположенности. Однако выводы предыдущих исследований трудно объяснить потому, что курение сигарет – очень сложный процесс, на который влияют различные факторы, такие как возраст, пол, окружающая среда [1].

Ген дофаминаминового транспортера (*SLC6A3*), локализованный в коротком плече хромосомы 5 (5p15.3), участвует в контроле дофаминергической передачи. Полиморфизм rs27072 гена *SLC6A3* ассоциирован с более тяжелыми симптомами при абстинентном алкогольном синдроме, такими как судороги. Многие авторы сообщают, что ген транспортера дофамина (*SLC6A3*) связан с синдромом гиперактивности и дефицита внимания. Также была найдена связь между транспортерным геном дофамина и возрастом начала

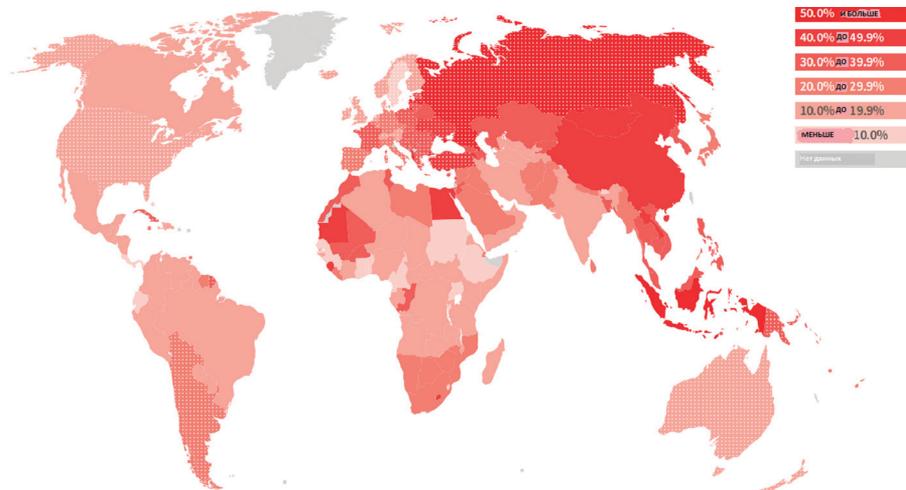


Рис.1. Распространенность курения табака в мире: от светлого к темному показано увеличение процента курящего населения по странам (по данным ВОЗ о тенденциях в области распространенности курения табака, 2015 г.)

ЯНЦ КМП: **ДЪЯКОНОВА Александра Тимофеевна** – м.н.с., dyakonovaa@bk.ru, **ПАВЛОВА Надежда Ивановна** – к.б.н., вр.и.о. в.н.с.-руковод. лаб., solnishko_84@inbox.ru, **СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна** – к.м.н., н.с., sonata608@yandex.ru, **АЛЕКСАНДРОВА Туйара Никоновна** – м.н.с., alexandrova_tyara@mail.ru, **ВАРЛАМОВА Марина Алексеевна** – н.с., varlamova.m@yandex.ru, **КУРТАНОВ Харитон Алексеевич** – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, hariton_kurtanov@mail.ru.

в отношении употребления табака и алкоголя. Исследования, проведенные преимущественно в европейской популяции, выявили, что аллель этого полиморфизма увеличивает риск курения, тогда как исследования в японской популяции показали связь между этим генотипом и курением. Ранее также была рассмотрена зависимость полиморфизмов от этнической принадлежности. В исследованиях ассоциации между вариантами аллелями *ANKK1 / DRD2* и *SLC6A3* и курением было высказано предположение, что наличие аллеля *ANKK1 / DRD2 Taq* вместе с аллелем А *SLC6A3* увеличивает тягу к сигаретам, вызывая привыкание. Кроме того, несколько исследований предположили, что по сравнению с носителями, носители аллеля А *SLC6A3* имеют более низкий риск раннего начала курения [3, 4, 6].

Итоги популяционных исследований в разных странах представлены в табл.1. В мире частота аллеля А составила 21%. Были проведены исследования в китайских популяциях Хань и Даи, у которых процент аллеля А составил 31%, что является наивысшим показателем во всем мире. В популяции африканского происхождения (юго-запад США) было выявлено самое наименьшее количество аллеля А – 10%. В популяции Йоруба (Нигерия) распространенность аллеля А составила 13%, что также является одним из наименьших показателей.

Авторы, изучавшие связь гена *SLC6A3* с никотиновой зависимостью, настаивали на том, что он оказывает влияние на прекращение курения [4, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение связи полиморфизма rs27072 гена *SLC6A3* с никотиновой зависимостью у курящего населения, проживающего в Якутии.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная часть работ по генотипированию полиморфизма rs27072 гена *SLC6A3* была проведена в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем. Для исследования были использованы образцы ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП с использованием УНУ «Геном Якутии» (рег.№УСУ_507512). В исследовании участвовали жители Республики Саха (Якутия). Исследование проводили с письменного согласия участников. Всего были исследованы образцы ДНК 97 чел., из них 45 мужчин и 52 женщин.

Геномную ДНК экстрагировали из периферической крови каждого участ-

Таблица 1

Распределение частоты аллеля полиморфизма rs27072 гена *SLC6A3*

Аллель	Популяции				
	во всем мире	китайская популяция Хань	китайская популяция Даи	африканцы (юго-запад США)	Йоруба (Нигерия)
Аллель А (%)	21	31	31	10	13
Аллель G (%)	79	69	69	90	87

Таблица 2

Условия проведения ПЦР

Ген	Амплификат	Условия проведения ПЦР
<i>SLC6A3</i>	217 п.н.	1. 95°C – 5 мин 2. 94°C – 30 с; 62°C – 30 с; 72°C – 1 мин – 35 циклов 3. 72°C – 7 мин

Примечание. п.н. – пар нуклеотид.

ника с использованием набора для выделения ДНК Excell Biotech (Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрация ДНК в каждом образце определялась на спектрофотометре Implen Nano Photometer (Германия) для измерения в микрообъемах. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ). Амплификация области гена, содержащего полиморфный вариант, проводилась стандартными парами праймеров производства ООО «Биотех-Индустрия», г. Москва. Реакционная смесь: праймер прямой и обратный по 1 мкл; Dream Taq PCR мастер микс -12,5 мкл; деионизированная вода 9,5 мкл и ДНК – 1 мкл. Общий объем реакционной смеси для амплификации составил 25 мкл. Смесь для рестрикции составила 20 мкл, амплификата 7 мкл, деионизированной воды 10,9 мкл, рестрикционного буфера 2 мкл и эндонуклеаза рестрикции *MspI* 0,1 мкл.

Температурно-временной режим для проведения ПЦР оптимизирован

для амплификации данной нуклеотидной последовательности и представлен в табл.2.

Детекция ПЦР продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в пластине 2%-ного агарозного геля с добавлением бромистого этидия – специфического интеркалирующего флуоресцентного ДНК(РНК)-красителя – с использованием стандартного трис-ацетатного буфера при напряженности поля ~ 20 В/см в течение 30 мин.

После ПЦР амплификат подвергался рестрикции с применением эндонуклеазы *MspI* (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск) в течение 3 ч при температуре 37°C. Детекция ПДРФ продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в пластине 4% агарозного геля с добавлением бромистого этидия с использованием стандартного трис-ацетатного буфера при напряженности поля ~ 20 В/см в течение 45 мин (рис.2).

Интерпретация результатов генотипирования была выполнена на основе

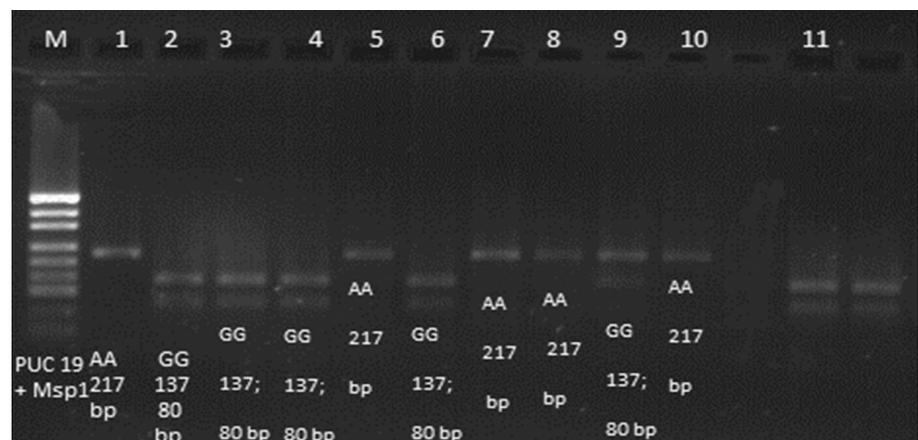


Рис.2. Электрофореграмма продукта амплификации участка гена *SLC6A3* в 4%-ном агарозном геле: дорожки №1, 5, 7, 8, 10 – генотип AA; № 2-4, 6 и 9 – генотип GG; М – маркер PUC19+*MspI*, Вр – пар оснований

Таблица 3

Распределение частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs27072 гена SLC6A3

Сравниваемые группы	Частота встречаемости генотипов, абс. (%)			Частота встречаемости аллелей, %		OR (95% CI), P	p
	AA	AG	GG	A	G	Аллель риска A	
Курящие	5 (10,2)	7 (14,28)	37 (75,51)	17 (17,34)	81 (82,65)	1,247 (0,389-1,636)	0,537
Некурящие	2 (4,16)	16 (33,33)	30 (62,5)	20 (20,83)	76 (79,16)		
Курящие женщины	1 (4,4)	2 (8,7)	20 (86,9)	4 (8,7)	42 (91,3)	0,991 (0,100-1,091)	0,061
Некурящие женщины	1 (3,5)	11 (37,9)	17 (58,6)	13 (22,4)	45 (77,6)		
Курящие мужчины	4 (13,8)	5 (17,3)	20 (68,9)	13 (22,42)	45 (77,58)	9,125 (0,916-10,041)	0,061
Некурящие мужчины	1 (4,34)	2 (8,69)	20 (86,95)	4 (8,7)	42 (91,3)		

различных шаблонов бэндов: GG генотип 137, 80 п.н., AG генотип 217, 137 и 80 п.н., AA генотип 217 п.н.

Статистический анализ полученных результатов исследования был проведен с помощью программы «Office Microsoft Excel 2010». Соответствие распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и сравнение частот аллельных вариантов/генотипов проводили с использованием критерия Х (хи-квадрата) методом Пирсона для таблиц сопряженности 2x2, расчетом отношения шансов (OR), 95% доверительного интервала (95% CI). Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате генотипирования полиморфизма rs27072 гена SLC6A3 установлено, что частота встречаемости генотипа GG среди всех обследованных лиц составляет 69,1%. При этом частота аллеля G составила 80,9% (табл.3).

В нашей выборке частота аллеля A у курящих составила 17,34%, некурящих – 20,83%. При гендерном разделении в группах курящих (женщины) и некурящих (мужчины) частота аллеля A составила 8,7%, а в группах некурящих (женщины) и курящих (мужчины) – 22,4%. Результаты оценки ассоциации полиморфизма rs27072 гена SLC6A3 показали, что частота встречаемости аллеля A в выборке курящих и некурящих людей не имеет достоверного отличия. Однако в выборке курящих людей количество носителей гомозиготного генотипа AA превышало количество участников с таким генотипом в некурящей выборке в 2 раза. Частота аллеля A у курящих достигает 17,3%, что почти равно с процентом аллеля A в выборке некурящих. Анализ статистических данных между выборками мужчин и женщин показал одинаковые результаты в этих группах. Это, скорее всего, обусловлено малым объемом выборки, также следует тщательно доработать выявление курения при анкетировании, добавив такие аспекты, как стаж, количество выкуриваемых сигарет.

Анализ ассоциации полиморфизма rs27072 гена SLC6A3 с никотиновой зависимостью свидетельствовал об отсутствии статистически значимых отличий между носителями различных генотипов не только в обследуемой

группе в целом, но и отдельно у мужчин и женщин (табл.3).

Закключение. Результаты исследования полиморфизма в популяции курящих среди жителей Республики Саха (Якутия) установили, что среди всех обследованных лиц преобладает аллель G, который не ассоциирован с никотиновой зависимостью: частота встречаемости его составила у курящих 81% и у некурящих – 76%. В выборке курящих людей количество носителей гомозиготного генотипа AA превышало количество с таким генотипом в некурящей выборке в 2 раза. Но в целом по статистическим данным достоверных различий по выборкам не обнаружено.

Таким образом, в результате данного исследования нами было выявлено, что полиморфизм rs27072 гена SLC6A3 не выявил связи с никотиновой зависимостью в исследуемой выборке. Вероятно, это обусловлено малым размером выборки и трудностью определения курения при помощи анкетирования. Так как мы основывались только на честности участников анкетирования, в будущем при составлении выборок необходимо группировать их по возрасту и возрасту начала курения.

Исследование было проведено в рамках НИР «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии популяций Республики Саха (Якутия)».

Литература

1. Александров А.А. Профилактика курения: роль и место психолога / А.А. Александров, В. Ю. Александрова // Вопросы психологии. – 1999. – № 4. – С. 35-42.

Александров А.А. Профилактика курения: роль и место психолога / А.А. Александров, В.Ю. Александрова // Psychology issues. – 1999. – № 4. – С. 35-42.

2. Табак ВОЗ. Информационный бюллетень. – 2013. – № 339.

Табак ВОЗ. News bulletin. – 2013. – № 339.

3. Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium / T. Sander, H. Harms, J. Podschus, U. Finckh [et al.] // Biol Psychiatry. – 1997 – № 41. – P. 299–304. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01509.x

4. Association of smoking and personality with a polymorphism of the dopamine transporter gene / A. Jorm, A. Henderson, P. Jacom [et al.] // Am J Med Genet. – 2000. – №96. – P.331–334. doi.org/10.1002/1096-8628(20000612)96:3<331::AID-AJMG19>3.0.CO;2-0.

5. Genetic influence of dopamine receptor, dopamine transporter, and nicotine metabolism on smoking cessation and nicotine dependence in a Japanese population / M. Ohmoto, T. Takahashi, Y. Kubota, S. Kobayashi [et al.] // BMC genetics. – 2014. – Т. 15. – № 1. – С. 151. doi.org/10.1186/s12863-014-0151-2.

6. Lerman C. Non-replication of genetic association studies: is DAT all folks? / C. Lerman, G. Swan // Nicotine Tobacco Res. – 2002; – №4 – P.247–249. doi.org/10.1080/14622200210141220.

7. Smoking status and the human dopamine transporter variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism: failure to replicate and finding that never smokers may be different / D. Vandenberg, C. Bennet, M. Grant, A. Strasser, R. O'Connor, R. Stauffer [et al.] // Nicotine Tobacco Res. – 2002. – № 4. – P.333–340. DOI: 10.1080/14622200210142689.

8. The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons / S. Michelaugh, C. Fiskerstrand, E. Lovejoy, M. Bannon [et al.] // Neurochem. – 2001. – №79. – P.1033–1038. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00647.x