

Karolina Kita

**OCENA WPŁYWU WYBRANYCH POLIMORFIZMÓW GENÓW
PODJEDNOSTEK ALFA-5 I ALFA-3 CHOLINERGICZNEGO RECEPTORA
NIKOTYNOWEGO NA STOPIEŃ UZALEŻNIENIA OD NIKOTYNY W
JEDNORODNEJ ETNICZNEJ GRUPIE KASZUBÓW**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Klinika Alergologii Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Ewa Jassem

Katedra Pneumonologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Marek Słomiński

Promotor: dr hab. n. med. Alicja Siemińska

Praca sfinansowana z grantu naukowego Narodowego Centrum Nauki:

Grant N N404 270839

Gdańsk 2016

*Pragnę podziękować przede wszystkim mojemu promotorowi i mentorowi
dr hab. n. med. Alicji Siemińskiej za inspirację, wszelką pomoc, jaką mi
udzieliła i cenne uwagi merytoryczne*

*Dziękuję prof. dr hab. n. med. Ewie Jassem za nakreślenie drogi naukowej i
umożliwienie prowadzenia badań*

Szczególne podziękowania składam rodzinie i przyjaciołom

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
2. WSTĘP	7
2.1. Epidemiologia i charakterystyka uzależnienia od tytoniu.....	7
2.2. Zespół uzależnienia od tytoniu jako jednostka chorobowa.....	8
2.3. Komórkowe i neurofizjologiczne patomechanizmy uzależnienia od tytoniu.....	12
2.4. Zmienność używania tytoniu i jego genetyczne podłoże.....	15
2.5. Badania regionu 15q24-25.1 genomu i polimorfizmów w klastrze genów <i>CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4</i>	17
3. CEL PRACY	21
4. MATERIAŁ I METODY	22
4.1. Materiał.....	22
4.1.1. Dobór próby.....	22
4.1.1.1. Ocena stopnia uzależnienia od nikotyny.....	23
4.1.1.2. Charakterystyka uczestników.....	26
4.2. Metody.....	27
4.2.1. Analiza molekularna.....	27
4.2.1.1. Izolacja genomowego DNA.....	27
4.2.1.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	28
4.2.1.3. Wykrywanie polimorfizmów za pomocą pirosekwencjonowania.....	30
4.2.2. Analiza statystyczna.....	32
5. WYNIKI	34
5.1. Dystrybucja alleli i genotypów w miejscach rs1051730, rs55853698 i rs6495308 w badanej próbie.....	34
5.2. Ocena związku pomiędzy uzależnieniem od nikotyny a płcią i wiekiem.....	35
5.3. Ocena związku pomiędzy uzależnieniem od nikotyny a wybranymi polimorfizmami z uwzględnieniem płci i wieku jako współzmiennych.....	35
5.4. Ocena związku pomiędzy wiekiem rozpoczynania palenia a płcią oraz wybranymi polimorfizmami.....	36

6. DYSKUSJA.....	43
7. WNIOSKI.....	54
8. PIŚMIENNICTWO.....	55
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	69
10. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	73
11. ANEKS.....	76

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACh	- acetylocholina
APA	- <i>American Psychiatric Association</i>
CHRNA3	- podjednostka α -3 nikotynowego receptora acetylochliny
CHRNA5	- podjednostka α -5 nikotynowego receptora acetylochliny
CHRNA6	- podjednostka α -6 nikotynowego receptora acetylochliny
CHRNB3	- podjednostka β -3 nikotynowego receptora acetylochliny
CHRNB4	- podjednostka β -4 nikotynowego receptora acetylochliny
CI	- przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
CPD	- liczba papierosów wypalanych dziennie (ang. <i>cigarettes per day</i>)
DA	- dopamina
DNA	- kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSM	- <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DSM-R	- <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Revision</i>
dNTPs	- trifosforany dezoksyrybonukleotydów (ang. <i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
ECB	- endokannabinoid (ang. <i>endocannabinoid</i>)
EOP	- endogenny peptyd opioidowy (ang. <i>endogenous opioid peptide</i>)
FTND	- test uzależnienia od nikotyny Fagerströma (ang. <i>Fagerström Test for Nicotine Dependence</i>)
GLU	- kwas glutaminowy
GABA	- kwas gamma-aminomasłowy (ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GWAS	- badanie asocjacyjne całego genomu (ang. <i>genome-wide association study</i>)
HWE	- równowaga Hardy'ego-Weinberga (ang. <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>)
LCHAD	- dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-koenzymu A długołańcuchowych kwasów tłuszczowych
LCHADD	- niedobór dehydrogenazy 3-hydroksyacylo-koenzymu A długołańcuchowych kwasów tłuszczowych
LD	- nierównowaga sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i>)

MAF	- częstość allelu rzadszego (ang. <i>minor allele frequency</i>)
NA	- noradrenalina
nAChR	- nikotynowy receptor acetylocholiny
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OR	- iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)
PCR	- łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
QTL	- <i>loci</i> cech ilościowych (ang. <i>quantitative trait loci</i>)
R²	- współczynnik korelacji
SNP	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
STR	- krótkie powtórzenia tandemowe (ang. <i>short tandem repeats</i>)
TTF	- długość czasu od obudzenia do wypalenia pierwszego rannego papierosa (ang. <i>time to first cigarette</i>)
UN	- uzależnienie od nikotyny
χ²	- test zgodności chi-kwadrat
WHO	- Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)
ZUT	- zespół uzależnienia od tytoniu
5-HT	- 5-hydrokсыtryptamina

2. WSTĘP

2.1. Epidemiologia i charakterystyka uzależnienia od tytoniu

Palenie tytoniu jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych nałogów na świecie, co w połączeniu z jego wyjątkową szkodliwością dla zdrowia sprawia, że uznawany jest za głównego zabójcę ludzkości. W populacjach krajów rozwijających się palenie tytoniu jest pojedynczą, a zarazem najczęstszą przyczyną przedwczesnej śmierci. Obecne szacunki wskazują, że ponad miliard mieszkańców Ziemi pali papierosy, a rocznie z powodu chorób odtytoniowych umiera 5,4 mln osób [1]. Jeśli aktualne trendy epidemiologiczne nie zostaną zahamowane, do 2030 roku liczba zgonów z powodu chorób odtytoniowych wzrośnie do ok. 8 mln. [1]. Warto zaznaczyć, że w przypadku uzależnienia od tytoniu szacowane wskaźniki chorobowości i śmiertelności znacznie przewyższają analogiczne wskaźniki dotyczące chorób i zgonów z powodu uzależnień od innych substancji psychoaktywnych [2].

Pomimo rosnącej wśród palaczy świadomości szkodliwości używania tytoniu, siła, z jaką ten zwyczaj uzależnia, powoduje, że skuteczne porzucenie palenia nie jest łatwe. Większość palaczy (około 70%) deklaruje chęć zerwania z nałogiem. W opracowanym przez Prochaskę i DiClemente tzw. transteoretycznym modelu zmiany osoby te znajdują się na etapie kontemplacji, czyli rozważają zaprzestanie w przyszłości palenia [3, 4]. Około 40% palaczy przechodzi w ciągu roku do kolejnych etapów tego modelu, tj. przygotowania do zmiany i działania, czyli podjęcia próby zerwania z nałogiem i niepalenia przez co najmniej jeden dzień. Jednak tylko u 2%-3% palaczy taka próba kończy się sukcesem, tj. długotrwałą abstynencją tytoniową [5].

Zasadniczy mechanizm odpowiadający za uzależnienie od tytoniu nie jest dostatecznie poznany. Wiadomo, że głównym czynnikiem uzależniającym jest zawarty w liściach tytoniu alkaloid nikotyna [6]. Wykazano też, że siła uzależniająca nikotyny jest porównywalna do tej, z jaką działa kokaina czy morfina [7, 8]. Psychofarmakologiczne efekty działania nikotyny prowadzą do uzależnienia zarówno fizycznego jak i behawioralnego. Uzależnienie fizyczne u

palaczy związane jest z utrzymywaniem odpowiednich stężeń nikotyny w ośrodkowym układzie nerwowym, co zapobiega objawom związanym z odstawieniem, pojawiającym się, gdy stężenie nikotyny we krwi i mózgu obniża się poniżej pewnego optymalnego dla palacza progu. Regularne sięganie po papierosa zapewnia utrzymywanie takiego stałego stężenia nikotyny w mózgu. Uzależnienie psychiczne jest bardziej złożone, wieloczynnikowe, obejmujące oddziaływania psychologiczne, społeczne, środowiskowe i kulturowe. Obie kategorie uzależnień wzajemnie na siebie oddziałują i z czasem utralają nałóg [9-11].

2.2. Zespół uzależnienia od tytoniu jako jednostka chorobowa

Uzależnienie od tytoniu definiuje się jako niedostosowanie (złą adaptację) ustroju do używania tej substancji, prowadzące do istotnych klinicznie zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania. Definicja uzależnienia od tytoniu od początku kształtowała się i ewoluowała w środowisku ekspertów zajmujących się zaburzeniami psychicznymi [12-16]. Po raz pierwszy termin "uzależnienie od tytoniu" został zawarty w nomenklaturze zaburzeń psychicznych w trzeciej edycji Diagnostycznego i Statystycznego Podręcznika Chorób Psychiczych (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; DSM*), wydanego przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne (*American Psychiatric Association; APA*) w 1980 roku [12]. Poprzednia wersja (*DSM-II*) z 1968 roku odnosiła pojęcie „uzależnienia” (*dependence*) lub „nadużywania” (*abuse*) do innych substancji uzależniających i nie uwzględniała tytoniu [17].

W roku 1988 raport Naczelnego Lekarza USA przedstawiający zdrowotne konsekwencje palenia papierosów oficjalnie uznał że: 1) palenie i inne formy tytoniu uzależniają, 2) substancją uzależniającą zawartą w tytoniu jest nikotyna, która może być dostarczana do organizmu zarówno przez palenie papierosów, jak też w inny sposób, jak żucie tytoniu czy wdychanie tabaki, 3) procesy fizjologiczne i behawioralne determinujące uzależnienie od tytoniu są podobne do procesów determinujących uzależnienie od heroiny i kokainy [18]. Późniejsze obserwacje epidemiologiczne potwierdziły duży potencjał nikotyny do wywoływania uzależnienia, porównywalny do mocy uzależniającej tych

dwóch substancji, uznawanych za tzw. twarde narkotyki [19]. Warto dodać, że istnieją dowody, że uzależnienie od nikotyny (UN) rozwija się bardzo szybko, już na etapie początkowego, nieregularnego jej używania, a nie tylko poprzez regularną podaż tej substancji, np. codzienne palenie papierosów [20-22].

W ślad za wspomnianym raportem Naczelnego Lekarza USA, wiodące autorytety, w tym Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*; WHO), APA, a także brytyjskie Królewskie Kolegium Lekarzy, wydały dokumenty, w których wyraźnie zauważalna jest ewolucja podejścia do kwestii uzależnienia od tytoniu [14, 23, 24].

WHO, w wydanej w roku 1992 Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób, Urazów i Przyczyn Zgonów ICD-10, oficjalnie uznała uzależnienie od tytoniu jako jednostkę chorobową i zaliczyła do zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania spowodowanych używaniem substancji psychoaktywnych [25]. Eksperti APA w czwartej edycji DSM z 1994 roku i jej późniejszej rewizji uaktualnili definicję, kryteria diagnostyczne i charakterystykę tej jednostki chorobowej, jak również zespołu objawów chorobowych towarzyszących odstawieniu nikotyny [14, 15]. Z kolei Królewskie Kolegium Lekarzy uznało uzależnienie od nikotyny za najistotniejszy problem związany z używaniem tytoniu i największą przeszkodę w skutecznym porzucaniu tego nałogu [24].

Według DSM-III/IV rozpoznanie uzależnienia od tytoniu (będącego w istocie uzależnieniem od nikotyny), w Polsce powszechnie określanego też zespołem uzależnienia od tytoniu (ZUT), było możliwe, gdy w ciągu 12 miesięcy, w dowolnym czasie, stwierdzano co najmniej trzy kryteria spośród siedmiu przedstawionych w Tabeli 1.

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne uzależnienia od nikotyny wg DSM-III/IV oraz kryteria zaburzeń spowodowanych używaniem nikotyny wg DSM-V

Kryteria uzależnienia od nikotyny wg DSM-III/IV
<p>1. Tolerancja, definiowana jako:</p> <ul style="list-style-type: none"> - potrzeba dostarczenia organizmowi znacznie większych ilości nikotyny dla uzyskania tego samego efektu - znacznie zmniejszony efekt działania przy ciągłym podawaniu tej samej ilości nikotyny <p>2. Zespół odstawienny, definiowany jako:</p> <ul style="list-style-type: none"> - wystąpienie typowych objawów abstynencyjnych - sięganie po nikotynę dla ich złagodzenia <p>3. Trudności w kontrolowaniu używania tytoniu, tj. używanie większych ilości tytoniu i/lub w dłuższym czasie niż zamierzany (<i>Larger/Longer</i>)</p> <p>4. Nieskuteczne próby zaprzestania czy zredukowania używania tytoniu (<i>Quit/Cut</i>)</p> <p>5. Duża ilość czasu poświęcana używaniu tytoniu</p> <p>6. Przedkładanie używania tytoniu ponad inne aktywności życiowe</p> <p>7. Obecność psychologicznych i/lub fizycznych problemów związanych z używaniem tytoniu (<i>Psych/Phys</i>)</p>
Kryteria dodane w DSM-V dla rozpoznania zaburzeń wywołanych używaniem nikotyny
<p>8. Zaniedbywanie ról życiowych</p> <p>9. Ryzykowne używanie</p> <p>10. Problemy interpersonalne</p> <p>11. Głód narkotykowy</p>

W ostatniej, piątej edycji DSM z 2013 roku, termin uzależnienie od tytoniu (nikotyny) zastąpiono nowym terminem - zaburzenie wywołane używaniem nikotyny (ang. *nicotine use disorder*; NUD). Przyjęto też ogólny termin dotyczący używania substancji uzależniających - zaburzenia wywołane używaniem substancji (ang. *substance use disorder*; SUD) [16, 26]. Jest on połączeniem dwóch innych terminów, które w poprzedniej, czwartej edycji DSM, były rozróżniane oddzielnie, tj. nadużywania substancji (ang. *abuse*) i uzależnienia (ang. *dependence*) [14]. Do rozpoznania tych zaburzeń stosowano osobne kryteria, przy czym kryteria nadużywania odnoszące się do większości

substancji psychoaktywnych nie obejmowały nikotyny. Rozpoznanie nadużywania wymagało obecności 1 z 4 kryteriów reprezentujących jego negatywne skutki: 1) niespełnianie oczekiwanych ról, 2) używanie substancji w sposób ryzykowny, 3) obecność problemów interpersonalnych oraz 4) konflikty z prawem [14].

W DSM-V do wcześniej stosowanych 7 kryteriów uzależnienia od tytoniu zostały dołączone trzy spośród czterech kryteriów nadużywania substancji (zaniedbywanie ról życiowych, ryzykowne używanie i problemy interpersonalne), a także dodatkowo, jako jedenaste kryterium, silne pragnienie przyjęcia substancji, zwane też głodem narkotykowym (ang. *craving*). Rozpoznanie NUD wymaga obecności w okresie roku co najmniej dwóch spośród tych jedenastu kryteriów, które przedstawiono w Tabeli 1 [16]. Obecnie zatem do rozpoznania NUD wystarcza spełnienie mniejszej liczby kryteriów charakteryzujących te zaburzenia, ale ich lista została rozszerzona. Wyróżniono przy tym łagodną postać NUD (przy obecności 2-3 kryteriów), umiarkowaną (4-5 kryteriów) oraz ciężką (6 lub więcej kryteriów). Połączenie nadużywania nikotyny (*abuse*) i uzależnienia od nikotyny (*dependence*) wynika z założenia, że oba te stany znajdują się na tym samym kontinuum jednego zespołu chorobowego (NUD), wywołanego używaniem nikotyny.

APA ściśle określiło także kryteria diagnostyczne dla zespołu odstawienia od nikotyny. Przedstawiono je w Tabeli 2. Spełnienie co najmniej 4 z ośmiu podanych kryteriów przemawia za rozpoznaniem zespołu abstynencyjnego [12, 14].

Uznanie uzależnienia od tytoniu za chorobę przewlekłą i nawracającą zaowocowało wprowadzeniem w wielu krajach własnych rekomendacji dotyczących leczenia [27]. Jednocześnie, intensywny rozwój wiedzy na temat mechanizmów neurofizjologicznych oraz genetycznego podłoża uzależnienia od tytoniu spowodował zwrot badań nad efektywnym leczeniem tego uzależnienia w kierunku farmakogenetyki. Powszechnie bowiem uważa się, że sukces w leczeniu osób uzależnionych od nikotyny będzie w przyszłości zależeć głównie od rozwoju tzw. medycyny spersonalizowanej, umożliwiającej dobrane

odpowiedniej terapii dla konkretnego pacjenta w zależności od jego indywidualnych cech, między innymi genotypu [28].

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne zespołu odstawienia od nikotyny wg DSM-III/IV

Kryteria zespołu odstawienia od nikotyny
1. Stany obniżonego nastroju/depresji
2. Objawy dysforyczne (gniew, drażliwość, frustracja)
3. Objawy anksjologiczne, tj. napady lęku
4. Zaburzenia funkcji poznawczych/ zaburzenia koncentracji
5. Niepokój
6. Bezsenna
7. Obniżenie częstości tętna
8. Wzmożony apetyt oraz zwiększenie masy ciała

2.3. Komórkowe i neurofizjologiczne patomechanizmy uzależnienia od tytoniu

Uzależnienie od substancji jest złożonym zjawiskiem behawioralnym, sterowanym przez skomplikowane mechanizmy zachodzące na poziomie komórkowym i molekularnym, uwarunkowanym przy tym przez liczne czynniki genetyczne i środowiskowe.

Proces uzależnienia od substancji zapoczątkowują wywołane przez nią zmiany aktywności i metabolizmu komórek nerwowych narażonych na jej ekspozycję. Długotrwała ekspozycja zmienia właściwości poszczególnych neuronów i ich połączeń, co prowadzi do zjawiska tolerancji, a w sytuacji braku substancji douczucia tzw. głodu narkotykowego. W efekcie rozwija się uzależnienie [29]. W przypadku tytoniu główną substancją uzależniającą jest nikotyna, która jest agonistą nikotynowych receptorów acetylocholiny (nAChR) na neuronach

zlokalizowanych w centralnym i wegetatywnym układzie nerwowym, a także w złączach nerwowo-mięśniowych mięśni szkieletowych.

Nikotynowy receptor acetylocholinowy jest białkiem przez błonowym, należącym do rodziny jonotropowych kanałów bramkowanych ligandami.

Liczne podtypy nAChRs są kombinacjami pięciu spośród jedenastu białkowych, genetycznie kodowanych podjednostek $\alpha 2$ - $\alpha 9$ i $\beta 2$ - $\beta 4$, warunkującymi ich rozmieszczenie i funkcje w obrębie układu nerwowego [30]. Receptor nikotynowy ma zatem budowę pentameru, a w mózgu ssaków najliczniej występuje podtyp złożony z podjednostek $\alpha 4$ i $\beta 2$. Jest on najprawdopodobniej głównym ogniwem w procesie neurofizjologicznego uzależnienia od nikotyny. Stwierdzono na przykład, że przerwanie stymulacji podjednostki $\beta 2$ u myszy eliminuje cechy behawioralnego uzależnienia od nikotyny [31, 32]. W innym badaniu wykazano, że mutacja o typie zamiany pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*; SNP) genu kodującego podjednostkę $\alpha 4$ u myszy, powoduje nadwrażliwość zmienionego receptora na nikotynę i nawet bardzo niskie dawki zastosowane do wybiórczej stymulacji tej podjednostki są wystarczające dla wywołania efektu wzmocnienia, co przy przewlekłym podawaniu nikotyny prowadzi do rozwoju tolerancji i sensytyzacji i w rezultacie do uzależnienia [33]. Uważa się, że różne konfiguracje liczbowe, w jakich podjednostki $\alpha 4$ i $\beta 2$ składają się na pentamerowy receptor nAChR, mogą modulować jego funkcje, m.in. zmieniając siłę przekazu sygnału w obrębie synaps [34].

Stymulacja receptorów nikotynowych powoduje uwolnienie różnych neurotransmiterów w mózgu [35-37]. Jednym z nich jest dopamina, potocznie zwana hormonem szczęścia. Jej uwolnienie w odpowiedzi na sygnał jest odbierane bowiem jako przyjemne doświadczenie i ma decydujące znaczenie dla wzmacniającego efektu nikotyny w uzależnieniu [38]. Zasadniczą rolę w powstawaniu uczucia przyjemności pełni układ mezolimbiczny centralnego układu nerwowego, to jest ciało prążkowane (*nucleus accumbens*) i część brzuszna nakrywki mostu (*ventral tegmentum*), najważniejsze struktury w tzw. systemie nagrody, pobudzanych przez nikotynę i inne substancje psychoaktywne [39-40]. Utrwaleniu neurobiologicznych mechanizmów

uzależnienia sprzyja zwiększenie liczby receptorów nAChRs w centralnym układzie nerwowym podczas długotrwałego stosowania nikotyny (mechanizm „*upregulation*”). Jest ono wyrazem zmian neuroadaptacyjnych służących utrzymaniu równowagi w sytuacji przewlekłej stymulacji substancją uzależniającą [41-42]. Te komórkowe i molekularne mechanizmy adaptacyjne są odpowiedzialne za rozwój tolerancji nikotyny podczas jej regularnego przyjmowania, tj. konieczność stosowania większych dawek nikotyny dla uzyskania takiego samego efektu, a także za zjawisko sensytyzacji receptorów powstające podczas nieregularnego przyjmowania nikotyny, czyli wywoływania takiego samego efektu przez mniejsze niż poprzednio dawki tej substancji [43-45]. Dodatkowo, potencjał uzależniający nikotyny jest wzmacniany przez aktywację szlaków noradrenergicznych układu nerwowego w odpowiedzi na nagły spadek stężenia nikotyny w osoczu. Mechanizm ten odpowiada za wywołanie objawów zespołu odstawienia nikotyny, tj. nastroju dysforycznego i/lub depresyjnego czy zaburzeń koncentracji [46-48].

Czynniki wewnętrzne i środowiskowe (pierwotne i wtórne) podtrzymujące używanie tytoniu i rozwój uzależnienia oraz neurotransmitery zaangażowane w te procesy przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Czynniki podtrzymujące używanie nikotyny i neuroprzekaźniki mediujące ten proces

Czynnik	Neuroprzekaźnik							
	ACh	DA	ECB	EOP	GLU	5-HT	NA	GABA
Pierwotny								
Ostre objawy odstawienie		✓					✓	✓
Negatywny afekt, modulacja nastroju		✓				✓	✓	
Uczucie przyjemności i wzmocnienie		✓		✓	✓		✓	
Bodźce warunkowe, przedłużona ab- stynencja	✓	✓			✓	✓		✓

Wtórny								
Redukcja stresu	✓	✓			✓		✓	
Antynocycpcja (hamowanie transmisji bólu)			✓	✓				
Wzmocnienie procesów poznawczych	✓	✓			✓		✓	
Kontrola masy ciała		✓	✓	✓				

Obecnie dostępna wiedza na temat neurobiologicznego podłoża uzależnienia nie pozwala jednoznacznie wskazać, które osoby są skłonne do rozpoczęcia palenia, dalszego regularnego dostarczania nikotyny oraz uzależnienia od tej substancji. Na indywidualne zachowania w tym zakresie wpływają bowiem liczne czynniki, głównie genetyczne, a także demograficzne, społeczno-środowiskowe, kulturowe oraz indywidualne, w tym cechy osobowości, które również w dużym stopniu są genetycznie uwarunkowane [49, 50].

2.4. Zmienność używania tytoniu i jej genetyczne podłoże

Zachowania w określonej populacji, na przykład palenie tytoniu, są kształtowane przez czynniki genetyczne i środowiskowe oraz ich wzajemne oddziaływanie [51]. Indywidualny wzór zachowania, czyli fenotyp, jest zatem efektem wpływu genotypu oraz środowiska. Dodatkowo, w obrębie każdej z tych dwóch składowych kształtujących fenotyp działają dwa rodzaje wpływów, powodując jego dalsze zróżnicowanie (wariancję). Genetyczne zróżnicowanie danej populacji jest wypadkową wariancji addytywnej, związanej z powstawaniem kombinacji genów przekazywanych od obojga rodziców i tworzących indywidualny genotyp, oraz wariancji nieaddytywnej, obejmującej interakcje w obrębie alleli u tego samego osobnika. Wpływy czynników środowiskowych obejmują z kolei oddziaływanie tzw. środowiska wspólnego, inaczej współdzielonego w obrębie tej samej rodziny i kształtującego fenotypowe podobieństwo (np. wpływ postawy rodziców wobec palenia tytoniu na postawę dzieci wobec tego zachowania), oraz oddziaływanie środowiska specyficznego, pozarodzinnego, różnicującego fenotypowo poszczególnych osobników w rodzinie (np. wpływ różnych grup rówieśniczych na zachowania bliźniaczego rodzeństwa, nie uczęszczającego do tej samej szkoły) [51].

Dodatkowo, wpływ czynników środowiskowych na kształtowanie się fenotypów związanych z używaniem tytoniu zależy w pewnym stopniu od indywidualnej podatności na oddziaływania otoczenia, mającej swoje źródło w genetycznym i neurobiologicznym podłożu osobowości [52]. W ten sposób zachodzi interakcja pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Oba typy czynników mogą też być ze sobą skorelowane, czego przykładem jest poszukiwanie przez osoby palące papierosy środowiska, które umożliwia im kontynuowanie tego zachowania, czyli odpowiada jego genetycznie uwarunkowanym cechom.

Początkowo, w badaniach nad genetycznym podłożem używania tytoniu posługiwano się klasyczną metodologią badawczą, tj. badaniami bliźniąt. Potwierdziły one znamienne wyższą zgodność występowania nałogu u monozygotycznych bliźniąt niż u dzygotycznych. Analiza statystyczna umożliwiła także ocenę proporcji udziału czynników środowiskowych i genetycznych (tj. odziedziczalność) w zmienności palenia tytoniu [53, 54]. Badania obejmujące duże próby wykazały, że ogólny fenotyp palenia tytoniu u danej osoby, a także poszczególne jego elementy są w istotnej mierze uwarunkowane genetycznie. Dotyczy to m. in. wieku rozpoczęcia palenia [55-57], kontynuacji tego zwyczaju lub zdolności do zaprzestania [53, 58], czy liczby papierosów wypalanych w ciągu dnia [55, 59].

Aktualnie, badania oceniające genetyczne tło nałogu tytoniowego w większym stopniu opierają się na analizie DNA niż na statystycznej ocenie odziedziczalności, a indywidualny fenotyp używania tytoniu badany jest na poziomie zróżnicowania genów (polimorfizm genetyczny) [60]. Przy pomocy technik molekularnych identyfikuje się i mapuje lokalizację genów, które w różnym stopniu wpływają na kształtowanie się indywidualnych fenotypów palenia tytoniu, czyli poszukuje się tzw. *loci* cech ilościowych (*Quantitative Trait Loci; QTL*). Jedną z najczęstszych strategii wykrywania *QTL* są badania asocjacji allelicznej, pozwalające na ustalenie ewentualnego związku pomiędzy polimorfizmami tzw. genów kandydujących (ang. *candidate gene studies*) a używaniem tytoniu, czy ściślej określonymi fenotypami tego zachowania. Dokonuje się tego przez ocenę i porównanie częstości występowania danego

allelu i cechy w populacji osób niespokrewnionych w badaniach kliniczno-kontrolnych (ang. *case-control studies*).

Początkowo badania genów kandydujących koncentrowały się głównie na genach o potencjalnym wpływie na neurohormonalne mechanizmy uzależnienia od nikotyny, tj. na genach zaangażowanych w neuroprzekaźnictwo mózgowe. Badano m. in. geny wpływające na tzw. szlak dopaminergiczny [61, 62], serotoninergericzny [63], czy opioidowy [64]. Obecnie największe zainteresowanie badaczy przyciągają warianty genów kodujących podjednostki receptorów nikotynowych.

2.5. Badania regionu 15q24-25.1 genomu i polimorfizmów w klastrze genów *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*

Złożony charakter zachowania, jakim jest używanie tytoniu, stanowi duże wyzwanie dla poznania jego podłoża genetycznego. To różnorodne fenotypowo zachowanie jest bowiem uwarunkowane działaniem wielu genów, przy czym modulujący wpływ pojedynczego genu najpewniej jest niewielki. Identyfikacja tych genów i ich polimorficznych wariantów stała się obecnie znacznie łatwiejsza dzięki poznaniu ludzkiego genomu oraz rozwojowi badań polegających na jego całościowym skanowaniu (tzw. badania: *genome-wide association study*; GWAS) z równoczesnym genotypowaniem ponad kilkuset tysięcy polimorfizmów typu pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*; SNP). Badania GWAS, wraz z odpowiednią analizą statystyczną, umożliwiły wskazanie regionu 15q24-25.1 genomu, to jest regionu zlokalizowanego na krótszym ramieniu chromosomu 15, w którym występują największe międzygrupowe różnice w częstościach polimorficznych wariantów DNA u osób palących i niepalących papierosy. Region ten zawiera klaster trzech genów kodujących podjednostki alfa-5, alfa-3 i beta-4 nikotynowego receptora acetylocholino (*CHRNA3*, *CHRNA5* i *CHRNA4*). Badania GWAS pozwoliły przy tym na identyfikację wariantów polimorficznych tych genów, wpływających na stopień uzależnienia od nikotyny [65-67]. W wielu replikacjach tych badań, a także w licznych doniesieniach, w których ograniczono się do badania niewielkiej liczby polimorfizmów (*candidate gene studies*), oceniano ich

związek z różnymi fenotypami uzależnienia od tytoniu, najczęściej liczbą papierosów wypalanych dziennie, stopniem UN określonym w teście Fagerströma lub HSI, czy długością czasu od obudzenia do zapalenia pierwszego papierosa [65, 67-82].

Szczególne zainteresowanie budzą obecnie dwa polimorfizmy SNP: rs16969968 w *CHRNA5* i rs1051730 w *CHRNA3*, w wysokim stopniu ze sobą skorelowane w populacji pochodzenia europejskiego, a przez to często traktowane zamiennie [71-73, 75, 78-82]. Większość badań, w których m. in. te SNPs były przedmiotem analizy, wykazała ich związek z liczbą papierosów wypalanych dziennie, co wskazuje, że jest to silna i stała zależność, niezależnie od przyjętej klasyfikacji fenotypowej i rodzaju zastosowanych metod analitycznych [71-73, 75, 78-81]. Co więcej, kilka metaanaliz potwierdziło znamiennej zależność pomiędzy wariantami rs1051730-rs16969968 a wielkością na dym tytoniowy, przy czym silniejszy związek wykazano, gdy samoreportowanie liczby CPD przez uczestników zastąpiono obiektywnym (biochemicznym) pomiarem tej ekspozycji [83-85]. Pomimo silnej nierównowagi sprzężeń pomiędzy tymi dwoma SNPs (współczynnik korelacji LD [R^2] = 1,0), polimorfizm rs1051730 w badaniach GWAS wykazuje nawet silniejszy związek z ND niż rs16966968 [84]. Chociaż funkcjonalna rola rs1051730 nie jest jednak znana, sugeruje się, że prawdopodobnie stanowi on silny markerowy SNP dla jakiegoś istotnego funkcjonalnie haplotypu w obrębie klastra genów *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* [84].

Ostatnio opublikowane badania pochodzące z dwóch krajów skandynawskich potwierdziły także, że obecność rzadszego allelu A w miejscu rs1051730 wiąże się nie tylko z większym ryzykiem palenia papierosów i uzależnienia od nikotyny, ale też z większym ryzykiem zgonu z powodu chorób odtytoniowych, tj. choroby wieńcowej, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc czy raka płuca [86, 87].

W licznych badaniach stwierdzono, że również inne polimorfizmy genów kodujących podjednostki alfa-3, alfa-5 i beta-4 receptora nikotynowego, między innymi rs 6495308 i rs55853698 mogą wpływać na fenotypy palenia papierosów

i uzależnienia od nikotyny [68-70, 75, 77, 78, 83, 88]. Dla przykładu, w niektórych doniesieniach wykazywano zależność pomiędzy intronowym polimorfizmem w locus rs6495308 a ND, definiowanym przy użyciu Testu Fagerstroma lub CPD. Warto jednak zaznaczyć, że nie w każdym przypadku zależność ta pozostawała statystycznie znamienna po przyjęciu poziomu istotności uwzględniającego poprawkę Bonferroniego dla wielokrotnych porównań [68-70, 75, 77, 78, 88]. Większość tych badań przeprowadzono wśród osób pochodzenia europejskiego, ale pozytywne wyniki, potwierdzające wpływ wspomnianych SNPs na uzależnienie od nikotyny uzyskano także w populacjach reprezentujących inne rasy, np. rasę żółtą. Wśród Koreańczyków płci męskiej wykazano przykładowo silną zależność pomiędzy rs6495308 a CPD, zarówno w analizie genotypowej dotyczącej tego pojedynczego SNP, jak też w analizie haplotypowej [77].

Innym polimorfizmem budzącym zainteresowanie badaczy jest rs55853698, położony w regionie promotorowym genu *CHRNA5* i u osób pochodzenia europejskiego ściśle skorelowany z rs1051730 ($r^2 > 0,96$) [83]. Zainteresowanie tym SNP zapoczątkowały doniesienia Liu i wsp. [83]. Po raz pierwszy, w badaniach GWAS regionu 15q25 genomu, obejmujących bardzo liczną próbę osób pochodzenia europejskiego (ponad 41 tysięcy), przy zastosowaniu procedury imputacji genotypów dla wszystkich SNPs tego regionu pozyskanych z bazy Projektu 1000 Genomów, a także po powtórzeniu metaanalizy danych, wykazano silną zależność pomiędzy rs55853698 a liczbą wypalanych dziennie papierosów. Z uwagi na lokalizację tego SNP w pobliżu nieulegającego translacji regionu 5'- genu *CHRNA5*, sugeruje się, że może on wpływać na transkrypcję mRNA. Wykazywany w wielu doniesieniach związek rs55853698 z CPD był nawet nieznacznie silniejszy niż w przypadku rs1051730, polimorfizmu mającego mocną ugruntowaną w piśmiennictwie pozycję jako SNP istotnie wpływający na palenie i UN [71-73, 78, 80].

Pomimo rozwoju badań GWAS, badania asocjacji allelicznej dotyczące pojedynczych genów kandydujących zajmują ważne miejsce na drodze ku poznaniu genetycznych uwarunkowań uzależnienia od nikotyny i wciąż są przeprowadzane w różnych populacjach. Wyniki nie są jednak jednoznaczne.

Jedną z potencjalnych przyczyn rozbieżności wyników genetycznych badań asocjacyjnych jest zróżnicowanie częstości alleli w populacjach reprezentujących odmienne rasy, a także możliwa dodatkowa etniczna stratyfikacja w obrębie badanej próby [89-91]. W celu wyeliminowania tego problemu, badania przedstawione w niniejszej rozprawie przeprowadzone zostały w etnicznie, i najpewniej w znacznym stopniu genetycznie homogennej, izolowanej populacji Kaszubów. Ograniczone zróżnicowanie alleliczne w takiej populacji czyni z niej wartościowy materiał do badań genetycznych, w tym badań asocjacji allelicznej, gdyż ewentualne wzmocnienie genów wpływających na UN może ułatwić wykrycie potencjalnego związku genotyp-fenotyp [92-94].

3. CEL PRACY

Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmów w miejscach rs55853698, rs1051730 i rs6495308 genów kodujących podjednostki alfa-5 i alfa-3 receptora nikotynowego na stopień uzależnienia od nikotyny w jednorodnej etnicznie grupie Kaszubów

Cele cząstkowe

1. Określenie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów kodujących podjednostki alfa-3 i alfa-5 receptora nikotyny.

2. Określenie zależności pomiędzy podstawowymi cechami demograficznymi, tj. płcią i wiekiem osób badanych a wybranymi fenotypami uzależnienia od tytoniu, określonymi przy pomocy:
 - a) wskaźnika FTND (ang. *Fagerström test for Nicotine Dependence*)
 - b) wskaźnika HSI (ang. *Heavy Smoking Index*)
 - c) liczby papierosów wypalanych dziennie (ang. *cigarette per day*; CPD)
 - d) długości czasu od obudzenia do wypalenia pierwszego porannego papierosa (ang. *time to first cigarette*; TTF)

3. Określenie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a wybranymi fenotypami uzależnienia od tytoniu.

4. Ocena wpływu płci i badanych polimorfizmów na wiek rozpoczynania palenia.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Materiał

4.1.1. Dobór próby

Dla uniknięcia istotnego w genetycznych badaniach asocjacyjnych problemu etnicznej stratyfikacji badanej próby, badania zostały przeprowadzone wśród Kaszubów, stanowiących zamkniętą, jednorodną etnicznie populację.

Kaszubi to licząca około 230 tysięcy populacja zamieszkująca większość terytorium Pomorza Gdańskiego i część Pomorza Zachodniego [95, 96]. Pierwsze wzmianki o Kaszubach pojawiły się w źródłach historycznych w połowie XIII wieku [97, 98]. Populacja ta prawdopodobnie została odłączona od jakiejś większej populacji, a jej powolna ekspansja i niewielka imigracja osobników z zewnątrz przyczyniły się do jej izolacji. Wraz z wysokim odsetkiem endogamii czynniki te wpłynęły najpewniej na niski stopień zróżnicowania genetycznego populacji Kaszubów, jednak struktura genetyczna tej grupy etnicznej nie była jak dotąd badana na szeroką skalę przy pomocy nowoczesnej metodologii genetyki populacyjnej. Uważa się jednak, że Kaszubi zachowując swoją tożsamość, kulturę, obyczaje i język, spełniają kryteria izolacji kulturowej i lingwistycznej, a ze względu na zamieszkiwanie obrzeży kraju, także geograficznej [99].

Rekrutacja uczestników badania prowadzona była wśród osób zgłaszających się do kilkunastu ośrodków zdrowia znajdujących się na Kaszubach. Z dorosłymi, aktualnie palącymi papierosy osobami, deklarującymi kaszubskie pochodzenie, przeszkolone pielęgniarki przeprowadzały wywiad kwestionariuszowy, podczas którego odnotowywały dane demograficzne, genealogiczne oraz dotyczące nałogu palenia tytoniu.

Część wywiadu dotycząca rodowodu uczestnika służyła potwierdzeniu jego kaszubskiego pochodzenia oraz utworzeniu osobnej bazy obejmującej wszystkich żyjących dorosłych krewnych pierwszego stopnia uczestników (rodzice, rodzeństwo i potomstwo), której przeszukiwanie pozwalało uniknąć

późniejszego włączania do badań osób spokrewnionych. Osobę pochodzenia kaszubskiego definiowano jako urodzoną w kaszubskiej rodzinie, w której zarówno rodzice jak i wszyscy dziadkowie byli Kaszubami, znającą język kaszubski i swobodnie się nim posługującą.

Każdorazowo, podczas rekrutowania nowego uczestnika, przeglądano bazę krewnych pierwszego stopnia uczestników już włączonych do badania. Jeśli osobę rekrutowaną odnajdywano w tej bazie, do badania spośród dwóch zidentyfikowanych w ten sposób krewnych włączano preferencyjnie osobę młodszą.

Dla celów analizy statystycznej w bazie zostały zgromadzone dane demograficzne (wiek, płeć) oraz dane dotyczące palenia papierosów (wiek rozpoczęcia palenia, liczba wypalanych papierosów dziennie, długość trwania czasu od obudzenia do wypalania pierwszego porannego papierosa, stopień uzależnienia od tytoniu określony liczbą punktów w teście Fagerströma, długość trwania nałogu). Aktualny codzienny palacz definiowany był jako osoba, która w dniu rekrutacji podawała codzienne palenie tytoniu od co najmniej roku. Liczbę paczolat określano na podstawie liczby wypalonych papierosów dziennie i czasu trwania nałogu.

Od wszystkich badanych osób została pobrana do heparynizowanych probówek próbka krwi żyłnej, która do czasu badania genetycznego została zamrożona i przechowywana w temp. -80st.C.

Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą i pisemną zgodę na udział w badaniu. Protokół został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną d/s Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym

4.1.1.1. Ocena stopnia uzależnienia od nikotyny

Stopień uzależnienia od nikotyny (UN) oceniano przy zastosowaniu Testu Uzależnienia od Nikotyny Fagerströma (FTND) [100]. Jest on skróconą, powszechnie stosowaną wersją Kwestionariusza Tolerancji Fagerströma (ang.

Fagerström Tolerance Questionnaire; FTQ), złożoną z sześciu pytań [101]. W przypadku dwóch pytań możliwy jest jedynie wybór odpowiedzi TAK lub NIE, punktowanych odpowiednio liczbą 1 lub 0 punktów. Przy pozostałych pytaniach, wybierając jedną spośród kilku możliwych odpowiedzi, można uzyskać od 0 do 3 punktów. Po zsumowaniu punktów za wszystkie odpowiedzi, łączny wynik może wynosić 0-10 punktów. Im wyższa suma uzyskanych punktów w kwestionariuszu FTND, tym większy stopień UN.

Test Uzależnienia od Nikotyny Fagerströma przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Test Uzależnienia od Nikotyny Fagerströma

Pytanie	Liczba punktów
1. Kiedy po obudzeniu zapalasz pierwszego papierosa?	
w ciągu 5 minut	3
po upływie 6-30 minut	2
po upływie pół godziny do godziny	1
po godzinie	0
2. Czy powstrzymanie się od palenia w miejscach, gdzie palić nie wolno, jest dla Ciebie problemem?	
tak	1
nie	0
3. Z którego papierosa najtrudniej Ci zrezygnować?	
z pierwszego rano	1
z każdego innego	0
4. Ile papierosów wypalasz dziennie?	
do 10	0
11-20	1
21-30	2
31 i więcej	3
5. Czy rano palisz więcej papierosów niż w ciągu reszty dnia?	
tak	1
nie	0
6. Czy nie możesz się powstrzymać od palenia, nawet podczas choroby, gdy musisz leżeć w łóżku?	
tak	1
nie	0

W przedstawionym badaniu zastosowano także tzw. Wskaźnik Intensywności Palenia (ang. *Heaviness of Smoking Index*; HSI), który dla uproszczonej oceny stopnia UN zawiera jedynie dwa pytania zaczerpnięte z FTND/FTQ. Są to pytania o liczbę papierosów wypalanych dziennie (CPD) oraz o długość czasu do zapalenia pierwszego papierosa po przebudzeniu (TTF) (Tabela 5).

Tabela 5. Wskaźnik Intensywności Palenia (*Heaviness of Smoking Index*; HSI)

Pytanie	Liczba punktów
1. Ile papierosów wypalasz dziennie? do 10 11-20 21-30 31 i więcej	0 1 2 3
2. W jakim czasie po obudzeniu zapalasz pierwszego papierosa? w ciągu 5 minut po upływie 6-30 minut po upływie pół godziny do godziny po godzinie	3 2 1 0

Wskaźnik HSI jest sumą punktów uzyskanych po określeniu LPD i CPP i mieści się w zakresie od 0 do 6.

4.1.1.2. Charakterystyka uczestników

Po weryfikacji ankiet, dwadzieścia dwie osoby wyłączone z badania ze względu na niepewne kaszubskie pochodzenie lub brak istotnych danych dotyczących nałogu palenia papierosów. Spośród 810 zrekrutowanych potencjalnych uczestników, do badania włączono ostatecznie 788 dorosłych osób, aktualnych codziennych palaczy papierosów, w wieku od 18 do 85 lat (średnio $43,6 \pm 13,8$ lat), w tym 282 kobiety w wieku od 20 do 73 lat (średnio $46,5 \pm 11,5$ lat) oraz 506 mężczyzn w wieku od 18 do 85 lat (średnio $42,0 \pm 14,6$ lat).

Średni wiek rozpoczęcia palenia tytoniu wynosił $18,9 \pm 3,8$, a średnia wartość CPD, FTND i TTF w badanej próbie odpowiednio $17,5 \pm 7,7$, $4,2 \pm 2,1$, i $2,8 \pm 1,3$. W Tabeli 6 przedstawiono charakterystykę badanej populacji pod względem cech demograficznych i profilu palenia tytoniu.

Tabela 6. Charakterystyka badanej populacji w odniesieniu do cech demograficznych oraz nałogu palenia papierosów [102]

Table 6. A demographic and smoking profile in the Kashubian sample of current smokers [102]

Cecha/ <i>Characteristic</i>	Wartości: Liczba (%), Średnia \pm SD <i>Values: Number (%), Mean \pm SD</i>
Mężczyźni/ <i>Males</i>	506 (64,2)
Wiek (lata)/ <i>Age (years)</i>	$43,6 \pm 13,8$
Przedział wieku/ <i>Age category</i>	
<30 lat/ <i>years</i>	162 (20,6)
30-45 lat/ <i>years</i>	230 (29,2)
46-60 lat/ <i>years</i>	320 (40,6)
>60 lat/ <i>years</i>	76 (9,6)
Wiek rozpoczynania palenia (lata)/ <i>Age at starting smoking (years)</i>	$18,9 \pm 3,8$
Palacze, którzy rozpoczęli palenie w wieku ≤ 16 lat/ <i>Smokers who started smoking in the age ≤ 16 yrs.</i>	174 (22,1)
Długość trwania nałogu (lata)/ <i>Duration of smoking (years)</i>	$23,0 \pm 12,6$

Liczba papierosów wypalanych dziennie (CPD)/No. of cigarettes smoked daily (CPD)	17,5 ± 7,7
Kategorie CPD/ <i>CPD category</i>	
≤5	35 (4,4)
6-10	172 (21,8)
11-15	35 (16,5)
16-20	349 (44,3)
>20	102 (12,9)
FTND	4,2 ± 2,1
HSI	2,8 ± 1,3
TTF ≤ 5 min	213 (27,0)

4.2. Metody

U wszystkich osób wykonano genotypowanie wybranych polimorfizmów typu SNP genów kodujących podjednostki alfa-5, alfa-3 cholinergicznego receptora nikotynowego. Na podstawie wcześniejszych doniesień o związku z fenotypami uzależnienia od tytoniu (UN) do genotypowania zostały wybrane dwa SNPs w loci rs1051730 i rs6495308 genu *CHRNA3*, oraz jeden SNP w locus rs55853698 genu *CHRNA5* (numery SNPs są zgodne z bazą *National Center for Biotechnology Information*; NCBI) [65, 68-73, 75-85, 88, 103, 104].

Na podstawie badań rzadszy (*minor*) allel A w rs1051730, częstszy (*major*) allel A w rs6495308 oraz rzadszy allel C w rs55853698 zostały uznane, jako allele, związane z większym ryzykiem uzależnienia od nikotyny [65, 68-73, 75-85, 88, 103, 104].

4.2.1. Analiza molekularna

4.2.1.1. Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA izolowano ze 100 µl pełnej krwi mrożonej, za pomocą zestawu Genomic MicroAX Blood Gravity, zgodnie z protokołem producenta (A&A Biotechnology; Gdynia, Polska). Próbki DNA następnie rozcieńczano 10-krotnie w 10 mM buforze Tris, w pH 8,0 i przechowywano w temperaturze 4°C.

4.2.1.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Amplifikację PCR rejonów obejmujących badane SNP przeprowadzano w roztworze o całkowitej objętości 50 μL , o składzie przedstawionym w Tabeli 7. PCR przeprowadzano w systemie iCycler (Bio-Rad).

Tabela 7. Skład mieszaniny do przeprowadzenia reakcji PCR

Składnik	Ilość
2xMaster Mix Plus High GC	25 μl
Starter sensowny	0,2 μl
Starter antysensowny	0,2 μl
DNA	2 μl
Woda dejonizowana	22,6 μl

Sekwencje starterów użytych do amplifikacji PCR fragmentów genów *CHRNA3* i *CHRNA5* obejmujących badane SNP zostały przedstawione w Tabeli 8.

Warunki temperaturowe reakcji PCR rejonów genów *CHRNA3* i *CHRNA5* obejmujących badane polimorfizmy przedstawiono w Tabelach 9 i 10.

Tabela 8. Startery sensowne (*forward*; F) i antysensowne (*reverse*; R) użyte w reakcji PCR oraz startery użyte do pirosekwencjonowania [Kita, 2015].

SNP	Starter	Sekwencja
rs1051730	rs1051730F	5'-AGG GAG AGG AGG ACA GAA A-3'
	biot-rs1051730R	5'-[Btñ]AAG GAC TAT TGG GAG AGC G-3'
	pyro-rs1051730-B	5'-TTG TAC TTG ATG TCG TGT TT-3'
rs55853698	rs55853698R-C	5'-TTG GGG AAT GGA GCA CTG AGT-3'
	biot-rs5585369F-C	5'-[Btñ]GCT AGG CTG AGG CTG CTG TC-3'
	pyro-rs55853698-C	5'-AAA CGA GGG CAG ACG CAG C-3'

rs6495308	rs6495308F biot-rs6495308R pyro-rs6495308	5'-TGT GTC CCC AAA CCT CTT CT-3' 5'-[B _{tn}]ACC CTT CTC AAC TAC GAC CT-3' 5'-CCT CTT CTC TAC TCT CC-3'
-----------	---	--

Tabela 9. Warunki temperaturowe reakcji PCR rejonów genu *CHRNA3* obejmujących miejsca polimorficzne rs1051730 i rs6495308

Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	3 min	
Denaturacja	94	30 sek	35
Przyłączanie starterów	60	30 sek	
Wydłużanie	72	30 sek	
Wydłużanie końcowe	72	5 min	

Tabela 10. Warunki temperaturowe reakcji PCR rejonu genu *CHRNA5* obejmującego miejsce polimorficzne rs55853698

Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	3 min	
Denaturacja	94	15 sek	40
Przyłączanie starterów	68	1 min	
Wydłużanie	72	5 min	

4.2.1.3. Wykrywanie polimorfizmów za pomocą pirosekwencjonowania

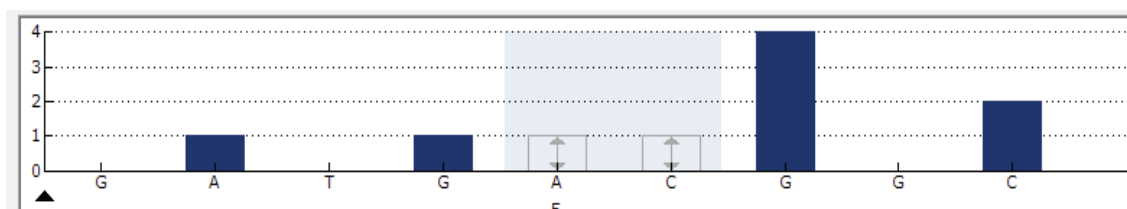
Analizę polimorfizmów genów kodujących podjednostki receptora nikotynowego *CHRNA3* i *CHRNA5* przeprowadzono poprzez pirosekwencjonowanie w analizatorze PSQ96MA Luc96 (PyroSequencing AB, Uppsala, Szwecja) z wykorzystaniem po 5 pmoli starterów pyro-rs1051730-B, pyro-rs55853698-C oraz pyro-rs6495308 przedstawionych w Tabeli 8 oraz zestawu odczynników PyroMark®GoldQ96 Reagents (Qiagen). Używano po 25 ul produktów PCR przygotowanych przy użyciu aparatury PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen) według procedury zalecanej przez producenta.

Przykładowe wyniki pirosekwencjonowania przedstawiono na Ryc. 1 (a, b, c, d), Ryc. 2 (a, b, c, d) i Ryc. 3 (a, b, c, d)

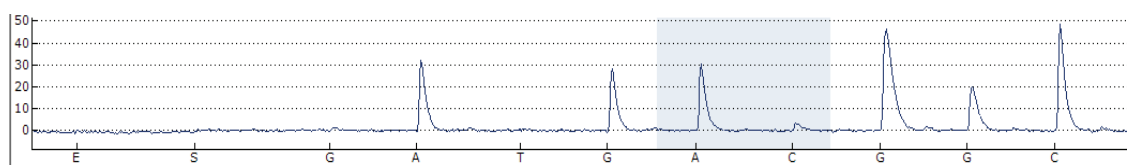
Rycina 1. Pirosekwencjonowanie rs55853698

Analizowana sekwencja obejmująca SNP: AGMGGGGCCG

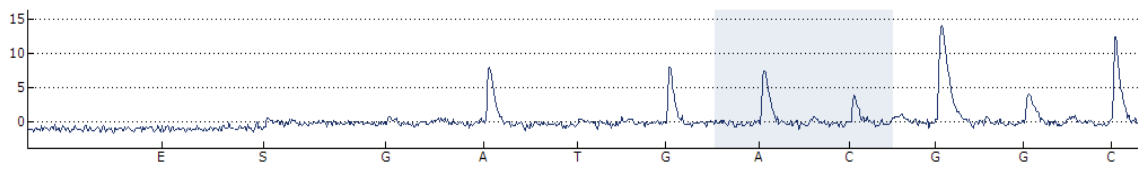
Kolejność dodawania dNTPs: GATGACGGC



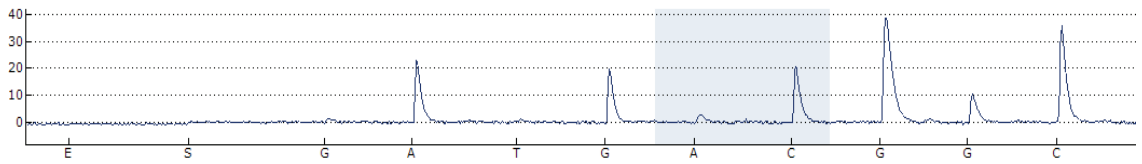
a) Histogram



b) Matryca AA



c) Matryca AC



d) Matryca CC

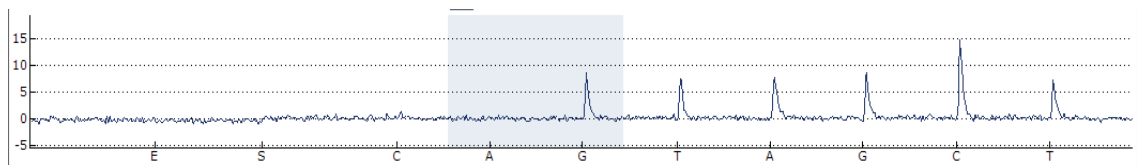
Rycina 2. Pirosekwencjonowanie rs1051730

Analizowana sekwencja obejmująca SNP: **RTAGCCTGGGGC**

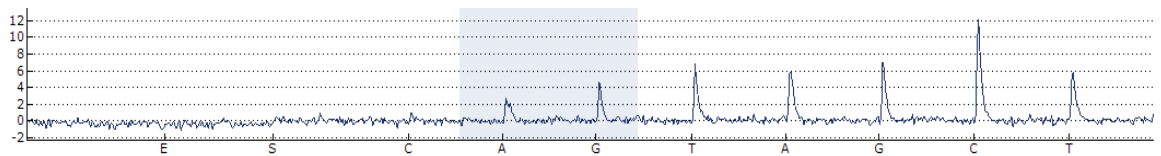
Kolejność dodawania dNTPs: CAGTAGCT



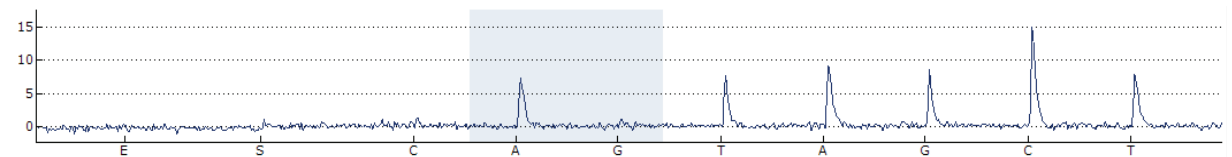
a) Histogram



b) Matryca GG



c) Matryca AG

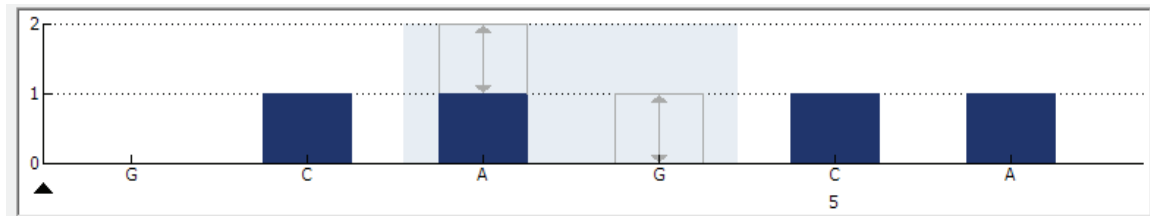


d) Matryca AA

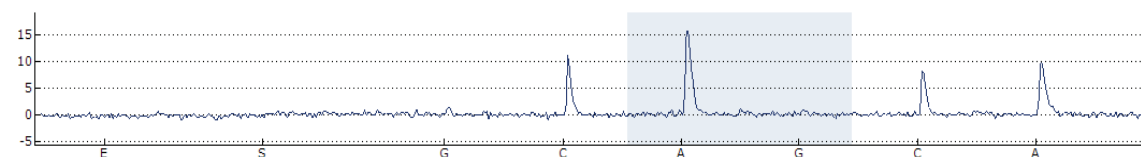
Rycina 3. Pirosekwencjonowanie rs6495308

Analizowana sekwencja obejmująca SNP: CARCAG

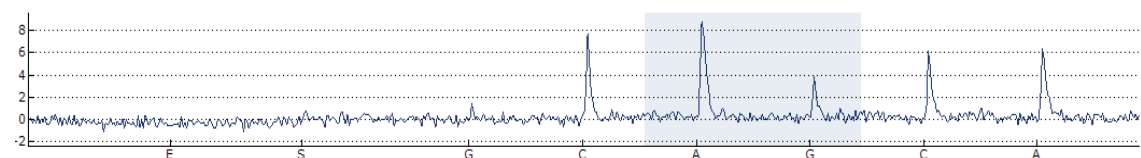
Kolejność dodawania dNTPs: GCAGCA



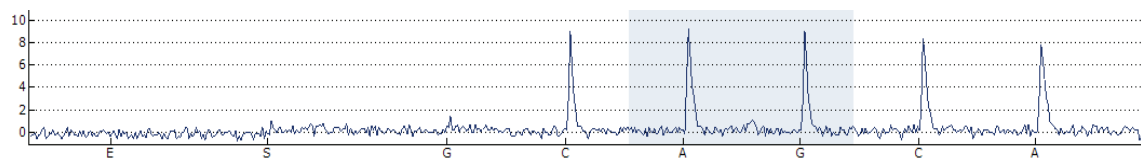
a) Histogram



b) Matryca AA



c) Matryca AG



d) Matryca GG

4.3. Analiza statystyczna

Analizę równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE) przeprowadzono za pomocą oprogramowania Haploview (wersja 4.2) [105]. Test zgodności chi-kwadrat (χ^2), z ewentualną poprawką Yatesa, został użyty do oceny rozkładu alleli i genotypów. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Związek płci i wieku badanych Kaszubów z uzależnieniem od nikotyny, zależność pomiędzy płcią uczestników a wiekiem rozpoczęcia palenia, a także związek wybranych polimorfizmów w miejscach rs1051730, rs6495308 i rs55853698 genów kodujących podjednostki alfa-3 i alfa-5 receptora nikotynowego z uzależnieniem od nikotyny (wybranymi

fenotypami UN) i wiekiem rozpoczynania palenia oceniano za pomocą analizy regresji logistycznej przy użyciu oprogramowania STATISTICA 10.0 (StaSoft Inc.; USA).

Fenotypami UN, włączonymi do analizy regresji logistycznej, były: FTND i HSI, oraz mniej złożone fenotypy określone przez pojedyncze elementy zaczerpnięte z testów FTND i HSI, tj. liczbę wypalanych dziennie papierosów (CPD) i długość czasu od obudzenia do wypalenia pierwszego porannego papierosa (TTF). Oba te fenotypy mogą mieć, jak się sugeruje, różne genetyczne podłoże, choć wykazano silny związek pomiędzy CPD i doznawaniem uczucia głodu narkotykowego (*craving*), które z kolei ściśle koreluje z TTF [106, 107].

Wiek rozpoczynania palenia oraz fenotypy UN zostały włączone do analizy jako cechy dychotomiczne. Dla wieku rozpoczynania palenia punktem odcięcia był 16 rok życia (≤ 16 rok życia vs > 16 rok życia). W przypadku stopnia uzależnienia od nikotyny określanego przy pomocy FTND i HSI, jako punkty odcięcia dla wyższego vs. niższy stopień UN przyjęto FTND = 4 pkt. (FTND < 4 vs. FTND \geq 4) i HSI = 3 pkt. (HSI < 3 vs. HSI \geq 3).

Fenotypy palenia papierosów określone przez CPD i TTF podzielono z kolei dychotomicznie na palenie do 10 papierosów dziennie (≤ 10 CPD) vs. palenie większej liczby papierosów (> 10 CPD), oraz wypalanie pierwszego papierosa w ciągu 5 minut po obudzeniu (TTF ≤ 5 min) vs. dłuższy czas do wypalenia pierwszego papierosa (TTF > 5 min). Cztery badane fenotypy UN oraz wiek rozpoczynania palenia były włączone do analizy regresji logistycznej jako zmienne zależne, natomiast genotyp dla poszczególnych badanych polimorfizmów, płeć i wiek były użyte we wszystkich analizach jako zmienne niezależne. Wyniki przedstawiono jako skorygowane ilorazy szans (ang. *odds ratios*; OR) z 95-procentowymi przedziałami ufności (95% CI - *confidence intervals*). Dla wielokrotnych testów zastosowano poprawkę Bonferroniego – przyjęto poziom istotności $p = 0,016$ (wartość p podzielona przez liczbę badanych SNPs).

5. WYNIKI

5.1. Dystrybucja alleli i genotypów w badanej próbie w miejscach rs1051730, rs55853698 i rs6495308

Genotypowanie trzech wybranych SNP obejmujących geny *CHRNA5* i *CHRNA3* przeprowadzono z powodzeniem, tj. ustalono genotypy u wszystkich badanych osób. Rozkład genotypów pozostawał w zgodzie z równowagą Hardy'ego-Weinberga dla polimorfizmów rs1051730 i rs6495308 (odpowiednio, $p = 0,82$ i $p = 0,59$), natomiast nie spełniał warunków tej równowagi dla polimorfizmu w locus rs55853698 ($p = 0,000$).

Porównanie liczebności i częstości alleli i genotypów dla miejsca rs6495308 w badanej populacji i próbkach referencyjnych CEU (mieszkańcy stanu Utah w USA i Europy Zachodniej pochodzenia europejskiego) z projektów HapMap [www.hapmap.org] i 1000 Genomów [www.1000genomes.org] nie wykazało istotnych różnic. Jednak rzadsze allele rs1051730-A i rs55853698-C występowały częściej ($p = 0,02$ i $p = 0,000$) w badanej próbie kaszubskiej. Częstości poszczególnych alleli i genotypów badanych polimorfizmów w badanej populacji i referencyjnych próbkach populacji CEU przedstawiono w Tabeli 11.

5.2. Ocena związku pomiędzy uzależnieniem od nikotyny a płcią i wiekiem

Stwierdzono, że palenie ponad 10 papierosów dziennie było istotnie związane z płcią męską i ze starszym wiekiem badanych (odpowiednio, OR = 1,87; 95% CI: 1,15-3,02; $p = 0,011$ i OR = 1,78; 95% CI: 1,16-2,75; $p = 0,009$) (Tabela 12). Wśród mężczyzn obserwowano natomiast znamienne niższy niż u kobiet odsetek palaczy, którzy zapalali pierwszego papierosa w ciągu pierwszych 5 minut po obudzeniu (24% vs 32%), a obliczony w regresji logistycznej iloraz szans dla tak szybkiego sięgania po dawkę nikotyny wynosił dla nich OR = 0,66; 95% CI: 0,48-0,92; $p = 0,014$ (dla kobiet: OR = 1.51; 95% CI: 1,08-2,09).

5.3. Ocena związku pomiędzy uzależnieniem od nikotyny a wybranymi polimorfizmami z uwzględnieniem płci i wieku jako współzmiennych

Stwierdzono, że nosiciele allelu A (genotypy AA i AG) w miejscu rs1051730 genu *CHRNA3* mieli istotnie wyższe ryzyko wypalania ponad 10 papierosów dziennie ($OR_{skorygowany}$ dla płci i wieku = 1,77; 95%CI: 1,20-2,59; $p = 0,004$) w porównaniu z nienosicielami (osoby o genotypie GG).

W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów nie stwierdzono wpływu na CPD.

Wykazano także, że nosiciele allelu A w miejscu rs1051730 mieli większe ryzyko niż osoby o genotypie GG wypalania pierwszego porannego papierosa w ciągu 5 minut po obudzeniu ($OR_{skor.} = 1,42$; 95%CI: 0,99-2,06), a także, że w ocenie stopnia uzależnienia przy pomocy testu Fagerströma wynik będzie wynosił 4 punkty lub więcej ($OR_{skor.} = 1,40$; 95%CI: 1,00-1,95), jednak zależności te były statystycznie słabe lub nieistotne po zastosowaniu poprawki Bonferroniego (odpowiednio, $p=0,059$ i $p=0,049$) (Tabela 13).

Podobnie w przypadku pozostałych badań polimorfizmów nie stwierdzono wpływu na TTF, FTND, a także HSI.

Zależność pomiędzy liczbą papierosów wypalanych dziennie a wybranymi polimorfizmami oceniono także w analizie post hoc przy użyciu innych progów odcięcia dla CPD, tj. >5 papierosów/dz, >15 papierosów/dz oraz >20 papierosów/dz. W każdym przypadku, przy przyjęciu poziomu istotności $p = 0,05$, stwierdzano istotną zależność pomiędzy wypalaniem większej liczby papierosów a polimorfizmem rs1051730 (Tabela 14), jednak po zastosowaniu procedury Bonferroniego dla wielokrotnych porównań, przy $p = 0,017$, istotną zależność stwierdzono jedynie dla progów >15 papierosów dziennie (odpowiednio, $p = 0,05$, $p = 0,012$ i $p = 0,04$). U nosicieli allelu A w miejscu polimorficznym rs105173 iloraz szans dla palenia ponad 15 papierosów dziennie wynosił 1,54 (95%CI: 1,10-2,15).

5.4. Ocena związku pomiędzy wiekiem rozpoczynania palenia a płcią oraz wybranymi polimorfizmami

Wykazano, że w badanej populacji kobiety znacznie rzadziej niż mężczyźni rozpoczynały palenie przed ukończeniem 16 r. życia (13% vs 27%). OR dla rozpoczynania palenia w wieku ≤ 16 lat wynosił dla nich 0,41 (0,27-0,61), $p = 0,0000$.

Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu badanych polimorfizmów na wiek rozpoczynania palenia. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 11. Liczebności i częstości alleli i genotypów dla miejsc rs1051730, rs6495308 i rs55853698 w badanej populacji i próbkach referencyjnych CEU z projektów HapMap i 1000 Genomów [102]

Table 11. Numbers and frequencies of alleles and genotypes in rs1051730-, rs6495308-, and rs55853698-tagging loci in the studied sample and in the reference CEU samples derived from HapMap and 1000 Genomes reference populations [102]

Polimorfizm/ <i>Polymorphism</i>	Allel/genotyp <i>Allele/genotype</i>	Kaszubi/ <i>Kashubians</i>		Populacja referencyjna (HapMap* lub 1000 Genomes **CEU ¹)/ <i>Reference population (HapMap* or 1000 Genomes **CEU¹)</i>		wartość <i>p</i> <i>p value</i>
		Liczba alleli/osób <i>Total No. of alleles/subjects</i>	Częstość (%) <i>Frequency (%)</i>	Liczba alleli/osób <i>Total No. of alleles/subjects</i>	Częstość (%) <i>Frequency (%)</i>	
rs1051730 (<i>CHRNA3</i>)	A	481	30,5	87	38,5*	0,02
	G	1095	69,5	139	61,5*	
	AA	84	10,6	18	15,9*	0,10
	AG	313	39,7	51	45,1*	0,27
	GG	391	49,6	44	38,9*	0,034
rs6495308 (<i>CHRNA3</i>)	A	1217	77,2	177	79,0*	0,55
	G	359	22,8	47	21,0*	
	AA	475	60,3	70	62,5*	0,65
	AG	267	33,9	37	33,0*	0,86
	GG	46	5,8	5	4,5*	0,56

rs55853698 (<i>CHRNA5</i>)	A	1250	79,3	119	60,1**	0,00
	C	326	20,7	79	39,9**	
	AA	554	70,3	37	37,4**	0,00
	AC	142	18,0	45	45,5**	0,00
	CC	92	11,7	17	17,2**	0,16

¹CEU – mieszkańcy Utah pochodzący z Północnej i Zachodniej Europy

¹CEU - Utah residents with Northern and Western European ancestry

*liczby i częstości alleli i genotypów pochodzą z danych HapMap Data Release 27 Phase II + III, February 2009

*allele and genotype counts and frequencies derived from HapMap Data Release 27 Phase II + III, February 2009

**liczby i częstości alleli i genotypów pochodzą z danych 1000 Genomes Project Data Release Phase 3, May 2013

**allele and genotype counts and frequencies derived from 1000 Genomes Project Data Release Phase 3, May 2013

Wartości przedstawione pogrubiałą czcionką wskazują statystyczną znamienność.

Values in boldface denote a significant association

Tabela 12. Związek pomiędzy FTND, CPD, HSI i TTF jako fenotypami uzależnienia od nikotyny a płcią i wiekiem

Table 12. Age and sex associations with FTND, CPD, HSI and TTF as nicotine dependence measures

Zmienne Variables	FTND		OR	CPD		OR	HSI		OR	TTF		OR
	Liczba osób No. of subjects		(95% CI)	Liczba osób No. of subjects		(95% CI)	Liczba osób No. of subjects		(95% CI)	Liczba osób No. of subjects		(95% CI)
	<4	≥4	Wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	≤10	>10	Wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	<3	≥3	Wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	≤5 min	>5 min	Wartość <i>p</i> <i>p-value</i>
Kobiety Females	115	167	1	256	26	1	129	153	1	92	190	1
Mężczyźni Males	203	303	1,05 (0,78- 1,43) 0,72	430	76	1,87 (1,15- 3,02) 0,011	238	268	0,97 (0,72- 1,30) 0,82	121	385	0,66 (0,48- 0,92) 0,014
Wiek <45 lat Age <45 years	169	223	1	352	40	1	188	204	1	96	296	1
Wiek ≥45 lat Age ≥45 years	149	247	1,27 (0,95- 1,70) 0,10	334	62	1,78 (1,16- 2,75) 0,009	179	217	1,12 (0,84- 1,48) 0,45	117	279	1,23 (0,89- 1,70) 0,20

Wartości przedstawione pogrubiałą czcionką wskazują statystyczną znamienność po korekcji Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (poziom istotności: $p = 0,0125$).

Values in boldface denote a significant association when applying Bonferroni correction for multiple testing (significance level: $p = 0.0125$)

Tabela 13. Związek pomiędzy uzależnieniem od nikotyny definiowanym przez FTND, CPD, HSI i TTF a wybranymi polimorfizmami w analizie regresji logistycznej [102]

Table 13 Logistic regression results for the association between ND defined by FTND, CPD, HSI or TTF and selected polymorphisms [102]

SNP/Genotyp	FTND		OR	CPD		OR	HSI		OR	TTF		OR
	Liczba		(95% CI)	Liczba		(95% CI)	Liczba		(95% CI)	Liczba		(95% CI)
	osób			osób			osób			osób		
	No. of subjects			No. of subjects			No. of subjects			No. of subjects		
	<4	≥4	wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	≤10	>10	wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	<3	≥3	wartość <i>p</i> <i>p-value</i>	≤5 min	>5 min	wartość <i>p</i> <i>p-value</i>
rs1051730 (CHRNA3)												
GG	171	220	1	120	271	1	193	198	1	93	298	1
AA + AG	147	250	<u>1,40</u> (1,00- 1,95) 0,049	87	310	1,77 (1,20- 2,59) 0,004	174	223	1,18 (0,85- 1,64) 0,31	120	277	1,42 (0,99- 2,06) 0,059
rs6495308 (CHRNA3)												
AA	188	287	1	114	361	1	218	257	1	131	344	1
GG+AG	130	183	0,98 (0,73- 1,32) 0,90	93	220	0,81 (0,58- 1,13) 0,22	149	164	0,99 (0,73- 1,34) 0,94	82	231	0,99 (0,71- 1,39) 0,95
rs55853698 (CHRNA5)												
AA	226	329	1	146	409	1	267	288	1	145	410	1
CC+CA	92	141	0,88 (0,61- 1,27) 0,49	61	172	0,72 (0,47- 1,08) 0,11	100	133	1,12 (0,79- 1,60) 0,52	68	165	0,96 (0,64- 1,41) 0,82

Wartości przedstawione pogrubiałą czcionką wskazują statystyczną znamienność przy przyjęciu poziomu istotności: $p = 0,017$ po korekcji Bonferroniego. Wartości podkreślone wskazują statystyczną znamienność przy przyjęciu poziomu istotności $p = 0,05$, tj. bez korekcji Bonferroniego.

Wartości OR są skorygowane dla płci, wieku i pozostałych polimorfizmów.

The values in boldface denote a significant association when applying Bonferroni corrected

p-value of 0.017. The underlined values denote a significant association when applying significance level $p = 0.05$ non corrected for multiple testing.

ORs are adjusted for age, sex and remaining polymorphisms.

Tabela 14. Związek pomiędzy liczbą papierosów wypalanych dziennie a badanymi polimorfizmami [102]

Table 14. Association between number of cigarettes smoked daily and studied polymorphisms [102]

SNP/Genotyp	CPD		OR	CPD		OR	CPD		OR
	Liczba osób		(95% CI)	Liczba osób		(95% CI)	Liczba osób		(95% CI)
	No. of subjects			No. of subjects			No. of subjects		
	≤5	>5	wartość p	≤15	>15	wartość p	≤20	>20	wartość p
			p-value			p-value			p-value
rs1051730 (CHRNA3)									
GG	23	368	1	182	209	1	349	42	1
AA + AG	12	385	<u>2,35</u> (1,00-5,53)	155	242	1,54 (1,10-2,15)	337	60	<u>1,65</u> (1,02-2,68)
			<u>0,05</u>			0,012			<u>0,04</u>
rs6495308 (CHRNA3)									
AA	18	457	1	194	281	1	408	67	1
GG+AG	17	296	0,77 (0,38-1,56)	143	170	0,87 (0,65-1,18)	278	35	0,84 (0,53-1,32)
			0,47			0,38			0,45
rs55853698 (CHRNA5)									
AA	25	10	1	234	321	1	482	73	1
CC+CA	530	223	0,63 (0,26-1,55)	103	130	0,73 (0,50-1,04)	204	29	0,72 (0,43-1,22)
			0,32			0,08			0,23

Wartości przedstawione pogrubiałą czcionką wskazują statystyczną znamienność przy przyjęciu poziomu istotności $p = 0,017$ po korekcji Bonferroniego. Wartości podkreślone wskazują statystyczną znamienność przy przyjęciu poziomu istotności $p = 0,05$, tj. bez korekcji Bonferroniego.

Wartości OR są skorygowane dla płci, wieku i pozostałych polimorfizmów.

The values in boldface denote a significant association when applying Bonferroni correction procedure for multiple testing (significance level: $p = 0.017$).

The underlined values denote significant association when applying significance level $p=0,05$ non corrected for multiple testing.

ORs are adjusted for age, sex and remaining polymorphisms

Tabela 15. Związek pomiędzy wiekiem rozpoczynania palenia a polimorfizmami w miejscach rs1051730, rs6495308 i rs55853698

Table 15. Association between age of smoking initiation and polymorphisms at loci rs1051730, rs6495308 i rs55853698

SNP/Genotyp <i>SNP/Genotype</i>	Wiek rozpoczynania palenia/ <i>Age of smoking initiation</i>		OR (95% CI) <i>wartość p/ p-value</i>
	Liczba osób <i>No. of subjects</i>		
	≤16 lat/ <i>years</i>	>16 lat/ <i>years</i>	
rs1051730 (CHRNA3)			
GG	88	303	1
AA + AG	86	311	1,05 (0,71-1,57) 0,79
rs6495308 (CHRNA3)			
AA	107	368	1
GG+AG	67	246	0,93 (0,65-1,34) 0,72
rs55853698 (CHRNA5)			
AA	130	425	1
CC+CA	44	189	0,75 (0,48-1,17) 0,20

6. DYSKUSJA

W ostatnich latach uwaga badaczy zajmujących się genetycznymi uwarunkowaniami używania tytoniu oraz uzależnienia od nikotyny koncentruje się na klastrze trzech genów zlokalizowanych w regionie 15q24-25.1 genomu, kodujących podjednostki alfa-5, alfa-3 i beta-4 nikotynowego receptora acetylocholino (geny *CHRNA3*, *CHRNA5* i *CHRNA4*). Dzięki badaniom z zastosowaniem skanowania całego genomu (GWAS) zidentyfikowano polimorfizmy typu pojedynczego nukleotydu (SNPs) tych genów, wpływające na zachowania związane z paleniem tytoniu [65-67]. Późniejsze badania, podjęte przez liczne zespoły badawcze, kolejno potwierdzały związek pomiędzy polimorficznymi wariantami genów podjednostek receptora nikotynowego a stopniem uzależnienia od nikotyny, określanym w tych badaniach zazwyczaj przy pomocy punktowego wyniku testu Fagerstroma lub liczby papierosów wypalanych dziennie (CPD) [68-82]. W nielicznych badaniach, w których oceniano zależność pomiędzy SNPs w badanym regionie a uzależnieniem od nikotyny określonym przy pomocy HSI lub TTF, wyniki także były dodatnie, potwierdzające wpływ pewnych polimorficznych wariantów genów receptora nikotynowego na to uzależnienie [78, 80]. Mocnym dowodem wpływu klastra genów *CHRNA3*, *CHRNA5* i *CHRNA4* na fenotypy UN, a zwłaszcza CPD, są wyniki kilku metaanaliz badań GWAS, wskazujące przy tym, że wpływ ten jest szczególnie silny w przypadku rs16966968 i rs105173 [76, 83-85, 104, 108].

Pomimo, że zależność pomiędzy wybranymi SNPs a fenotypami UN wykazywano już w różnych populacjach pochodzenia europejskiego, celem podjętych badań było replikowanie tych wyników w polskiej populacji. Warto podkreślić, że wpływ konkretnych polimorfizmów na UN różni się w populacjach z powodu różnic dotyczących nierównowagi sprzężeń. Dlatego też uważa się, że zależności pomiędzy powszechnie występującymi odmianami polimorficznymi genów a złożonymi fenotypami, zidentyfikowane w badaniach GWAS, muszą być w szerokim zakresie badane w różnych populacjach z odmiennymi częstościami alleli [109].

Złożone, poligenowe podłoże UN powoduje, że wpływ pojedynczego genu jest najpewniej niewielki i dla jego wykazania potrzebne są badania obejmujące bardzo dużą (rzędu tysięcy, a nawet setek tysięcy) liczbę uczestników. Z badaniami GWAS przeprowadzonymi na tak dużych próbach mogą jednak konkurować badania obejmujące znacznie mniejszą liczbę uczestników, ale stanowiących próbę względnie mało zróżnicowaną pod względem etnicznym i kulturowo-środowiskowym, z dokładnie określonymi fenotypami UN [89]. W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki badania przeprowadzonego wśród Kaszubów, populacji szczególnej z uwagi na swoją geograficzną, kulturowo-językową, a najpewniej także genetyczną izolację, a przy tym dogodną dla ośrodka badawczego, ze względu na zamieszkiwanie przez nią województwa pomorskiego, na terenie którego Gdański Uniwersytet Medyczny się mieści.

Kaszubi przyciągają szczególną uwagę genetyków od czasu, gdy wśród kaszubskich noworodków stwierdzono prawie dziesięciokrotnie wyższą częstość występowania deficytu enzymu dehydrogenazy 3-hydroksyacylokoenzymu A długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficyt*; LCHADD) niż wśród dzieci rodzących się w innych regionach Polski [110]. Deficyt LCHAD, wynikający z punktowej mutacji (1528G>C) w genie HADHA powoduje bardzo rzadką, potencjalnie śmiertelną, chorobę metaboliczną dziedziczną autosomalnie recesywnie, wywołującą zaburzenia oksydacji kwasów tłuszczowych [111-114].

W odróżnieniu od LCHADD, uzależnienie od nikotyny nie dziedziczy się w klasyczny mendelowski sposób i pojedynczy gen wpływa na UN w mniej spektakularny sposób. Przeprowadzając przedstawione badania wśród Kaszubów przyjęto, że izolowana populacja, jaką stanowią, sprzyja poszukiwaniu wielogenowych uwarunkowań uzależnienia od nikotyny z powodu wzmocnienia wpływu pewnych genetycznych *loci* a osłabienia wpływu innych.

W badanej grupie Kaszubów ryzyko wypalania większej liczby papierosów (CPD>10) było istotnie związane z wiekiem powyżej 45 roku życia oraz płcią męską. Kobiety natomiast, podobnie jak w doniesieniach pochodzących z innych krajów, znamienne częściej niż mężczyźni sięgały po pierwszego

rannego papierosa w ciągu 5 minut po obudzeniu, chociaż paliły mniejszą liczbę papierosów w ciągu całego dnia [115-117]. Również ryzyko rozpoczęcia palenia papierosów przed 16 rokiem życia było u kobiet istotnie niższe niż u mężczyzn, co potwierdza obserwacje innych autorów, że inicjacja tytoniowa zaczyna się u kobiet później niż u mężczyzn [117-119].

Podobnie jak we wcześniejszych doniesieniach innych autorów, w badanej grupie palaczy papierosów wykazano silną zależność pomiędzy rs1051730 (*CHRNA3*) a CPD. Stwierdzono także związek rs1051730 z FTND, był on jednak słaby, co mogło wynikać z niedostatecznej wielkości badanej próby. Dodatkową, potencjalną przeszkodą w wykazaniu mocnej korelacji tego polimorfizmu z FTND mogła być niższa częstość występowania rzadszego allelu (MAF) rs1051730 w badanej populacji Kaszubów (30,5%) w porównaniu do innych prób populacji rasy kaukaskiej. Na przykład MAF w referencyjnej populacji CEU (HapMap Data Rel 27 Phase II+III, Feb. 2009) określono na 38,5%, a w europejsko-amerykańskiej próbie w badaniu Saccone i wsp. - 35.0% [69].

Wykazanie istotnego wpływu pojedynczego SNP na FTND wymaga najpewniej większej liczebności badanej grupy niż wykazanie wpływu tego polimorfizmu na liczbę wypalanych dziennie papierosów. FTND, jako standardowy i powszechnie stosowany środek pomiaru UN, zarówno w praktyce klinicznej jak też w badaniach naukowych, obejmuje bowiem ocenę obydwu aspektów uzależnienia od tytoniu: fizjologicznego i poznawczo-behawioralnego (psychologicznego), przy czym ten drugi składnik UN odpowiada za blisko 20% całkowitej wariacji w uzyskanej punktacji FTND [100, 120, 121]. Uważa się jednak, że test Fagerstroma ma słabe właściwości psychometryczne i nie odzwierciedla wszystkich aspektów UN, w tym głodu narkotykowego (*craving*), subiektywnej samooceny kompulsji w używaniu tytoniu, objawów abstynencyjnych czy automatyzmów behawioralnych, uważanych za ważne elementy składające się na uzależnienie [122-124]. Niedawno wykazano, że FTND jest instrumentem odnoszącym się głównie do zachowań charakteryzujących sposób radzenia sobie palaczy z obniżeniem stężenia nikotyny we krwi, wywołującym kliniczne objawy odstawienne [125].

Wykazany w badanej próbie słaby związek pomiędzy FTND a polimorfizmem w miejscu rs1051730, może zatem częściowo wynikać z faktu, że na całkowity wynik FTND, oprócz uzależnienia fizjologicznego (CPD), w znaczący sposób wpływają także inne, psychologiczne aspekty UN. Co więcej, sugeruje się, że pojedynczy SNP może mieć wpływ jedynie na pewną ściśle określoną cechę składającą się na psychologiczne lub fizjologiczne UN i dlatego wykazanie związku pomiędzy FTND a danym wariantem polimorficznym jest szczególnie trudne [89]. Jest to jedna z przyczyn, dla których fenotypem UN, często ocenianym pod kątem związku z polimorfizmami genów *CHRNA3* i *CHRNA5*, była, obok FTND, liczba papierosów wypalanych dziennie [84, 85, 126].

W badanej populacji Kaszubów, podobnie jak w badaniach Sorice i wsp. [79], jako punkt odcięcia przyjęto wartość CPD równe 10, dzieląc badaną próbę na 2 kategorie palaczy: palących „mało” (*low-dose smoking*; $CPD \leq 10$) i palących „dużo” (*high-dose smoking*; $CPD > 10$). Warto zaznaczyć, że wielu autorów przyjmowało także inne punkty odcięcia, np. oddzielając przy pomocy liczby 20 CPD umiarkowanych palaczy (*light smokers*; $CPD \leq 20$) od osób intensywnie i dużo palących (*heavy smokers*; $CPD > 20$) [78]. W przeprowadzonej w przedstawionym badaniu analizie *post-hoc*, zależność pomiędzy rs1051730 a CPD, również po zastosowaniu tego punktu odcięcia została wykazana, jednak po korekcji analizy przy użyciu poprawki Bonferroniego nie uzyskano istotności statystycznej, jak przy progu 10 CPD. Podobny wynik otrzymano porównując palaczy palących ≤ 5 CPD i palaczy palących większą liczbę papierosów. Z kolei, przy użyciu punktu odcięcia 15 CPD ponownie wykazano istotny związek statystyczny pomiędzy rs1051730 a liczbą wypalanych papierosów dziennie.

FTND i CPD były w piśmiennictwie najczęściej badanymi fenotypami w ocenie zależności pomiędzy odmianami wariantowymi genów w klastrze *CHRNA5-A3-B4* a uzależnieniem od nikotyny. Warto zaznaczyć jednak, że według niektórych autorów kwalifikowanie palaczy jako uzależnionych lub nieuzależnionych od nikotyny jedynie na podstawie oceny CPD jest obarczone dużym błędem [127]. W kilku doniesieniach jako fenotypy uzależnienia od nikotyny zastosowano TTF lub HSI, będący kombinowaną oceną CPD i TTF łącznie [78, 80, 128]. Sam TTF, jako pojedyncza cecha, uznawany jest za ważny i wiarygodny wskaźnik

UN [129], cechujący się dodatkowo wysoką odziedziczalnością [130]. Zależność pomiędzy TTF a klastrem genów *CHRNA5-A3-B4* nie była jednak, jak dotąd, szerzej badana [78, 80, 128].

Kolejnymi zatem, obok FTND i CPD, fenotypami uzależnienia od nikotyny, które postanowiono ocenić pod kątem ich ewentualnej zależności od wybranych SNPs, były w przedstawionej pracy HSI i TTF. W dotychczasowych publikacjach jako punkt odcięcia najczęściej stosowano $HSI = 4$ [131]. W przedstawionej pracy, ze względu na średnią wartość HSI w badanej próbie Kaszubów równą $2,8 \pm 1,3$, jako punkt odcięcia przyjęto $HSI = 3$. Przy pomocy tego punktu odcięcia podzielono badaną grupę na 2 kategorie: uczestników ze słabym/umiarkowanym stopniem UN ($HSI < 3$) i uczestników z silnym UN ($HSI \geq 3$). W analizowanej próbie nie znaleziono związku rs1051730 z HSI czy TTF, chociaż w dostępnych publikacjach był on sporadycznie opisywany. Przykładowo, Marques-Vidal i wsp. stwierdzili istotną zależność pomiędzy rs1051730 a $HSI \geq 5$ (wartości OR i 95% CI dla każdego dodatkowego allelu wynosiły odpowiednio 1.31 oraz 1.00-1.71), a także pomiędzy tym SNP a $TTF \leq 5$ min (OR = 1.32; 95% CI: 1.05-1.65) [80].

Kolejnym badanym w populacji kaszubskiej polimorfizmem był rs6495308. Stwierdzone częstości występowania częstszego allelu (*major*) A i rzadszego (*minor*) G w miejscu rs6495308 były podobne do częstości obserwowanych w innych populacjach pochodzenia europejskiego, a także wśród Afroamerykanów. Dla przykładu, w przedstawionym badaniu MAF (*minor allele frequency*) wynosił 0,23, a w referencyjnej populacji CEU lub innych analizowanych próbach europejsko-amerykańskich i afrykańsko-amerykańskich MAF zawierał się przedziale od 0,21 do 0,30 [69, 88]. Z kolei, w koreańskiej populacji allelem rzadziej występującym był allel A, a częstość jego występowania wynosiła 0,26 [77].

Początkowo wykazano, że allel A w miejscu rs6495308 związany jest z większym ryzykiem UN, ponieważ nosiciele tego allelu częściej palili ≥ 25 CPD w porównaniu z nosicielami rzadszego allelu G [70]. W badaniach Saccone i wsp. stwierdzono też, że obecność allelu A zwiększa OR dla UN definiowanego

jako FTND ≥ 4 , jednak po korekcji wartości p poprzez zastosowanie poprawki Bonferroniego nie uzyskano statystycznej istotności. Wyniki badań sugerowały też, że rzadziej występujący allel G może mieć z kolei znaczenie ochronne przed UN zarówno w populacji amerykańskiej pochodzenia europejskiego, jak też wśród Afroamerykanów [65, 68]. Dodatkowo, badanie Li i wsp. potwierdziło związek pomiędzy rs6495308 a paleniem tytoniu, zarówno na poziomie genotypu (wykazanie ryzykownego allelu pojedynczego SNP), jak też na poziomie haplotypów (wykazanie ryzykownego zestawu alleli kilku sąsiadujących ze sobą SNPs na jednej chromatydzie, dziedziczonych razem), co sugeruje, że ten polimorfizm może wpływać na UN również poprzez inne, złożone mechanizmy [77]. W przedstawionym badaniu nie znaleziono zależności pomiędzy rs6495308 a CPD lub FTND w populacji Kaszubów. Podobnie, w innym polskim badaniu, przeprowadzonym w niereprezentatywnej grupie ogólnej populacji naszego kraju, takiego związku nie potwierdzono [132].

Pozostałe dwa fenotypy uzależnienia od nikotyny, tj. HSI i TTF, analizowane w badanej grupie Kaszubów, nie wykazały również istotnego związku z polimorfizmem rs6495308. Podobny wynik uzyskali autorzy, którzy wykorzystali materiał pochodzący z szeroko zakrojonych badań COMMIT (*Community Intervention Trial for Smoking Cessation*) przeprowadzonych wśród amerykańskich palaczy papierosów pochodzenia europejskiego [78, 133]. W badanej grupie 1301 osób stwierdzono jednak, że posiadacze kombinacji genotypów AA dla rs1051730 i TT dla rs6495308 mieli blisko dwukrotnie większe ryzyko dla zapalania pierwszego rannego papierosa w szybkim, do 10 minut po obudzeniu, czasie [78]. Badanie będące przedmiotem przedstawionej rozprawy nie pozwala na odniesienie się do tego wyniku, gdyż nie wykonywano analizy haplotypów. Podobnie jak w przypadku omówionego wcześniej polimorfizmu rs1051730, wielkość badanej próby populacji kaszubskiej, a w związku z tym także moc statystyczna badania, mogły być niewystarczające do ujawnienia istotnej zależności pomiędzy rs6495308 a fenotypami ND.

Trzeci polimorfizm, rs55853898, został wybrany do analizy w przedstawionym badaniu na podstawie wcześniejszych doniesień, sugerujących jego wpływ na CPD [83]. W badanej próbie nie uzyskano jednak istotnej zależności pomiędzy

tym SNP a fenotypami ND, w tym również CPD. Warto zaznaczyć przy tym, że w populacji kaszubskiej rozkłady alleli i genotypów dla polimorfizmu w locus rs55853698 nie spełniały warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga ($p=0,000$).

Podsumowując, badanie będące przedmiotem niniejszej rozprawy wykazało istotny związek pomiędzy polimorfizmem rs1051730 a liczbą wypalanych papierosów w ciągu dnia (CPD) w populacji Kaszubów. Nie potwierdzono natomiast innych zależności pomiędzy badanymi SNP a fenotypami UN, opisywanych w innych doniesieniach [65, 68, 70, 73, 75, 77, 78, 80, 88], czego powodem mogły być metodologiczne ograniczenia badania. Najważniejsze z nich to wielkość badanej próby Kaszubów i moc analizy statystycznej, które, pomimo szczególnego charakteru tej homogennej etnicznie populacji, były prawdopodobnie niewystarczające dla potwierdzenia niektórych z wcześniej publikowanych wyników, uzyskanych głównie na drodze badań GWAS [134]. Te bardzo kosztowne badania przeprowadzane są zwykle w ramach międzynarodowych konsorcjów na materiale pochodzącym z wielu biobanków, a zatem na próbach liczących dziesiątki, a nawet setki tysięcy uczestników. Ułatwia to wykrycie słabego zazwyczaj wpływu pojedynczego genu na tak złożone zachowania jak palenie tytoniu i uzależnienie od nikotyny. Uważa się, że dla wyjaśnienia ryzyka rozwoju tych zachowań przedmiotem badań powinny być dodatkowo interakcje pomiędzy genami, a także pomiędzy genami a środowiskiem. Badania GWAS znacznie ułatwiają wykrycie tego rodzaju interakcji.

Kolejną przeszkodą w wykazaniu znamienności statystycznej badanych zależności pomiędzy wybranymi SNPs a fenotypami UN w jednorodnej etnicznie grupie Kaszubów było zastosowanie w analizie statystycznej, zgodnie z regułami poprawności metodologicznej, procedury Bonferroniego dla wielokrotnych porównań. Należy jednak zaznaczyć, że jest ona uważana przez niektórych autorów za metodę zbyt konserwatywną i rygorystyczną [135], co w przypadku mniejszej liczebności próby może ograniczyć wykazanie istotnych zależności pomiędzy polimorficznymi wariantami genów klastra *CHRNA5-A3-B4* a uzależnieniem od nikotyny.

Warto podkreślić, że pomimo ekspansji badań GWAS, badania asocjacji allelicznej dotyczące pojedynczych polimorfizmów typu SNP genów kandydujących i replikowanie ich w różnych populacjach wciąż odgrywają ważną rolę w poszukiwaniu genetycznych uwarunkowań uzależnienia od nikotyny. Przedstawiona praca jest włączeniem się w ten nurt badań, posiada jednak pewne ograniczenia, które należy uwzględnić przy ocenie jej naukowej wartości. Jedno z nich wynika z faktu, że badana grupa najpewniej nie jest reprezentatywna dla całej populacji palących Kaszubów, gdyż model przedstawionego badania zakładał dogodny dobór próby. Kolejnym ograniczeniem, typowym dla badań z pozyskiwaniem informacji o uczestniku od niego samego na drodze sondażu typu *self-report* (samoraportowania), jest możliwość błędnego klasyfikowania uczestników pod względem fenotypowym (informacja podana przez respondenta nie jest w żaden sposób weryfikowana). Na przykład, podawane w ankietach przez uczestników informacje na temat liczby wypalanych w ciągu dnia papierosów nie były weryfikowane na drodze obiektywnych badań biochemicznych (pomiar stężenia metabolitów nikotyny) i liczby te mogły być zaniżane [136]. Również dane pozwalające na wykluczenie krewnych pierwszego stopnia uzyskano na drodze samoraportowania, i również nie weryfikowano ich na poziomie genetycznym. Ponadto genetyczną homogenność badanej próby przyjęto arbitralnie, gdyż nie została ona jak dotąd zrewidowana badaniami oceniającymi genetyczną strukturę populacji Kaszubów. Niemniej jednak warto zwrócić uwagę, że w badaniach Rębały i wsp., choć ukierunkowanych bardziej na śledzenie migracji polskiej populacji, na podstawie zróżnicowania STR i SNP haplogrup DNA chromosomu Y potwierdzono genetyczną odmienność Kaszubów od innych regionalnych grup polskiej populacji [137].

Należy także zaakcentować kilka silnych stron przedstawionego badania. Przede wszystkim badano próbę pochodzącą z izolowanej geograficznie, kulturowo, językowo, i najpewniej także genetycznie populacji Kaszubów. Ta homogenność pozwalała uniknąć istotnego w genetycznych badaniach asocjacyjnych problemu etnicznej stratyfikacji badanej próby. Po drugie, wyłączenie z badań osób spokrewnionych pozwoliło uniknąć udziału w nich

osobników poddanych tym samym wpływowi środowiska wspólnego (rodzinnego) na fenotypy UN.

Wyniki przedstawionego badania potwierdziły wpływ klastra genów *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* na fenotypy UN, dostarczając tym samym kolejnych argumentów dla zwrotu badań nad nowymi terapiami UN w kierunku receptorów nikotynowych.

Różnorodność typów neuronalnych receptorów nikotynowych dla acetylocholiny nAChRs, wraz z polimorficznym zróżnicowaniem genów kodujących podjednostki tych receptorów, stwarza szerokie pole dla implementacji tzw. spersonalizowanego leczenia UN, tj. celowanego leczenia pomagającego rzucić palenie palaczom o konkretnym genotypie [138]. Spośród genów różnych podjednostek receptora nAChR, gen *CHRNA5* kodujący podjednostkę alfa-5, badany również w przedstawionej pracy, został zidentyfikowany w badaniach GWAS jako gen kandydujący, który najistotniej wpływa na ryzyko uzależnienia od nikotyny [139-143]. Należy zaznaczyć jednak, że chociaż podjednostka alfa-5 wpływa na stopień powinowactwa i siłę wiązania agonistów i antagonistów nikotyny, sama nie bierze udziału w wiązaniu agonistów i w związku z tym nie jest najlepszym celem dla leku mającego ułatwiać rzucenie palenia. Co ciekawe, badania GWAS nie wykazały silnego związku genów podjednostek $\alpha 4$, $\beta 2$ i $\alpha 7$ z uzależnieniem od nikotyny, natomiast badania asocjacyjne ukierunkowane na pojedyncze geny kodujące te podjednostki nAChR sugerują, że ich warianty polimorficzne istotnie wpływają na powstawanie fenotypu palacza uzależnionego od nikotyny. Warto dodać, że te właśnie podjednostki tworzą typy receptorów nAChRs, będące celem dla warenikliny.

Wareniklina, częściowy agonista receptora nikotynowego o budowie $\alpha 4\beta 2$, jest aktualnie najbardziej skutecznym lekiem w leczeniu UN [144, 145]. Działanie warenikliny polega na redukcji głodu narkotykowego i objawów zespołu odstawiennego [146-148]. Ułatwienie porzucenia palenia przez wareniklinę może także do pewnego stopnia zachodzić poprzez stymulację innego typu nAChRs, homomerycznych receptorów złożonych z podjednostek $\alpha 7$ [149, 150]. W niedawno przeprowadzonych badaniach neurobiochemicznych

stwierdzono, że wardeniklina jest całkowitym agonistą receptorów zawierających tę podjednostkę, jednak jej działanie jest słabsze, niż gdy działa jako częściowy agonista w przypadku receptorów zawierających podjednostkę $\beta 2$ [150].

Dla określenia, które typy receptorów nikotynowych można zablokować lub pobudzić odpowiednim lekiem dla uzyskania pożądanego efektu fenotypowego, konieczne są dalsze badania. W spersonalizowanym leczeniu uzależnienia od nikotyny niezwykle przydatna będzie wiedza na temat genotypu konkretnego palacza odnośnie wariantów polimorficznych genów kodujących podjednostki tych receptorów, jak też rozpoznanie indywidualnych czynników psychologicznych i środowiskowych sprzyjających paleniu czy motywujących do porzucenia nałogu. Wiedza ta z pewnością pomoże w wyborze odpowiedniej, zindywidualizowanej strategii leczenia. Warto przytoczyć przykład dobrze ilustrujący tę strategię, choć dotyczący innych genów niż badane w przedstawionej pracy. Poza klastrem genów *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* badania GWAS, badania asocjacyjne dotyczące pojedynczych genów kandydujących, a także metaanaliza tych badań potwierdziły bowiem związek z uzależnieniem od nikotyny innego klastra genów *CHRNA3-CHRNA6* położonego w chromosomie 8 [138, 151]. Badania Hofta i wsp. pozwoliły zidentyfikować cztery SNPs w obrębie tego klastra, związane z niepowodzeniem w rzucaniu palenia (większą liczbą nieudanych prób zaprzestania palenia) [152]. Fletcher i wsp. dowiedli z kolei, że wysoka cena papierosów wywiera większy wpływ na utrzymanie abstynencji u palaczy posiadających „ochronny” genotyp GG w zakresie jednego z tych polimorfizmów (rs2304297 w *CHRNA6*) niż u osób o innym genotypie [153]. Słaby wpływ wysokiej ceny papierosów u osób o genotypie CC na utrzymanie abstynencji sugeruje konieczność zastosowania alternatywnych sposobów motywowania do skutecznego porzucenia nałogu.

Opracowanie spersonalizowanego leczenia wymaga zatem połączenia badań genetycznych pozwalających zidentyfikować geny związane z uzależnieniem od tytoniu, laboratoryjnych badań na zwierzętach, pozwalających określić funkcje kodowanych przez nie białek oraz funkcjonalne znaczenie SNPs występujących w tych genach, opracowanie wiarygodnych narzędzi oceny czynników

motywujących palenie papierosów, a także kontrolowanych badań klinicznych z lekami celowanymi. Przedstawione badanie allelicznej asocjacji dotyczące genów kodujących podjednostki alfa-5 i alfa 3 receptora nikotynowego, potwierdzające ich wpływ na fenotypy UN, stanowi pewien wkład do opracowania w przyszłości bardziej skutecznego, zindywidualizowanego leczenia uzależnienia od nikotyny.

7. WNIOSKI

1. Wyniki badania przedstawionego w rozprawie potwierdzają istotny wpływ polimorfizmu rs1051730 w genie *CHRNA5* na fenotyp uzależnienia od tytoniu, zdefiniowany jako liczba papierosów wypalanych dziennie.
2. Kontynuacja badań w poszukiwaniu genów i ich wariantów polimorficznych zaangażowanych w rozwój uzależnienia od nikotyny, a także replikowanie tych badań w różnych etnicznie populacjach, może przyczynić się do wdrożenia spersonalizowanych, uwzględniających indywidualny genotyp sposobów leczenia, a tym samym do zwiększenia skuteczności leczenia UN.

8. PIŚMIENICTWO

1. Eriksen M, Mackay J, Ross H. Tobacco Atlas. 4th ed. WHO; Geneva: 2011.
2. Hurt RD, Offord KP, Croghan IT, Gomez-Dahl L, Kottke TE, Morse RM, Melton LJ 3rd. Mortality following inpatient addictions treatment. Role of tobacco use in a community-based cohort, JAMA 1996; 275:1097-1103.
3. Prochaska JO, DiClemente CC. Stages and processes of self-change of smoking: toward an integrative model of change. J Consult Clin Psychol 1983; 51: 380-395.
4. Prochaska JO, Redding AR, Evers KE. The transtheoretical model and stages of change. In: Glanz K, Rimer B, Lewis FM eds. Health Behavior and Health Education: Theory, Research and Practice. San Francisco, California. Jossey-Bass; 2002: 99-120.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette smoking among adults and trends in smoking cessation – United States, 2008. Morb Mortal Wkly Rep 2009; 13: 1227-1232.
6. Balfour DJ, Wright AE, Benwell ME, Birrell CE. The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. Behav Brain Res 2000; 113: 73-83.
7. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs Nature 1996; 382: 255–257.
8. Stolerman IP, Jarvis MJ. The scientific case that nicotine is addictive. Psychopharmacology 1995; 117: 2-10.
9. Feyerabend C, Ings RM, Russel MA. Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking. Br J Pharmacol 1985; 19: 239-247.
10. Benowitz NL, Hall SM, Herring RI i wsp. Smokers of low-yield cigarettes do not consume less nicotine. N Engl J Med 1983; 309: 139A2.
11. Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR. Cigarettes smokers self administer intravenous nicotine. Pharmacol Biochem Behav 1983; 19: 887-890.

12. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Third Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1980.
13. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders III-R. Washington (DC): American Psychiatric Association; 1987.
14. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
15. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., text revision. Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.
16. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
17. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Second Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1968.
18. US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking: nicotine addiction: a report of the Surgeon General. Washington, DC, US Government Printing Office, 1988.
19. Preventing tobacco use among young people: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 1994.
20. DiFranza J.R., Savageau J.A., Fletcher K. i wsp. Measuring the loss of autonomy over nicotine use in adolescents: the DANDY (Development and Assessment of Nicotine Dependence in Youths) study. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 2002; 156: 397–403.
21. DiFranza J.R., Savageau J.A., Fletcher K. i wsp. Symptoms of tobacco dependence after brief intermittent use: the Development and Assessment of Nicotine Dependence in Youth-2 study. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 2007; 161: 704–710.
22. DiFranza J.R., Riggs N., Pentz M.A. Time to re-examine old definitions of nicotine dependence. Nicotine Tobacco Res. 2008; 10: 1109–1111.

23. World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders. Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.
24. Tobacco smoking in Britain: an overview. In: Nicotine addiction in Britain: report of the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. London, Royal College of Physicians, 2000.
25. World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders. Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.
26. Regier DA, Kuhl EA, Kupfer DJ. The DSM-5: Classification and criteria changes. *World Psychiatry* 2013; 12: 92–98.
27. Raw M, Anderson P, Batra A i wsp. WHO Europe evidence based recommendations on the treatment of tobacco dependence. *Tob Control* 2002, 11: 44-46.
28. Walton R, Johnstone E, Munafó M i wsp.: Genetics clues to the molecular basis of tobacco addiction and progress towards personalized therapy. *Trends Mol Med*. 2001, 7: 70-76.
29. Koob GF, Caine SB, Parsons L, Markou A, Weiss F. Opponent process model and psychostimulant addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 57: 513-521.
30. Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996; 16: 1077–1085.
31. Maskos YS, Molles BE, Pons S i wsp. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotine receptors. *Nature* 2005, 436: 130-137.
32. Mineur YS, Picciotto MR. Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 323-333.
33. Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 2004; 306: 1029-1032.
34. Tapia L, Kuryatow A, Lindstrom J. Ca²⁺permeability of the (alpha4)₃(beta2)₂ stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)₂(beta2)₃ human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 769-776.

35. Mansvelder HD, McGehee DS. Cellular and synaptic mechanism of nicotine addiction. *Neurobiol* 2002; 53: 606-617.
36. Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 1997; 390: 401-404.
37. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; 382: 255-257.
38. Koob G. Neural mechanism of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 654: 171-191.
39. Dani JA, de Biasi M. Cellular mechanism of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70: 439-446.
40. Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005; 8: 1445-1449.
41. Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 2000; 25: 515-532.
42. Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tob Res* 2000; 2: 19-37.
43. Post R.M. Intermittent versus continuous stimulation: Effect of time interval on sensitization or tolerance. *Life Sci.* 1980; 26: 1275–1282.
44. Robinson T.E., Berridge K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* 1993; 18: 247–291.
45. Robinson T.E., Berridge K.C. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 2001; 96: 103–114.
46. Hughes JR, Hatsukami DK, Pickens RW, Krahn D, Malin S, Luknic A. Effect of nicotine on the tobacco withdrawal syndrome *Psychopharmacology (Berl)* 1984; 83: 78-82.
47. Kenny PJ, Markou A. Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70: 531–549.
48. Azam L, McIntosh JM. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors that modulate nicotine-evoked [3H]norepinephrine release from mouse hippocampal synaptosomes. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 967–976.

49. True WR, Heath AC, Scherrer JF i wsp. Genetic and environmental contributions to smoking. *Addiction* 1997; 92: 1277-1287.
50. Munafo MR, Clark TG, Johnstone EC i wsp. The genetic basis for smoking behavior: A systemic review and meta analysis. *Nicotine Tob Res* 2004; 6: 583-597.
51. Oniszczenko W. Genetyka zachowania. Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne, 2005, 14-21.
52. Strelau J. Temperament-Osobowość-Działanie. Warszawa, PWN, 1985.
53. Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI. Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Genet* 2005; 35: 397-406.
54. Kendler KS, Thornton LM, Pederson NL. Tobacco consumption in Swedish twins reared apart and reared together. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 57: 886-892.
55. True WR, Heath AC, Scherrer TC i wsp. Genetic and enviromental contributions to smoking. *Addiction* 1997; 92: 1277-1287.
56. Eaves LJ, Eysenck HJ. New approaches to the analysis of twin data and their application to smoking behavior. W: Eysenck HJ, red. *The causes and effects of smoking*. London, UK: Maurice Temple Smith, 1980; 140-314.
57. Hannah MC, Hopper JL, Mathews JD. Twin concordance for a binary trait. II. Nested analysis of ever-smoking and ex-smoking traits and unnested analysis of a "committed- smoking" trait. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 153-165.
58. Kaprio J, Hammar N, Koskenvuo M i wsp. Cigarette smoking and alcohol use in Finland and Sweden: a cross- national twin study. *Int J Epidemiol* 1982; 11: 378-386.
59. Madden PA, Pedersen NL, Kaprio J i wsp. The epidemiology and genetics of smoking initiation and persistence: Cross-cultural comparisons of twin study results. *Twin Res* 2004; 7: 82-97.
60. Plomin R. Individual differences research in a postgenomic era. *Personality and individual differences*, 2002; 33: 909-920.
61. Wu X, Hudmon KS, Detry MA i wsp. D2 dopamine receptor gene as determinant of African-Americans and Mexican-Americans: a lung cancer

- case control study. *Cancer epidemiol. Biomarkers Prev* 2000; 9: 1021-1026.
62. Ma Y, Yuan W, Cui W, Li MD. Meta-analysis reveals significant association of 3'-UTR VNTR in SLC6A3 with smoking cessation in Caucasian populations. *Pharmacogenomics J* 2016; 16: 10-17.
 63. Lerman C, Shields PG, Audrain J i wsp. The role of serotonin transporter gene in cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 253-255.
 64. Ray R, Jepson C, Wileyto EP i wsp. Genetic variation in mu-opioid-receptor-interacting proteins and smoking cessation in a nicotine replacement therapy trial. *Nicotine Tob Res* 2007; 9: 1237-1241.
 65. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL i wsp.: Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 36-49.
 66. Bierut LJ, Madden PA, Breslau N. i wsp. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 24-35.
 67. Bierut LJ. Nicotine dependence and genetic variations in the nicotinic receptors. *Drug Alcohol Depend* 2009; 104 (Suppl 1): 64-69.
 68. Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL i wsp.: Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 150B: 453-466.
 69. Saccone NL, Wang JC, Breslau N i wsp.: The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and European-Americans. *Cancer Res* 2009; 69: 6848-6856.
 70. Berrettini W, Yuan X, Tozzi F i wsp.: Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 368-673.
 71. Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT i wsp: Nicotinic receptor variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3517-3525.

72. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P *et al*: A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638-642.
73. Weiss RB, Baker TB, Cannon DS *et al*: A candidate gene approach identifies the CHRNA5-A3-B4 region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet*, 2008; 4: 1000125.
74. Caporaso N, Gu F, Chatterjee N *et al*: Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One* 2009; 4: e4653.
75. Chen X, Chen J, Williamson VS *et al*: Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 150B: 926-933.
76. Tobacco-and-Genetics-Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 2010; 42: 441-447.
77. Li MD, Yoon D, Lee JY *et al*: Associations of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster with smoking behaviors in a Korean population. *PLoS ONE* 2010; 5: e12183.
78. Bousman ChA, Rivard C, Haese JD, Ambrosone Ch, Hyland A. Alpha-5 and -3 nicotine receptor gene variants predict nicotine dependence but not cessation: findings from the COMMIT cohort. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011; 159: 227-235.
79. Sorice R, Bione S, Sansanelli S *et al*: Association of a variant in the CHRNA5-A3-B4 gene cluster region to heavy smoking in the Italian population. *Eur J Hum Gen* 2011; 19: 593-596.
80. Marques-Vidal P, Kutalik Z, Paccaud F *et al*: Variant within the promoter region of the CHRNA3 gene associated with FTND dependence is not related to self-reported willingness to quit smoking. *Nicotine Tob Res* 2011; 9: 833-839.
81. Conlon MS, Bewick MA. Single nucleotide polymorphisms in CHRNA5 rs16969968, CHRNA3 rs578776, and LOC123688 rs8034191 are associated with heaviness of smoking in women in Northeastern Ontario, Canada. *Nicot Tob Res* 2011; 13: 1076-1083.

82. Budulac SE, Vonk JM, Postma DS, Siedlinski M, Timens W, Boezen MH. Nicotinic acetylcholine receptor variants are related to smoking habits, but not directly to COPD. *PLoS ONE* 2012; 7: e33386.
83. Liu J Z, Tozzi F, Waterworth DM i wsp: Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nature Genetics* 2010; 42: 436-440.
84. Ware JJ, van den Bree MB, Munafò MR. Association of the CHRNA5-A3-B4 gene cluster with heaviness of smoking: a meta-analysis. *Nicotine Tob Res* 2011; 13: 1167-1175.
85. Munafò MR, Timofeeva MN, Richard WM i wsp: Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and objective measures of tobacco exposure. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 740-748.
86. Hallden S, Sjogren M, Hedblad B, Engstrom G, Hamrefors V, Manjer J, Melander O. Gene variance in the nicotinic receptor cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) predicts death from cardiopulmonary disease and cancer in smokers. *J Intern Med* 2016; 279: 388-398.
87. Kupiainen H, Kuokkanen M, Kontto J i wsp. CHRNA5/CHRNA3 locus associates with increased mortality among smokers. *COPD* 2016; 13: 464-470.
88. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC et al: Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 1163–1171.
89. Lerman C, Swan GE. Non-replication of genetic variation in the nicotinic receptors. *Nicot Tob Res* 2002; 4: 247-249.
90. Wacholder S, Rothman N., Caporaso N. Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias. *J Natl Canc Inst* 2000; 92: 1151-1158.
91. Li MD, Beuten J, Ma JZ i wsp, Ethnic- and gender-specific association of the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene (CHRNA4) with nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1211-1219.
92. Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nature Rev* 2000; 1: 182-190.
93. Jorde LB, Watkins WS, Kere J, Nyman D, Eriksson AW. Gene mapping in isolated populations: new roles for old friends? *Human Heredity* 2000; 50: 57-65.

94. Heuting P, Oostra BA. Gene finding in genetically isolated populations. *Hum Mol Gen* 2002; 11: 2507-2515.
95. Wyniki Narodowego Spisu Powszechnego Ludności i Mieszkań 2011. Podstawowe informacje o sytuacji demograficzno-społecznej ludności Polski oraz zasobów mieszkaniowych. Główny Urząd Statystyczny, 2011. http://www.kaszubi.pl/images/dodatkowe/aktualnosci/Wyniki_demograficzne_spisu_2011_-_f.pdf
96. Pomorze – Mała ojczyzna Kaszubów. Praca zbiorowa, Gdańsk 2000, Zrzeszenie Kaszubsko -Pomorskie, Instytut Kaszubski.
97. Labuda G. Kaszubi i ich dzieje, Gdańsk: Oficyna CZEC, 1996.
98. Labuda G. Historia Kaszubów w dziejach Pomorza, Gdańsk: Instytut Kaszubski, 2006.
99. Obracht-Prondzyński C. Kaszubi dzisiaj: kultura, język, tożsamość; Gdańsk : Instytut Kaszubski, 2007.
100. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC i wsp. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict* 1991; 86: 1119-1127.
101. Fagerström KO. Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment. *Addict Behav* 1978; 3: 235-241.
102. Kita-Milczarska K, Siemińska A, Jassem E. Association between *CHRNA3* and *CHRNA5* nicotine receptor subunit gene variants and nicotine dependence in an isolated population of Kashubians in Poland. *Med Sci Monit* 2016; 22: 1442-1450.
103. Kaisu K, Ulla B, Markku H i wsp. Association of serum cotinine level with a cluster of three nicotinic acetylcholine receptor genes (*CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4*) on chromosome 15. *Human Molecular Genetics* 2009; 18: 4007-4012.
104. Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH i wsp. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet* 2010, 6: e1001053.

105. Barrett JC, Fry B, Malle J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265.
106. Richardson CG, Ratner PA. A confirmatory factor analysis of the Fagerstrom Test for Nicotine Dependence. *Addict Behav* 2005; 30: 697-709.
107. Marks MJ, Pauly JR, Gross SD i wsp. Nicotine binding and nicotine receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci* 1992; 12: 2765-2784.
108. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson D, Surakka I i wsp. Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Gene*. 2010; 42: 448-453.
109. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Gen* 2012; 90: 7-24.
110. Piekutowska-Abramczuk D i wsp. A comprehensive HADHA c.1528G>C frequency study reveals high prevalence of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in Poland. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33 Suppl 3: 373-7.
111. den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, Ijlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics* 2002; 109: 99–104.
112. den Boer ME, Dionisi-Vici C, Chakrapani A, van Thuijl AO, Wanders RJ, Wijburg FA. Mitochondrial trifunctional protein deficiency: a severe fatty acid oxidation disorder with cardiac and neurologic involvement. *J Pediatr* 2003; 142: 684–689.
113. Yang BZ, Heng HHQ, Ding JH, Roe CR. The genes for the α - and β -subunits of the mitochondrial trifunctional protein are both located in the same region of the human chromosome 2p23. *Genomics* 1996; 37: 141–143.
114. Tynii T, Palotie A, Viinikka L i wsp. Long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation: clinical presentation of 13 patients. *J Pediatr* 1997; 130:67–76.
115. Royce JM, Corbett K, Sorensen G, Ockene J. Gender, social pressure, and smoking cessations: the Community Intervention Trial for Smoking Cessation (COMMIT) at baseline. *Soc Sci Med* 1997; 44: 359-370.

116. Champagne BM, Sebr   EM, Schargrotsky H, Pramparo P, Boissonnet C, Wilson E. Tobacco smoking in seven Latin American cities: the CARMELA study. *Tob Control* 2010;19: 457-462.
117. Hukkinen M, Kaprio J, Broms U, Koskenvuo M, Korhonen T. Characteristics and consistency of light smoking: long-term follow-up among Finnish adults. *Nicotine Tob Res* 2009; 11:797-805.
118. Filippidis FT, Vardavas CI, Loukopoulou A, Behrakis P, Connolly GN, Tountas Y. Prevalence and determinants of tobacco use among adults in Greece: 4 year trends. *Eur J Public Health* 2013; 23: 772-776.
119. Memon A, Moody PM, Sugathan TN, el-Gerges N, al-Bustan M, al-Shatti A, al-Jazzaf H. Epidemiology of smoking among Kuwaiti adults: prevalence, characteristics, and attitudes. *Bull World Health Organ* 2000; 78: 1306-1315.
120. Dijkstra A, Tromp D. Is the FTND a measure of physical as well psychological tobacco dependence? *J Subst Abuse Treat* 2002; 23: 367-374.
121. Moolchan ET, Radzius A, Epstein DH, Uhl G, Gorelic DA., Cadet JL, Henningfeld JE. The Fagerstrom test for nicotine dependence and the diagnostic interview schedule: do they diagnose the same smokers? *Addict Behav* 2002; 27: 101-113.
122. Shadel WG, Shiffman S, Niaura R, Nichter M, Abrams DB. Current models of nicotine dependence: what is known and what is needed to advance understanding of tobacco etiology among youth. *Drug Alcohol Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire*. *Br J Addict* 1991; 86: 1119-1127.
123. Etter JF, Duc TV, Perneger TV. Validity of the Fagerström test for nicotine dependence and of the Heaviness of Smoking Index among relatively light smokers. *Addiction* 1999; 94: 269-281.
124. Etter JF. A comparison of the content-, construct- and predictive validity of the cigarette dependence scale and the Fagerström test for nicotine dependence. *Drug Alcohol Depend* 2005; 77: 259-268.
125. DiFranza JR, Wellman RJ, Savageau JA, Beccia A, Ursprung WW, McMillen R. What aspect of dependence does the Fagerström Test for

- Nicotine Dependence measure?, Hindawi Publishing Corporation, ISRN Addiction 2013; Article ID 906276.
126. Chen LS i wsp. Smoking and genetic risk variation across populations of European, Asian, and African American ancestry- a meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol* 2012; 36: 340-351.
 127. de Leon J, Diaz FJ, Becoña E, Gurpegui M, Jurado D, Gonzalez-Pinto A. Exploring brief measures of nicotine dependence for epidemiological surveys. *Addict Behav* 2003; 28: 1481-1486.
 128. Broms U, Wedenoja J, Largeau MR i wsp. Analysis of detailed phenotype profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res* 2012; 14: 720-733.
 129. Fagerström K. Time to first cigarette; the best single indicator of tobacco independence? *Monaldi Arch Chest Dis* 2003; 59: 91-94.
 130. Haberstick BC, Timberlake D, Ehringer MA, Lessem JM, Hopfer CJ, Smolen A, Hewitt JK. Genes, time to first cigarette and nicotine dependence in a general population sample of young adults. *Addiction* 2007; 102: 655-665.
 131. Chaiton MO, Cohen JE, McDonald PW, Bondy SJ. The Heaviness of Smoking Index as a predictor of smoking cessation in Canada. *Addict Behav* 2007; 32: 1031-1042.
 132. Buczkowski K, Sieminska A, Linkowska K, Czachowski S, Przybylski G, Jassem E, Grzybowski T. Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and several nicotine dependence traits in Polish population: a case-control study. *Biomed Res Int* 2015; 350348.
 133. COMMIT Research Group Community Intervention Trial for Smoking Cessation (COMMIT): summary of design and intervention. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1620–1628.
 134. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 91-99.
 135. Li MD, Yoon D, Lee J-Y, Han B-G, Niu T, Payne TJ, Ma JZ and Park T. (2010) Associations of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster with smoking behaviors in a Korean population. *PLoS ONE*, 5, e12183.

136. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, Diehr P, Koepsell T, Kinne S. The validity of self-reported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health* 1994; 84: 1086-1093.
137. Rębała K, Martínez-Cruz B, Tönjes A i wsp. Contemporary paternal genetic landscape of Polish and German populations: from early medieval Slavic expansion to post-World War II resettlements. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 415-422.
138. Wen L, Yang Z, Cui W, Li MD. Crucial roles of the CHRN3-CHRNA6 gene cluster on chromosome 8 in nicotine dependence: update and subjects for future research. *Transl Psychiatry* 2016; 6: e843.
139. Bierut LJ. Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron* 2011; 69: 618-627.
140. Morel C, Fattore L, Pons S i wsp. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatr* 2014; 19: 930-936.
141. Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster on chromosome 15 to tobacco smoking: from genetic association to mechanism. *Mol Neurobiol* 2014; 53: 472-484.
142. Berrettini WH, Doyle GA. The CHRNA5-A3-B4 gene cluster in nicotine addiction. *Mol Psych* 2011; 17: 856-866.
143. Melroy-Greif WE, Stitzel JA, Ehringer MA. Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes Brain Behav* 2016; 15: 89-107.
144. Ebbert JO. Varenicline and combination nicotine replacement therapy are the most effective pharmacotherapies for treating tobacco use. *Evid Based Med*. 2013; 18: 212–213.
145. Cahill K, Stevens S, Lancaster T. Pharmacological treatments for smoking cessation. *JAMA*. 2014; 311: 193–194.
146. Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA i wsp. Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006; 296: 56–63.

147. Gonzales D, Rennard SI, Nides M i wsp. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006; 296: 47–55.
148. Fagerström K, Hughes J. Varenicline in the treatment of tobacco dependence. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008; 4: 353–363.
149. Livingstone PD , Srinivasan J , Kew JN i wsp. Alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci*. 2009; 29: 539-550.
150. Brunzell DH, McIntosh JM, Papke RL. Diverse strategies targeting $\alpha 7$ homomeric and $\alpha 6\beta 2^*$ heteromeric nicotinic acetylcholine receptors for smoking cessation. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1327: 27-45.
151. Cui W i wsp. Significant association of CHRNA3 variants with nicotine dependence in multiple ethnic populations. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 1149-1151.
152. Hoft NR, Corley RP, McQueen MB, Schlaepfer IR, Huizinga D, Ehringer MA. Genetic association of the CHRNA6 and CHRNA3 genes with tobacco dependence in a nationally representative sample. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 698-706.
153. Fletcher JM. Why have tobacco control policies stalled? Using genetic moderation to examine policy impacts. *PLoS One* 2012; 7: e50576.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Tytuł: Ocena wpływu wybranych polimorfizmów genów podjednostek alfa-5 i alfa-3 cholinergicznego receptora nikotynowego na stopień uzależnienia od nikotyny w jednorodnej etnicznie grupie Kaszubów

Wprowadzenie

Palenie tytoniu jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych nałogów na świecie, a przy tym, ze względu na wyjątkową szkodliwość dla zdrowia, głównym zabójcą ludzkości. Obecne szacunki wskazują, że ponad miliard mieszkańców Ziemi pali papierosy, a rocznie z powodu chorób odytoniowych umiera 5,4 mln osób. Główną przeszkodą w ograniczeniu używania tytoniu, zarówno w skali jednostki jak też społeczeństw, jest uzależnienie od zawartej w jego liściach nikotyny, substancji psychoaktywnej o potencjale uzależniającym porównywalnym do heroiny czy kokainy.

Nikotyna jest agonistą nikotynowych receptorów acetylocholino (nAChR) na neuronach zlokalizowanych m. in. w centralnym i wegetatywnym układzie nerwowym. Liczne podtypy nAChRs są kombinacjami pięciu spośród jedenastu białkowych podjednostek $\alpha 2$ - $\alpha 9$ i $\beta 2$ - $\beta 4$, genetycznie kodowanych. Receptor nikotynowy ma zatem budowę pentamery, a w mózgu ssaków najliczniej występuje podtyp złożony z podjednostek $\alpha 4$ i $\beta 2$. Jest on najprawdopodobniej głównym ogniwem w procesie neurofizjologicznego uzależnienia od nikotyny (UN). Przyłączenie nikotyny do receptorów nikotynowych powoduje stymulację różnych szlaków neurotransmisyjnych w mózgu, m. in. dopaminowego. Uwolnienie dopaminy pobudza tzw. układ nagrody i jest odbierane jako przyjemne doświadczenie, co ma decydujące znaczenie dla wzmacniającego efektu nikotyny w uzależnieniu.

Klasyczne badania genetyczne, tj. badania bliźniąt, oraz nowoczesne metody, wykorzystujące skanowanie całego genomu z równoczesnym genotypowaniem dziesiątek-setek tysięcy polimorfizmów typu pojedynczego nukleotydu (SNPs), czyli tzw. badania GWAS, a także badania genów kandydujących z genotypowaniem mniejszej liczby SNPs wskazują, że używanie tytoniu oraz UN są w znacznym stopniu genetycznie uwarunkowane. Dzięki badaniom GWAS zidentyfikowano region genomu 15q24-25.1 zawierający klaster genów

kodujących podjednostki α -3, α -5 i β -4 receptora nikotynowego, wpływający na te zachowania. Wpływ pojedynczych genów jest jednak niewielki i dla jego wykazania konieczne są badania przeprowadzone na bardzo dużych próbach. Uważa się jednak, że jednorodność etniczna badanej populacji ułatwia wykrycie lub potwierdzenie istotnego wpływu danego polimorfizmu nawet w mniej licznych próbach. Z tego względu przedstawione badania podjęto w homogenicznej etnicznie, izolowanej populacji Kaszubów.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmów w miejscach rs1051730 i rs6495308 genu *CHRNA3* kodującego podjednostkę alfa-3 receptora nikotynowego oraz w miejscu rs55853698 genu *CHRNA5* kodującego podjednostkę alfa-5 na stopień uzależnienia od nikotyny w jednorodnej etnicznie grupie Kaszubów.

Materiał i metody

Badaniem objęto 788 dorosłych, niespokrewnionych ze sobą osób pochodzenia kaszubskiego, aktualnych codziennych palaczy papierosów, w wieku od 18 do 85 lat (średnio $43,6 \pm 13,8$ lat), w tym 282 kobiety w wieku od 20 do 73 lat (średnio $46,5 \pm 11,5$ lat) oraz 506 mężczyzn w wieku od 18 do 85 lat (średnio $42,0 \pm 14,6$ lat).

Przy pomocy wywiadów kwestionariuszowych zgromadzono od wszystkich uczestników dane demograficzne (wiek, płeć) oraz dane dotyczące palenia papierosów (wiek rozpoczęcia palenia, liczba wypalanych papierosów dziennie, długość czasu od obudzenia do wypalania pierwszego porannego papierosa, stopień uzależnienia od tytoniu określony liczbą punktów w teście Fagerströma, długość trwania nałogu). Dodatkowo, od badanych osób pobierano próbki krwi żyłnej. Zostały one zamrożone i przechowywane w temp. -80° C do czasu badania genetycznego, w trakcie którego, po wyizolowaniu z krwi genomowego DNA, amplifikowano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy regiony zawierające badane polimorfizmy, a następnie, poprzez pirosekwencjonowanie, przeprowadzano ich genotypowanie.

Związek polimorfizmów w miejscach rs1051730, rs6495308 i rs55853698 genów kodujących podjednostki alfa-3 i alfa-5 receptora nikotynowego z uzależnieniem od nikotyny (wybranymi fenotypami UN) i wiekiem rozpoczynania palenia, a także zależność pomiędzy płcią uczestników a wiekiem rozpoczynania palenia, oceniano za pomocą analizy regresji logistycznej.

Fenotypy UN, włączone do analizy statystycznej, były zdefiniowane przy pomocy Testu Uzależnienia od Nikotyny Fagerströma (FTND), Wskaźnika Intensywności Palenia (HSI), liczby wypalanych dziennie papierosów (CPD) i długości czasu od obudzenia do wypalenia pierwszego porannego papierosa (TTF).

Badane fenotypy UN oraz wiek rozpoczynania palenia zostały włączone do analizy jako cechy dychotomiczne.

Wyniki przedstawiono jako skorygowane ilorazy szans z 95-procentowymi przedziałami ufności. Dla wielokrotnych testów zastosowano poprawkę Bonferroniego – przyjęto poziom istotności $p = 0,016$.

Wyniki

Nie wykazano istotnego wpływu badanych SNPs na FTND, HSI i TTF, a także na wiek rozpoczynania palenia. Stwierdzono natomiast, że nosiciele allelu A (genotypy AA i AG) w miejscu rs1051730 genu *CHRNA3* mieli istotnie wyższe ryzyko wypalania ponad 10 papierosów dziennie (OR = 1,77; 95%CI: 1,20-2,59; $p = 0,004$) w porównaniu z osobami o genotypie GG. W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów nie wykazano wpływu na CPD. Palenie ponad 10 papierosów dziennie było także istotnie związane z płcią męską i ze starszym wiekiem badanych (odpowiednio, OR = 1,87; 95% CI: 1,15-3,02; $p = 0,011$ i OR = 1,78; 95% CI: 1,16-2,75; $p = 0,009$). Wśród mężczyzn obserwowano natomiast znamienne niższy niż u kobiet odsetek palaczy, którzy zapalali pierwszego papierosa w ciągu pierwszych 5 minut po obudzeniu (24% vs. 32%), a obliczony w regresji logistycznej iloraz szans dla tak szybkiego sięgania po dawkę nikotyny wynosił dla nich OR = 0,66; 95% CI: 0,48-0,92; $p = 0,014$ (dla kobiet: OR = 1.51; 95% CI: 1,08-2,09).

Wnioski

Wyniki badania potwierdzają istotny wpływ polimorfizmu rs1051730 w genie *CHRNA5* na fenotyp uzależnienia od tytoniu, zdefiniowany jako liczba papierosów wypalanych dziennie. Kontynuacja badań w poszukiwaniu genów i ich wariantów polimorficznych zaangażowanych w rozwój uzależnienia od nikotyny, a także replikowanie tych badań w różnych etnicznie populacjach, może przyczynić się do zwiększenia w przyszłości skuteczności leczenia UN poprzez wdrożenie spersonalizowanych sposobów leczenia, uwzględniających indywidualny genotyp palacza.

10. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Abstract

Title: Association between selected polymorphisms of *CHRNA3* and *CHRNA5* nicotine receptor subunit gene variants and nicotine dependence in an isolated population of Kashubians in Poland

Background

Cigarette smoking is one of the most prevalent addictive habits. This, together with health risks of smoking, makes tobacco the biggest killer of human beings. It is estimated that above one billion people smoke cigarettes worldwide, and 5.4 million people die annually from tobacco-related diseases. The main barrier in reducing tobacco use both at the individual and population level is addiction to nicotine, the psychoactive substance contained in the tobacco leaves, which in its addictive potential is comparable to heroin or cocaine.

Nicotine is an agonist for the neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) which are localized both in the vegetative and central nervous system (CNS). Numerous subtypes of nAChRs are combinations of five among eleven genetically coded protein subunits $\alpha 2$ - $\alpha 9$ and $\beta 2$ - $\beta 4$. Thus, nicotinic receptor is a pentamer and the nAChR type which is predominant in the mammalian brain is composed of $\alpha 4$ and $\beta 2$ subtypes. nAChR most likely plays a key role in the neurophysiologic processes of nicotine dependence (ND). Binding of nicotine to nAChRs activates various neurotransmitter pathways in the CNS, including dopaminergic pathway. Release of dopamine stimulates the reward system what is perceived as a pleasant sensation, which, in turn, is crucial for reinforcement-enhancing effect of nicotine in addiction.

Classical genetic twin studies, and more recently, genome wide association studies (GWAS) which allow for scanning tens to hundreds of thousands of single nucleotide polymorphisms (SNPs), as well as allelic association studies on less number of candidate genes, have yielded strong evidence that tobacco use and ND are to a considerably degree genetically determined. Thanks to genome-wide association studies, the genetic region 15q24-25.1 that may influence these behaviors was identified. This genome region comprises a cluster of genes encoding the *CHRNA5*, *CHRNA3*, and *CHRNA4* subunits of the nAChR. Because the influence of a single gene on complex behavior is

small, studies conducted with the use of very large samples are needed for demonstrating it. It is considered however, that ethnic homogeneity of the study sample allows for detection or confirmation of the significant influence of a given polymorphism even in the smaller sample. Therefore, the presented study was undertaken in ethnically homogeneous, isolated population of Kashubians.

Aim

The aim of the study was to assess the influence of polymorphisms in rs1051730 and rs6495308 loci of the *CHRNA3* gene which encodes alfa-3 subunit of the nAChR and in rs55853698 locus of the *CHRNA5* gene which encodes alfa-5 nicotinic receptor subunit on the ND in ethnically homogeneous sample of Kashubians.

Material and methods

The study was conducted in the sample consisted of 788 adult, non-related to each other, current daily smokers of Kashubian origin aged 18-85 (mean age 43.6 ± 13.8). There were 282 women aged 20-73 years (mean age 46.5 ± 11.5 years) and 506 males aged 18-85 years (mean age 42.0 ± 14.6 years) among them.

With the use of questionnaire-based face-to-face interviews demographic (age, sex) and smoking data (the age of smoking initiation, the number of cigarettes smoked daily, the time to first cigarette after wakening, the level of ND defined by the Fagerström Test for Nicotine Dependence scoring, the length of a smoking history) were recorded for all participants. In addition, the sample of venous blood were collected into heparinized tubes from all subjects, then frozen and stored at -80°C . When required for genotypic analyses, genomic DNA was extracted and used as a template for the PCR, and then studied polymorphisms were detecting by pyrosequencing.

Correlations between rs1051730, rs6495308 and rs55853698, and ND (the selected ND phenotypes), as well as between sex and age of smoking initiation were estimated using logistic regression analysis.

Analyzed ND phenotypes were defined by the four measures: FTND and Heavy Smoking Index (HSI) scoring, the number of cigarettes smoked daily (CPD) and the time to first cigarette after waking (TTF). These ND phenotypes and age at which subjects starting smoking were incorporated into the analysis as dichotomous traits.

Results are presented as age- and sex-adjusted odds ratios (ODs) with their 95% confidence intervals (95% CI). The Bonferroni correction procedure for multiple testing in the logistic regression analyses was used and a significance level of 0.016 as a type 1 error was set.

Results

No associations between ND defined by FTND, HSI or TTF and studied polymorphisms or age at starting smoking were found. In turn, it was demonstrated that carriers of risk allele A in the rs1051730 loci of *CHRNA3* (genotypes AA and AG) had significantly higher risk of smoking more than 10 CPD in comparison to individuals with GG genotype (odds ratio (OR) = 1.77; 95% confidence interval (CI): 1.20-2.59, $p = 0.004$). In case of the remaining studied SNPs no influence on CPD was found. Smoking CPD > 10 was significantly associated with male gender and older age of subjects (OR = 1.87; 95% CI: 1.15-3.02; $p = 0.011$ and OR = 1.78; 95% CI: 1.16-2.75; $p = 0.009$, respectively).

However, there were significantly less smokers who smoked their first cigarette up to five minutes after waking among males than among females (24% vs. 32) and OR for TTF ≤ 5 min was 0.66; 95% CI: 0.48-0.92; $p = 0.014$ (for women respectively: OR = 1.51; 95% CI: 1.08-2.09).

Conclusion

Our findings confirm that rs1051730 influences significantly ND phenotype, as defined by CPD.

The continuation of searching for genes and their polymorphic variants involved into the development of ND, as well as replication of studies in ethnically different populations could contribute to the improvement of the effectiveness of UN treatment by the implementation in future of personalized therapies which take into account the individual's genotype.

11. ANEKS

Ankieta zastosowana w badaniu:

Nr

Imię, nazwisko.....wiek.....

PESEL.....

Wiek rozpoczęcia palenia:.....

Liczba wypalanych papierosów dziennie.....

Liczba punktów w skali Fargerströma.....

Długość okresu palenia papierosów (odjąć okresy niepalenia).....

[Liczba paczkołat.....]

Czy chce Pan/Pani znać wynik swoich badań genetycznych z ich ewentualną interpretacją?

TAK NIE

KWESTIONARIUSZ FAGERSTROMA

1. Jak szybko po obudzeniu zapala Pan/Pani papierosa?

- w ciągu 5 minut (3 pkt)
- w ciągu 6-30 minut (2 pkt)
- po 30 minutach (1 pkt)

2. Czy powstrzymanie się od niepalenia w miejscach, gdzie jest to zakazane (kościół, kino) stanowi dla Pana/Pani problem?

- tak (1 pkt)
- nie (0 pkt)

3. Z którego papierosa najbardziej nie chciałaby Pan/Pani zrezygnować?

- pierwszego rano (1 pkt)
- każdego innego (0 pkt)

4. Ile papierosów pali Pan/Pani dziennie?

- 10 lub mniej (0 pkt)
- 11-20 (1 pkt)
- 21-30 (2 pkt)
- 31 i więcej (1 pkt)

5. Czy pali Pan/Pani więcej rano, po przebudzeniu, niż w ciągu dnia?

- tak (1 pkt)
- nie (0 pkt)

6. Czy pali Pan/Pani nawet w czasie choroby leżąc w łóżku przez większość dnia?

- tak (1 pkt)
- nie (0 pkt)

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W BADANIU

Wpływ polimorfizmów genów receptora nikotynowego w autochtonicznej grupie etnicznej Kaszubów, jako populacji zamkniętej, na uzależnienie od tytoniu: badanie kliniczno-kontrolne

Udział Pani/Pana w badaniu jest możliwy jedynie po podpisaniu niniejszego formularza.

Badanie jest poufne, co oznacza, że zachowamy pełną poufność dotyczącą osobiście Pana/Pani oraz wyników badań. Tajemnicę lekarską zachowamy także w publikacjach, dotyczących przeprowadzonego badania. Jedynie prawomocna decyzja sądu może spowodować ujawnienie danych osobowych. Polskie prawo chroni poufność Pana/Pani danych osobowych.

Po zapoznaniu się z założeniami badania, możliwymi dla mnie skutkami udziału w nim oraz klauzulą poufności wyników badań wyrażam zgodę na:

1. udzielenie odpowiedzi na pytania zawarte w ankiecie dotyczącej mojego rodowodu i ankiecie dotyczącej palenia tytoniu wraz z kwestionariuszem uzależnienia od nikotyny
2. pobranie ode mnie 6 ml krwi do celów analizy molekularnej

W związku z możliwością uzyskania informacji co do ewentualnej mojej podatności na choroby psychiczne nie wyrażam zgody na wykorzystanie tej informacji w przedmiotowej pracy, a informacje o podatności na choroby psychiczne proszę przekazać jedynie mojej osobie.

Data

Podpis osoby biorącej udział w badaniu

Data

Podpis badacza

Ankieta dotycząca rodowodu

Imię, Nazwisko.....

Data urodzenia.....

Miejsce urodzenia.....

Adres.....

- MATKA:**
- a) Imię i nazwisko rodowe matki.....
 - b) pochodzenie (gdzie się urodziła/żyła przed zamążpójściem: miejscowość, region Polski, kraj).....
 - c) czy zna/ła język kaszubski ? (wpisać: **TAK** lub **NIE** lub ?).....

DZIAKOWIE ze strony matki:

- miejsce urodzenia.....
- czy znali j. kaszubski? BABCIA.....DZIADEK.....

- OJCIEC:**
- a) Imię i nazwisko
 - b) pochodzenie (gdzie się urodził/żył przed założeniem rodziny: miejscowość, region Polski, kraj).....
 - c) czy znał język kaszubski ? (wpisać: **TAK** lub **NIE** lub ?).....

DZIAKOWIE ze strony ojca:

- miejsce urodzenia.....
- czy znali j. kaszubski? BABCIA.....DZIADEK.....

DOROSŁE RODZENŃSTWO ŻYJĄCE - Imiona, Nazwiska, Miejsce zamieszkania

- 1.....
- 2.....
- 3.....
- 4.....
- 5.....
- 6.....

DOROSŁE DZIECI - Imiona, Nazwiska, Miejsce zamieszkania

- 1.....
- 2.....
- 3.....
- 4.....
- 5.....
- 6.....

RODZICE jeśli żyją – Imiona, Nazwiska, Miejsce zamieszkania

- 1.....
- 2.....