Physiology and Pharmacology, 12 (4), 296 - 306
Winter 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

CYP2A6 genetic polymorphism and its relation to the risk of smoking dependence in Iranian men

Masoumeh Emamghoreishi[1,2], Hamid-Reza Bokaee[1], Mojtaba Keshavarz[1]

1. Dept. Pharmacology, Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Psychiatry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 4 Jan 2008 **Revised: 28 Sept 2008** **Accepted: 15 Oct 2008**

Abstract

Introduction: Nicotine is the psychoactive substance responsible for establishing and maintaining smoking dependence. CYP2A6 is the primary enzyme that converts nicotine to its inactive metabolite cotinine. Genetic variations in CYP2A6 accounts for some of the inter-individual variability in nicotine metabolism and has been indicated to influence smoking behavior and dependence. Therefore, the aim of this study was to examine whether there is a relationship between CYP2A6 genetic polymorphism and smoking dependence in an Iranian population.

Methods: We assessed 118 male non-smokers (1-99 cigarettes/lifetime) and 133 dependent current smokers for demographic, cigarette use history and DSM-IV dependence. Subjects were genotyped for CYP2A6 alleles associated with decreased nicotine metabolism (* 2, *4, or *9 allele) using allele-specific nested PCR. Based on their genotypes, subjects were grouped into slow (one or two copies of *2 or *4, or two *9 alleles), intermediate (one *9 allele), and normal (have no copies of *2 , *4 , or *9 alleles) nicotine metabolizer.

Results: Intermediate nicotine metabolizers were at higher risk for becoming a dependent smoker (odd ratio [OR] = 3.71; $p = 0.009$). Slow metabolizers had a significantly lower age of first smoking in comparison to normal and intermediate metabolizers ($p = 0.037$). Cigarette consumption and the degree of smoking dependence were not significantly different among smokers with different CYP2A6 genotypes.

Conclusion: In the Iranian male population, the risk for becoming a dependent smoker increases with genotypes for intermediate nicotine metabolism, while slow nicotine metabolizers experience smoking in lower ages. These findings increase our understanding of the effect of CYP2A6 genotypes on smoking dependence in Iranian male population and may help us develop new strategies for quitting smoking.

Keywords: CYP2A6, Polymorphism, Smoking, Iranians

* Corresponding author e- mail: emamm@sums.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۴)، ۲۹۶ – ۳۰۶
زمستان ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

ارتباط پلی مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 با خطر وابستگی به سیگار در مردان ایرانی

معصومه امام‌قریشی*، حمیدرضا بکایی، مجتبی کشاورز
بخش فارماکولوژی و مرکز تحقیقات روانپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

دریافت: ۱۵ بهمن ۸۶ بازبینی: ۴ مهر ۸۷ پذیرش: ۲۴ مهر ۸۷

چکیده

مقدمه: نیکوتین یک ماده محرک روانی است که مسئول ایجاد و ادامه وابستگی به سیگار می‌باشد. CYP2A6 مهمترین آنزیم در غیر فعال کردن نیکوتین به کوتنین می‌باشد. تنوع ژنتیکی در CYP2A6 باعث اختلافات فردی در متابولیسم نیکوتین شده و می‌تواند وابستگی به سیگار را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی‌مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 و وابستگی به سیگار در یک جمعیت ایرانی بود.

روش‌ها: ۱۸۸مرد غیرسیگاری (۱–۹۹ سیگار در طول زندگی) و ۱۳۳ مرد سیگاری وابسته، از نظر اطلاعات شخصی، تاریخچه مصرف سیگار و شدت وابستگی به سیگار ارزیابی شدند. آلل‌های ۲، ۴ و ۹ ژن CYP2A6 که با کاهش متابولیسم نیکوتین همراه می‌باشند با استفاده از روش allele-specific nested PCR تعیین گردیدند. افراد به سه گروه ژنوتیپی متابولیسم کند (یک کپی یا بیشتر از آلل‌های ۲ یا ۴ یا هموزیگوت آلل ۹)، متوسط (هتروزیگوت آلل ۹) و طبیعی (فاقد آلل‌های ۲، ۴ و ۹) تقسیم‌بندی شدند.

یافته‌ها: متابولیسم متوسط نیکوتین ریسک سیگاری شدن را ۲/۷ برابر افزایش داد (OR = ۳/۷۱ ،p = ۰/۰۰۹). سن شروع اولین سیگار در افراد با متابولیسم کند کمتر از افراد با متابولیسم طبیعی و متوسط بود (p = ۰/۰۳۷). بین سه گروه ژنوتیپی در افراد سیگاری، تفاوتی در میزان مصرف سیگار و شدت وابستگی به سیگار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: در جمعیت ایرانی، ریسک وابستگی به سیگار در افراد با ژنوتیپ برای متابولیسم متوسط نیکوتین افزایش می‌یابد و افراد با متابولیسم کند، مصرف سیگار را در سن پایین تری شروع می‌کنند. این یافته‌ها دانسته‌های ما را در مورد اثر ژنوتیپ CYP2A6 بر ریسک وابستگی به سیگار در جمعیت ایرانی افزایش می‌دهد و ممکن است برای پایه‌ریزی روش‌های جدید در ترک سیگار کمک کننده باشد.

واژه‌های کلیدی: CYP2A6، پلی مرفیسم، سیگار کشیدن، ایرانی.

مقدمه

کشیدن سیگار به عنوان یک عادت و وابستگی و با میزان شیوع متفاوت در جوامع امروزی دیده می‌شود. با وجود کوشش‌های فراوان در سطح جهان برای جلوگیری از گسترش مصرف سیگار، تقریبا حدود یک سوم از افراد بالای ۱۵ سال در جهان سیگار می‌کشند. سازمان بهداشت جهانی، سیگار کشیدن را بعنوان اولین علت مرگ ومیرهای قابل پیشگیری در جهان قرار داده است و پیش بینی کرده است که تعداد مرگ‌های زود هنگام بدلیل مصرف سیگار تا سال ۲۰۲۰ به مرز ۱۰ میلیون نفر در سال برسد [۴۰]. در ایران، طبق آخرین آمارهای اعلام شده از سوی معاونت سلامت وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی ۱۵ درصد جمعیت کشور یعنی ۱۱ میلیون نفر سیگاری می‌باشند. همچنین شیوع مصرف سیگار در آقایان ۲۶ درصد و در

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: emamm@sums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

خانم‌ها ۳/۶ درصد گزارش شده است [۲]. در ایران، سالانه بیش از ۷۵۰۰۰ نفر به علت مصرف سیگار و بیماری‌های ناشی از آن جان خود را از دست می‌دهند [۱]. بنا به گفته مسئولین مبارزه با استعمال دخانیات در سالهای اخیر، مصرف سیگار در بین جوانان ۱۷ درصد و در بین زنان ۳/۵ درصد افزایش در کشور داشته است و این روند می‌تواند جامعه را با تهدیدات بسیاری در زمینه سلامت و امنیت روبه رو کند. بنابراین شناخت عواملی که در ایجاد وابستگی به سیگار دخالت دارند و راههای پیشگیری از آن می‌تواند اهمیت بسزایی در ارتقا سلامت جامعه داشته باشد.

اتیولوژی اعتیاد به سیگار بسیار پیچیده می‌باشد و هر دو عامل محیط و ژنتیک را در بر می‌گیرد [۱۲، ۳۶]. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ۵۰ درصد شروع مصرف سیگار و بیشتر از ۷۰ درصد از ادامه مصرف سیگار ناشی از عوامل ژنتیک می‌باشد[۳۶، ۳۷]. نیکوتین ماده اصلی موجود در سیگار است که مسئول ایجاد و ادامه وابستگی به سیگار می‌باشد [۱۴]. نشان داده شده است که افراد معتاد، رفتار سیگار کشیدن خود را طوری تنظیم می‌کنند تا یک سطح ثابت از نیکوتین را بطور مرکزی و محیطی بدست آورند [۵، ۱۸، ۳۰]. واین موضوع با سرعت متابولیسم نیکوتین کنترل می‌گردد. در انسان تقریبا ۷۰ تا ۸۰٪ نیکوتین به ماده غیر فعال کوتینین متابولیزه می‌شود [۶]. آنزیم کبدی سیتوکروم P450 2A6 (CYP2A6)، که دارای پلی مرفیسم ژنتیکی است، مسئول غیر فعال کردن نیکوتین می‌باشد [۱۶]. آلل‌های گوناگونی از این آنزیم با فعالیت متفاوت تاکنون شناخته شده است [۳۹]. بنابراین آلل‌های مختلف آنزیم CYP2A6 می‌توانند سرعت متابولیسم نیکوتین و در نتیجه میزان نیکوتینی که در بدن می‌ماند را تغییر دهند. از اینرو اینطور فرض شده است که افراد با ژنوتیپی از CYP2A6 که منجر به کاهش فعالیت آنزیم گردد به دلیل اینکه نیکوتین به مدت بیشتری در بدنشان باقی می‌ماند و عوارض ناشی از مصرف را بیشتر نشان می‌دهند، احتمالاً تمایل کمتری برای شروع مصرف مداوم سیگار دارند و در معرض خطر کمتری برای سیگاری شدن قرار دارند [۳۸]. در این ارتباط، در یک مطالعه بر روی افراد نژاد سفید (Caucasian) در کانادا مشاهده شد که تعداد کسانی که دارای آلل با نقص در متابولیسم نیکوتین هستند در گروه وابسته به سیگار در مقایسه با افراد غیر سیگاری بسیار کمتر می‌باشد [۲۶]. همچنین مشاهده شد که در بین افراد معتاد به سیگار، افراد هتروزیگوت با نقص در متابولیسم نیکوتین بطور معنی داری تعداد سیگار کمتری در روز و در هفته در مقایسه با افراد سیگاری هموزیگوت با متابولیسم طبیعی نیکوتین می‌کشیدند. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که پلی مرفیسم ژنتیکی در آنزیم CYP2A6 یک تعیین کننده مهم در رفتار سیگار کشیدن و وابستگی به سیگار می‌باشد. از آنجایی که تفاوت‌های نژادی و قومی بسیاری در متابولیسم نیکوتین، بدلیل پلی مرفیسم ژنتیکی در آنزیم CYP2A6، وجود دارد [۷، ۱۱، ۲۱، ۲۵] و با توجه به رشد فزاینده اعتیاد به سیگار در ایران، انجام چنین مطالعاتی در جمعیت ایرانی می‌تواند اهمیت بسزایی در شناخت بهتر علل وابستگی به سیگار و کاربرد منطقی تر روش‌های درمانی جدید که در پیشگیری و درمان اعتیاد به سیگار مطرح شده اند، داشته باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مرفیسم ژنتیکی آنزیم CYP2A6 با رفتار سیگار کشیدن و ریسک وابستگی به سیگار در جمعیت ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۳۳ مرد سیگاری وابسته و ۱۱۸ مرد غیرسیگاری، ایرانی و در سنین بین ۱۹ تا ۵۰ سال شرکت داشتند. افراد غیرسیگاری در این مطالعه حداقل ۱ بار در عمرشان سیگار مصرف کرده بودند اما در طول زندگی مجموعاً کمتر از ۱۰۰ نخ سیگار کشیده بودند؛ افراد سیگاری، افرادی بودند که در زمان انجام مطالعه به صورت روزانه سیگار می‌کشیدند. در افراد سیگاری، وابستگی به سیگار با معیار DSM-IV [۳] و شدت وابستگی با معیار Fagerstrom Test for Nicotine Dependence (FTND) تعیین گردید [۱۳]. با استفاده از پرسشنامه، اطلاعات شخصی فرد (سن، وضعیت تحصیلی)، وضعیت سیگاری بودن، سن شروع اولین سیگار، تعداد نخ سیگار مصرفی در روز و مدت مصرف سیگار بدست آمد. واجد شرایط بودن افراد برای ورود به مطالعه از طریق مصاحبه رودررو و با استفاده از پرسشنامه تعیین گردید. افراد با سابقه ابتلا به بیماری‌های کبدی نظیر هپاتیت، بیماری‌های کلیوی، مصرف الکل بیش از یکبار در هفته، بیماری‌های روانی نظیر اضطراب، افسردگی و سایکوز، مصرف داروهای محرک نظیر LSD و مصرف مداوم داروهایی که با عملکرد آنزیم CYP 2A6 تداخل

جدول ۱- غلظت مواد در مخلوط واکنش‌های PCR و برنامه واکنش PCRI و PCRII برای آلل‌های مورد مطالعه

	CYP2A6*2		CYP2A6*4		CYP2A6*9	
	PCRI	PCRII	PCRI	PCRII	PCRI	PCRII
Reaction mixtures						
DNA	0.3 µg	1µl of PCRI product	0.3 µg	1µl of PCRI product	0.3 µg	1µl of PCRI product
Primer (each) (µM)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Each dNTP (mM)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
$MgCl_2$ (mM)	4	4	3.4	3.4	3	1.4
Taq polymerase (units)	2	2	2	2	2	2
Reaction conditions						
Initial denaturation, ^{0}C (s)	95(60)	95(60)	95(60)	95(60)	94(60)	94(60)
Denaturation, ^{0}C (s)	95(15)	95(15)	95(15)	95(15)	94(20)	94(20)
Annealing, ^{0}C (s)	60(20)	50(20)	52(20)	50(20)	55(30)	68 (40)
Extension, ^{0}C (s)	72(180)	72(45)	72(60)	72(60)	72(120)	72(60)
# Cycles	36	20	35	25	35	20
Final extension, ^{0}C (min)	72(7)	-	72(7)	-	72(7)	-

داشتند، از مطالعه خارج شدند. همچنین در این مطالعه تنها مصرف سیگار در نظر گرفته شد و مصرف قلیان، پیپ و سایر اشکال توتون در نظر گرفته نشد. سلامتی افراد از نظر فیزیکی با استفاده از معاینه پزشکی و گرفتن تاریخچه پزشکی و سلامت روانی با استفاده از تست لیکرد (پرسشنامه سلامت عمومی) مورد بررسی قرار گرفت. از افراد واجدشرایط برای ورود به مطالعه رضایت نامه دریافت گردید. انجام این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز تایید شد.

از افراد شرکت کننده در مطالعه، مقدار ۱۰-۸ سی سی خون، در لوله حاوی محلول ۱۰ درصد EDTA، گرفته شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش salting out [۱۷]، انجام گرفت. پس از استخراج، DNA در آب استریل قابل تزریق حل گردید و غلظت آن با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و بر اساس 1 OD = 20 µg/ml برای DNA دورشته ای، تعیین گردید. از نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای تعیین خلوص نمونه DNA استفاده شد. جهت انجام آزمایش PCR نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بایستی بیشتر یا مساوی ۱/۸ باشد.

آلل‌های CYP2A6 با استفاده از روش Allele-specific nested PCR تعیین شدند. در این روش، PCR شامل دو مرحله است که در مرحله اول (PCRI) پرایمرها طوری طراحی می‌شود که طول بزرگ تری از ژنوم رونویسی شود و در مرحله دوم(PCRII) با استفاده از محصول PCRI به عنوان الگو و دو پرایمر دیگر قطعه اختصاصی در ناحیه مورد نظر از ژنوم تکثیر می‌یابد.

برای انجام واکنش PCRI برای هر نمونه DNA، ابتدا مخلوط واکنش شامل بافر مخصوص PCR، MgCl2، dNTP، پرایمرها، Taq DNA polymerase، و ژنومیک DNA با غلظت نهایی مشخص شده در جدول ۱ تهیه گردید. حجم نهایی مخلوط با آب مقطر استریل قابل تزریق به µl ۲۵ رسانده شد. برای انجام واکنش PCRII، روش تهیه نمونه‌ها کاملاً شبیه مرحله اول بود با این تفاوت که به جای ژنومیک DNA از محصول PCR بدست آمده از مرحله اول استفاده شد (جدول ۱). پرایمرهای استفاده شده برای تعیین آلل‌های ۲، ۴ و ۹ در واکنش‌های PCRI و PCRII بر اساس مطالعات قبلی بوده [۲۳، ۲۴، ۳۲] و در جدول ۲ مشخص شده است. پس از تهیه مخلوط واکنش و قرار دادن آنها در داخل دستگاه ترموسایکلر (MWG primus 96)، واکنش PCR مطابق با شرایط اختصاصی برای تعیین هر آلل بطور جداگانه، که در مطالعات قبلی توصیف شده است [۲۳، ۲۴، ۳۲] و در جدول ۱ مشخص شده است، انجام گرفت. در تمام واکنش‌های PCR، یک نمونه کنترل منفی (بدون وجود DNA) و نمونه‌های کنترل مثبت با سه ترکیب ژنوتیپی مختلف استفاده شد. نمونه‌های کنترل مثبت برای آلل‌های مورد آزمایش (۲، ۴ و ۹) به صورت هدیه از دکتر Rachel Tyndale، استاد دانشگاه تورنتو، دریافت شد.

محصولات حاصل از PCRII، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ یا ۲٪ با ولتاژ ۶۰ به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز شد. از DNA ۱Kbp Ladder و ۱۰۰ bp بعنوان سایز مارکر استفاده شد. وجود هر یک از آلل‌های ۲، ۴و ۹ با توجه به اندازه باند ایجاد شده بر روی ژل رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید تعیین گردید

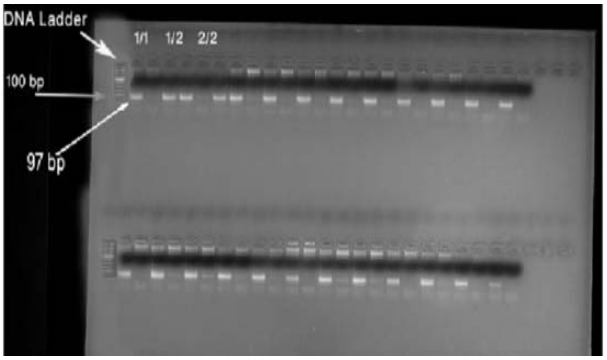
جدول۲- پرایمرهای اختصاصی هر یک از آلل‌های CYP2A6 که در واکنش PCRI و PCRII استفاده شدند.

کد پرایمر	سکانس پرایمر	نام پرایمر
آلل ۲ PCR I	5´ – GCT GAA CAC AGA GCA GAT GTA CA – 3´	2A6ex1
آلل ۲ PCR I	5´ – GGA GGT TGA CGT GAA CTG GAA GA – 3´	2A6ex4R
آلل۲ PCR II	5´ – TCG TCC TGG GTG TTT TCC TTC - 3´	2A6E3R
آلل ۲ PCR II	5´ – CTC ATC GAC GCC CT -3´	2A6WT
آلل ۲ PCR II	5´ – CTC ATC GAC GCC CA – 3´	2A6Mut
آلل ۴ PCR I	5 – GGCCAAGATGCCCTACATG – 3	2Aex7F
آلل ۴ PCR I	5- GGAATAGGTGCTTTTTAAGAATC-3	2A6R3.R
آلل ۴ PCR II	5´-ACCCACATTAGAAGCTTTCTAGA-3´	2A6Int7F1
آلل ۴ PCR II	5´-CCCCATTAGAAGCTTTCTACTCA-3´	2A7Int7F1
آلل ۴ PCR II	5´-GCTTTTTAAGAATCTGTCTAGAA-3´	2A6R4
آلل ۹ PCR I	5´-ACCTAGACTTAATCTTCCCGTATAC -3´	2A6 5Pr1F
آلل ۹ PCR I	5´-CCCAAGATCCTGTCTTTCTGAT-3´	2A6In1R
آلل ۹ PCR II	5´-ATC CTC CAC AAC AGAAGA CCC CTA A- 3´	2A6 460F
آلل ۹PCR II	5´-ACG GCT GGG GTG GTT TGC CTT TA- 3´	2A6 17RA
آلل ۹ PCR II	5´-ACG GCT GGG GTG GTT TGC CTT TC-3´	2A6 17RC

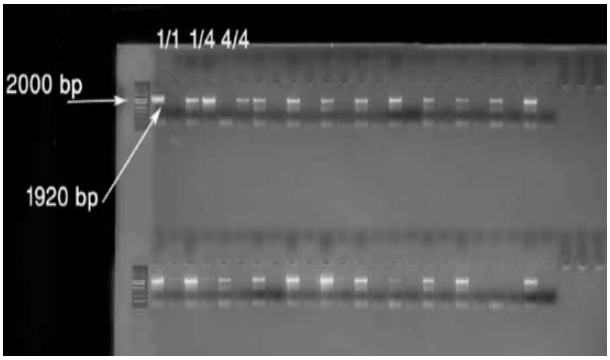
(شکل ۱، ۲و ۳).

افراد بر طبق ژنوتیپ و تاثیر آن بر متابولیسم نیکوتین [۳۲]، به سه گروه با فعالیت آنزیمی طبیعی، متوسط و کند تقسیم شدند. بدین ترتیب که افراد با فعالیت طبیعی آنزیم (۱۰۰٪ فعالیت) فاقد هرگونه آلل با کاهش فعالیت یا عدم فعالیت (آلل‌های ۲، ۴ و ۹) بودند ؛ افراد با فعالیت آنزیم متوسط (۷۵٪ فعالیت) دارای تنها یک کپی از آلل ۹ بودند و افراد با فعالیت آنزیم کند (۵۰٪ یا کمتر از فعالیت) یک کپی یا بیشتر از آلل‌های ۲ یا ۴ را دارا بوده یا در آلل ۹ هموزیگوت بودند.

تفاوت در میانگین سن افراد بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری با استفاده ازIndependent t test ارزیابی شد. بررسی تفاوت در وضعیت تحصیل بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری و وضعیت سیگاری بودن در بین سه گروه ژنوتیپی (طبیعی، متوسط و کند متابولیزه کننده) با استفاده از تست مجذور کای انجام گرفت. از Fisher Exact Test جهت مقایسه هر دو گروه ژنوتیپی با هم از نظروضعیت سیگاری بودن استفاده شد. ریسک وابستگی به سیگار در گروه‌های ژنوتیپی مختلف با محاسبه Odd ratio ارزیابی گردید. در گروه افراد سیگاری، سن مصرف اولین سیگار، شدت اعتیاد به سیگار (FTND) و میزان مصرف سیگار (تعداد نخ در روز و پاکت/سال) از توزیع نرمال برخوردار نبود و به همین دلیل مقایسه میانگین این متغیرها در افراد سیگاری با ژنوتیپ‌های



شکل۱- تصویر ژنوتیپ آلل ۲ با کنترل‌های مثبت ۱/۱، ۲/۱و ۲/۲ و نمونه‌های مورد مطالعه



شکل۲- تصویر ژنوتیپ آلل ۴ با کنترل‌های مثبت ۱/۱، ۴/۱و ۴/۴ و نمونه‌های مورد مطالعه

جدول۳- وضعیت تحصیل افراد مورد مطالعه در دو گروه سیگاری ، غیرسیگاری و در مجموع (سیگاری + غیرسیگاری) را نشان می‌دهد .

وضعیت تحصیل	افراد سیگاری	افراد غیرسیگاری	در مجموع
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
بی سواد	۲ (۰/۰۲)	۰	۲ (۰/۰۱)
ابتدایی	۳۰ (۲۲/۵۶ ٪) *	۱۳ (۱۱/۰۱ ٪)	۴۳ (۱۷/۱۳ ٪)
راهنمایی	۲۹ (۲۱/۸ ۰ ٪)	۲۰ (۱۶/۹۵ ٪)	۴۹ (۱۹/۵۲ ٪)
دبیرستانی	۵۲ (۳۹/۰۹ ٪)	۳۸ (۳۲/۲۰ ٪)	۹۰ (۳۵/۸۶ ٪)
دانشگاهی	۲۰ (۱۵/۰۳ ٪) *	۴۷ (۳۹/۸۳٪)	۶۷ (۲۶/۶۹٪)
مجموع	۱۳۳	۱۱۸	۲۵۱

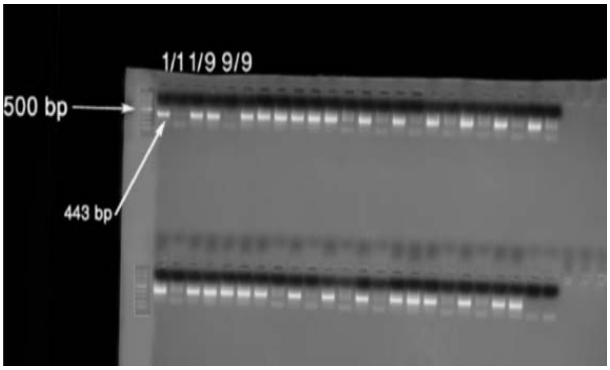
اعداد داخل پرانتز درصد افراد در هرسطح تحصیلی می‌باشد که نسبت به تعداد کل افراد در آن ستون محاسبه شده‌است . در مجموع درصد افراد با تحصیلات دبیرستانی بیشترین درصد و افراد بی‌سواد کمترین درصد را دارا هستند .

*$p < 0.05$ تفاوت معنی‌دار در مقایسه با افراد غیرسیگاری .

مختلف با استفاده از تست Kruskal-Wallis ارزیابی گردید و در صورت معنی دار بودن از تست Mann-Whitney برای مقایسه دو گروه با هم استفاده شد. تست‌های آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS 11.5 و Epi Info 6.0 انجام گردید. p<0.05 به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج بصورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۳۳ مرد سیگاری و ۱۱۸ مرد غیرسیگاری شرکت کردند. میانگین سن افراد سیگاری (۱۰/۳۸ ± ۳۷/۴۳) از میانگین سن افراد غیر سیگاری (۱۰/۷۹ ±۳۴/۵۱) به طور معنی‌داری بالاتر بود (p= ۰/۰۳). وضعیت تحصیل افراد مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. با ارزیابی که توسط تست مجذور کای انجام گرفت مشخص شد که اختلاف معنی‌داری در سطح تحصیلات بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری وجود دارد (p< ۰/۰۰۱، X^2 = ۲۲/۶۲). این تفاوت معنی‌دار، در سطح تحصیلات ابتدایی و دانشگاهی بین دو گروه سیگاری و غیرسیگاری بود، بدین ترتیب که درصد افراد با تحصیلات دانشگاهی در گروه غیرسیگاری و درصد افراد با تحصیلات ابتدایی در گروه سیگاری بیشتر بود (p <۰/۰۰۱).



شکل ۳- تصویر ژنوتیپ آلل ۹ با کنترل های مثبت ۱/۱، ۹/۱و ۹/۹ و نمونه‌های مورد مطالعه

شکل‌های ۱، ۲و ۳ ژنوتیپ آلل‌های ۲، ۴ و ۹ ژن CYP2A6 را برای نمونه‌های کنترل مثبت با سه ترکیب ژنوتیپی مختلف و نمونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. در بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 و ریسک وابستگی به سیگار، به طور کلی ارتباط معنی داری بین وضعیت وابستگی به سیگار و ژنوتیپ CYP2A6 مشاهده شد (p< ۰/۰۰۹، X^2 = ۹/۴۵). در بررسی‌های متعاقب که با استفاده از Fisher Exact Test انجام گرفت، مشخص شد که نسبت افراد با فعالیت متوسط آنزیم، در افراد سیگاری (۱۸/۸٪) به طور معنی داری بیشتر از نسبت آن در افراد غیرسیگاری (۵/۹٪) می‌باشد (p = ۰/۰۰۹). برای اینکه مشخص شود ژنوتیپ با فعالیت متوسط آنزیم تا چه حد ریسک وابستگی به سیگار را افزایش می‌دهد، Odd ratio محاسبه گردید که برابر ۳/۷۱ با حدود اطمینان ۰/۶۴۴ – ۰/۱۱۱ بود و این بدین معنا است که ژنوتیپ با متابولیسم متوسط، خطر سیگاری شدن را ۲/۷ برابر افزایش می‌دهد. نسبت افراد با ژنوتیپ کندمتابولیزه کننده در افراد سیگاری (۳/۸٪) و در افراد غیر سیگاری (۳/۴٪) تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت (جدول ۴).

در بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 با رفتارهای ناشی از مصرف سیگار در افراد سیگاری، تفاوت

جدول۴- تعداد افراد با ژنوتیپ‌های مختلف CYP2A6 را در دو گروه افراد سیگاری ، غیرسیگاری و در مجموع (سیگاری + غیر سیگاری) نشان می‌دهد .

ژنوتیپ	سیگاری	غیرسیگاری	مجموع
طبیعی	۱۰۳	۱۰۶	۲۰۹
متوسط	۲۵ *	۷	۳۲
کند	۵	۵	۱۰
مجموع	۱۳۳	۱۱۸	۲۵۱

*$p = 0.009$ تفاوت معنی دار در مقایسه با افراد غیرسیگاری

معنی‌داری در شدت وابستگی به سیگار در بین سه گروه ژنوتیپی با متابولیسم طبیعی (۲/۱۷ ± ۳/۲۴)، متابولیسم متوسط (۲/۵ ± ۳/۳۶) و متابولیسم کند (۲/۴ ± ۴/۶) وجود نداشت. در تعداد نخ سیگار روزانه بین سه گروه ژنوتیپی با متابولیسم طبیعی (۸/۷ ± ۱۲/۷)، متابولیسم متوسط (۸/۶ ± ۱۱/۱۵) و متابولیسم کند (۲۲/۲ ± ۲۲/۴) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری در تعداد پاکت سیگار مصرفی در سال (پاکت/سال) بین سه گروه با متابولیسم طبیعی (۱۳/۸۶ ± ۱۳/۲۹)، متابولیسم متوسط (۸/۰۲ ± ۹/۵۷) و متابولیسم کند (۳۵/۷۵ ± ۲۷/۴۴) وجود نداشت. لیکن در سن مصرف اولین سیگار بین افراد سیگاری با فعالیت مختلف آنزیمی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (X^2 = ۶/۶۲، p < ۰/۰۵). بدین صورت که افراد در گروه کند متابولیزه کننده سن مصرف اولین سیگار (۳/۴۲ ± ۱۳/۲) بطور معنی‌داری پایین تراز سن افراد با متابولیسم طبیعی (۵/۹۴ ± ۱۹/۱) و متابولیسم متوسط (۵/۱۵ ± ۱۸/۸۸) بود (p< ۰/۰۵).

بحث

مطالعه کنونی اولین مطالعه‌ای است که به بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 با ریسک وابستگی به سیگار و رفتارهای ناشی از سیگار در جمعیت ایرانی می‌پردازد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ارتباطی بین ژنوتیپ و ریسک وابستگی به سیگار و سن مصرف اولین سیگار وجود دارد. ریسک وابستگی به سیگار در افراد دارای ژنوتیپ ایجاد کننده فعالیت آنزیمی متوسط در متابولیسم نیکوتین، بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ ایجاد کننده فعالیت آنزیمی طبیعی بود. همچنین در توافق با مطالعات قبلی [۳۲]، میانگین سن شروع اولین سیگار در افراد کند متابولیزه کننده، کمتر از متابولیزه کننده‌های طبیعی بود.

در این مطالعه در توافق با سایر مطالعات [۳۲] افراد سیگاری از سطح تحصیلات کمتری برخوردار بودند، بدین معنی که بیشترین درصد افراد با تحصیلات ابتدایی، سیگاری بودند در حالیکه بیشترین درصد افراد با تحصیلات دانشگاهی در گروه غیرسیگاری قرار داشتند.

میانگین سن افراد سیگاری در این مطالعه، برخلاف برخی از مطالعات قبلی [۳۲]، بالاتر از افراد غیرسیگاری بود. این مشاهده می‌تواند به دلیل انتخاب افراد غیرسیگاری در این مطالعه از بین دانشجویان که جوان هستند، باشد. در هر حال با توجه به اینکه در مطالعات قبلی نشان داده شده است که درمحدوده سنی ۲۲-۵۹ سال تفاوتی در فعالیت آنزیم یا کینتیک دفع نیکوتین وجود ندارد [۴۱]، و بیان شده که سن تاثیری در ارتباط بین فعالیت آنزیمی CYP2A6 و وضعیت وابستگی به سیگار ایجاد نمی‌کند [۲۲]. بنظر نمی‌رسد که این مسئله تاثیری در نتایج بدست آمده داشته باشد.

در این مطالعه نشان داده شد که ریسک وابستگی به سیگار در جمعیت ایرانی، در افراد دارای ژنوتیپ ایجاد کننده فعالیت آنزیمی متوسط در متابولیسم نیکوتین، بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ ایجاد کننده فعالیت آنزیمی طبیعی است. هر چند این نتیجه در توافق با نتایج برخی مطالعات در نژاد سفید می‌باشد [۱۵، ۳۲]، لیکن این یافته منطبق بر فرضیه اولیه ارائه شده نمی‌باشد، بدین معنی که نتایج بدست آمده قابل توجیه با کاهش یا نقص در فعالیت آنزیم نمی‌باشد. فرضیه ابتدایی چنین بیان می‌کند که میزان آلل‌های حذف یا با فعالیت آنزیمی کم، در افراد غیرسیگاری بیشتر است و این آلل‌های مغلوب افراد را در مقابل وابستگی به سیگار محافظت می‌کنند [۱۹، ۳۸]. در جمعیت‌های مختلف فرضیه بالا مورد بررسی قرار گرفته است و در برخی از

مطالعات نشان داده شده است که در گروه غیرسیگاری‌ها درصد افراد با فعالیت متابولیسمی کند بیشتر از افراد با فعالیت آنزیمی طبیعی بوده لیکن فعالیت متوسط آنزیم تاثیری در وضعیت سیگاری بودن افراد ایجاد نکرده است [۲۸، ۳۴]. اما در مطالعاتی نیز این فرضیه مورد تردید قرار گرفته است [۳۱، ۳۳، ۴۴]. بطور مثال در یک مطالعه مشخص شده است که هیچ کدام از آلل‌های با فعالیت آنزیمی کم، نه تنها فرد را در برابر وابستگی به سیگار محافظت نمی‌کند، بلکه داشتن ۱ یا ۲ کپی از آلل‌های فاقد فعالیت آنزیمی ریسک وابستگی به سیگار را افزایش می‌دهد [۲۲]. این نتیجه در توافق با نتیجه مطالعه کنونی در جمعیت ایرانی است که مشاهده شد، داشتن یک کپی از آلل با کاهش فعالیت آنزیمی ریسک وابستگی به سیگار را در جمعیت ایرانی ۲/۷ برابر افزایش می‌دهد. این مشاهده را می‌توان بدین شکل توضیح داد که فعالیت آنزیمی کاهش یافته CYP2A6 باعث تماس طولانی تر و/یا بالاتر نیکوتین با مغز می‌شود که این تماس می‌تواند باعث افزایش پروسه‌های نوروفیزیولوژیک مغزی منجر به وابستگی شود [۲۲]. از طرف دیگر قابل ذکر است که افرادی که در این مطالعه در گروه با فعالیت متوسط آنزیم قرار گرفته‌اند اکثرا دارای ژنوتیپ ۹*/۱ * بوده و نشان داده شده است که این ژنوتیپ اثر متوسطی در کلیرنس نیکوتین دارد [۳۲]، یعنی هم پوشانی زیادی در متابولیسم نیکوتین در افراد با این ژنوتیپ با افراد دارای ژنوتیپ ۱*/۱* (فعالیت طبیعی آنزیم) وجود دارد واحتمالا هم پوشانی فنوتیپی باعث شده است که درصد افراد با این ژنوتیپ در گروه سیگاری‌ها بیشتر باشد یا بعبارتی دیگر اثر آلل ۹ (کاهش فعالیت آنزیمی) در جلوگیری از سیگاری شدن مشاهده نشود. بنابراین این احتمال وجود دارد که فرکانس بالای آلل ۹ در جمعیت ایرانی همراه با با تاثیر آن در متابولیسم نیکوتین سهم بسزایی در نتایج بدست آمده در مطالعه کنونی داشته است.

تفاوت در نتایج این مطالعه با برخی از مطالعات قبلی در جمعیت‌های دیگر، می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد: اول اینکه مانند تمام مطالعات احتمال خطای نوع دوم آماری بایستی در نظر گرفته شود. بدلیل اینکه تعداد افراد کند متابولیزه کننده در این مطالعه کم بود این احتمال وجود دارد که خطای نوع دوم آماری اتفاق افتاده باشد. در صورت وجود یک ارتباط ضعیف بین ژنوتیپ با فعالیت کند آنزیم و رفتار سیگار کشیدن، احتمال تعیین این ارتباط با تعداد کم نمونه در گروه کند متابولیزه کننده ضعیف است. از طرف دیگر، بایستی خاطر نشان کرد که استفاده از تعداد نمونه‌های زیاد به منظور تعیین وجود یک ارتباط ضعیف، می‌تواند اهمیت کاربردی یافته‌ها را مورد سوال قرار دهد. در هر حال، جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش را، در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، می‌توان یک جمعیت آماری متوسط در نظر گرفت. در هرحال با توجه به اینکه در برخی از مطالعات دیگر نیز ارتباطی بین ژنوتیپ با رفتارهای ناشی از سیگار کشیدن مطابق با فرضیه اولیه یافت نشده است [۳۱، ۴۰] بنظر می‌رسد که این اختلاف در نتایج فقط به اندازه نمونه‌ها و قدرت آنالیز مربوط نمی‌باشد هر چند که پیشنهاد می‌شود نتایج مطالعه کنونی با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر تائید گردد.

از عللی که می‌تواند باعث اختلاف در نتایج بین مطالعات گوناگون شود تفاوت در جنبه‌های مختلف طراحی مطالعه می‌باشد مثلا تفاوت در تعریف افراد سیگاری، تفاوت در خصوصیات جمعیت مورد مطالعه (نسبت دو جنس مونث و مذکر، وضعیت روانی افراد، وابستگی و مصرف سایر مواد مثل الکل). یکی از تفاوت‌های مطالعه کنونی با سایر مطالعات این است که جمعیت مورد مطالعه فقط از مردان تشکیل شده است. علت انتخاب مردان برای مطالعه، از یک طرف بدلیل کم بودن شیوع مصرف سیگار در زنان ایرانی بود [۲] و از طرف دیگر بدلیل اینکه در برخی از مطالعات بر روی نژاد سفید پوست گزارش شده است که در زنان فعالیت آنزیم CYP2A6 و کلیرنس نیکوتین بیشتر از مردان است [۱۰، ۲۷، ۴۳]، بنابراین در تعبیر و تفسیر نتایجِ مطالعاتی که مربوط به نیکوتین می‌شود جنسیت افراد مورد مطالعه بایستی در نظر گرفته شود. جالب توجه است که در مطالعه‌ای که در کانادا بر روی جمعیت سفید پوست انجام گرفته است و تاثیر جنسیت بر روی ارتباط بین وابستگی به سیگار و ژنوتیپ با فعالیت کند آنزیم بررسی شده است، اینگونه گزارش شده است که نسبت کند متابولیزه کننده‌ها تا حدودی در زنان بیشتر از مردان است و این سبب شده است که ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ با فعالیت کند آنزیم و وابستگی به سیگار درزنان، ولی نه در مردان، دیده شود [۳۲]. بنابراین اگر فقط نتایج مربوط به مردان را در مطالعه فوق در نظر بگیریم نتایج آن مشابه با مطالعه کنونی می‌باشد که ارتباطی بین ژنوتیپ با فعالیت کند آنزیم و کاهش ریسک وابستگی به سیگار مشاهده نشد. بدون شک اینکه نسبت‌های متفاوت وجود

زنان و مردان در مطالعات مختلف تا چه حد در نتایج بدست آمده دخیل است نیاز به مطالعات با طراحی مناسب برای پاسخگویی به این سوال دارد.

از نقاط قوت مطالعه کنونی این است که هیچکدام از افراد مورد مطالعه وابستگی به الکل یا سایر مواد مخدر نداشتند و یا در حال استفاده از این مواد نبودند. در مطالعات قبلی افراد وابسته به الکل یا سایر مواد مخدر که خود می‌توانند رفتار سیگار کشیدن را تحت تاثیر قرار دهند در مطالعه شرکت داده شده اند. یک ارتباط قوی بین مصرف/وابستگی الکل و نیکوتین وجود دارد [۴]. همچنین مصرف زیاد الکل با کشیدن بیشترِ سیگار در ارتباط است [۴۲]. هر چند که در مطالعات قبلی وارد کردن اینگونه افراد در مطالعه را بدین صورت توجیه نموده‌اند که عواملی که باعث مصرف سیگار در افراد الکلی یا معتاد به سایر مواد می‌شود با بقیه افراد متفاوت است، ولی در هر حال ارزیابی تاثیر این عوامل در نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی مشکل است. لیکن در مطالعه کنونی اثرات مخدوش کننده احتمالی این عامل بر روی نتایج از بین رفته است.

از محدودیت‌های سایر مطالعات که می‌تواند نتایج را تحت تاثیر قرار دهد، وضعیت روانی افراد مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به اتیولوژی مشترک برخی بیماری‌های روانی و وابستگی به سیگار و اینکه شیوع وشدت وابستگی به سیگار در افراد مبتلا به بیماری‌های روانی بیشتر است [۲۹]، احتمال تاثیروضعیت روانی افراد بر روی نتایج مطالعات قبلی نمی‌تواند دور از ذهن باشد. در مطالعه کنونی با استفاده از تست روانی و گرفتن تاریخچه دارویی و پزشکی، افرادی را که سابقه بیماری‌های روانی داشتند یا در زمان انجام مطالعه دارای بیماری‌های روانی (اضطراب، افسردگی و سایکوز) بودند یا احتمال آن داده می‌شد، در مطالعه وارد نشدند. بنابراین، در مطالعه کنونی، بر خلاف مطالعات قبلی، سه عاملی که می‌تواند اثر مخدوش کننده در نتایج داشته باشند یعنی جنسیت، وابستگی به الکل یا سایر مواد و وضعیت روانی در جمعیت مورد مطالعه درنظر گرفته شده است. هر کدام از این عوامل ممکن است در مغایرت بین نتایج مطالعات مختلف تاثیرگذار باشد.

در این مطالعه در توافق با مطالعات قبلی، سن مصرف اولین سیگار در افراد کند متابولیزه کننده کمتر از افراد با متابولیسم طبیعی یا متوسط بود. در مطالعه کنونی، در افراد سیگاری با ژنوتیپ‌های متفاوت تفاوتی در میزان مصرف سیگار (تعداد نخ درروز و پاکت/سال) وجود نداشت. در بعضی از مطالعات مشاهده شده است که در میان افراد سیگاری، افراد کند متابولیزه کننده، به میزان معنی داری میزان مصرف سیگار کمتری نسبت به افراد با فعالیت آنزیم طبیعی دارند [۹، ۳۲] و این شاید به این دلیل باشد که افراد با متابولیسم نرمال، نیکوتین را با سرعت بیشتری متابولیزه می‌کنند و تیتر نیکوتین خون این افراد با سرعت بیشتری کاهش می‌یابد و این متابولیسم سریع تر با مصرف تعداد نخ بیشتر سیگار جبران می‌گردد [۲۰]. در مطالعه کنونی، چنین ارتباطی بین میزان مصرف سیگار و متابولیسم کند نیکوتین مشاهده نشد که شاید بدلیل کم بودن تعداد افراد سیگاری کند متابولیزه کننده در مقابل تعداد زیاد افراد سیگاری با فعالیت آنزیم طبیعی باشد. عامل دیگری که در میزان مصرف افراد سیگاری دخالت دارد، عمق پک به سیگار است. هر قدر عمق پک به سیگار بیشتر باشد میزان نیکوتین بیشتری فرد دریافت می‌کند و نیاز به مصرف تعداد کمتری نخ سیگار می‌باشد. مثلا در مطالعات قبلی مشخص شده است که افراد نژاد سیاه نسبت به افراد نژاد سفید، میزان نیکوتین بیشتری به ازای هر سیگار کسب می‌کنند [۳۵]. بنابراین با وجودی که در مطالعه کنونی تفاوتی در میزان مصرف سیگار بین گروه‌های ژنوتیپی مختلف وجود نداشت، این احتمال وجود دارد که افراد سیگاری با عمق پک متفاوت، سطح نیکوتین خود را تنظیم می‌کنند. مثلا، افراد با فعالیت آنزیم نرمال، عمق پک بیشتری در هر سیگار داشته باشند و میزان نیکوتین بیشتری از هر سیگار کسب کنند. از اندازه‌گیری سطح CO تنفسی (بازدم) بعنوان معیاری برای اندازه‌گیری عمق پک به سیگار استفاده می‌شود [۸]. لیکن از محدودیت‌های ما در این مطالعه این بود که وسیله اندازه‌گیری میزان CO تنفسی در اختیار نداشتیم تا بتوان از این نظرگروه‌های ژنوتیپی را بایکدیگر مقایسه نماییم.

بطور کلی، در این مطالعه مشخص شد که کثرت وقوع آلل ۹ از ژن CYP2A6 در جمعیت ایرانی بالا است و وجود این آلل، ریسک وابستگی به سیگار را در جمعیت ایرانی افزایش می‌دهد و مشاهده شد که سن شروع مصرف سیگار در افراد کند متابولیزه کننده، به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به افراد با فعالیت آنزیمی نرمال و متوسط کمتر است. این مطالعه اولین گزارش در مورد تاثیر پلی مرفیسم ژنتیکی CYP2A6 بر

وابستگی به سیگار و رفتارهـای ناشـی از آن در جمعیـت ایرانـی می‌باشد و یکی از ریسک فاکتورهای مهم ابتلا به وابسـتگی بـه سیگار را در جمعیت ایرانی (آلل ۹) آشکار می‌سازد. این یافتـه‌هـا می‌تواند اهمیت زیادی در کاربرد روش‌های مختلف ترک سیگار، بخصوص استفاده از چسب نیکوتین، در جمعیت ایرانی داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشـکی شیراز به خاطر پشتیبانی مالی ایـن تحقیـق، جنـاب آقـای دکتـر حسـن حـق‌شـناس (بخـش اعصـاب و روان و مرکـز تحقیقـات روانپزشکی- بیمارستان حافظ- شـیراز) بـه خـاطر همکـاری در ارزیابی روانی افراد مورد مطالعه، جناب آقای طباطبـایی (بخـش آمار- دانشکده بهداشت- شیراز) به خاط زحمات ایشان در انجام آنالیزهای آماری و پرسنل محترم مرکز انتقـال خـون شـیراز بـه خاطر همکاری در جمع آوری نمونه‌های خونی از افراد سـیگاری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Ahmadi J, Khalili H, Jooybar R, Namazi N, Mohammadagaei P, Prevalence of cigarette smoking in Iran. ***Psychol Rep*** 89 (2001) 339-41.

[2] American Psychiatric Association (APA), ***Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)*** (4th ed). Washington, DC: American Psychiatric Association press (1994).

[3] Batel P, Pessione F, Maitre C, Rueff B, Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. ***Addiction*** 90 (1995) 977-980.

[4] Benowitz NL, Jacob III P, Nicotine renal excretion rate influences nicotine intake during cigarette smoking. ***J Pharmacol Exp Ther*** 234 (1985) 153-155.

[5] Benowitz NL, Jacob III P, Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. ***Clin Pharm Ther*** 56 (1994) 483-493.

[6] [6] Benowitz NL, Zevin S & Jacob PIII, Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. ***J Pharmacol Exp Ther*** 287 (1998) 958-962.

[7] Benowitz NL, Jacob III P, Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. ***Clin Pharmacol Ther*** 67 (2000) 653-659.

[8] Benowitz NL, Pérez-Stable EJ, Herrera B, Jacobs-jnci P, Slower metabolism and reduced intake of nicotine from cigarette smoking in Chinese-Americans. ***J Natl Cancer Inst*** 94 (2002) 108-115.

[9] Benowitz NL, Lessov-Schlaggar C, Jacob-jnci P, Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. ***Clin Pharmacol Ther*** 79 (2006) 480-488.

[10] Carabello RS, Giovino GA, Pechacek TF, Racial and ethnic differences in serum cotinine levels of cigarette smokers. ***JAMA*** 280 (1998) 135-139.

[11] Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R, Genetic influence on smoking – a study of male twins. ***N Engl J Med*** 327 (1992) 829-833.

[12] Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerstrom K-O, The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. ***Brit J Addict*** 86 (1991) 1119-1127

[13] Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR. Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. ***J Pharmacol Exp Ther*** 234 (1985)1-12.

[14] Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF, Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. ***Clin Pharmacol Ther*** 77 (2005) 145-158.

[15] Messina ES, Tyndale RF & Sellers EM, A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. ***J Pharmacol Exp Ther*** 282 (1997) 1608-1614.

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

[17] McMurruw M, Foxx R, Nicotine's role in smoking: an analysis of nicotine regulation. ***Psychol Bull*** 93 (1983) 302-307.

[18] Mwenifumbo J, Meyers M, Wall T, Lin S, Sellers EM, Tyndale RF, Ethnic variation in CYP2A6*7 , CYP2A6*8 and CYP2A6*10 as assessed with a novel haplotyping method. ***Pharmacogent Genom*** 15 (2005) 189-192.

[19] Mwenifumbo J, Sellers EM, Tyndale RF, Nicotine metabolism and CYP2A6 activity in a population of black African descent: Impact of gender and light smoking. ***Drug Alcohol Depend*** 89 (2007) 24-33.

behavior. ***Behavior Genetics*** 29 (1999) 257-261.

[31] Schoedel A, Hoffmann B, Rao Y, Sellers EM, Tyndale RF, Ethnic Variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. ***Pharmacogenetics*** 14 (2004) 615-626.

[32] Schulz T, Ruhnau P, Muller M, Bunger J, Elliehausen H, Hallier E, Lack of correlation between CYP2A6 genotype and smoking habits. ***Arch Pharmacol*** 363 (Supplement) (2001) 657.

[33] Sellers EM, Kaplan H, Tyndale RF, Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. ***Clin Pharmacol Ther*** 68 (2000) 35-43.

[34] Swan G, Benowitz N, Lessov Ch, Jacob III P, Tyndale R, Wilhelmson K, Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence. ***Pharmacogenet Genom*** 15 (2005) 115-125.

[35] True WR, Heath AC, Scherrer JF, Waterman B, Goldberg J, Lin N, Eisen S, Lyons M, Tsuang M, Genetic and environmental contributions to smoking. ***Addiction*** 92 (1997) 423-431.

[36] True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Bucholz KK, Heath AC, Eisen S, Lyons M, Goldberg J, Tsuang M, Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. ***Arch Gen Psychiat*** 56 (1999) 655-661.

[37] Tyndale RF, Sellers EM, Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. ***Ther Drug Monit*** 24 (2002) 163-171.

[38] URL CYP allele nomenclature committee. http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2a6.htm; accessed date 15 Jan 2008

[39] Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G, CYP2A6 genetic polymorphism and correlation with smoking status in Brazilians. ***Pharmacogenom J*** 5 (2005) 42-48.

[40] Wynne G, Drug metabolism and ageing. ***J Br Menopause Soc*** 11 (2005) 51-56.

[41] Zacny JP, Behavioral aspect of alcohol-tobacco interactions. ***Recent Dev Alcohol*** 80 (1990) 205-219

[42] Zeman M, Hiraki L, Sellers E, Gender differences in tobacco smoking : higher relative exposure to smoke than nicotine in women. ***J Women Health Gend Based Med*** 11 (2002) 147-153.

[20] Nakajama M, Fukami T, Yamanaka H, Higashi E, Sakai H, Yoshida R, Kwon J, McLeod H, Yokoi T, Comprehensive evaluation of variability in nicotine metabolism and CYP2A6 polymorphic alleles in four ethnic populations. ***Clin Pharmacol Ther*** 80 (2006) 282-297.

[21] O'Loughlin J, Paradis G, Kim W, DiFranza J, Meshefedjian G, McMillan-Davey E, Wong S, Hanley J, Tyndale R, Genetically decreased CYP2A6 and the risk of tobacco dependence: a prospective study of novice smokers. ***Tob Control*** 13 (2004) 422-428.

[22] Oscarson M, Gullsten H, Rautio A, Bernal M, Sinues B, Dahl M, Stengard J, Pelkonen O, Raunio H, Ingelman-sundberg M, Genotyping of human cytochrom P450 2A6 (CYP2A6) a nicotine C-oxidase. ***FEBS Letters*** 438 (1998) 201-215.

[23] Oscarson M, McLellan RA, Asp V, Ledesma M, Bernal Ruiz ML, Sinues B, Rautio A, Ingelman-Sundberg M, Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6*12) that causes reduced CYP2A6 activity. ***Hum Mutat*** 20 (2002) 275–283.

[24] Perez-Stable EJ, Herrera B, Jacobs IIIP, Benowitz NL, Nicotine metabolism and intake in black and white smokers. ***JAMA*** 280 (1998)152-156.

[25] Pianezza M, Sellesrs EM, Tyndale RF, Nicotine metabolism defect reduces smoking. ***Nature*** 393 (1998) 750.

[26] Prather R, Tu T, Rolf C, Gorsline J, Nicotine pharmacokinetic of Nicoderm (nicotine transdermal system) in woman and obese men compared with normal-sized men. ***J Clin Pharmacol*** 33 (1993) 644-649.

[27] Rao Y, Hoffmann E, Zia M, Bodin L, Zeman M, Sellers EM, Tyndale RF, Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping and in vivo effects on smoking. ***Mol Pharmacol*** 58 (2000) 747-755.

[28] Reese TJ, Benowitz NL, Therapeutics for nicotine addiction. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, Eds ***Neuropsychopharmacology*** 5th ed. Philadelphia: Lippincott Willliams & Wilkins, 2002, p. 1533-1543.

[29] Russell M, Nicotine intake and its regulation by smokers, In: Martin ed. ***Advances in behavioral biology –tobacco, smoking and nicotine***. Plenum, New York, 1987, p. 25-50.

[30] Sabol S, Hamer D, An improve assay shows no association between the CYP2A6 gene and cigarette smoking

[43] Zhang X, Ammemo K, Ameno S, Iwahashi K, Kinoshita H, Kobuta T, Mostafa J, Ijiri I, Lack of association between smoking and CYP2A6 gene polymorphism in a Japanese population. ***Nihon Arukoru Yakobutsu Igakki Zasshi*** 36 (2001) 486-490.