



A COMT Val158Met polimorfizmus (rs4680) és a nikotin dependencia

Csép Katalin, Árgyó Nóra, Fejér Enikő, Bănescu Claudia, Todoran Butilă Anamaria

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Genetika Tanszék

Polimorfizmus COMT - Val158Met (rs4680) și dependența la nicotină

Prin eliberarea dopaminei fumatul produce dependență la nicotină. Toate genele ale căror produse intervin în metabolizarea dopaminei sunt candidate pentru dezvoltarea dependenței. rs4680 este un polimorfism funcțional al genei COMT (catechol-O-metil-transferază), care determină apariția a două alele cu produs genic diferit din punct de vedere funcțional: o enzimă cu activitate crescută Val158 (H-high, G1497) respectiv redusă Met158 (L-low, A1497). Deși rezultatele sunt contradictorii, s-a presupus că purtătorii polimorfismului prezintă un risc crescut de a dezvolta dependență. Totodată există diferențe populaționale importante, iar pe baza literaturii de specialitate accesibilă la populația autohtonă nu au fost publicate studii în acest sens. În cadrul unui studiu caz-control am analizat polimorfismul rs4680 prin metoda PCR-RFLP utilizând Nla III în relație cu trăsăturile dependenței la nicotină estimată prin sistemele NDSS, HSI și FNDS adaptate pentru populația locală la 147 fumători și 109 nefumători. Deși riscul calculat pentru dezvoltarea fumatului apreciat prin OR (odds ratio) în cazul GG vs AA a fost de 1,91 (CI95%: 0,5-5,2, $p > 0,05$), iar în cazul GG vs GA+AA de 1,51 (CI95%: 0,5-4,3, $p > 0,05$), scorul global al dependenței la nicotină respectiv componentele dependenței apreciate prin NDSS - și anume impulsul și prioritatea - au prezentat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în funcție de genotip ($p = 0,03$). Pe baza acestor date se pare că rs4680 nu este un factor de risc important pentru dezvoltarea fumatului, însă influențează dependența la nicotină, iar studii suplimentare ar putea avea implicații directe asupra intervențiilor personalizate eficiente.

Cuvinte cheie: : dependență la nicotină, polimorfismul genei COMT

A dohányzás magas morbiditással és mortalitással társuló közegészségügyi probléma. A kancerogén hatáson

The COMT - Val158Met polymorphism (rs4680) and nicotine dependence

By dopamine release, nicotine reinforces continued use, so genes encoding enzymes responsible for dopamine metabolism are candidates for dependence. rs4680 is a functional polymorphism of COMT (catechol-O-methyl-transferase), determining a high activity Val158 (H, G1497) and low activity Met158 (L, A1497) variant. Though results found have been contradictory, it has been suggested that Val158 carriers are at increased risk to develop addiction. There are differences between the populations, and to our best knowledge no study in the local population has been carried out in this respect. In a case-control study we analyzed rs4680 by PCR-RFLP using Nla III in association with the characteristics of nicotine dependence estimated by NDSS, HSI and FNDS adapted for the local population in 147 smokers and 109 non-smokers. Though genotype associated risk for smoking was not statistically significant (GG vs AA: OR = 1.96, CI95%: 0.5-5.2, $p > 0.05$; GG vs GA+AA: 1.54, CI95%: 0.5-4.3, $p > 0.05$), the overall scores of dependence and its certain components, namely drive and priority, showed significant differences across the genotypes ($p < 0.05$). In conclusion, COMT appears as a risk modifier involved in the development of nicotine dependence rather than a susceptibility gene for the development of smoking. Further investigations in this respect could have direct practical importance in increasing the efficacy of cessation attempts on an individual basis.

Keywords: nicotine dependence, COMT gene polymorphism.

kívül a nikotin függőség kialakulása jelenti a legnagyobb veszélyt. A nikotin dependencia magyarázza a dohányzók 70%-nál a sikertelen leszokást [10].

A dohányzás háttere multifaktoriális. A nikotin dependencia kialakulásában genetikai és környezeti tényezők játszanak szerepet. A nikotin a mezokortikolimbikus rendszer aktiválása révén dopamin felszabadítást ered-

Csép Katalin

540139 Marosvásárhely – Târgu Mureș

Gh. Marinescu utca 38.

E-mail: genetica.umftgmro@gmail.com

ményez, és úgy tartják, hogy ez játszik szerepet az agyi jutalmazás-megerősítés (reward-reinforcing) folyamatban, amely az ismételt és fokozott használatot erősíti, fenntartja. Mindezek alapján a dopamin anyagcserében szerepet játszó gének a nikotin dependencia kandidánsai. Közülük a legfontosabbnak a COMT (katekol-O-metil transzferáz) tűnik, amelynek Val158Met funkcionális polimorfizmusa (rs4680) az enzimaktivitás módosítása révén kockázati tényezőként szerepelhet a függőség kialakulásában [1, 3, 10, 16].

A helyi populációra is jellemző, fiatalok és nők körében egyaránt terjedő, komoly egészségügyi terhet okozó dohányzás sikeres prevenciójának illetve kezelésének kulcsa lehet az egyéni rizikófel mérés alapján történő personalizált beavatkozás. A rizikófel mérés valamint az ezt követő farmakogenetikai vizsgálatokból kiinduló egyénre szabott kezelés a genetikai háttér tisztázásán alapul [3, 4]. Ennek keretében, a jelen tanulmányt további érvekkel indokolták a COMT génnel kapcsolatos ellentmondásos publikációk, [14] a polimorfizmus populációs különbségei, valamint a hazai lakosság ezen irányú kivizsgálásának hiánya.

Anyag és módszer

A tanulmányban 147 dohányzó és volt-dohányos valamint 109 nem dohányzó személy vett részt Maros és Hargita megyéből, írott beleegyezésüket követően.

A dohányzás valamint nikotin dependencia illetve a függőség jellemvonásainak megítélésére a FNDS (Fagerström Nicotine Dependence Scale), HSI (Heaviness of Smoking Index) és NDSS (Nicotine Dependence Syndrome Scale) módszereket alkalmaztuk, a kérdőíveket a helyi populációnak megfelelően adaptálva, magyar és román nyelvre lefordítva [8, 9, 15].

A COMT polimorfizmus vizsgálatát PCR-RFLP analízissel végeztük, Whatman kártyára (Whatman FTA Elute Cards) levett, szobahőn megszárított valamint szállított kapilláris vérmintákból nyert DNS-ből. Az amplifikációhoz használt primerek nukleotid-szekvenciája 5'-TACTGTGGCTACTCAGCTGTGC-3' (fw) illetve 5'-GTGAACGTGGTGTGAACACC-3' (rev) (Eurogentec) volt, a reakció körülményei pedig 95° - 30 sec, 60° - 30 sec illetve 72° - 45 sec, 3 perces előzetes denaturációt követően, befejezéséig pedig 5 perc extenzióval. Az enzimatis hasítást Nla III - Hin III (Fermentas Life Sciences) restrikciós endonukléázzal

végeztük, majd a fragmentumok szétválasztására az elektroforézist 2%-os agaróz gélben végeztük.

Az eredmények statisztikai feldolgozásakor a Statistica 6.0 (Statistica version 6, StatSoft Inc., 2001) és GraphPad InStat 3 (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95), számítógépes programokat használtuk.

Eredmények

A vizsgálati csoportok demográfiai jellemzésének valamint dohányzási szokásainak adatait az **1.** és a **2. táblázat** tartalmazza.

A NDSS, HSI (≥ 2 - enyhe/mérsékelt dependencia) és FNDS ≤ 4 (mérsékelt dependencia) rendszerben számolt indexek az aktuális dohányzóknál enyhe/mérsékelt dependenciát mutattak -0,39, 2,8 illetve 3,38 medián értékekkel, a két nem között statisztikailag szignifikáns eltéréssel: a nikotin dependencia globális indexei minden esetben jelentősen erősebbnek bizonyultak férfiak esetében (NDSS -0,32/-0,48, FNDS 3.23/2.93, HSI 2.16/1.83; $p < 0,05$).

1.táblázat. A vizsgálati csoportok demográfiai jellemzése

	Dohányos (N=85)	Volt-dohányos (N=62)	Nem-dohányzó (N=109)	
Nem (férfi/nő, %)	52,2/ 47,8	54,8/ 45,2	50,4/49,6	
Életkor (év, átlag \pm SD)	37,8 \pm 9,3	39,2 \pm 9,7	35,2 \pm 10,1	
Végzettség (%)	alapfokú	12,9	14,5	6,42
	középfokú	71,8	74,2	54,09
	egyetemi	15,3	11,3	45,87
Havi jövedelem (RON, %)	< 700	12,9	14,3	7,33
	700- 1500	64,7	67,75	32,1
	1500- 3000	15,3	12,5	41,31
	> 3000	7,1	6,45	19,26
Lakhely (városi/falusi környezet, %)	84,7/ 15,3	83,9/ 16,1	94,5/5,5	
Családi állapot (%)	házas	68,2	87,1	80,74
	hajadon	31,8	12,9	19,26

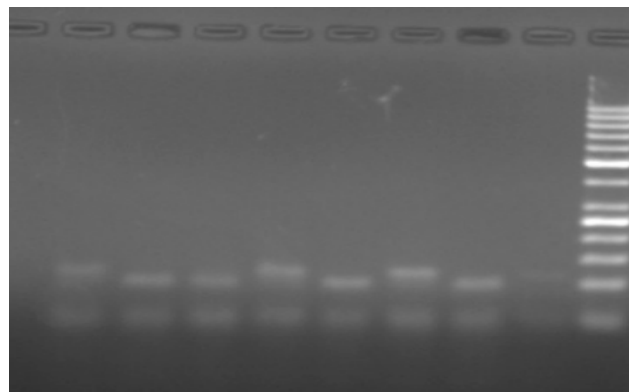
A COMT gén G1497A szubsztitúció okozta SNP (single nucleotide polymorphism) mutációja a Nla III restrikciós endonukleáz alkalmazásakor az A allél esetében 18+88+96 bp míg a G allél esetében 18+114 bp restrikciós fragmentumokat eredményezett. (**1. ábra**)

Az G – A allél-frekvencia a dohányos (jelenleg dohányzó és volt dohányos) és a nem-dohányzó vizsgálati csoportnál 53,1 – 46,9 illetve 44,4 – 55,6%, míg a GG – GA – AA genotípusok talált megoszlása 30,6 – 44,9 – 24,5 valamint 22,2 – 44,4 – 33, 3% volt.

2.táblázat. A dohányzási szokások jellemzése a vizsgálati csoportokban

	<i>Dohányosok</i>	<i>Volt dohányosok</i>	
<i>Életkor az első cigaretta elszívásakor (év, átlag ± SD)</i>	16,7 ± 3,2	16,5 ± 2,4	
<i>Naponta elszívott cigaretták száma (%)</i>	≤10	60,7	
	11–20	28,6	
	21-30	10,7	
	≥31	0	
<i>A dohányzás időtartama (%)</i>	≤6 hónap	3,6	
	6 hónap -1 év	0	
	1 - 5 év	28,6	
	5 -10 év	14,3	
<i>A dohányzás kiprobálásának oka (%)</i>	≥10 év	50	
	kíváncsiság	50,6	
	mások utánzása	14,1	
	lázadás	2,4	
	stressz	4,7	
<i>Nikotin pótlás kísérlete (%)</i>	unalom	2,4	
	barátok hatása	36,5	
	4,8	0	
	<i>Elvonási tünetek (%)</i>	ingerlékenység	31,8
		nyugtalanosság	35
testsúly gyarapodás		15,3	
<i>A rágyújtás elsődleges körülményei (%)</i>	reggel ébredés után	67	
	étkezés után	47	
	várakozás közben	26	
	társaságban	52	
	stresszhelyzetben	27	
	egész nap	14	
<i>Személyiség típus (%)</i>	betegség esetén is	1,2	
	nyugodt, kiegyensúlyozott	57,6	
	aggodalmaskodó, ideges	42,4	
<i>Egyéb szokások (%)</i>	kávé fogyasztás	80	
	alkohol fogyasztás	9,4	
	drog használat	0	

A dohányzás esetében számolt OR (odds ratio) GG illetve AA esetében 1,91 (CI95%: 0,5-5,2, p>0,05), míg GG és GA+AA esetén 1,51 (CI95%: 0,5-4,3, p>0,05).



1. ábra. A COMT Val158Met elektroforetikus képe néhány vizsgálati személynél Nla III enzimmel történő hasítást követően (1, 4, 6 – GA, 2, 3, 5, 7 – AA, 8 – GG; marker)

3.táblázat. A nikotin-dependencia jellemzői közötti különbségek a genotípus szerint (p – “one tailed”, Mann-Whitney U teszt)

	<i>Indíttatás</i>	<i>Sztereotípiá</i>	<i>Kontinuitás</i>	<i>Prioritás</i>	<i>Tolerancia</i>	<i>Globális index</i>
GG vs AA	0,02	0,08	0,4	0,02	0,3	0,03
GG vs GA+AA	0,04	0,19	0,12	0,04	0,24	0,03

A nikotin-dependencia globális indexei a genotípus szerint szignifikáns különbséget mutatnak: GG – AA illetve GG – GA+AA esetében 0,722 – 0,026 illetve 0,722 – 0,141 (p<0,05). Az NDSS rendszerrel megítélt nikotin-dependencia komponensei között észlelt különbségek mértékét a genotípus alapján a **3. táblázatban** bemutatott Mann-Whitney teszttel számított p értékek szemléltetik.

Megbeszélés

Iker és család vizsgálatok igazolják a genetikai tényezők szerepét a dohányzási függőség kialakulásában. A dohányzás mérsékelt heritabilitást mutat. A nikotin-dependencia genetikai hátterének vizsgálatok a nikotin receptorok valamint az anyagcsere - hatás kivitelezésében szerepet játszó molekulákat kódoló gének tekinthetők kandidánsnak

(CYP2A6, CYP2D6, 5-HT2A, COMT, DR stb.) [3, 11, 16] Ezen belül a dopaminerg rendszer az addiktív szerek használatának megerősítésében (reinforcing) betöltött szerepe miatt különös fontosságú [6, 7].

Az agyi jutalmazó hatás három rendszer (dopamin, GABA, endogén opioid) keretén belül valósul meg. Más dependenciát okozó szerekhez hasonlóan, a nikotin aktiválja a mezokortikolimbikus rendszert, amely dopamin felszabadulással jár, ez pedig az agyi jutalmazó-megerősítő (reward-reinforcing) hatás kialakításában jelentős szerepet játszik. A megszokás a dózis emelésével jár, az önadagolást az alacsony felezési idő mellett az enzim indukció tovább fokozza. A dohányzás elhagyása – a nikotin megvonása elvonási tünetekkel jár [10].

A folyamat lépései illetve a rendszer részei a dopamin szintézis a dopaminerg neuronokban (TH – tirozin hidroxiláz), a dopamin felszabadulás a pre-szinaptikus neuronokból, a poszt-szinaptikus neuronok receptora-inak (DRD1-5) aktiválása, a dopamin pre-szinaptikus neuronok által történő újrafvétele (DAT – dopamin transzporter) és a felszabadult dopamin metabolizációja (DBH – dopamin beta-hidroxiláz, MAO – monoamin-oxidáz, COMT – katekol-O-metil transzferáz) [10].

A COMT Mg^{2+} dependens enzim amely a katekolaminok (dopamin, adrenalin, noradrenalin) lebontásában illetve inaktivációjában játszik szerepet, modulálva a dopaminerg neurotranszmissziót úgy a prefrontális kortextben, mind a mezolimbikus jutalmazási rendszerben. Hatása pleiotrop, befolyásolja a kognitív funkciók kivitelezését, érzelmi folyamatokat, magatartás formákat, és számos betegség kialakulását (skizofrénia, bipoláris pszichózis, emlő illetve méh-daganat stb.) [6, 7].

A 22q11.21 lokalizációjú COMT gén 6 exonnal rendelkezik. Két promoterral működik, az alternatív transzkripció iniciáció két forma - a rövid, citoplazmában található, szolubilis (soluble; S-COMT, 221 aminosav) és a membránhoz kötött, hosszú (membrane-bound ; MB-COMT, 271 aminosav) izoenzim megjelenését eredményezi. MB-COMT elsősorban az agyban található, míg a S-COMT a vérben és a különböző szervekben. A MB-COMT szubsztrát-affinitása magasabb, katalitikus aktivitása azonban alacsonyabb az S-COMT formához viszonyítva. A COMT leginkább tanulmányozott és jellemzett gyakori polimorfizmusa a funkcionális rs4680. A 4. exonban található tranzíció jellegű szubsztitúció (G→A) aminosav cseréhez vezet, a két izoenzimnek megfelelően különböző pozícióban (Val158Met - MB-COMT illetve Val108Met - S-COMT). A funkcionális polimorfizmus

következtében eltérő enzimaktivitás jelentkezik. Így a Val158 aktívabb (high activity allele; H) mint a Met158 (low activity allele; L): a stabilabb H allél géntermék a dopamint 3-4-szer erősebben metabolizálja [1, 3, 4, 5].

Az A/Met hordozóit "worrier" - aggódó személyeknek tartják: az alacsony enzimaktivitás magasabb dopamin szinttel jár, alacsonyabb fájdalom-küszöb, jobb memória és figyelem-összpontosítás jellemző. Ezzel szemben a G/Val homozigótákat "warrior", harcos alkatnak tartják: a magas COMT aktivitás alacsonyabb prefrontális dopamin szinttel jár, így a fájdalom küszöb magasabb, a stressz tolerancia jobb, ám a kognitív teljesítmények gyengébbek. A nikotin a dopamin felszabadulást segíti elő, így a H allélt hordozó dohányzóknál az alacsonyabb dopamin szint és eltérően érzékelt agyi jutalmazási folyamat hozzájárulhat a dependencia kialakulásához [7, 12].

Számos tanulmányban követték az rs4680 és dohányzás valamint nikotin-dependencia közötti összefüggést, ám eltérő eredményeket találtak: egyeseknek az összefüggést nem sikerült igazolniuk [6, 7, 12], míg mások jelentős társulást találtak a gén-változat illetve GG genotípus és a dohányzás kialakulása, a nikotin-dependencia valamint a dohányzás elhagyásának sikertelensége között [1, 2, 3, 5, 13]. Eredményeink az első csoportot erősítik, azaz a vizsgált populációnál a COMT nem tűnik a dohányzás kialakításában jelentős kockázati tényezőnek. Megjegyzendő azonban, hogy a feltételezett minor génhatás miatt a kisszámú vizsgálati személy a kapott eredmény értékét korlátozza, és egyértelmű következtetések levonása végett indokolt a tanulmány kiterjesztése. Ugyanakkor a jelentősnek vélt populációs különbségek miatt szükséges a vizsgálatok reprodukciója változó népcsoportoknál, és tanulmányunk elvégzésekor a hazai populációnál a rendelkezésünkre álló szakirodalomban sem allél frekvencia adatokat, sem ilyen irányú vizsgálatokat nem találtunk.

Noha az alacsony enzimaktivitás dominánsnak tekintett, és egyes szerzők ajánlása alapján a számítások alkalmasával az AA és GA homo- és heterozigóta esetek együtt kezelhetők, valójában a heterozigóták enzim-aktivitása átmeneti értéket mutat a domináns és recesszív homozigótákhoz viszonyítva, tehát intermedier öröklődésről van szó. Ezt megpróbáltuk számításaink során figyelembe venni, ám a viszonylag alacsony esetszám valamint a csekély gén-hatás esetében, és a ritka GG genotípus az eredmények óvatos interpretálását indokolja.

Az NDSS módszer kivitelezése bonyolultabb ugyan, ám a legalkalmasabb a dependencia megítélésre, hiszen a függőség különböző összetevőinek tanulmányozá-

sára is megfelel. Mindhárom rendszer alapján a nikotin dependencia kifejezettebbnek bizonyult férfiaknál, az alacsony illetve átlagon felüli jövedelemmel rendelkezők esetében, amely vélhetően a kifejezettebb stresszel társuló életmóddal magyarázható. A genotípusos összefüggések tanulmányozásakor a férfiak és nők egyazon csoportban történő kezelése azonban emiatt az eredmények értelmezésekor problémát jelenthet. Bár a dohányzás kialakulása szempontjából az rs4680 nem tűnik kockázati génnek, a nikotin-dependenciára, különösen annak bizonyos komponenseire a polimorfizmus jelentős hatással van. Így a dohányzóknál a genotípus alapján a nikotin-dependencia globális indexe jelentősen magasabb a GG genotípus esetében. Ugyanakkor a dependencia egyes komponensei nem egyformán különböznek, így statisztikailag szignifikáns eltérés csak az impulzus – indíttatás és prioritás esetében volt kimutatható, ami azonban a dopaminerg hatással összhangban van.

Úgy tűnik a Val/Val személyek számára fokozottab kihívást jelent az absztinencia, és részben a COMT polimorfizmus magyarázhatja a leszokási kísérletek sikerességét [2, 3]. A tanulmányban vizsgált dohányzók mintegy 2/3-a szeretne a dohányzásról leszokni. Noha még nem képezik a gyakorlat részét, a közeljövőben várható farmakogenetikai vizsgálati lehetőségekre számítva, felmértük hogyan viszonyul ezekhez a hazai populáció, egyelőre különösebb felkészítés hiányában. A tanulmányban résztvevő dohányzók 60%-a hajlandó lenne olyan genetikai analízis elvégzésére, amely a leszokás sikerességének örökletes komponenseit vizsgálná; a dohányzók ¼ állította, hogy ezért akár fizetne is. A leszokás sikerességének gyakori oka a dohányzás elhagyásával járó testsúly emelkedés (39,3%, elsősorban nőknél) valamint az ingerlékenység (az esetek 1/3-ában) volt. A dohányzás fennállása a családban vélhetően mind az öröklött genetikai és a közös környezeti hatás - szokások következtében fokozottan kedvezőtlen hatással van a leszokás sikerességére. Az egyénre jellemző hajlamosító – kockázati tényezők felismerése képezheti az alapját a perszonalizált hatékony beavatkozásoknak, így a genotípus alapján megválasztott terápiának.

Következtetések

A dohányzás illetve nikotin dependencia komplex multifaktorális - genetikai és környezeti tényezők - által meghatározott jelenség. A hazai populációnál a COMT

gén Val158Met polimorfizmusa nem tűnik a dohányzás kialakulása szempontjából jelentős kockázati tényezőnek, ám a nikotin dependencia modulátorának bizonyul, elsősorban a függőség impulzus - indíttatás és prioritás komponenseit súlyosbítva.

Irodalom

1. Beuten J., Payne T.J., Ma J.Z. et al. - Significant association of catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes with nicotine dependence in male and female smokers of two ethnic populations, *Neuropsychopharmacology*, 2006;31(3):675-84.
2. Breitling L.P., Dahmen N., Illig T., Rujescu D. et al. - Variants in COMT and spontaneous smoking cessation: retrospective cohort analysis of 925 cessation events. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(8):657-9.
3. David S.P., Munafò M.R. - Genetic variation in the dopamine pathway and smoking cessation, *Pharmacogenomics*, 2008;9(9):1307-21.
4. David S.P., Strong D.R., Leventhal A.M. et al. - Influence of a dopamine pathway additive genetic efficacy score on smoking cessation: results from two randomized clinical trials of bupropion, *Addiction*, 2013;108(12):2202-11.
5. Gordana N., Matea N., Fran B. et al. - Association study of a functional catechol-o methyltransferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects, *Neuroscience Letters*, 2010, 473: 216-219.
6. Guo S., Chen da F., Zhou D.F. et al. - Association of functional catechol-O-methyltransferase (COMT)Val108Met polymorphism with smoking severity and age of smoking initiation in Chinese male smokers, *Psychopharmacology (Berl.)*, 2007, 190: 449-456.
7. Greenbaum L., Kanyas K.S., Rigbi A. et al. - Why do young women smoke? VII COMT as a risk modifying gene for Nicotine dependence - role of gene-gene interaction, personality, and environmental factors, *Hum Psychopharmacol*, 2010;25(7-8):536-42.
8. Heatherton T.F., Kozlowski L.T., Frecker R.C. et al. - The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: A revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire, *British Journal of Addictions*, 1991, 86: 1119-1127.
9. Heatherton T.F., Kozlowski L., Frecker R.C. et al. - Measuring the heaviness of smoking: using self-reported time to the first cigarette of the day and number of cigarettes smoked per day, *British Journal of Addiction*, 1989, 84: 791-799.
10. Kincses Ajtay M. - Kábítószeres. Szenvedélybetegségek, Studium Alapítvány Kiadó, Marosvásárhely, 2006, 307-313.
11. Meredith S.S., Han Y.H., Sandra C.H. et al. - A community based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-A), *Preventive Medicine*, 2008, 47: 116-122.
12. Mutschler J., Abbruzzese E., von der Goltz C. et al. - Lack of association of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism with risk of tobacco smoking: results from a multicenter case-control study, *Nicotine Tob Res*, 2013;15(7):1322-7.

13. Nedic G., Nikolac M., Borovecki F. et al. - Association study of a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects. *Neurosci Lett.* 2010 12;473(3):216-9.
14. Redden D.T., Shields P.G., Epstein L. et al. - Catechol-O-methyl-transferase functional polymorphism and nicotine dependence: an evaluation of nonreplicated results, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005;14(6):1384-9.
15. Shiffman S., Waters A.J., Hickcox M. - The Nicotine Dependence Syndrome Scale: A multi-dimensional measure of nicotine dependence, *Nicotine and Tobacco Research*, 2004, 6: 327-348.
16. Vikas B., Ashwin A.P., Wade H.B. et al. - The Genetic Determinants of Smoking, *Chest*, 2003, 123: 1730-1739.