

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.89-008.441.44-055.1/.2(045)

Для корреспонденции

Зайнуллина Айгуль Галиевна – кандидат медицинских наук,
научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики
человека Учреждения РАН «Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН»
Адрес: 455054, г. Уфа, пр. Октября, д. 71
Телефон: (347) 235-60-88
E-mail: zainullina@bk.ru

З.Л. Халилова, А.Г. Зайнуллина, Д.А. Гайсина, Э.К. Хуснутдинова

Анализ ассоциаций гаплотипов гена триптофангидроксилазы 1 с суицидальным поведением

Analysis of association
between haplotype
tryptophan hydroxylase 1
gene and suicidal behavior

Z.L. Khalilova, A.G. Zaynullina,
D.A. Gaysina, E.K. Khusnutdinova

The tryptophan hydroxylase (TPH1) gene is a major candidate gene for suicidal behavior. Association of TPH1 gene haplotypes with suicidal behavior was analyzed using the PCR/RFLP method in groups of individuals who committed suicide attempts (96 men and 198 women) and healthy donors (233 men and 226 women). Study results suggest an association between the TPH1 gene and suicidal behavior.

Key words: suicidal behavior, gene, tryptophan hydroxylase, polymorphic loci, haplotypes

Учреждение РАН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН»
Institute of Biochemistry and Genetics at the Ufa Research Centre under the Russian Academy of Sciences

Ген триптофангидроксилазы 1 (TPH1) является одним из основных генов-кандидатов суицидального поведения. В группах индивидов, совершивших попытки самоубийства (96 мужчин и 198 женщин), и здоровых доноров (233 мужчин и 226 женщин) методом ПЦР/ПДРФ проведен анализ ассоциаций гаплотипов гена TPH1 с суицидальным поведением. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об ассоциации гена TPH1 с суицидальным поведением.

Ключевые слова: суицидальное поведение, триптофангидроксилаза, ген, полиморфные локусы, гаплотипы

Фермент триптофангидроксилаза (TPH) является лимитирующим ферментом биосинтеза серотонина [7]. Серотонинергическая система вовлечена в формирование различных типов социального поведения (пищевого, полового, агрессивного) и депрессии. Ее дисфункция может привести к развитию различных психических расстройств, таких, как депрессивные расстройства, импульсивность, вспыльчивость и агрессия [4, 5, 16]. Результаты исследований многих авторов свидетельствуют о том, что у пациентов с психическими заболеваниями снижение уровня основного метаболита серотонина – 5-гидроксииндолилуксусной кислоты – в спинномозговой жидкости коррелирует с наличием в анамнезе попыток суицида и с высоким риском его развития в дальнейшем [18, 22].

Фермент триптофангидроксилаза катализирует окисление триптофана в 5-гидроксириптофан, предшественник нейромедиатора серотонина (5-НТ). Таким образом, ген, кодирующий фермент TPH, отвечает за уровень 5-НТ в синаптической мембране и является одним из основных кандидатов в исследованиях, связанных с суицидальным поведением (СП) [5]. В настоящее время выявлены 2 изоформы фермента TPH – TPH1 и TPH2. По аминокислотному составу они гомологичны на 71% [10, 12, 26].

Однако в настоящее время большая часть исследований генов *TRH* приходится на долю гена *TRH1*. Ген, кодирующий фермент *TRH1*, локализован на хромосоме 11p15.3-p14, занимает область в 29 Kb и состоит из 11 экзонов. Существуют данные о дифференциальной экспрессии гена *TRH1* в зависимости от половой принадлежности [23], что объясняется влиянием половых гормонов на уровень транскрипции гена *TRH1* (в частности, прием эстрогена увеличивает концентрацию мРНК гена *TRH1* в дорсальном шве мозга у макак [4]).

Данные литературы показывают ассоциацию полиморфных локусов гена *TRH1* с СП в различных популяциях мира. Однако ряд авторов указывает на отсутствие такой взаимосвязи [1, 3, 13, 14, 20, 21]. Противоречивость результатов, полученных в разных группах исследователей, возможно, обусловлена существованием половых и этнических различий, влиянием факторов окружающей среды, а также недостаточно большим размером выборок в отдельных исследованиях.

В настоящее время актуально проведение анализа ассоциаций гаплотипов с риском возникновения суицидального поведения. Анализ гаплотипов – подход, который позволяет проводить комплексное изучение гена на основе аллелей локусов, локализованных в пределах гена и *cis*-регуляторных элементов.

Целью исследования стал анализ ассоциаций гаплотипов, состоящих из четырех полиморфных маркеров rs1800532 (218A>C), rs4537731 (-6526A>G), rs211105 (2202G>T) и rs7933505 (1135A>G) гена *TRH1*, с суицидальным поведением.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 294 индивида (96 мужчин и 198 женщин) в возрасте 31,84±14,79 года, совершивших попытки самоубийства и находящиеся в момент забора крови в реанимационном отделении больницы № 21 г. Уфы (табл. 1).

Контрольную группу составили 459 здоровых донора (233 мужчин и 226 женщин) той же возрастной группы (средний возраст 30,0±10,0 года), не состоявшие на учете у психиатра и отрицавшие наличие у себя наследственной отягощенности по психическим заболеваниям.

От всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании после ознакомления с процедурой эксперимента. Данное исследование было одобрено локальным биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Выделение ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови [17]. Амплификацию четырех полиморфных локусов гена *TRH1* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Для определения

Таблица 1. Некоторые характеристики лиц, совершивших попытки суицида

Характеристика	Группа лиц с СП	
	абс.	%
Объем выборки:		
мужчин	96	33
женщин	198	67
Способ совершения попыток суицида:		
отравление	239	81,3
вскрытие вен	25	8,5
падение с высоты	18	6,1
асфиксия	12	4,1
Случаи повторных попыток суицида	41	13,9
Наследственная отягощенность анамнеза	16	5,8
Отягощенность психическими расстройствами	38	13
В том числе:		
алкоголизм, наркомания	12	4,1
шизофрения	11	3,7
ЧМТ	8	2,7
неврозы	5	1,7
другие	4	1,3

нуклеотидных замен проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей эндонуклеазой рестрикции [25]. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции выполняли с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле. После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Гаплотипический анализ проведен с использованием программы UNPHASED [8]. Редкие гаплотипы (с частотой меньше 2%) были исключены из анализа ассоциаций. Анализ неравновесия по сцеплению между локусами попарно проведен с использованием программы HAPLOVIEW 4.0. [2]. Для расчета мощности выборки использовалась программа PS [9].

Показатель относительного риска (OR, odds ratio) и соответствующий 95%-ный доверительный интервал рассчитывали в программе SISA Tables (<http://www.quantitativeskills.com>).

Результаты и обсуждение

Наиболее исследуемым в гене *TRH1* является полиморфный локус rs1800532, расположенный в 7-м интроне и вовлеченный в процессы сплайсинга, трансляции или стабильности мРНК [11]. Другой полиморфный маркер rs4537731, расположенный в промоторной области гена *TRH1*, способен влиять на трансляцию гена *TRH1* [19]. Полиморфные маркеры rs211105 (во 2-м интроне) и rs7933505 (в 7-м интроне) гена *TRH1* изучены мало.

Результаты настоящего исследования представлены в табл. 2.

Анализ неравновесия по сцеплению в гене *TRH1* показал наличие сцепления между всеми четырьмя локусами попарно (значения D' варьируют от 0,572 до 0,861).

Таблица 2. Распределение частот гаплотипов полиморфных маркеров rs7933505-rs1800532-rs211105-rs4533771 гена *TPH1* в изученных группах

Гаплотип	Общая группа			Мужчины			Женщины		
	контроль, %	СП, %	χ^2 (<i>p</i>)	контроль, %	СП, %	χ^2 (<i>p</i>)	контроль, %	СП, %	χ^2 (<i>p</i>)
A-A-T-A	39,0	35,0	2,07 (NS)	41,0	35,0	0,49 (NS)	38,0	31,0	1,50 (NS)
A-A-T-G	3,3	7,7	6,32 (0,012)	2,6	7,9	3,04 (0,08)	4,0	8,0	3,73 (0,053)
A-C-T-A	4,2	4,3	0,32 (NS)	7,0	2,6	2,10 (NS)	3,0	5,0	4,81 (NS)
A-C-T-G	1,3	3,6	6,39 (0,011)	2,0	4,6	1,24 (NS)	NA	NA	NA
G-A-T-A	1,1	2,2	1,10 (NS)	2,3	4,5	1,25 (NS)	NA	NA	NA
G-C-G-A	4,2	3,4	1,05 (NS)	3,0	1,8	1,08 (NS)	5,0	4,0	0,51 (NS)
G-C-G-G	17,0	12,2	1,70 (NS)	16,0	15,0	0,001 (NS)	17,0	11,0	2,76 (NS)
G-C-T-G	15,7	16,4	0,48 (NS)	10,0	17,0	1,08 (NS)	19,0	16,0	2,44 (NS)
G-C-T-G	11,6	11,0	0,01 (NS)	10,0	7,0	0,01 (NS)	13,0	12,0	0,0001 (NS)

Примечание. NS – not significant (недостовверные различия); NA – not applicable (не включен в анализ).

Сравнительный анализ распределения частот гаплотипов между общими группами больных с СП и контрольной выборкой показал статистически значимое различие, близкое к достоверному ($p=0,057$), обусловленное высокими частотами встречаемости гаплотипов *TPH1* A-A-T-G (7,7 против 3,3%; $p=0,012$; OR=2,51; 95%CI 1,23–5,16) и *TPH1* A-C-T-G (3,6 против 1,3%; $p=0,011$; OR=2,94; 95%CI 0,99–9,01) по сравнению с таковыми в контроле.

Частота гаплотипа *TPH1* A-A-T-G в подгруппах мужчин и женщин с СП также наблюдалась с более высокой частотой, чем в контрольных выборках мужчин (7,9 против 2,6%; $p=0,080$) и женщин (8 против 4%; $p=0,053$).

Таким образом, наличие гаплотипов *TPH1* A-A-T-G и *TPH1* A-C-T-G повышает риск суицидального поведения в обследованной группе лиц. Относительный риск (OR) развития СП составил 2,51 и 2,94 соответственно.

В литературе существуют сведения об ассоциации СП с гаплотипами, сконструированными из различных полиморфных локусов гена *TPH1*. Так, гаплотипический анализ, проведенный G. Turecki и соавт. (2001), выявил ассоциацию гаплотипа G-T-C, состоящего из полиморфных локусов (-6526A>G, -5806G>T, 218A>C) гена *TPH1* с завершённым суицидом [24].

X. Liu и соавт. (2006) показали ассоциацию гаплотипа T-C-A-A-A (сконструированного на основании полиморфных локусов -7680G>T, -7065C>T, -6526A>G; 218A>C, 779A>C) гена *TPH1* с СП в китайской популяции [15].

G. Zabolí и соавт. (2006) изучили 6 полиморфных локусов гена *TPH1* в группе женщин с пограничными

расстройствами, имевших, как минимум, 2 попытки суицида в анамнезе. Было выявлено, что гаплотип T-C-A-A-A, сконструированный на основании локусов -7680G>T, -7065C>T, -6526A>G; 218A>C, 779A>C гена *TPH1*, ассоциирован с СП [25].

Заключение

Суицидальное поведение является сложным многофакторным признаком, формирующимся в результате комплексного взаимодействия генетических факторов и окружающей среды. За последние десятилетия значительно расширились знания о его биологических механизмах. Изучение генов-кандидатов является актуальным аспектом исследований биологических основ поведения человека, в том числе суицидального. Результаты таких исследований представят интерес для практической работы врачей и психологов в суицидологии как для выделения групп риска суицидального поведения, так и для проведения превентивных мер.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского гуманитарного научного фонда (№11-06-00554а) и 7-рамочной программы Европейского союза ADAMS, HEALTH-F4-2009-242257 (государственный контракт № 02.527.11.0006 «Сравнительное популяционно-генетическое изучение широко распространенных мультифакториальных заболеваний в популяциях EU/АС и России»).

Сведения об авторах

Халилова Зульфия Леонардовна – аспирант лаборатории молекулярной генетики человека Учреждения РАН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН»

E-mail: curtys@inbox.ru

Зайнуллина Айгуль Галиевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека Учреждения РАН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН»

E-mail: zainullina@bk.ru

Гайсина Дарья Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Отдела долгожительства и старения Факультета эпидемиологии и здравоохранения Университетского колледжа Лондона (Великобритания)

E-mail: dgaisina@mail.ru

Хуснутдинова Эльза Камилевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики человека Учреждения РАН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН»

E-mail: elzakh@mail.ru

Литература

1. Andreou D., Saetre P., Werge T. et al. Tryptophan hydroxylase gene 1 (TPH1) variants associated with cerebrospinal fluid 5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid concentrations in healthy volunteers // *Psychiatry Res.* – 2010. – Vol. 180 (2–3) – P. 63–67.
2. Barrett J., Fry B., Maller J., Daly M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // *Bioinformatics.* – 2005. – Vol. 21 (2). – P. 263–265.
3. Bellivier F., Chaste P., Malafosse A. Association between the TPH gene A218C polymorphism and suicidal behavior: a meta-analysis // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatry Genet.* – 2004. – Vol. 124. – P. 87–91
4. Bethea C., Mirkes S., Shively C. et al. Steroid regulation of tryptophan hydroxylase protein in the dorsal raphe of macaques // *Biol. Psychiatry.* – 2000. – Vol. 47 (6). – P. 562–576.
5. Bondy B., Buettner A., Zill P. Genetics of suicide // *Mol. Psychiatry.* – 2006. – Vol. 11 (4). – P. 336–351.
6. Bondy B., Erfurth A., de Jonge S. et al. Possible association of the short allele of the serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) with violent suicide // *Mol. Psychiatry.* – 2000. – Vol. 5. – P. 193–195.
7. Cooper J., Melcer I. The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1961. – Vol. 132. – P. 265–268.
8. Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes // *Genet. Epidemiol.* – 2003. – Vol. 25 (2). – P. 115–121.
9. Dupont W., Plummer W. Power and sample size calculations. A review and computer program // *Control. Clin. Trials.* – 1990. – Vol. 11 (2). – P. 116–128.
10. Hasegawa H., Ichiyama A. Tryptophan 5-monoxygenase from mouse mastocytoma: high-performance liquid chromatography assay // *Methods Enzymol.* – 1987. – Vol. 142. – P. 88–92.
11. Hong C., Tsai S., Wang Y. Association between tryptophan hydroxylase gene polymorphism (A218C) and schizophrenic disorders // *Schizophr. Res.* – 2001. – Vol. 49 (1–2). – P. 59–63.
12. Kuhn D., O'Callaghan J., Juskevich J. et al. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-MG2+: dependence on calmodulin // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1980. – Vol. 77. – P. 4688–4691.
13. Lalovic A., Turecki G. Meta-analysis of the association between tryptophan hydroxylase and suicidal behavior // *Am. J. Med. Genet.* – 2002. – Vol. 114B. – P. 533–540.
14. Li D., He L. Further clarification of the contribution of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene to suicidal behavior using systematic allelic and genotypic meta-analyses // *Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 119. – P. 233–240.
15. Liu X., Li H., Qin W. et al. Association of TPH1 with suicidal behaviour and psychiatric disorders in the Chinese population // *J. Med. Genet.* – 2006. – Vol. 43. – P. 4–10.
16. Mann J. Neurobiology of suicidal behavior // *Nat. Rev.* – 2003. – Vol. 4. – P. 819–828.
17. Mathew C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // *Methods in Molecular Biology* / Ed. J.M. Walker. – N.Y.: Human Press, 1984. – Vol. 2. – P. 31–34.
18. Nielsen D., Virkkunen M., Lappalainen J. et al. A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 1998. – Vol. 55. – P. 593–602.
19. Rotondo A., Schuebel K., Bergen A. et al. Identification of four variants in the tryptophan hydroxylase promoter and association to behaviour // *Mol. Psychiatry.* – 1999. – Vol. 4. – P. 360–368.
20. Rujescu D., Giegling I., Sato T. et al. Genetic variations in tryptophan hydroxylase in suicidal behavior: analysis and meta-analysis // *Biol. Psychiatry.* – 2003 – Vol. 54 (4). – P. 465–473.
21. Saetre P., Lundmark P., Wang A. et al. The tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) gene, schizophrenia susceptibility, and suicidal behavior: a multi-centre case-control study and meta-analysis // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* – 2010. – Vol. 153B (2). – P. 387–396.
22. Stanley B., Molcho A., Stanley M. et al. Association of aggressive behavior with altered serotonergic function in patients who are not suicidal // *Am. J. Psychiatry.* – 2000. – Vol. 157 (4). – P. 609–714.
23. Tsai S., Wang Y., Chen J. et al. Allelic variants of the tryptophan hydroxylase (A218C) and serotonin 1B receptor (A-161T) and personality traits // *Neuropsychobiology.* – 2003. – Vol. 48 (2). – P. 68–71.
24. Turecki G., Zhu Z., Tzenova J. et al. TPH and suicidal behavior: a study in suicide completers // *Mol. Psychiatry* – 2001. – Vol. 6. – P. 98–102.
25. Zaboli G., Gizatullin G., Nilsonne A. et al. Tryptophan Hydroxylase-1 Gene Variants Associate with a Group of Suicidal Borderline Women // *Neuropsychopharmacology.* – 2006. – Vol. 31. – P. 1982–1990.
26. Walther D., Peter J., Bashammakh S. et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. // *Science* – 2003 – Vol. 299. – P. 76.