



Związek polimorfizmu genu transportera serotoniny (5-HTT_LPR) z nasileniem objawów alkoholowego zespołu abstynencyjnego*

Association study between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTT_LPR) and the intensity of alcohol withdrawal

SZYMON SYREK¹, JUSTYNA PELKA-WYSIECKA¹,
JOLANTA KUCHARSKA-MAZUR¹, GEORG ARENTOWICZ²,
JERZY SAMOCHOWIEC¹

Z: 1. Katedry i Kliniki Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
2. AZIP, Kolonia, Niemcy

STRESZCZENIE. *Cel.* Wyniki badań z zakresy biochemii układu nerwowego, farmakologii i fizjologii wskazują na istotną rolę serotoniny (5-HT) w rozwoju uzależnienia od alkoholu oraz przebiegu alkoholowego zespołu abstynencyjnego. W naszym badaniu poszukiwaliśmy związku pomiędzy uzależnieniem od alkoholu oraz natężeniem objawów abstynencyjnych w przebiegu ZZA a polimorfizmem genu transportera serotoniny (5-HTT_LPR). *Metoda.* Grupę badaną stanowiło 96 chorych uzależnionych od alkoholu, z rozpoznaniem postawionym wg kryteriów ICD-10. Grupę kontrolną stanowiło 187 zdrowych ochotników. Natężenie objawów abstynencyjnych mierzono skalą CIWA-Ar. *Wyniki.* Na podstawie analizy statystycznej stwierdza się asocjację pomiędzy polimorfizmem genu 5-HTT_LPR a wynikiem skali CIWA-Ar. Osoby z niższą aktywnością transkrypcyjną genu transportera serotoniny (region promotora 5-HTT) wykazują istotnie statystycznie wyższe natężenie objawów zespołu abstynencyjnego ($p < 0,004$). Nie stwierdzono istotnych różnic rozkładu alleli i genotypów pomiędzy chorymi z ZZA a grupą kontrolną. *Wnioski.* Powyższe wyniki pozwalają na sformułowanie hipotezy o istotnym wpływie polimorfizmu genu 5-HTT na natężenie objawów alkoholowego zespołu abstynencyjnego.

SUMMARY. *Aim.* Neurochemical, pharmacological and physiological studies indicate the important role of 5-HT in alcohol dependence and alcohol withdrawal syndrome. We tested the possible association between the serotonin transporter gene polymorphism and the intensity of alcohol withdrawal syndrome. *Method.* The group of 96 alcohol dependent patients, diagnosed according to ICD-10 criteria were examined. The study included 187 healthy volunteers as control subjects. To assess the severity of withdrawal symptoms we used the CIWA-Ar scale. *Results.* Based on the statistical analysis, we found the association between the 5-HTT_LPR gene polymorphism and the CIWA results. Individuals with low transcriptional activity of the 5-HTT gene promoter region proved to have significantly higher severity of withdrawal symptoms ($p < 0,004$). There were no significant differences in frequency of the genotypes and alleles between alcoholics and controls. *Conclusions.* Presented results enable us to formulate the hypothesis that the 5-HTT gene polymorphism affects the severity of withdrawal syndrome.

Słowa kluczowe: alkohol / uzależnienie / transporter serotoniny / objawy abstynencyjne / genetyka
Key words: alcohol / dependence / serotonin transporter / withdrawal syndrome / genetics

* Środki na badanie pochodziły z grantów: KBN 3PO5D 14622 oraz BMBF, POL 01/063.

Przy przewlekłej ekspozycji na alkohol etylowy rozwija się zależność fizyczna związana ze zmianami neuroadaptacyjnymi w o.u.n. U osób pijących przez długi okres czasu, nagłe zmniejszenie stężenia alkoholu w organizmie może skutkować pojawieniem się szerokiego spektrum objawów. Zaburzenia prawidłowego neuroprzekaznictwa uważa się za główną przyczynę alkoholowego zespołu abstynencyjnego [1]. Wprowadzenie jednorazowe dawki alkoholu osłabiają funkcję wielu receptorów i jonowych kanałów pobudzających powodując efekt sedatywny, jednak w trakcie rozwoju tolerancji dochodzi do odwrócenia tego efektu. Następująca przewaga mechanizmów aktywizujących powoduje, po nagłym odstawieniu alkoholu, pojawienie się objawów abstynencyjnych, takich jak lęk, pobudzenie psychoruchowe i drgawki [1]. Nasilenie objawów zespołu abstynencyjnego i wystąpienie powikłań w postaci zaburzeń świadomości lub napadów drgawkowych jest jednym z wyznaczników głębokości uzależnienia.

Według obecnie przyjmowanych koncepcji, objawy wegetatywne wyzwalane są przez nadaktywność przekaznictwa adrenergicznego i noradrenergicznego, halucynacje – przez nadczynność przekaznictwa dopaminergicznego. Drgawki alkoholowe związane są z układami hamującymi GABA i układem glutaminergicznym, natomiast zaburzenia emocjonalne (kontrola impulsów) i poznawcze – z zaburzeniem równowagi układów serotonergicznego i cholinergicznego [2].

Uzależnienie od alkoholu jest stanem chorobowym o heterogennej etiologii, w tym genetycznej, i różnorodnym obrazie klinicznym. Dotychczasowe poszukiwania obejmowały polimorfizmy związane z układami: dopaminergicznym, opioidowym, GABA-ergicznym, genami warunkującymi degradację amin biogennych oraz układem serotonergicznym [3].

Wiele funkcji fizjologicznych jest regulowanych przez neurotransmisję serotonergiczną (5-hydroksytryptamina). Należą do nich: aktywność psychoruchowa, rytm snu

i czuwania, przyjmowanie pokarmów oraz funkcje poznawcze i stany emocjonalne.

Transporter serotoniny jest zlokalizowany na błonie presynaptycznej i odpowiada za reabsorpcję serotoniny wydzielonej do szczeliny synaptycznej. Gen zlokalizowano na chromosomie 17q12. Funkcjonalny polimorfizm insercyjno-delecyjny promotora genu transportera serotoniny (5HTT_LPR) obejmuje 44 pary zasad i został opisany przez Lescha i wsp. oraz Heilsa i wsp. [1996]. Aktywność transkrypcyjna wariantu „s” (*short* – 484 bp) jest 2-krotnie niższa niż wariantu „L” (*long*-insercyjny – 528 bp). Osobnicy z allelem „s” mają obniżony wychwyt zwrotny serotoniny ze szczeliny synaptycznej [4].

Deficyty neurotransmisji serotonergicznej były dotąd wiązane także z wczesnym początkiem alkoholizmu, zachowaniami impulsywnymi i agresywnymi [5] oraz z zaburzeniami afektywnymi [6] i lękowymi [7].

Allel „s” jest wiązany z ciężkim przebiegiem zespołu abstynencyjnego polegającym na wystąpieniu drgawek i majaczenia [8]. Wielu badaczy stwierdzało zależność pomiędzy wariantami genu 5HTT_LPR a gwałtownymi próbami samobójczymi (innymi niż zażycie leków – *violent suicide attempts*), u alkoholików wykazujących tego typu zachowania częściej obserwowano występowanie genotypu „ss” [9].

CEL

Przedstawiane badanie asocjacyjne przeprowadzone na populacji pacjentów z nasilonymi objawami alkoholowego zespołu abstynencyjnego zostało zaprojektowane w celu weryfikacji hipotezy o wpływie polimorfizmu w regionie promotora genu 5-HTT na nasilenie objawów abstynencyjnych. Badano także wpływ tego polimorfizmu w homogennych podgrupach pacjentów z wczesną utratą kontroli picia, próbami samobójczymi w wywiadzie oraz ciężkimi powikłaniami alkoholowego zespołu abstynencyjnego (przebyte majaczenie drżenne lub/i drgawki alkoholowe).

OSOBY BADANE

Grupę badaną stanowiło 96 chorych uzależnionych od alkoholu, z rozpoznaniem wg kryteriów ICD-10 (16 kobiet i 80 mężczyzn, średnia wieku 39 ± 11 lat) hospitalizowanych w Klinice Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej oraz w Ośrodku Terapii Uzależnień w Stanominie. Wszyscy badani wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu, na które uzyskano akceptację Komisji Etycznej przy Pomorskiej Akademii Medycznej. Grupę kontrolną stanowiło 187 niespokrewnionych ze sobą osób (średnia wieku 35 ± 14) bez zaburzeń psychicznych rozpoznawanych na osi I wg klasyfikacji ICD-10.

METODA

Natężenie objawów abstynencyjnych mierzone było przy przyjęciu do szpitala skalą CIWA-Ar [10]. Przeprowadzono także ustrukturyzowany wywiad odnośnie uzależnienia obejmujący wiek utraty kontroli picia, przebyte epizody drgawek, majaczenia drzennego oraz próby samobójcze.

DNA wyizolowano metodą wysalania z krwi żyłnej. Warunki PCR użyte w tym badaniu przebiegały zgodnie z procedurą opisaną przez Lescha i wsp. w 1996 r. [11].

Do obliczeń statystycznych użyto programu komputerowego SPSS for Windows [12], do obliczenia różnic częstości występowania genotypów i alleli użyto testu χ^2 . Do oznaczenia związku pomiędzy polimorfizmem 5-HTT_LPR a natężeniem objawów abstynencyjnych użyto testu t-Studenta oraz analizy wariancji (ANOVA).

WYNIKI

Wyniki w grupie badanej mieściły się w zakresie od 11 do 59 punktów (maksymalna liczba punktów do osiągnięcia – 67). U 52 pacjentów stwierdzono bezwzględne wskazania do intensywnej detoksykacji (suma punktów w skali CIWA-Ar > 20). Częstość występowania alleli w grupie badanej i w grupie kontrolnej spełniała prawo Hardy'ego-Weinberga.

Na podstawie analizy statystycznej stwierdziliśmy asocjację pomiędzy polimorfizmem genu 5-HTT_LPR a wynikami skali CIWA-Ar. Osoby posiadające niższą aktywność transkrypcyjną genu transportera serotoniny (genotyp „ss”) wykazują istotnie statystycznie większe natężenie objawów zespołu abstynencyjnego ($p < 0,004$) w porównaniu do osób z obecnym przynajmniej jednym allelem „L” („ss” śr. = $29,55 \pm 15,48$ vs. „Ls” i „LL” śr. = $20,38 \pm 8,77$) (tabl. 1).

Tablica 1. Porównanie średnich wartości skali CIWA-Ar u osób z różnym genotypem 5-HTT_LPR

Badana grupa	Genotyp	N	CIWA-Ar		Poziom istotności*
			Średnia	Odchylenie stand.	
Cała grupa badana	„LL” + „Ls”	85	20,38	8,772	0,004
	„ss”	11	29,55	15,481	
Występowanie drgawek lub majaczenia	„LL” + „Ls”	31	22,90	8,064	0,006
	„ss”	5	44,20	9,757	
Obecne w wywiadzie próby samobójcze	„LL” + „Ls”	33	22,15	9,919	0,016
	„ss”	5	36,00	19,698	
Utrata kontroli picia poniżej 26 r. ż.	„LL” + „Ls”	47	21,23	9,467	0,047
	„ss”	7	30,00	17,243	

* analiza wariancji, test t Studenta

Tablica 2. Częstości genotypów w badanych grupach

Badane grupy	N	Genotypy			Poziom istotności*
		S/S	S/L	L/L	
Grupa kontrolna	186	0,08	0,47	0,45	–
Grupa badana	96	0,11	0,44	0,45	0,716
Drgawki lub/i majaczenie	36	0,14	0,30	0,56	0,183
Próby samobójcze	38	0,13	0,40	0,47	0,576
Utrata kontroli picia poniżej 26 r.ż. (M)	54	0,13	0,39	0,48	0,580

* test χ^2

Mężczyźni i kobiety nie różnili się istotnie w natężeniu objawów AZA (mężczyźni \bar{x} . = 21,46 ± 10,15; kobiety \bar{x} . = 21,69 ± 10,36). Średnia różnica nasilenia objawów abstynencyjnych była większa w homogennych podgrupach pacjentów wydzielonych ze względu na: wczesną utratę kontroli picia, próby samobójcze w wywiadzie oraz ciężkie powikłania alkoholowego zespołu abstynencyjnego (tabl. 1).

Porównując częstość alleli i genotypów z grupą kontrolną nie stwierdziliśmy związku pomiędzy wariantami polimorfizmu 5-HTT_LPR a występowaniem i ilością prób samobójczych ani wiekiem utraty kontroli picia u uzależnionych od alkoholu. Nie obserwowaliśmy także różnic w częstości występowania drgawek lub/i majaczenia w wywiadzie pomiędzy grupami pacjentów wydzielonych ze względu na warianty genu 5-HTT_LPR (tabl. 2).

DYSKUSJA

Niski poziom aktywności serotoninerdycznej w o.u.n. był brany pod uwagę jako czynnik podatności na uzależnienie od alkoholu z powodu stwierdzonej dodatniej korelacji z ilością spożywanego alkoholu [8]. Prezentowane wyniki nie potwierdzają tezy o wpływie polimorfizmu 5-HTT_LPR na podatność na ZZA, potwierdzają natomiast hipotezę o wpływie polimorfizmu regulującego syntezę transportera serotoniny na

ciężkość uzależnienia mierzonego natężeniem objawów abstynencyjnych. Interesujący jest natomiast brak różnic w natężeniu objawów AZA pomiędzy homozygotami „LL” i heterozygotami, uważano bowiem, że to obecność pojedynczego allelu „s” wiąże się z wyższym poziomem zewnątrzkomórkowej serotoniny [13].

Brak istotnych asocjacji polimorfizmu genu 5-HTT z pozostałymi cechami fenotypowymi (próby samobójcze, utrata kontroli picia <26 r.ż., drgawki i majaczenie), których związek z badanym polimorfizmem postulowali liczni autorzy może wynikać z mniejszej liczebności grupy w porównaniu z cytowanymi badaniami [4, 8, 14]. Do wyjaśnienia pozostaje dokładny mechanizm działania podwyższonego poziomu serotoniny w szczelinie synaptycznej na wyżej wymienione objawy. Prawdopodobnie zaangażowane w proces są zarówno receptory pre- jak i postsynaptyczne, u których zachodzi neuroadaptacyjna down-regulacja spowodowana obniżonym wychwytem zwrotnym neuroprzebieżnika.

Niewyjaśnione pozostają liczne aspekty funkcjonowania układu serotoninerdycznego w przebiegu ZZA, np. zastosowanie leków z grupy SSRI w celu leczenia AZA. Środki farmakologiczne nasilające przebieżnictwo serotoninerdyczne powodują zmniejszenie ilości wypijanego alkoholu u zwierząt laboratoryjnych, dlatego też leki z grupy SSRI brane były pod uwagę w długoterminowym leczeniu uzależnionych. Powstaje pytanie

o wpływ poszczególnych typów receptorów serotoniny na rozwój i przebieg uzależnienia od alkoholu. W toku badań na zwierzętach oraz prób klinicznych z wykorzystaniem wprowadzonych już do leczenia preparatów celem sprawdzenia ich skuteczności w leczeniu objawów uzależnienia postawiono szereg hipotez o roli podtypów receptorów 5-HT.

Żadnego z dotychczas badanych receptorów serotonergicznyczych nie można uważać za samodzielnie odpowiedzialnego za rozwój, przebieg i powikłania uzależnienia. W badaniu prowadzonym przez Edenberga i wsp. w ramach największego jak dotąd projektu dotyczącego genetycznych uwarunkowań alkoholizmu COGA (*Collaborative Study on Genetics of Alcoholism*) na grupie 105 rodzin nie udało się potwierdzić związku lub sprzężenia 5-HTT z wystąpieniem uzależnienia [14].

Podsumowując można stwierdzić, że genetyka molekularna przyczyniła się istotnie do zrozumienia etiologii AZA. Nasza praca potwierdza hipotezę o istotnym wpływie funkcjonalnego polimorfizmu 5-HTT_LPR na przebieg alkoholowego zespołu abstynencyjnego. Pamiętać jednak należy, że transporter serotoniny reguluje wyłącznie stężenie neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej. Rodzaj przekazywanego dalej sygnału zależy od typów receptorów postsynaptycznych oraz złożonej interakcji w systemie innych przekaźników.

Alkohol jest związkiem toksycznym prowadzącym do neurodegeneracji, a najsilniej na ten proces wpływają powtarzające się epizody AZA [15]. Brak jest przekonujących badań farmakogenetycznych z użyciem nowych leków w terapii alkoholowego zespołu abstynencyjnego. Prezentowane powyżej badanie genetyczne nie uwzględnia takich czynników predysponujących do uzależnień jak środowisko, warunki socjalne i sytuacja życiowa. Liczymy jednak, że przedstawione wyniki mogą stać się przyczynkiem skuteczniejszego, celowanego leczenia chorych uzależnionych od alkoholu.

PIŚMIENNICTWO

1. Kostowski W. Neurobiologiczne mechanizmy uzależnienia od alkoholu etylowego. W: Pappa M, red. Uzależnienia lekowe. Kraków; 1997.
2. Glue P, Nutt D. Overexcitment and disinhibition. Dynamic neurotransmitter interaction in alcohol withdrawal. *Brot J Psychiatry* 1990; 157: 491–9.
3. Samochowicz J, Hajduk A. Genetyczne podłoże alkoholowego zespołu abstynencyjnego. *Alkoholizm i Narkomania*; 14 (1): 121–8.
4. Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, Hommer D, Linnoila M, Weinberger DR. A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 643–9.
5. Ishiguro H, Saito T, Akazawa S, Mitushio H, Tada K, Enomoto M, Mifune H, Toru M, Shibuya H, Arinami T. Association between drinking-related antisocial behavior and a polymorphism in the serotonin transporter gene in Japanese population. *Alc Clin Exp Res* 1999; 23 (7): 1281–4.
6. Collier D, Stoeber G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* 1996; 1: 453–60.
7. Mazzanti C, Lappalainen J, Long J, Bengel D, Naukkarinen H, Eggert M. Role of the serotonin transporter promoter polymorphism in anxiety related traits. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 936–40.
8. Sander T, Harms H, Lesch KP, Dufeu P, Kuhn S, Hoehe M, Rommelspacher H, Schmidt LG. Association analysis of a Regulatory Variation of the Serotonin Transporter Gene with Severe Alcohol Dependence. *Alc Clin Exp Res* 1997; 21 (8): 1356–9.
9. Gorwood P, Batel P, Ades J, Hamon M, Boni C. Serotonin transporter gene polymorphisms, alcoholism and suicidal behavior. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 259–64.
10. Sullivan JT, Sykora K, Schneidman J, Naranjo CA, Sellers EM. *Br J Addictions* 1989; 84: 1353–7.
11. Lesch K, Bengel D, Heils A, Sabol S, Greenberg B, Petri S, Benjamin J, Muller C, Hamer D,

- Murphy D. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science* 1996; 274: 1483–7.
12. SPSS Base 9.0 User's Guide Marking Department US of America; 2001.
 13. Stoltenberg SF. Serotonergic agents and alcoholism treatment: a simulation. *Alc Clin Exp Res* 2003; 27 (12): 1853–9.
 14. Hasselbrock VM, Foroud T, Edenberg H, Nurnberger JI, Reich T, Rice JP. Genetics and alcoholism: The COGA project. W: *Alcohol in health and disease*, edited by Dharam P. Agrawal, Helmut K. Seitz Marcel Dekker; 2001.
 15. Samochowiec J, Samochowiec A, Wojciechowski B. Nowoczesna terapia zespołu zależności alkoholowej: doświadczenia europejskie. *Polska Medycyna Rodzinna* 2004; 6 (3): 6–10.

*Adres: Dr Szymon Syrek, Katedra i Klinika Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej,
ul. Broniewskiego 26, 71-460 Szczecin*