

*Agnieszka Permoda-Osip, Janusz Rybakowski, Aleksandra Suwalska,  
Monika Dmitrzak-Węglarz, Piotr Czerwski, Anna Leszczyńska-Rodziejewicz, Joanna Hauser*

## **Polimorfizm genu transportera noradrenaliny a działanie profilaktyczne litu w chorobie afektywnej dwubiegunowej\***

*Norepinephrine transporter gene polymorphism  
and prophylactic lithium treatment in bipolar affective disorder*

Klinika Psychiatrii Dorosłych Akademii Medycznej w Poznaniu  
Pracownia Genetyki Psychiatrycznej Akademii Medycznej w Poznaniu

### **Streszczenie**

Zaburzenia neuroprzewodnictwa noradrenergicznego prawdopodobnie odgrywają rolę w patogenezie choroby afektywnej dwubiegunowej. Celem niniejszej pracy było poszukiwanie asocjacji pomiędzy polimorfizmem 1287 A/G genu transportera noradrenaliny (*norepinephrine transporter* – *NET*), a profilaktycznym efektem węglanu litu u osób z chorobą afektywną dwubiegunową. Badaniem objęto 90 osób (52 kobiety, 38 mężczyzn) z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej. Średnia wieku pacjentów wynosiła  $52 \pm 12$  lat, a średni czas leczenia węglanem litu wynosił  $14,6 \pm 7,3$  lat. Stężenie litu w surowicy krwi u tych pacjentów utrzymywało się pomiędzy 0,5–0,8 mmol/l. Pacjentów podzielono na 3 grupy, w zależności od skuteczności profilaktycznego działania węglanu litu: chorzy z bardzo dobrą reakcją na leczenie litem (*excellent lithium responders*), z częściową reakcją na leczenie litem (*partial lithium responders*) oraz pacjentów nie wykazujących korzystnego efektu litu (*lithium non-responders*). W badanej grupie nie stwierdzono zależności pomiędzy jakością profilaktycznego działania węglanu litu, a ocenianym polimorfizmem genu NET.

### **Summary**

Disturbances of noradrenaline neurotransmission probably play a role in the pathogenesis of bipolar affective disorder. The purpose of the present study was searching for an association between 1287 A/G polymorphism of noradrenaline transporter gene (*norepinephrine transporter* – *NET*) and a prophylactic effect of lithium carbonate in patients with bipolar affective illness. The study included 90 subjects (52 women and 38 men) with bipolar affective illness. The mean age of the patients was  $52 \pm 12$  years and the duration of lithium therapy was  $14,6 \pm 7,3$  years. Serum lithium concentration in those patients was in the range of 0,5 to 0,8 mmol/l. Patients were divided into three groups, depending on the efficacy of lithium carbonate prophylaxis: excellent lithium responders, partial lithium responders and lithium non-responders. In the group of investigated patients, no relationship between the quality of lithium prophylactic effect and the studied polymorphism of NET gene was found.

---

**Słowa kluczowe:** choroba afektywna dwubiegunowa, węglan litu, transporter noradrenaliny

**Key words:** bipolar affective illness, lithium carbonate, norepinephrine transporter

---

\* Praca wykonana w ramach grantu KBN Nr 2PO5B 01226. Dr Piotr Czerwski jest stypendystą nagrody Fundacji Nauki Polskiej dla młodych badaczy za rok 2004.

## Wstęp

W myśl hipotezy katecholaminowej zaburzeń afektywnych, jedną z przyczyn depresji jest niedobór noradrenaliny (NA), natomiast nadmiar tego neuroprzekaźnika może wiązać się z wystąpieniem stanów maniakalnych (14). W badaniach biochemicznych wykonanych u pacjentów z chorobami afektywnymi obserwowano zmiany stężeń noradrenaliny, nie zawsze jednak zgodne z powyższą koncepcją. Roy i wsp. (10) stwierdzili podwyższony poziom noradrenaliny w osoczu krwi u osób w trakcie epizodu depresji typu melancholicznego, zaś Lake i wsp. (6) wykazali znaczące podwyższenie poziomu noradrenaliny w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z chorobą afektywną jedno- i dwubiegunową. Kelly i wsp. (4) zaobserwowali spadek poziomu NA po terapii elektrowstrząsowej, który korelował z poprawą stanu klinicznego. Klimek i wsp. stwierdzili natomiast obniżone poziomy transportera noradrenaliny (*norepinephrine transporter* – *NET*), białka odpowiedzialnego za doneuronalny wychwyty zwrotny tego neuroprzekaźnika, w mózgu osób z rozpoznaniem depresji, które popełniły samobójstwo (5).

Działanie na układ noradrenergiczny wykazano również w odniesieniu do jonu litu, który jest najważniejszym lekiem normotymicznym stosowanym w leczeniu i profilaktyce choroby afektywnej dwubiegunowej. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że lit zwiększa inaktywację NA i zmniejsza dostępność tego neuroprzekaźnika na synapsach noradrenergicznych (13). W badaniu klinicznym stwierdzono wpływ litu na stężenie NA w surowicy krwi oraz na czynność receptorów noradrenergicznych alfa2 (8). Efekty te mogą mieć związek z farmakologicznym działaniem litu w chorobie afektywnej dwubiegunowej.

Badania farmakogenetyczne wskazują na związek pomiędzy jakością działania profilaktycznego węglanu litu, a polimorfizmem genów dotyczących układów neuroprzekaźnikowych i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. W badaniach asocjacyjnych, wykonanych również w naszym ośrodku, stwierdzono związek między efektem profilaktycznym litu a polimorfizmem genu hydroksylazy tryptofanu (15), fosfolipazy C (17), transportera serotoniny (11) oraz czynnika neurotrofowego pochodzenia mózgowego (BDNF) (12).

W niniejszej pracy podjęliśmy próbę badania asocjacji pomiędzy profilaktycznym działaniem węglanu litu, a polimorfizmem genu transportera noradrenaliny (NET). Transporter ten jest białkiem transbłonowym zależnym od jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ . Składa się z 12 domen, 617 aminokwasów. Gen kodujący NET znajduje się na chromosomie 16 (16q12.2) (1, 9).

## Metodyka badań

### Pacjenci

Badaniem objęto 90 osób (52 kobiety, 38 mężczyzn) z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej, leczonych w Poradni Przyklinicznej Katedry Psychiatrii Akademii Medycznej w Poznaniu. Średni wiek pacjentów wynosił

52 ± 12 lat. Długość leczenia litem wyniosła od 7,3 do 21,9 lat (średnio 14,6 lat). Stężenie litu w surowicy krwi u tych pacjentów utrzymywało się pomiędzy 0,5–0,8 mmol/l.

Pacjentów podzielono na 3 grupy, w zależności od skuteczności profilaktycznego działania węglanu litu:

1. Pacjenci z bardzo dobrą reakcją na lit (*excellent lithium responders – ER*) – grupa obejmująca osoby bez epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu;
2. Pacjenci z częściową reakcją na lit (*partial lithium responders – PR*) – u których nastąpiła redukcja epizodów afektywnych o 50% w trakcie pobierania litu w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem tego leku;
3. Pacjenci nie wykazujący korzystnego efektu litu (*lithium non-responders – NR*) – u których redukcja epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu wynosiła mniej niż 50% w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem węglanu litu.

Badania zostały zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną Akademii Medycznej w Poznaniu.

### **Genotypowanie**

Polimorfizm genu transportera noradrenaliny analizowano metodą PCR – RFLP. Amplifikację polimorficznego fragmentu genu NET wykonano przy użyciu starterów opisanych przez Jönsson i wsp. (3). Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 21 µl, która zawierała: 100 ng genomowego DNA, 10 pmoli każdego ze starterów (NETF 5'-TCC AGG GAG ACC CTA ATT CC-3' i NETR 5'-TTG ACT TTA TTG AAA TGC GGC-3'), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,01% żelatyny, 5% formamidu, 10% glicerolu, 1 U polimerazy Taq. Zastosowano następujący profil reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 2 min. w 95°C; 35 cykli obejmujących: 30 s w 95°C, 60 s w 56°C, 30 s w 72°C; końcowa elongacja – 7 min. w 72°C. Uzyskany produkt PCR o długości 241 par zasad (pz) poddano przez noc analizie restrykcyjnej w temp. 37°C, przy użyciu 0,3 U enzymu Cfr131. W całkowitej objętości (10 µl) mieszaniny restrykcyjnej produkt reakcji PCR stanowił 6,5 µl; użyto 1 × stężonego buforu R+. Po analizie restrykcyjnej produkt PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydydy w stężeniu docelowym 0,25 µg/ml żelu. Genotypy określono na podstawie wyników rozdziału elektroforetycznego. Allel A (nietrawiony) charakteryzuje się obecnością fragmentu 97 pz, a allel G (trawiony) obecnością fragmentów o wielkości 76 pz i 21 pz (niewidoczny w żelu). Dodatkowo obecne są zawsze prążki stałe o wielkości 31 pz i 113 pz (16).

### **Analiza statystyczna**

Analizę zmiennych prowadzono przy zastosowaniu testów  $\chi^2$ . Komputerowy program SPSS (wersja 10) był użyty do przetwarzania analiz statystycznych.

Zgodność rozkładu genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga analizowano przy użyciu programu "Utility Programs For Analysis Of Genetic Linkage"

## Wyniki

Wśród badanych znajdowały się 22 osoby (24,4%) bardzo dobrze reagujące na leczenie profilaktyczne litem (12 kobiet i 10 mężczyzn), 48 osób (53,3%) z grupy chorych częściowo reagujących na lit (31 kobiet i 17 mężczyzn) oraz 20 osób (22,2%) z niekorzystnym efektem leczenia profilaktycznego węglanem litu (9 kobiet i 11 mężczyzn). Kliniczną charakterystykę tych grup pacjentów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Kliniczna charakterystyka grup pacjentów

	Ogółem n = 88	ER n = 22	PR n = 48	NR n = 20
Wiek	52,7±11,97	57,8±14,2	53,2±12,2	54,1±8,4
Płeć [M:K]	38:52	10:12	17:31	11:9
Choroby psychiczne w rodzinie N (%)	41 (46,6%)	11 (40,7%)	24 (53,3%)	6 (37,5%)
Wiek rozpoczęcia choroby lata [±SD]	31,5±10,7	33,0±11,6	31,1±10,9	30,1±8,5
Trwanie choroby przed litem lata [±SD]	7,4±7,4	9,7±9,6	5,6±5,9	8,7±6,0
Czas leczenia litem lata [±SD]	14,6±7,3	14,0±7,1	15,3±7,9	13,8±5,8
Liczba epizodów afektywnych przed wprowadzeniem litu [±SD]	6,2±4,1	7,0±3,6	6,0±4,5	5,8±3,9
Liczba epizodów afektywnych po wprowadzeniu litu [±SD]	3,3±3,9	0	3,5±2,7	8,2±4,8

ER – excellent lithium responders – pacjenci z bardzo dobrą reakcją na lit (bez epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu)

PR – partial lithium responders – pacjenci z częściową reakcją na lit (redukcja epizodów afektywnych o 50% w trakcie pobierania litu w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem tego leku)

NR – lithium non-responders – pacjenci nie wykazujący korzystnego efektu litu (redukcja epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu wynosiła mniej niż 50% w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem węglanu litu)

Jak wynika z tabeli, badane grupy nie różniły się istotnie pod względem wieku, proporcji płci, obciążenia rodzinnego chorobami psychicznymi, klinicznym przebiegiem choroby przed leczeniem litem oraz długością stosowania litu. W grupie NR większa była proporcja mężczyzn, natomiast nieco mniejszy odsetek osób z rodzinnym obciążeniem chorobą psychiczną w porównaniu z pozostałymi grupami.

Rozkład genotypów w badanej grupie pacjentów był zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga. W tabeli 2 podano rozkład genotypów A/A, A/G, G/G oraz alleli A i G w grupach pacjentów wyróżnionych pod względem jakości profilaktycznego efektu węglanu litu.

Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości genotypów w poszczególnych grupach wykazujących różną skuteczność profilaktycznego działania węglanu litu. Dotyczyło to zarówno wszystkich pacjentów ( $p = 0,609$ ), jak również osobno

Tabela 2. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu 1287 A/G genu NET w grupach pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową wykazujących różną jakość efektu profilaktycznego węglanu litu

	GENOTYPY			ALLELE	
	A/A	A/G	G/G	A	G
ER	1 4,5%	12 54,5%	9 40,9%	14 31,8%	30 68,2%
PR	4 8,3%	21 43,8%	23 47,9%	29 30,2%	67 69,8%
NR	2 10%	6 30%	12 60%	10 25,0%	30 75,0%

Różnica pomiędzy ER vs PR vs NR:  $p = 0,609$  dla genotypów,  $p = 0,768$  dla alleli

Różnica pomiędzy ER + PR vs NR:  $p = 0,395$  dla genotypów,  $p = 0,559$  dla alleli.

ER – excellent lithium responders – pacjenci z bardzo dobrą reakcją na lit (bez epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu)

PR – partial lithium responders – pacjenci z częściową reakcją na lit (redukcja epizodów afektywnych o 50% w trakcie pobierania litu w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem tego leku)

NR – lithium non-responders – pacjenci nie wykazujący korzystnego efektu litu (redukcja epizodów afektywnych w trakcie pobierania litu wynosiła mniej niż 50% w porównaniu z liczbą epizodów przed pobieraniem węglanu litu)

analizowanej grupy mężczyzn ( $p = 0,120$ ) i kobiet ( $p = 0,758$ ). Nie stwierdzono również istotnych różnic w częstości alleli A i G (cała grupa  $p = 0,768$ , mężczyźni  $p = 0,146$ , kobiety  $p = 0,487$ ). Nie znaleziono również statystycznie istotnych różnic porównując grupy ER + PR z grupą NR pod względem częstości genotypów ( $p = 0,395$ ) oraz alleli ( $p = 0,559$ ).

## Omówienie

Nasze badanie jest pierwszym, w którym badano zależność pomiędzy polimorfizmem 1287 A/G genu transportera noradrenaliny, a działaniem profilaktycznym węglanu litu w dobrze scharakteryzowanej grupie osób z chorobą afektywną dwubiegunową. Od czasu wprowadzenia leków przeciwdepresyjnych wybiórczo działających na transporter noradrenaliny, takich, jak reboksetyna, nastąpił dalszy wzrost zainteresowania udziałem tej substancji w etiopatogenezie chorób afektywnych. Znalazło to odzwierciedlenie w badaniach genetyczno-molekularnych, porównujących polimorfizmy NET u pacjentów z chorobami afektywnymi w porównaniu z osobami zdrowymi. Hadley i wsp. w 1995 roku badając pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową, nie stwierdzili związku pomiędzy polimorfizmem genu transportera noradrenaliny, a tym zaburzeniem (2). Badania Stobera i wsp. również nie potwierdziły asocjacji między polimorfizmem Val69Ile, Thr99Ile, Val245Ile, Val449Ile, Gly478Ser i 1287 A/G, a chorobą afektywną dwubiegunową (16). Jönsson i wsp. w 1998 roku wykazali natomiast zależność

pomiędzy stężeniem w płynie mózgowo-rdzeniowym 3-metoksy-4-hydroksy-fenyloglikolu (MHPG), a polimorfizmem transportera noradrenaliny, a ich rezultaty wskazują, że NET wywiera wpływ na metabolizm noradrenaliny w ośrodkowym układzie nerwowym (3). W poprzednim badaniu klinicznym typu „case-control” wykonanym w naszym ośrodku nie stwierdzono związku polimorfizmu 1287 A/G NET z zaburzeniami afektywnymi dwubiegunowymi (7).

Pewnym ograniczeniem w interpretacji wyników naszej pracy było badanie tylko jednego polimorfizmu genu transportera noradrenaliny. Uważa się również, że badany polimorfizm 1287A/G NET nie ma znaczenia funkcjonalnego dla działania transportera. Do pełniejszego spojrzenia na związek pomiędzy działaniem profilaktycznym węglanu litu u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową, a transporterem noradrenaliny, celowe wydaje się badanie szeregu polimorficznych wariantów genu NET, w tym takich, które mają znaczenie funkcjonalne.

## Piśmiennictwo

1. Bruss M., Kunz J., Lingen B., Bonisch H.: Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Hum. Genet.* 1993; 91: 278–80.
2. Hadley D., Hoff M., Holik J., Reimherr F., Wender P., Coon H., Byerley W.: Manic-depression and the norepinephrine transporter gene. *Hum. Heredity.* 1995; 45: 165–8.
3. Jönsson E., Nöthen M., Gustavsson P., Neidt H., Bunzel R., Propping P., Sedvall G.: Polymorphisms in the dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter genes and their relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *Psychiatry Res.* 1998; 79: 1–9.
4. Kelly C., Cooper S.: Differences and variability in plasma noradrenaline between depressive and anxiety disorders. *J. Psychopharmacol.* 1998; 12: 161–167.
5. Klimek V., Stockmeier C., Overholser J., Meltzer H., Kalka S., Dille G., Ordway G.: Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J. Neurosci.* 1997; 17: 8451–8458.
6. Lake C., Pickar D., Ziegler M., Lipper S., Slater S., Murphy D.: High plasma norepinephrine levels in patients with major affective disorder. *Am. J. Psychiatry.* 1982; 10: 1315–1318.
7. Leszczyńska-Rodziewicz A., Czernski P., Kapelski P., Godlewski S., Dmitrzak-Węglarz M., Rybakowski J., Hauser J.: A polymorphism of the norepinephrine transporter gene in bipolar disorder and schizophrenia: lack of association. *Neuropsychobiology.* 2002; 45: 182–185.
8. Ozerdem A., Schmidt M., Manji H., Risinger R., Potter W.: Chronic lithium administration enhances noradrenergic responses in intravenous administration of the alpha2 antagonist idazoxan in healthy volunteers. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2004; 24: 150–154.
9. Porzgen P., Bonisch H., Bruss M.: Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 215: 1145–1150.
10. Roy A., Pickar D., Linnoila M., Potter W.: Plasma norepinephrine level in affective disorders. Relationship to melancholia. *Arch. Gen. Psychiatry.* 1985; 42: 1181–1185.
11. Rybakowski J., Suwalska A., Czernski P., Dmitrzak-Węglarz M., Leszczyńska-Rodziewicz A., Hauser J.: Prophylactic effect of lithium in bipolar affective illness may be related to serotonin transporter genotype. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57: 124–7.
12. Rybakowski J., Suwalska A., Skibińska M., Szczepankiewicz A., Leszczyńska-Rodziewicz A., Permoda A., Czernski P., Hauser J.: Prophylactic lithium response and polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Pharmacopsychiatry.* 2005; 38: 166–170.

13. Sastre E., Nicolay A., Bruguerolle B., Portugal H.: Effect of lithium on norepinephrine metabolic pathways. *Life Sci.* 2005; 77: 758–767.
14. Schildkraut J.: The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry.* 1965; 122: 509–522.
15. Serretti A., Lilli R., Lorenzi C., Gasperini M., Smeraldi E.: Tryptophan hydroxylase gene and response to lithium prophylaxis in mood disorders. *J. Psychiatr. Res.* 1999b; 33: 371–7.
16. Stöber G., Nöthen M., Pörzgen P. et al.: Systematic search for variation in the Human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and study of association with major psychiatric disorders. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 67: 523–532.
17. Turecki G., Grof P., Cavazzoni P. et al.: Evidence for a role of phospholipase C-gamma1 in the pathogenesis of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry.* 1998; 3: 534–8.