

Polimorfizm genu promotora PAX-6 i inne czynniki związane z atrofią mózgowia u osób uzależnionych od alkoholu

PAX-6 gene promoter polymorphism and other factors involved in brain atrophy in alcohol dependent patients

Jerzy Samochowiec¹, Jolanta Kucharska-Mazur¹, Jan Horodnicki¹,
Klaus Peter Lesch², Hans Rommelspacher³, Lutz Gerhard Schmidt⁴

¹Z Katedry i Kliniki Psychiatrii PAM w Szczecinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Horodnicki

²Psychiatrische Klinik und Poliklinik Universität Würzburg

Kierownik: prof. dr hab. P. Riederer

³Klinische Neurobiologie Freie Universität Berlin

Kierownik: prof. dr hab. H. Rommelspacher

⁴Psychiatrische Klinik und Poliklinik Universität Mainz

Kierownik: prof. dr hab. L. G. Schmidt

Stwierdzono korelację między zanikami mózgu i mózdzku a polimorfizmem genu promotora PAX-6, obniżeniem tolerancji alkoholu, występowaniem objawów abstynencyjnych, w tym majaczenia alkoholowego.

alkohol
atrofia mózgu i mózdzku
PAX-6

We found correlation between atrophy of the brain and the cerebellum, and PAX-6 gene promoter polymorphism, decrease of alcohol tolerance, occurrence of withdrawal symptoms especially delirium tremens.

alkohol
brain and cerebellum atrophy
PAX-6

Wstęp

Uzależnienie od alkoholu, oprócz skutków społecznych i psychologicznych, powoduje także istotne skutki somatyczne [1]. Pojęcie tzw. alkoholowego uszkodzenia mózgu obejmuje m. in.: zaburzenie funkcji poznawczych, zespół Wernickego-Korsakowa, alkoholowe zwyrodnienie mózdzku i ośpienie alkoholowe [2]. Istotną rolę w tym procesie odgrywa neurotoksyczne działanie alkoholu, niedobór tiaminy, witaminy PP, uszkodzenie wątroby, urazy głowy, prenatalne narażenie na działanie alkoholu [3, 4, 5]. Skullerud i wsp. [6] stwierdzili zanik mózdzku u 37% alkoholików poddanych przez nich autopsji, przy czym uszkodzenia mózgu częściej występowały u osób prowadzą-

cych włóczęgowski tryb życia. Stwierdzono, że zanik mózgu jest bardziej nasilony u osób uzależnionych od alkoholu z zespołem Wernickego-Korsakowa w porównaniu z osobami uzależnionymi z marskością wątroby lub z uzależnionymi bez tych powikłań. Degeneracja neuronów w zewnętrznych warstwach kory występowała z równym natężeniem w trzech wymienionych grupach [4]. Wpływ na uszkodzenie mózgu ma też sposób picia alkoholu – u szczurów obserwowano mniejszą masę mózgu, jeżeli podawano im alkohol w okresie rozwoju mózgu w ten sposób, że jego chwilowe stężenie było większe, nawet jeśli na dobę wypijały mniej alkoholu niż szczury, u których chwilowe stężenia alkoholu były mniejsze [7].

Za szczególnie ważne dla pełnego zrozumienia istoty alkoholizmu jest znalezienie genetycznego podłoża poszczególnych neurobiologicznych i psychobiologicznych składowych uzależnienia. Na podstawie struktury, jądrowej lokalizacji oraz potencjału włączającego i wyłączającego procesy aktywacyjne stwierdzono, że geny PAX są czynnikami kontrolującymi rozwój płodu, a w szczególności uczestniczącymi w prawidłowej regionalizacji mózgowia. Ich ekspresja rozpoczyna się od 8 dnia od zapłodnienia [8]. Uczestniczą one w powstawaniu prekursorowych linii komórek neuronalnych oraz w ich dalszej specjalizacji. Jak wykazała to hybrydyzacja *in situ*, u dorosłych regionalna dystrybucja transkryptów genów PAX pozostaje nie zmieniona i wpływa na neuroplastyczność, procesy neurodegeneracyjne i neuroreperacyjne [9, 10, 11].

W pracy wybrano PAX-6, zawierający 14 eksonów, zlokalizowany w ludzkim chromosomie 11p13, prawdopodobnie związanym z uzależnieniem od alkoholu [12]. W nim znajdują się loci dla genów receptora D4 i hydroksylazy tyrozynowej. Nadto, PAX-6 odgrywa kluczową rolę w rozwoju układu limbicznego oraz w procesie migracji i różnicowania późno powstających neuronów kory mózgu [13]. Wpływa on na rozwój neuronów dopaminergicznych, czyli układów odgrywających istotną rolę w rozwoju uzależnienia poprzez efekt nagrody [10]. Prawie wszystkie mutacje PAX-6 powodują utratę funkcji alleli, co w rezultacie u człowieka może doprowadzić m.in. do braku tęczówki, a u myszy do fenotypu „małego oka” (small eye) [9]. Substytucje nukleotydów w rejonie eksonów powodują, że powstaje 80% kodonów nonsensownych [9]. Transkrypcja PAX-6 jest regulowana przez 2 oddzielne promotory, zwane A i B, przy czym ekspresja w dojrzałym mózgu jest kontrolowana głównie przez promotor B. Nadto, sekwencja powtórzeń polimorficznych dinukleotydów o strukturze (AC)_m (AG)_n znajduje się ~ 1 kb w kierunku „pod prąd” od miejsca inicjacji transkrypcji, związanego z promotorem B [14]. Stwierdzono występowanie ~ 80% alleli z 24–28 powtórzeniami. Aktywność promotora z wariantem z ≥ 29 powtórzeniami jest od 4 do 9 razy większa od aktywności allelu z 26 powtórzeniami („krótkie allele”), a zawartość mRNA jest dwukrotnie większa u osób z długimi allelami niż z krótkimi [15].

W prezentowanej pracy poszukiwano związku między polimorfizmem promotora PAX-6 i innymi parametrami opisującymi osoby uzależnione, takimi jak: sposób picia, prawdopodobieństwo szybszego zaniku mózgu i mózdzku.

Material i metody

Projekt badania uzyskał aprobatę Komisji Etyki Szpitala Klinicznego Rudolfa Virchowa przy Freie Universität Berlin. Uczestnicy badań wyrazili zgodę po uzyskaniu

pisemnej informacji o przebiegu badań i ich celu.

W badaniach wzięło udział 68 osób z ZZA, narodowości niemieckiej, w tym 59 mężczyzn (w wieku $41,2 \pm 9,5$) i 9 kobiet (w wieku $38,3 \pm 8,9$ lat). Osoby te spełniały kryteria zespołu zależności alkoholowej wg ICD-10. Rekrutowano je spośród pacjentów Kliniki Psychiatrii Freie Universität Berlin. Historię uzależnienia od alkoholu ustalano na podstawie ustruktrowanego wywiadu, opartego na Composite International Diagnostic Interview (CIDI), nasilenie objawów abstynencyjnych oceniano wg skali CIWA-R, nadto przeprowadzano badania internistyczne i psychiatryczne. Kryterium wykluczającym było uzależnienie od innej substancji niż alkohol lub nikotyna oraz stwierdzenie w wywiadzie poważnych schorzeń psychiatrycznych. Nadto, wyodrębniono grupy osób z alkoholowymi zespołami abstynencyjnymi powikłanymi drgawkami lub majaczeniem podanymi w wywiadzie.

U osób zakwalifikowanych do badań wykonywano tomografię komputerową mózgu i mózdzku, której wyniki oceniało 2 niezależnych radiologów z Kliniki Radiologii Benjamin Franklin Krankenhaus, Freie Universität Berlin [16], oraz dokonywano oceny polimorfizmu PAX-6, składającego się z 24 do 36 powtórzeń dinukleotydowych [17].

Preparatyka DNA: PCR wykonywano przy całkowitej objętości 25 μ l, zawierającej 60 ng genomowego DNA, 10 pM każdego primera, 200 μ M każdego dNTP, 2 μ Ci (α - 32 P)-dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol), 1,5 mM $MgCl_2$, 75 mM Tris – HCl: pH 9,0, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% Tween 20 i 0,5 j. polimerazy Taq DNA (Eurogentec). Primerami były:

P6repU (sense):

5' - CTC CGT GGA CTG AGA AGA C-3'

P6repD (antisense):

5' - GGA TGA CCA ATG CTG GGA - 3'

Warunki PCR były następujące: 95°C przez 3 min + 94°C przez 40 s (denaturacja) + 56°C przez 30 s (annealing) + 72°C przez 1 min (elongacja) przez 35 cykli, końcowa elongacja przez 5 min przy 72°C. Do 2 μ l produktu PCR dodawano 8 μ l roztworu kończącego (zawierającego 97% dejonizowany formamid; 10 mM EDTA: pH 7,5; 0,03% błękit bromofenolowy, 0,003% ksilenocyjanol FF). Mieszanina była ogrzewana do 90°C przez 3 min, chłodzona w lodzie i umieszczana na 6% żelu poliakryloamidowym, na którym rozdzielano fragmenty alleli znakowane radioaktywnym fosforem 32 P. Elektroforezę wykonywano przez 2,5 h przy 65 W, po czym wysuszony żel zamykano w kasecie z kliszą na 12 do 48 h w zamrażarce do -70°C.

Analiza statystyczna: Stosowano test rang Spearmana oraz test Manna-Whitneya w celu oceny korelacji między polimorfizmem promotora genu PAX-6 oraz parametrami charakteryzującymi grupę osób uzależnionych od alkoholu a zanikiem mózgu.

Wyniki

Uzyskane wyniki potwierdzają prawo Hardy'ego–Weinberga; częstości alleli i genotypów pacjentów przedstawiono w pracy opublikowanej przez nas w *Addiction*

Biology [17].

W tabeli 1 przedstawiono analizę zależności między zanikami mózgowia a liczbą

Tabela 1

**Analiza zależności między zanikami mózgowia a liczbą powtórzeń
(od 24 do 36 dinukleotydowych powtórzeń) w promotorze B genu PAX-6 u 68 pacjentów.
W tabeli podano współczynniki korelacji**

Parametr	PAX-6-1	PAX-6-2	PAX-6 carr
Zanik mózgu (u: n=63)	-0,300 p=0,001*	-0,333 p=0,005*	-0,425 p<0,001*
Zanik wokolicy czarnej (u: n=59)	0,028 p=0,821	-0,060 p=0,595	-0,129 p=0,293
Zanik wokolicy południowej (u: n=13)	0,092 p=0,465	0,02 p=0,871	0,030 p=0,75
Zanik wokolicy ciemieniowej (u: n=59)	0,036 p=0,773	-0,005 p=0,900	-0,052 p=0,675
Zanik wokolicy skroniowej (u: n=44)	0,047 p=0,704	-0,002 p=0,914	-0,002 p=0,914
Zanik mózdzku (u: n=27)	-0,329 p=0,000*	-0,429 p<0,001*	-0,550 p<0,001*
Poszerzenie układu komorowego (u: n=20)	-0,115 p=0,235	-0,147 p=0,23	-0,166 p=0,177
Kliniczna ocena ataksji mózdzkowej (u: n=0)	-0,261 p=0,032*	-0,282 p=0,02*	-0,405 p=0,001*

PAX-6-1 – 1. allel, PAX-6-2 – 2. allel, przy czym liczba powtórzeń w PAX-6-1 ≤ PAX-6-2,
PAX-6 carr – jeżeli przynajmniej jeden allel zawiera ≥ 29 powtórzeń, PAX-6 carr=1, jeżeli nie –
PAX-6 carr=0; * – zależność jest istotna statystycznie

powtórzeń w promotorze B genu PAX-6.

W tabeli 2 przedstawiono związki pomiędzy zmianami w różnych obszarach mózgu a takimi cechami klinicznymi, jak: spadek tolerancji alkoholu, występowanie objawów abstynencyjnych, w tym majaczenia alkoholowego.

Nie stwierdzono korelacji między zanikami mózgowia a płcią, wiekiem osoby uzależnionej, zwiększeniem tolerancji alkoholu, ilością wypijanego alkoholu w ciągu doby, urazami głowy podanymi w wywiadzie, występowaniem padaczki alkoholowej, głodu alkoholowego, palimpsestów, warunkami socjalnymi osoby uzależnionej (posiadanie mieszkania, pracy, korzystanie z opieki socjalnej), próbami samobójczymi ujawnionymi w wywiadzie.

Tabela 2
Niegenetyczne parametry skorelowane z zanikami w obrębie mózgowia (n = 68).
W tabeli podano współczynniki korelacji

Parametr	Spadek tolerancji alkoholu u 6% pacjentów	Niepełne objawy abstinencyjne u 100% pacjentów	Mijażenie alkoholowe u 19% pacjentów
Zanik mózgu (u: n=68)	0,161 p=0,189	0,112 p=0,384	0,138 p=0,318
Zanik wokolicy czółowej (u: n=59)	0,044 p=0,722	0,345 p=0,044*	0,328 p=0,006*
Zanik wokolicy polifalnej (u: n=16)	0,028 p=0,821	0,173 p=0,158	0,246 p=0,043*
Zanik wokolicy ciemienskiej (u: n=59)	0,019 p=0,879	0,234 p=0,054	0,333 p=0,006*
Zanik wokolicy skroniowej (u: n=44)	-0,077 p=0,534	0,328 p=0,006*	0,341 p=0,004*
Zanik móżdżku (u: n=27)	0,243 p=0,046*	0,182 p=0,137	0,266 p=0,029*
Poszerzenie układu komorowego (u: n=26)	-0,062 p=0,615	0,099 p=0,424	0,309* p=0,01
Minimalna ocena skłębki móżdżkowej (u: n=5)	0,148 p=0,23	0,028 p=0,833	-0,158 p=0,228

* – zależność jest istotna statystycznie

Omówienie wyników

W badanej grupie 68 osób uzależnionych od etanolu stwierdzono zaniki w różnych częściach mózgowia łącznie u 92,6% osób. Ten odsetek jest większy niż w badaniach Skulleruda i wsp. [6], którzy stosowali jednak odmienną metodę oceny (autopsja), nadto ich badania dotyczyły innej populacji.

Z uzyskanych rezultatów wynika, że istnieje odwrotnie proporcjonalny związek między liczbą powtórzeń w promotorze genu PAX-6 a występowaniem zaników mózgu i móżdżku. Może to być związane z wpływem tego genu na procesy neuroplastyczne (degenerację i regenerację) w ośrodkowym układzie nerwowym. Ekspresja genu mającego co najmniej 29 powtórzeń dinukleotydowych (AC)_m (AG)_n jest u ludzi przeszło 2–3-krotnie większa – co wykazali w swoich badaniach Okladnova i wsp. [15] oraz Sander i wsp. [18] – stąd być może większa zdolność regeneracyjna mózgowia u osób

ęięć+ínńarę d'ianidlicé (AC)_m, (RĀ)_n â d'tëinidł Ā alir PAX-6 č řndiôčlé eïçar č eïçcl-ęř.

Đi' aeličl řndiôčé eiddlëčdiarëi n ôeliurlicé nieldríninnč ę řëçaiët, d'i' aeličlé řánnçilïöçiiüö nčed'niëiá, inëiçiliiüö řëçaiëüüë älëčclë.

Polymorphismus des Promotorgenes PAX-6 und andere Faktoren, die mit der Enzephalonatrophy bei alkoholabhängiger Personen verbunden sind

Zusammenfassung

In der Gruppe von 68 Personen, die alkoholabhängig waren, beurteilte man die Geschichte der Alkoholabhängigkeit mit der Hilfe eines strukturalisierten Interviews. Der Polymorphismus des Promotorgenes PAX - 6 wurde untersucht. Man beurteilte das Auftreten der atrophischen Prozesse des Zerebrums und des Enzephalons mit Hilfe von CT. Es wurde ein negativer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Wiederholungen (AC)_m (AG)_n im Promotor des Genes PAX - 6 und der Atrophie des Zerebrums und Enzephalons festgestellt. Das Auftreten der Atrophie hing mit der Verringerung der Alkoholtoleranz, Auftreten der Abstinenzsymptome zusammen, die mit dem Alkoholdelir kompliziert wurden.

Le polymorphisme du gène promoteur PAX-6 et les autres facteurs liés avec l'atrophie du cerveau des alcooliques

Résumé

Dans le groupe de 68 alcooliques on examine le polymorphisme du gène promoteur PAX-6, l'histoire de l'alcoolisme et l'atrophie de la cervelle et du cerebellum. On trouve une négative corrélation du nombre de répétitions (AC)_m (AG)_n du promoteur B du gène PAX-6 et l'atrophie de la cervelle et du cerebellum. L'apparition de ces lésions corréle avec la tolérance abaissée de l'alcool, les symptômes de l'abstinence et le delirium tremens.

Piśmiennictwo

1. Scheepers BD. *Alcohol and the brain*. Brit. J. Hosp. Med. 1997; 57: 548–551.
2. Butterworth RF. *Pathophysiology of alcoholic brain damage: synergistic effects of ethanol, thiamine deficiency and alcoholic liver disease*. Metab. Brain Dis. 1995; 10: 1–8.
3. Charness ME. *Brain lesions in alcoholics*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1993; 17: 2–11.
4. Kril JJ. *The contribution of alcohol, thiamine deficiency and cirrhosis of the liver to cerebral cortical damage in alcoholics*. Metab. Brain Dis. 1995; 10: 9–16.
5. Solomon DA, Malloy PF. *Alcohol, head injury, and neuropsychological function*. Neuropsychol. Rev. 1992; 3: 249–280.
6. Skullerud K, Andersen SN, Lundevall J. *Cerebral lesions and causes of death in male alcoholics. A forensic autopsy study*. Int. J. Legal. Med. 1991; 104: 209–213.
7. Bonthius DJ, West JR. *Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1990; 14: 107–118.
8. Prosser J, van Heyningen V. *Pax mutations reviewed*. Hum. Mutat. 1998; 11: 93–108.
9. Chalepakis G, Stoykova A, Wijnholds J, Tremblay P, Gruss P. *Pax: gene regulators in the developing nervous system*. J. Neurobiol. 1993; 10: 1367–1384.
10. Stoykova A, Gruss P. *Roles of Pax genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns*. J. Neurosc. 1994; 14: 1395–1412.
11. Tremblay P, Gruss P. *Pax: genes for mice and men*. Pharmacol. Ther. 1994; 61: 205–226.
12. Long JC, Knowler WC, Hanson RL. *Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome – wide scan in an American Indian population*. Am.

- J. Med. Genet. 1998; 81: 216–221.
13. Fukuda T, Kawano H, Osumi N, Eto K, Kawamura K. *Histogenesis of the cerebral cortex in rat fetuses with a mutation in the Pax-6 gene*. Brain Res. Dev. Brain Res. 2000; 120: 65–75.
 14. Okladnova O, Syagailo YV, Moessner R, Riederer P, Lesch KP. *Regulation of Pax-6 gene transcription: alternate promoter usage in human brain*. Brain Res. Mol. Brain Res. 1998; 60: 177–192.
 15. Okladnova O, Syagailo YV, Tratnitz M. *A promoter-associated polymorphic repeat modulates PAX-6 expression in human brain*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998; 248: 402–405.
 16. Busse O, Agnoli AL, Lippmann R, Schutz HJ. *The clinical significance of ventricular enlargement and cortical atrophy in computed tomography of the brain*. Radiol. 1981; 21: 91–97.
 17. Samochowiec J, Rottmann M, Okladnova O, Syagailo Y, Stober G, Sander T, Muhlbauer E, Smolka M, Tranitz M, Winterer G, Rommelspacher H, Schmidt LG, Lesch KP. *Association analysis of a PAX-6 gene promoter-associated polymorphic repeat with alcohol dependence*. Add. Biol. 1999; 4: 323–328.
 18. Sander T, Syagailo Y, Samochowiec J, Okladnova O, Lesch KP, Janz D. *Association analysis of a regulatory promoter polymorphism of the PAX-6 gene with idiopathic generalized epilepsy*. Epilepsy Res. 1999; 1: 61–67.

Otrzymano: 28.08.2000
Zrecenzowano: 9.07.2001
Przyjęto do druku: 22.08.2001

Adres: Jerzy Samochowiec
Katedra i Klinika Psychiatrii PAM
71-460 Szczecin, ul. Broniewskiego 26
Email: samoj@sci.pam.szczecin.pl