

*Urszula Pych, Anna Tonderska,
Andrzej Bidziński, Adam Płaźnik*

Transporter serotoniny

Zakład Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

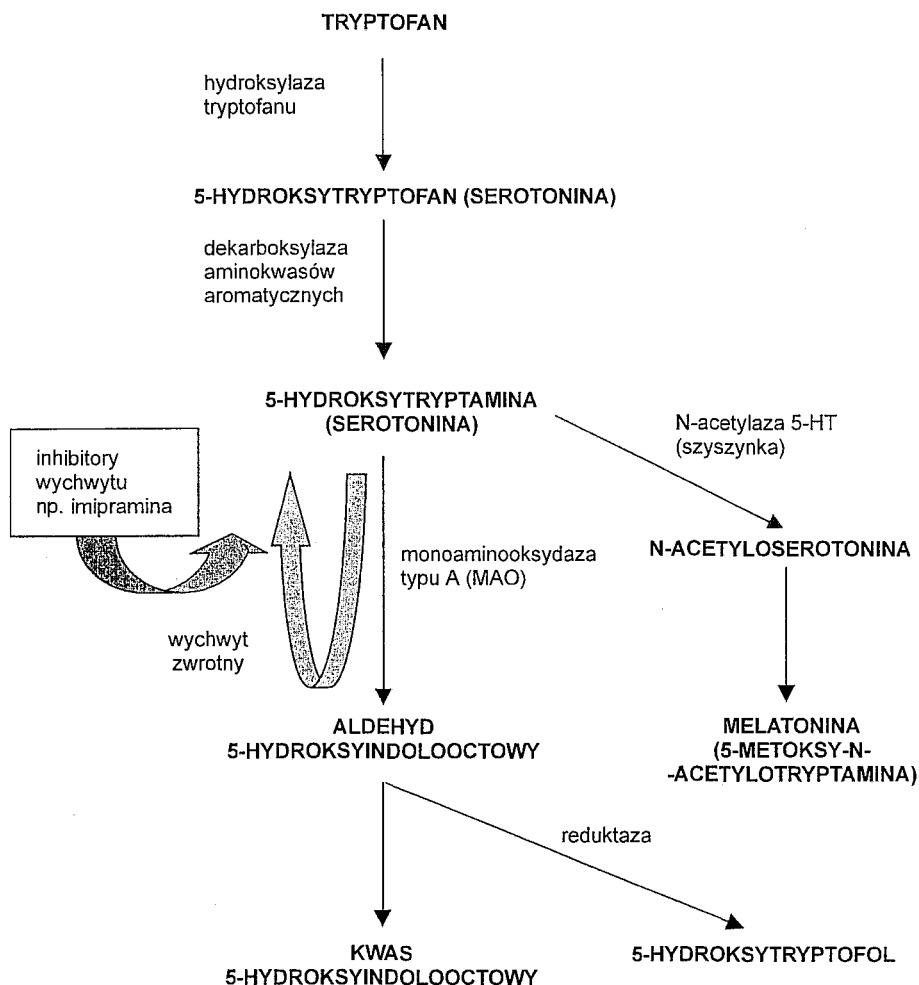
Wychwyt zwrotny serotoniny z przestrzeni synaptycznej odbywa się przy pomocy transportera serotoniny (5-HTT). Aktywność 5-HTT jest regulowana przez kinazę białkową C i fosfatazę 2A. Trwają intensywne badania nad zmianami w obwodowej i ośrodkowej aktywności transportera, poprzez analizowanie kinetyki wychwytu zwrotnego, szybkości maksymalnej (V_{max}) oraz stałej powinowactwa (K_m). Celem tej pracy jest przegląd najbardziej interesujących prac badawczych na temat zmian w ekspresji 5-HTT, skorelowanej z chorobami psychicznymi (jako ligandów używa się [3H]imipraminy, [3H]paroksetyny, [3H]citalopramu).

Summary

The termination of serotonergic neurotransmission is accomplished by rapid uptake of the released 5-HT by serotonin transporter (5-HTT). Activity 5-HTT is regulated by kinase C and phosphatase 2A. Changes in peripheral and central activity of 5-HTT (its uptake kinetic, V_{max} and K_m) are intensively studied. Many reports show modification in the binding of platelet presynaptic 5-HT uptake sites in psychiatric illnesses (with [3H]imipramine, [3H]paroxetine, [3H]citalopram used as ligands). This papers reviews some of the most important data from this field of research.

1. Wstęp

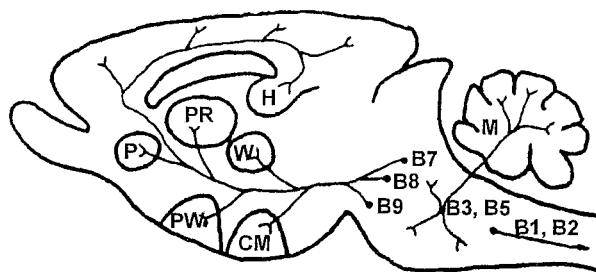
W układzie nerwowym u organizmów wyższych przekąźnictwo chemiczne jest główną drogą komunikacji międzyneuronalnej. Do substancji przekąźnikowych należą między innymi acetylocholina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, niektóre aminokwasy (kwas gamma-aminomasłowy, glicyna, kwas glutaminowy). Ważnym przenośnikiem chemicznym jest serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT), syntetyzowana z egzogenego aminokwasu L-tryptofanu (rys. 1) (30, 92), w komórkach błony śluzowej jelit i w OUN (8). Serotonina reguluje procesy morfogenetyczne (proliferaację komórkową, migrację i różnicowanie komórek nerwowych). Neurony serotonergiczne pełnią istotną rolę w różnych czynnościach mózgu (rys. 2) (92). 5-HT obecna jest w największych ilościach w płytkach krwi, w przewodzie pokarmowym, w mózgowiu i siatkówce (23). Wprawdzie płytki krwi nie mogą syntetyzować 5-HT, ale są w stanie ją wychwytywać, magazynować i uwalniać.



Rys. 1. Schemat przedstawiający syntezę i metabolizm 5-HT (wg Kostowski 1996)

Uważa się, że zaburzenia w czynności serotonergicznego unerwienia OUN są ważne z punktu widzenia patomechanizmu chorób afektywnych, lękowych, uzależnień, tendencji samobójczych, migreny, bulimii, otyłości, zaburzeń snu i pamięci. Na precyzję międzykomórkowej komunikacji w OUN duży wpływ ma czas trwania i intensywność działania neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej. 40 lat temu odkryto, że neuroprzekaźniki są inaktywowane przez tzw. wychwyt zwrotny, w który są zaangażowane selektywne białka nośnikowe – transportery. Dotąd scharakteryzowano 20 różnych transporterów (29), przypisując im istotny udział przy przekazywaniu impulsów nerwowych, bowiem przyczyniają się one do zakończenia sygnału w komórce nerwowej (50).

W przekaznictwie synaptycznym serotoniny bierze udział 15 różnych typów receptorów, a za usunięcie serotoniny znajdującej się w przestrzeni synaptycz-



Ryc. 2. Schemat lokalizacji głównych szlaków serotonergicznych w mózgu: CM – ciało migdałowe, H – hipokamp, M – mózdzek, P – przegroda, PR – prążkowie, PW – podwzgórze, W – wzgórze, B1–B9 – jądra szwu (wg Zahorodna 2000)

nej jest odpowiedzialny transporter serotoniny (5-HTT) (rys. 3) (8, 70) (inna nazwa SERT tzn. presynaptyczny transporter serotoniny) (11). 5-HTT wychwytyjąc serotoninę z przestrzeni synaptycznej wkrótce po uwolnieniu moduluje jej zawartość w przestrzeni synaptycznej.

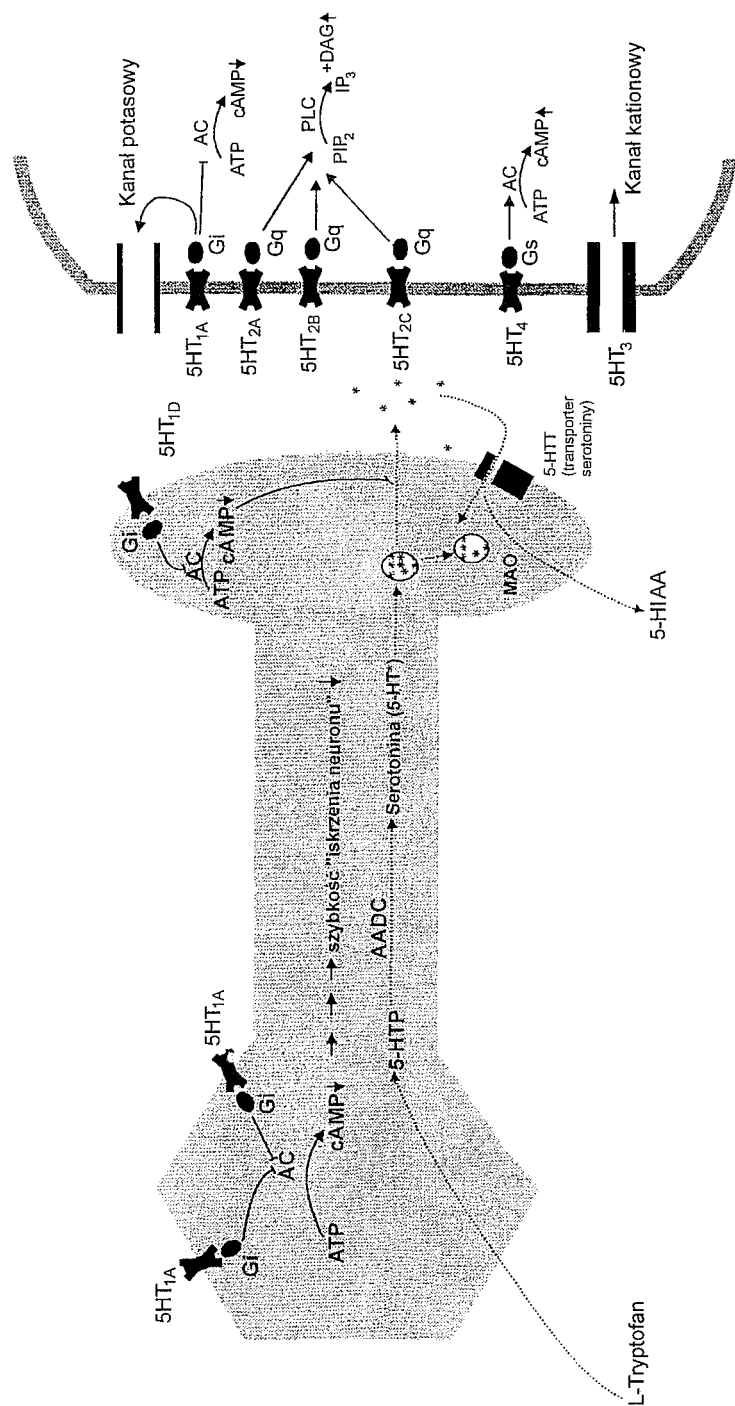
2. Historia odkrycia transportera serotoniny i transportera noradrenaliny

Transporter noradrenaliny (NET) i 5-HTT są transporterami monoaminowymi. W związku z tym, iż są one miejscem działania wielu leków przeciwdepresyjnych, wzrosło zainteresowanie ich budową oraz funkcjonowaniem (29).

Pierwszym poznanym transporterem był transporter GABA (91), następnie odkryto transporter noradrenaliny. W 1991 roku udało się zlokalizować ludzki gen kodujący transporter noradrenaliny. Gen kodujący ten transporter (znajduje się na długim ramieniu chromosomu 16) (36, 55). Wiadomo też, że zarówno NET jak również 5-HTT jest hamowany przez trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, kokainę i amfetaminę. Z mózgu szczura wyizolowano również fragment DNA, który koduje transporter serotoniny (91).

3. Lokalizacja transporterów

Do lokalizacji transporterów używa się metod immunochemicznych oraz hybrydyzacji *in situ*. Określenie położenia transporterów w mózgu człowieka stało się możliwe dzięki zastosowaniu selektywnych radioligandów (55). Wykazano, że ekspresja transportera serotoniny zachodzi w neuronach i komórkach glejowych, a największe jego zagęszczenie występuje w śródmózgowiu, moście, wzgórzu i podwzgórzu (93). Stwierdzono występowanie 5-HTT w licznych komórkach poza neuronami – w płytkach krwi i limfoblastach oraz w łożysku (50). W celu zlokalizowania transmembranowych helis będących fragmentami 5-HTT wykorzystuje się przeciwciała (tzw. SERT specyficzne) oraz techniki immunofluorescencyjne (50).



Rys. 3. Schemat pokazujący synapsę 5-HT z uwzględnieniem rozmieszczenia receptorów, mechanizmu przekazywania synaptycznego, syntezy i metabolizmu 5-HT (wg Benkert 1993)

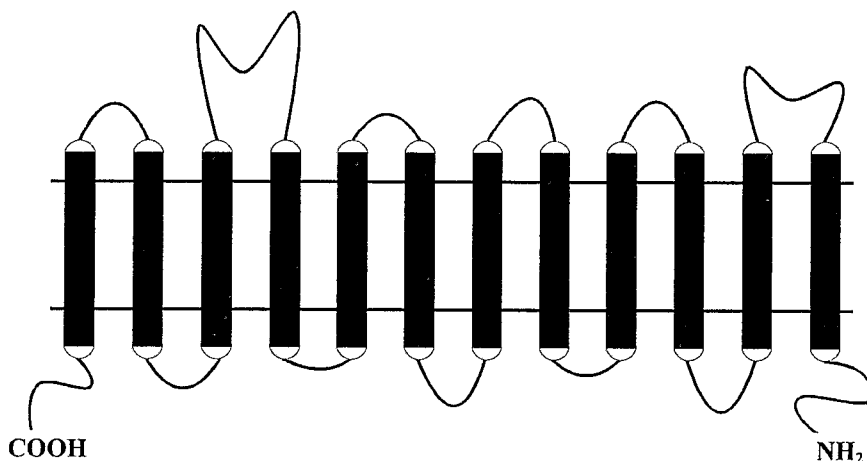
Objaśnienia:	AC	cyklaza adenylowa	5-HTP	5-hydroksytryptofan
.....	PLC	fosfolipaza C	PIP ₂	dwufosforan inozytolu
—	TRPH	hydroksylaza tryptofanu	5-HIAA	kwas 5-hydroksyindolooctowy
→	AADC	dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych	IP ₃	trójfosforan inozytolu
Gi, Gs, Gq	MAO	monoaminooksydaza	DAG	diacylglicerol

4. Budowa transportera serotoniny

Ze względu na miejsce działania transportery neuroprzekaźników dzieli się na dwie rodziny:

1. błonowe znajdujące się w błonie presynaptycznej, odpowiedzialne za wychwyt zwrotny neuroprzekaźnika. Aktywność tych transporterów zależy przede wszystkim od gradientu Na^+ , a dodatkowo od Cl^- i K^+ .
2. pęcherzykowe transportujące serotoninę z cytoplazmy do wnętrza pęcherzyków magazynujących służących do przechowywania neurotransmiterów (29).

Klasycznymi transporterami błonowymi są SCDNT (transportery neurotransmiterów zależne od sodu i chloru), do których należy m.in. 5-HTT. U ssaków transporter serotoniny wykazuje homologię budowy z transporterem dopaminy i norepinefryny. Ma on strukturę odpowiadającą ogólnemu schematowi budowy SCDNT (rys. 4) (36, 91), a mianowicie składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 630 aminokwasów, którego końce $-\text{NH}_2$ i $-\text{COOH}$ umieszczone są od strony wewnętrznej błony komórki. Łańcuch ten dwunastokrotnie „przebiega” podwójną warstwę lipidową błony komórkowej tworząc w ten sposób 12 helikoidalnych transmembranowych domen (TM1-TM12), które składają się z 15–25 aminokwasów. Helisy oddzielone są poprzez pętle (jest 6 zewnątrz- i 5 wewnątrzkomórkowych pętli). Duża pętla zewnątrzkomórkowa zawiera prawdopodobnie cztery miejsca do N-glikozylacji. Przypuszcza się, że domeny TM1-TM4 mogą być zaangażowane w transport Na^+ , Cl^- , a domenom TM7-TM12 przypisuje się rolę w rozpoznawaniu substratu 5-HT i wiązaniu inhibitora. Region TM12 ma wysokie powinowactwo do trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, a TM1 ma wysokie powinowactwo do mazindolu, citalopramu i kokainy (50, 91). 5-HTT ma dwa miejsca do przyłączenia się serotoniny i dwa miejsca do przyłączenia się kokainy (91).

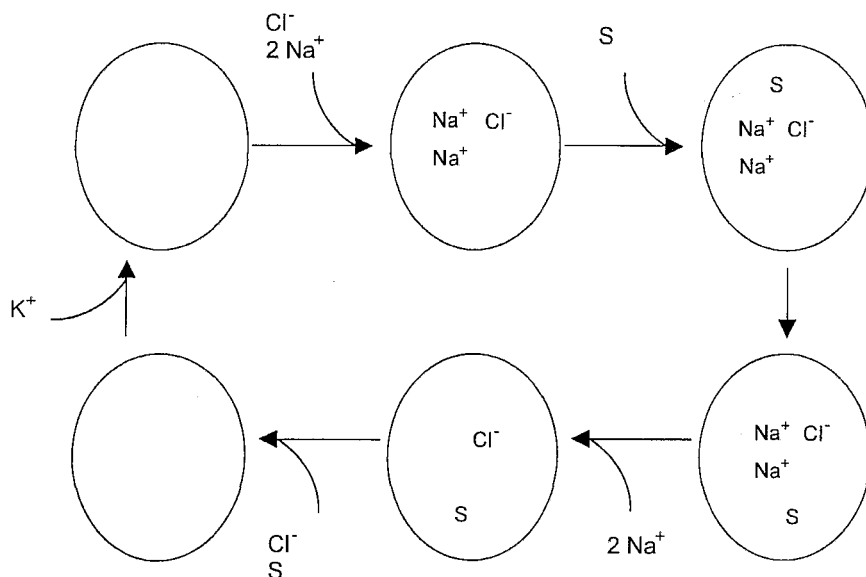


Rys. 4. Schemat budowy transportera serotoniny (wg Lesch 1998)

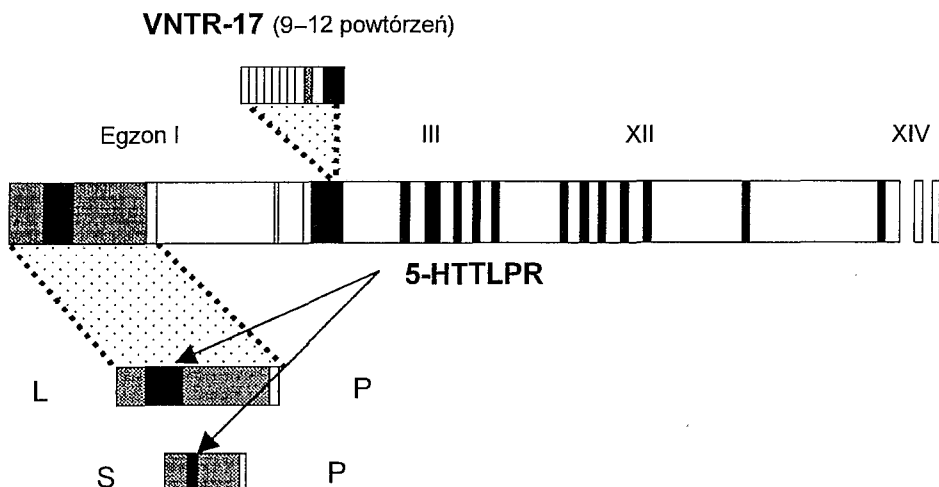
5. Regulacja

Mechanizm transportu serotoniny przez 5-HTT jest związany z udziałem Na^+ , Cl^- (rys. 5) (50). Do zewnętrznej strony błony transportera przyłączają się jony Na^+ , Cl^- . W wyniku tego zachodzą zmiany konformacyjne, umożliwiające przyłączenie substratu, np. 5-HT. Następnie po przeniknięciu do wnętrza komórki odłącza się substrat i zostają uwolnione jony Na^+ , Cl^- . Transporter wraca do pierwotnego stanu przy udziale jonów K^+ . Tak więc 5-HTT jest zależny od jonów Na^+ , Cl^- (po zewnętrznej stronie błony komórkowej) oraz od K^+ (po cytoplazmatycznej stronie transportera). Prawdopodobnie transportery monoaminowe są regulowane przez fosforylację przy udziale kinazy białkowej i defosforylację przy pomocy fosfatazy. Fosforylacja zmienia aktywność transportera przy pomocy podobnych mechanizmów jak to ma miejsce w przypadku receptorów związanych z białkiem G (GPCRs). Badania wykazały, że wychwyt zwrotny 5-HT jest regulowany przez kinazę białkową C (PKC) zależną od diacyloglicerolu. Sugeruje się, że przy udziale kinazy następuje fosforylacja, co powoduje obniżenie transportu (11). Zahamowanie aktywności fosfataz, a szczególnie fosfatazy 2A (które są enzymami defosforylującymi transporter) nasila fosforylację. Badania wykazały, że serotonina może obniżać fosforylację transportera serotoniny i tym samym nasilać czynność 5-HTT (11, 65).

Działalność 5-HTT jest ponadto regulowana na poziomie genetycznym. Badania *in vitro* wykazały, że ekspresja genu omawianego transportera jest regulowana przez cAMP oraz hormony steroidowe i leki przeciwdepresyjne.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający wychwyt zwrotny neuroprzekaźnika przy udziale jonów (opis rysunku w tekście). S – substrat (wg Nelson 1999)



Rys. 6. Budowa i regulacja ekspresji genu transportera serotoniny. Dwie formy genu 5-HTTLPR: forma L (długa), forma S (krótka), VNTR-17: intron II genu promotora (wg Lesch 1998)

Gen transportera serotoniny jest umiejscowiony na chromosomie 17q11.1-q12, a w jego budowie wyróżniamy 14 egzonów obejmujących 35 kpz. Opisano polimorfizm tego genu (rys. 6) – jedna postać dotyczy intronu 2 i polega na zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (VNTR – variable number of tandem repeats). W tym przypadku motyw jest powtórzony 9, 10 lub 12 razy i liczy 16–17 pz. Sugeruje się na podstawie badań genetycznych, że wystąpienie 9 powtórzeń może być związane z występowaniem depresji jednobiegunowej, natomiast 12 powtórzeń z występowaniem depresji dwubiegunowej (36). Inny polimorfizm insercyjno-delecyjny występuje w rejonie kontrolującym transkrypcję genu transportera 5-HTT. Charakteryzuje się występowaniem dwóch form alleli, które regulują aktywność promotora. W populacji ludzi spotyka się trzy fenotypy: ll, ls, ss. W przypadku występowania homozygoty typu ll dochodzi do zwiększonej aktywności transkrypcyjnej genu, co wiąże się również ze zwiększeniem wychwyty zwrotnego serotoniny. Natomiast występowanie fenotypu ss jest związane ze zmniejszonym wychwytem zwrotnym 5-HT, a także występowaniem szeregu chorób np. choroby afektywnej, anoreksji, bulimii, depresji, uzależnień alkoholowych czy tendencji samobójczych (36, 60, 84, 87). Do nieprawidłowości dochodzi również na poziomie transkrypcji (duże znaczenie może mieć tutaj kinaza białkowa zależna od cAMP), translacji lub przemieszczenia transportera do błony komórkowej.

Zastosowania osiągnięć genetyki i biologii molekularnej w farmakologii jest ogromnym krokiem naprzód w badaniu mechanizmu działania leków. Pod wpływem leków przeciwdepresyjnych dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących wiele kluczowych dla systemu nerwowego białek, takich jak hydroksylaza tyrozyny, białko 5-HTT, receptory glukokortykoidowe, receptory monoaminergiczne (47).

6. Wiązanie radioligandów do transportera

Badanie funkcji serotoninerгіcznych na poziomie obwodowym datuje się od lat siedemdziesiątych, kiedy uznano, że płytki krwi przez swoje podobieństwo morfologiczne i biochemiczne (tabela 1) do neuronów serotoninerгіcznych są doskonałym narzędziem badawczym dla układu serotoninerгіcznego (75, 77).

Tabela 1. Porównanie płytek krwi i neuronu (wg Owens 1994)

	Płytki	Neuron
Transporter błonowy (5-HTT)	+	+
Transporter pęcherzykowy (5-HTT)	+	+
Wychwyt i transport 5-HT	+	+
Uwalnianie 5-HT	+	+
Synteza 5-HT	—	+
MAO typu B	+	+
Enolaza neuronalna	+	+

Ocenę obwodowej aktywności transportera u ludzi można dokonać stosując różne metody:

1. Poprzez badanie kinetyki wychwytu zwrotnego, oceniając szybkość maksymalną transportu serotoniny (V_{max}), oraz stałą powinowactwa (K_m); oba te parametry mogą być zaburzone w chorobach, u podłoża których leży dysfunkcja układu 5-HT.
2. Badanie wiązania radioligandów, będących specyficznymi antagonistami transportera, [3H]imipraminy[IMI], [3H]paroksetyny i [3H]citalopramu. Ta metoda dostarcza informacji o maksymalnej ilości miejsc wiążących radioligand, B_{max} , oraz o K_d , stałej dysocjacji (26).

Obie te metody badania parametrów serotoniny na obwodzie znalazły zastosowanie w ocenie różnic pomiędzy chorymi na depresję i inne zaburzenia psychiczne a osobami zdrowymi. Metody te stosuje się również do oceny postmortem aktywności 5-HTT w mózgu. Obecnie możliwe są także badania *in vivo* przy użyciu metod obrazowania mózgu z wykorzystaniem specyficznych radioligandów jak [123-I]-beta-CIT ([124-I]-metylo3beta-/jodofenylo/-tropan). Metody te to PET-pozytronowa tomografia emisyjna, SPECT-fotonowa tomografia emisyjna, oraz bardziej dostępny i mniej kosztowny funkcjonalny rezonans magnetyczny (66). Często stosuje się w badaniach molekularnych metodę hybrydyzacji *in situ* do określenia ilości powstającego, nowego mRNA dla białka transportera.

A. Badania wiązania imipraminy (IMI) do transportera serotoniny

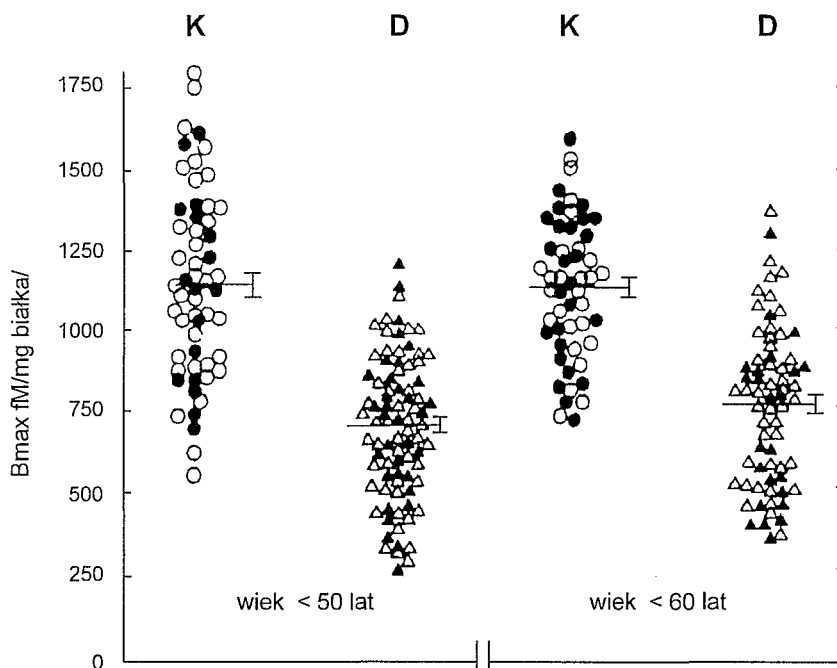
Przez ostatnie dwie dekady powstała bardzo duża ilość prac badawczych na temat wiązania imipraminy do transportera znajdującego się w płytkach krwi u chorych z depresją. Wczesne badania (tabela 2) dowodziły, że wiązanie

Tabela 2. Wartości Bmax (fmole/mg białka) i Kd (nM) dla wiązania imipraminy w depresji i innych zaburzeniach psychicznych (wg Ellis 1994)

Autor	Choroba	Grupa kontrolna			Chorzy		
		Bmax	SD	Kd	SD	Bmax	SD
Paul (1980)	Depresja	703		1,9		548	2,0
Raisman (1981)	Depresja	581		2,4		300	2,4
Baron (1983)	Depresja	991		3,4		776	2,5
Suranyi-Cadote (1983)	Depresja	658	136	3,0	0,5	510	3,0
Schneider (1985)	Depresja	2 656	705	1,9	0,4	2 138	1,9
Braddock (1986)	Depresja	120	22	0,5	0,1	122	0,6
Nemeroff (1988)	Depresja	943		1,0		547	0,9
Plenge (1988)	Depresja	1 240		0,6		1 243	0,6
Szadoczky (1989)	Depresja	903		1,9		616	1,6
Healy (1990)	Depresja	1 076	45	0,56	0,04	1 087	0,55
Mellerup (1990)	Depresja	619	216	0,2	0,1	544	0,2
Black (1990)	OCD	1 052	449	1,23	0,69	1 198	1,08
Szadoczky (1991)	Depresja	1 048		2,0		663	1,4
DeMet (1991)	Depresja	2 490		1,79	0,27	1 570	1,96
Nemeroff (1994)	Depresja	1 077	189	1,01	0,3	754	1,09
Iny (1994)	Depresja	1 784	430	1,5	0,5	1 280	2,7
„	Dystymia	„		„		1 248	1,4
„	GAD	„		„		1 240	316
„	Panika	„		„		1 190	2,2
Rosel (1999)	Depresja	1 712	106	1,25	0,09	1 134	74
Arranz (1999)	Alkoholizm	1 225	62	0,95	0,06	1 147	59
							0,98
							0,03
							0,1
							0,94
							0,82
							0,3
							1,4
							0,9
							1,1
							1,0
							0,05
							0,08

OCD – zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne

GAD – lęk uogólniony



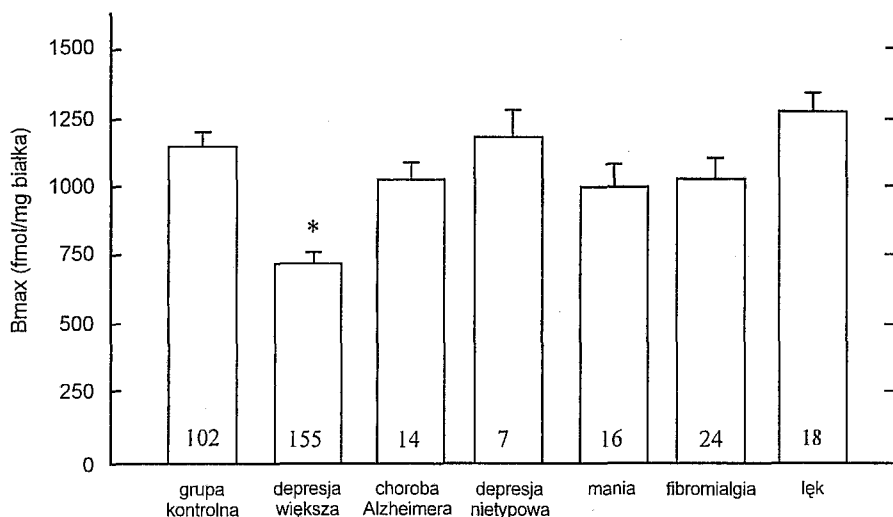
Rys. 7. Indywidualne wartości Bmax dla [3H]imipraminy w płytkach osób chorych i zdrowych u kobiet i mężczyzn. Wyniki dla chorych w obu grupach wiekowych są znacznie niższe niż u osób zdrowych ($p < 0,01$).

Oznaczenia: K – grupa kontrolna, D – chorzy na depresję, $\blacktriangle \bullet$ – mężczyźni, $\triangle \circ$ – kobiety (wg Owens 1994)

to jest znamienne obniżone w depresji jedno- i dwubiegunowej (46, 56, 57, 64). Ponieważ zjawisko redukcji wiązania było powtarzalne (65–75% autorów stwierdzało obniżenie wiązania), fakt ten został uznany za istotny marker depresji, mimo bardzo dużych rozrzutów wartości Bmax w grupach chorych i zdrowych oraz znacznego „zachodzenia” na siebie wyników otrzymanych dla chorych i zdrowych w tym samym eksperymencie (rys. 7).

Sytuacja nie jest jednak jednoznaczna, bowiem Paul (1981), Suranyi-Cadotte (1985), Gay i wsp. (1983) badając grupę chorych leczonych elektrowstrząsami lub lekami przeciwdepresyjnymi wykazali, że niezależnie od klinicznej reakcji chorych na terapię wiązanie imipraminy nie różniło się od wartości przed leczeniem.

Problem, czy obniżone wiązanie imipraminy jest markerem cechy czy stanu (depresyjnego) do dnia dzisiejszego nie został rozstrzygnięty. Większość autorów przyjęła zjawisko zredukowanego wiązania imipraminy raczej za markera cechy niż markera stanu depresyjnego. W innych zaburzeniach zmiany w wiązaniu imipraminy nie osiągały poziomu znamienności statystycznej (rys. 8) (52). Także sponsorowane przez Światową Organizację Zdrowia wieloosrodkowe badanie nie wykazało różnic w wiązaniu imipraminy między grupami chorych z depresją a osobami zdrowymi. Obecność dwóch populacji miejsc o wysokim



Rys. 8. Specyficzność obniżonego wiązania [3H]imipraminy w depresji w porównaniu z innymi kategoriami diagnostycznymi

* – $p < 0,05$ w porównaniu z pozostałymi grupami.

U podstawy każdego słupka zaznaczono liczbę chorych z każdej grupy (wg Owens 1994)

i niskim powinowactwie do imipraminy (9), łącznie z wadami metodycznymi mogło stanowić przyczynę dużej rozbieżności i zmienności wyników. Wartości B_{max} i K_d zarówno u osób zdrowych jak i wśród chorych z depresją wahają się od 100 do 2400 femtomoli na mg białka, wartość K_d dla imipraminy – od 0.2 do 3 nM (dane z metaanalizy Ellisa 1994). Jeszcze inne czynniki mogły przyczyniać się do tych rozbieżności – jak wynika z badań Rauscha (1982), Healy (1990) i D'Hondta (1994) – wiązanie imipraminy podlega rytmom dobowym i sezonowym zarówno u osób zdrowych jak i chorych na depresję niesezonową i sezonową oraz w znaczący sposób zależy od wieku. Metaanaliza danych dotyczących wartości B_{max} i K_d dla wiązania imipraminy w depresji, obejmująca ponad 1900 chorych wykazała, że niezależnie od metody oznaczania, wiązanie imipraminy u chorych jest jednak znacznie obniżone. W badaniach post-mortem stwierdzono w tkance mózgowej, podobnie jak w płytkach, znaczną redukcję wiązania w korze i hipokampie u osób z depresją i samobójców (59, 79), oraz znaleziono szereg różnic regionalnych w mózgu samobójców dotyczących wiązania imipraminy – najwyższe, w porównaniu z kontrolą wiązanie w formacji hipokampu, najniższe w sklepieniu i niektórych regionach kory.

Parametry wychwytu zwrotnego 5-HT również były badane w depresji, choć nie tak intensywnie jak wiązanie ligandów do 5-HTT. Wielu autorów zgadza się, że wychwyt u nieleczonych chorych jest obniżony (19, 81, 90), a parametry transportu serotoniny podlegają rytmom dobowym i sezonowym. Udoskonalone metodycznie badania wiązania IMI w depresji są kontynuowane, ponieważ są już dostępne radioligandy z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny – paroksetyna i citalopram, które mają znacznie większe

powinowactwo do transportera serotoniny. Prace te są jednak nieliczne, ale i one nie wyjaśniają wielu problemów, związanych m.in. z faktem, że między B_{max} dla imipraminy i B_{max} dla paroksetyny nigdy nie stwierdzono korelacji, wykonując oznaczenia u tych samych chorych. Potwierdza to przypuszczenia, że te dwa ligandy wiążą się do odrębnych miejsc w cząsteczce transportera. W nowszych pracach (tabela 2, 1994–1999), znaczny spadek wiązania imipraminy w grupach chorych z depresją zaobserwowali Nemeroff (1994), Rosel (1999) oraz Iny (1994). Wiązanie imipraminy było również znamienne obniżone w dystymii, niepokoju i napadach lęku panicznego (28).

Biorąc pod uwagę fakt, że transporter płytkowy i neuronalny są produktami tego samego genu, wskaźniki płytkowe powinny odzwierciedlać zmiany zachodzące w mózgu w związku z prowadzeniem terapii lekami przeciwdepresyjnymi. U zdrowych ochotników obserwowano wzrost B_{max} transportera płytkowego po podaniu amitryptyliny i dezypraminy (13, 14, 24), natomiast amineptyna, maprotylina, mianseryna i imipramina nie wywierały żadnego efektu na B_{max} (62, 81, 88). Chlorimipramina po 7 dniach stosowania wywołała znaczny wzrost wiązania trytowanej imipraminy (62).

U chorych z depresją notowano wzrost wiązania $[3H]$ imipraminy w płytkach po farmakoterapii zimelidyną, alaproklatem i dezypraminą (3, 86), oraz po podaniu imipraminy i lofepraminy (24). Natomiast Wagner (1987) po nortryptylinie nie stwierdziła żadnych zmian w wiązaniu IMI do transportera płytkowego u chorych z depresją. Z kolei Healy (1990) oprócz zmian w B_{max} obserwował również znaczny wzrost wartości stałej dysocjacji K_d dla $[3H]$ imipraminy w płytkach po leczeniu imipraminą i lofepraminą.

B. Wiązanie paroksetyny

Paroksetyna jest około 10 razy bardziej selektywnym ligandem niż IMI (K_d w mózgu szczura wynosi 0.05–0.15 nM). Jej wiązanie w mózgu, w odróżnieniu od imipraminy, jest prawie kompletnie zahamowane przez chemiczne zniszczenie serotonergicznych zakończeń nerwowych i dotyczy tylko jednej populacji miejsc. W mózgu człowieka paroksetyna wykazuje identyczną charakterystykę farmakologiczną jak w mózgu szczura. Zdolność antagonistów transportera 5-HT do hamowania wiązania paroksetyny koreluje z hamowaniem przez nie wychwyty zwrotnego serotoniny. W mózgu szczura wiązanie specyficzne paroksetyny stanowi 90% wiązania całkowitego, natomiast w synaptosomach kory człowieka tylko 40%, podczas gdy wiązanie citalopramu aż 80%. Świadczy to dobitnie o tym, że citalopram jest lepszym ligandem do badań 5-HTT. Lezja neuronów serotonergicznych powoduje całkowity zanik wiązania citalopramu (44).

W większości badań wiązanie paroksetyny (tabela 3 – wybrane wartości) u chorych z depresją przed leczeniem nie różniło się od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej (5, 16, 17, 27, 28, 34, 35, 48). Zmiany B_{max} w depresji odnotował natomiast Nemeroff (1994) i Alvarez (1999), to znaczy w obu przypadkach u chorych wystąpiło znacznie obniżone wiązanie paroksetyny w porównaniu z osobami zdrowymi (tabela 4) (73). U pacjentów z niepokojem

Tabela 3. Wartości Bmax (fmole na mg białka) i Kd (nM) dla wiązania paroksetyny w depresji i innych zaburzeniach psychicznych

Nazwisko	Choroba	Grupa kontrolna			Chorzy		
		Bmax	SD	Kd	SD	Kd	SD
Iny (1994)	Depresja	1 513	84	0,7	1 225	0,7	0,2
"	Dystymia	"		"	1 295	0,6	0,1
"	GAD	"		"	936	0,8	0,9
"	Panika	"		"	963	0,5	0,9
Nemeroff (1994)	Depresja	514	135	–	374	–	–
Sheline (1995)	Depresja	1 175	122	0,65	934	0,24	0,02
Stein (1995)	Panika	672	410	0,13	666	0,11	0,05
"	Fobia soc.	"		"	636	0,11	0,05
Bakish (1997)	Depresja	714	188	0,14	693	0,11	0,10
Rosel (1999)	Depresja	1 280	81	0,062	1 441	0,060	0,002
Arranz (1999)	Alkoholizm	1 294	57	0,048	1 551	0,061	0,003
Alvarez (1999)	Depresja	3,88*	0,77	–	2,85*	–	–

* – fmole na 10 x E9 płytek

Tabela 4. Stałe dysocjacji leków przeciwdepresyjnych dla 5-HTT i NAT (K_d, nM) i współczynnik selektywności 5-HTT/NAT (wg Tatsumi 1997)

Lek	5-HTT	SD	NAT	SD	5-HAT/NAT
Amitryptylina	4,30	0,12	35	2	8,1
Imipramina	1,40	0,03	37	2	27
Klomipramina	0,28	0,01	38	1	130
Dezypramina	17,6	0,7	0,83	0,05	0,047
Lofepramina	70	4,05	5,4	0,4	0,077
Nortryptylina	18	1,0	4,37	0,07	0,24
Maprotylina	5800	200	11,1	0,3	0,0019
Nefazodon	200	20	360	40	1,8
Oksaprotylina	3900	100	4,9	0,2	0,0012
Zimelidyna	152	6	9400	100	62
Mirtazapina	> 100 000		4600		–
Wenlafaksyna	8,9	0,3	1060	40	120
Citalopram	1,16	0,01	4070	80	3500
Demetylocitalopram	3,6	0,2	1820	40	500
Sertralina	0,29	0,01	420	20	1400
Demetylosertralina	3,0	0,2	390	10	130
Fluoksetyna	0,81	0,02	240	10	300
Fluwoksamina	2,2	0,2	1300	30	580
Paroksetyna	0,13	0,01	40	2	300

i paniką B_{max} było również obniżone (Iny 1994), a w alkoholizmie II typu – podwyższone (4). Marazziti w serii badań dotyczących wiązania paroksetyny stwierdziła jej obniżone wiązanie u nie leczonych uprzednio osób z napadami paniki, chorobą obsesyjno-kompulsywną i innymi zaburzeniami związanymi z kontrolą impulsywności, jak kleptomania i zespół Tourettea (41, 42, 43).

Wpływ farmakoterapii na wiązanie paroksetyny i wychwyt serotoniny jest ostatnio przedmiotem licznych badań. Alvarez (1999) badając ludzi chorych na depresję, Black (1990) pacjentów z chorobą obsesyjno-impulsywną obserwowali spadek wiązania paroksetyny po leczeniu klomipraminą, również fluoksetyna obniżała wiązanie paroksetyny u chorych z depresją (1). Z kolei Bakish (1997) u chorych z depresją nie obserwował zmian w wiązaniu, natomiast stwierdził znaczne podwyższenie K_d dla paroksetyny oraz redukcję szybkości maksymalnej transportu po leczeniu SSRI – paroksetyną i fluoksetyną. Natomiast Sallee (72) w grupie dzieci i młodzieży z depresją, leczonych sertralina obserwowował redukcję powinowactwa [3H]paroksetyny do 5-HTT.

Interesujące wyniki otrzymał Sallee i wsp. (1996) u dzieci i młodzieży z chorobą obsesyjno-kompulsywną. Wyjściowa wartość B_{max} różnicowała osoby reagujące poprawą na leczenie SI-5HT, były to osoby z wyższą ponad dwukrotnie wartością B_{max} w porównaniu z grupą chorych nie reagujących na farmakoterapię. Jednak wartość tego spostrzeżenia jako ewentualnego predyktora skutecznej terapii wymaga dalszych badań.

Odrębną grupę stanowią badania dotyczące osób, które dokonały próby samobójczej. Dane psychofarmakologiczne, genetyczne oraz neurochemiczne

sugerują, że transporter i receptory 5-HT stanowią integralną część patofizjologii depresji i prób samobójczych. Wiadomo, że obroty serotoniny w pniu mózgu są zmniejszone w tej grupie osób, a antagoniści transportera serotoniny zmniejszają częstość ideacji i zachowań samobójczych (85). W doświadczeniach eksperymentalnych SI-5HT nasilają aktywność serotoninergiczną w śródmózgowiu (76). We wcześniejszych badaniach postmortem stwierdzono w tkance mózgowej, podobnie jak w płytkach, znaczną redukcję wiązania trytowanej imipraminy w korze i hipokampie u osób z depresją i samobójców (31, 59, 79). W nowszych badaniach, w przodomózgowiu, stwierdzano obniżone wiązanie radioligandów – inhibitorów wychwyty 5-HT (2, 33). Badanie autoradiograficzne wiązania [3H]paroksetyny w okolicy jąder szwu – miejsc syntezy serotoniny nie wykazało jednak istotnej różnicy u chorych z depresją, którzy dokonali próby samobójczej (12). Natomiast Malison i wsp. (1998) obserwowali spadek ilości 5-HTT przy użyciu metody obrazowania mózgu z beta-CIT w strukturach śródmózgowia u chorych z depresją. Jest wiele danych wskazujących, że w przypadku myśli samobójczych istotne znaczenie mogą mieć zmiany aktywności transportera noradrenaliny.

Alkoholizm jest kolejną chorobą, w której patofizjologii może mieć udział system serotoninergiczny a antagoniści transportera 5-HT znajdują zastosowanie w przedłużaniu okresów abstynencji i łagodzenia symptomów zespołu abstynencyjnego. Badania genetyczne sugerują związek alkoholizmu z polimorfizmem regionu promotora genu 5-HTT, ale nie znaleziono jednoznacznego związku funkcjonalnego formy l i s z wiązaniem [3H]paroksetyny w tej grupie osób (53). Obrazowanie przy pomocy fotonowej tomografii komputerowej (SPECT) z ligandem beta-CIT wykazało znaczną redukcję gęstości 5-HTT w pniu mózgu, dodatkowo korelującą z okresem konsumpcji alkoholu oraz skalą depresji i niepokoju podczas okresu abstynencji (25). Te badania wymagają jednak potwierdzenia, ponieważ były wykonywane ze względów ekonomicznych na małych liczebnie próbach.

C. Wiązanie radioligandów u osób z chorobą afektywną sezonową

Choroba afektywna sezonowa (SAD) jako kategoria zaburzeń nastroju istnieje relatywnie od niedawna. Została opisana przez Rosenthala (1984), który zidentyfikował jej postać letnią i zimową. Wielu ludzi doświadcza zmian nastroju w zależności od pory roku, ale do zdiagnozowania tych zaburzeń jako choroby afektywnej niezbędne jest spełnienie szeregu warunków: epizody obniżonego nastroju występujące jesienią lub zimą, niekiedy ze spontaniczną remisją na wiosnę, zaburzenia snu, wzrost apetytu, przyrost masy ciała. Przyczyny depresji tego rodzaju nie są do końca znane, podobnie jak pozostałych zaburzeń afektywnych. Przypuszcza się, że u chorych występują zaburzenia rytmów dobowych, a światło o odpowiedniej długości fal przywraca 'właściwy' rytm dobowy (37). Niektórzy badacze sugerują, że w patofizjologii tej choroby zaangażowana jest melatonina, do syntezy której niezbędny jest tryptofan, a serotonina leży na szlaku tej syntezy (38). Być może przyczyną jest sezonowy niedobór serotoniny, który zostaje

wyrównany przez fototerapię. Penev (1997) wykazał, że światło podnosi poziom serotoniny w mózgu królika. Wiadomo także, że fenfluramina i fluoksetyna są skutecznymi lekami w depresji sezonowej (71), co może pośrednio oznaczać, iż serotonina jest zaangażowana w patofizjologię tej choroby.

Obniżona ilość miejsc wiążących imipraminę oraz wzrost B_{max} po fototerapii – została zaobserwowana przez Szadoczkę i wsp. (1989). Przy zastosowaniu jako liganda bardziej selektywnej paroksetyny nie udało się jednak powtórzyć tej obserwacji, nie wystąpiła różnica w wiązaniu paroksetyny między chorymi a grupą kontrolną, jak również fototerapia nie zmieniła B_{max} dla wiązania paroksetyny (54). Z kolei Mellerup (1993) i Smedh (1999) badając niezależnie wiązanie paroksetyny do preparatu błon płytkowych otrzymali zbliżone wyniki: wiązanie paroksetyny przed leczeniem było podwyższone w porównaniu z grupą osób zdrowych, szczególnie w grupie chorych reagujących poprawą na fototerapię. Po leczeniu B_{max} paroksetyny u tych chorych ulegał znamiennemu obniżeniu. Tak więc wyłania się interesująca możliwość różnicowania chorych pod względem podatności na fototerapię na podstawie wiązania paroksetyny do transportera płytkowego. Najistotniejszym faktem wynikającym z tych doświadczeń jest stwierdzenie, że skuteczna fototerapia związana jest ze znacznym spadkiem wiązania paroksetyny, korelując ze spadkiem punktacji na skali depresji Hamiltona.

Podwyższone wiązanie paroksetyny obserwowane w depresji zimowej może być zjawiskiem odpowiedzialnym za obniżenie czynności serotonergicznej u tych chorych (nasilony wychwyt zwrotny neurotransmitera). Łącznie z innymi symptomami świadczącymi o niedoczynności układu 5-HT, jak zwiększony apetyt, nasilone zapotrzebowanie na sen, wyniki tych badań podkreślają rolę systemu serotonergicznego mózgu w patomechanizmie depresji sezonowej.

Przeciwnie wyniki do Smedh (1999) i Mellerupa (1993) uzyskał Stain-Malmgren (1998) badając wiązanie paroksetyny oraz parametry wychwytu zwrotnego serotoniny. Chorzy reagujący poprawą na fototerapię mieli w tym badaniu znacznie niższą wartość B_{max} niż chorzy bez poprawy oraz znacznie wyższą K_m , co świadczy o zmianie powinowactwa transportera do serotoniny. Obniżone wiązanie paroksetyny (B_{max}) wzrosło po fototerapii do poziomu obserwowanego w grupie osób zdrowych. Wyniki otrzymane przez Stain-Malmgren sugerują, że choroba afektywna sezonowa jest związana z zaburzeniami w procesie wychwytu zwrotnego 5-HT.

Liczne badania z użyciem imipraminy wskazują, że redukcja ilości transportera serotoniny jest charakterystyczna w pewnych podgrupach depresji, określanych dawniej jako endogenne (31). Mellerup (1993) sugeruje, że depresje osób niereagujących na fototerapię zaliczyć można do tej właśnie kategorii. Przeciwnie jeśli wiązanie paroksetyny przed leczeniem jest wysokie, to zaburzenia podgrupy chorych reagujących na fototerapię mogłyby należeć do kategorii depresji nieendogennej (46).

Zastosowanie fotonowej tomografii emisyjnej (SPECT), z użyciem jako ligandu [123-J]-beta-CIT, wykazało spadek liczby transporterów serotoniny

u chorych z SAD (89) w okolicy wzgórza i podwzgórza (bez zmian w śródmózgowiu). Ten fakt wyjaśniałby specyficzną symptomatologię SAD, ponieważ wiele nietypowych objawów tej postaci depresji odzwierciedla zaburzenia funkcji podwzgórza.

7. Własności farmakologiczne transportera

Do transportera serotoniny wiążą się z dużym powinowactwem leki przeciwdepresyjne, które są antagonistami 5-HTT, oraz substancje psychostymulujące, np. kokaina. Obie te grupy związków podwyższają zewnątrzkomórkowe stężenie 5-HT, tym samym wydłużają czas i siłę przekąźnictwa serotoninergicznego.

Badania farmakologiczne transportera serotoniny można przeprowadzać na synaptosomach z mózgu szczura lub człowieka, ale ostatnio większość tego typu badań wykonuje się na transfekowanych genem transportera 5-HT liniach komórkowych tkanek nieneuralnych, np. HEK-293 (ludzka tkanka embrionalna nerki). Zaletą tej metody jest brak wpływu innych błonowych białek występujących w tkance nerwowej, które mogłyby interferować z oznaczeniami biochemicznymi.

Naturalnym substratem transportowanym przez 5-HTT jest serotonina, a egzogennym np. fenfluramina. Wśród substratów nietransportowanych są podstawione amfetaminy np. metamfetamina, metkatinon, MDMA, natomiast antagonistami transportera są kokaina i leki będące inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny. Do tej grupy należą zarówno klasyczne leki trójpierścieniowe jak i nowa generacja selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (SSRI), które aczkolwiek nie przewyższają leków trójcyclicznych pod względem skuteczności klinicznej to jednak pozbawione są wielu działań niepożądanych (Stahl 1998). Endogenne inhibitory transportera serotoniny nie są znane. W piśmiennictwie jest wiele prac dotyczących charakterystyki farmakologicznej transportera serotoniny. Przedstawione w tabeli 4 dane, otrzymane w modelu z transfekowanym genem transportera, pochodzą z pracy Tatsumi i wsp. (1997) i przedstawiają stałe dysocjacji oraz współczynniki selektywności dla 37 różnych leków przeciwdepresyjnych, będących inhibitorami wychwytu NA i 5-HT.

Wśród leków antydepresyjnych paroksetyna, należąca do grupy SSRI, jest najsilniejszym antagonistą transportera serotoniny, $K_d=0.13 \pm 0.01$ nM. Jednak najbardziej selektywny okazał się citalopram, jego powinowactwo do transportera noradrenaliny (NAT) wynosi $1/3500$ powinowactwa do 5-HTT i jest znacznie niższe niż paroksetyny. Metabolity tych leków, demetylocitalopram i demetylosertralina, działają również bardzo silnie antagonistycznie wobec 5-HTT, w odróżnieniu od drugorzędowych metabolitów imipraminy i amitryptyliny, które są bardziej specyficzne wobec transportera noradrenaliny. Czterocykliczne leki antydepresyjne jak maprotylina, oksaprolina, mianseryna, mirtazepina oraz inhibitory MAO mają bardzo słabe działanie antagonistyczne 5-HTT.

Owens i wsp. (1997) stwierdził, stosując tkankę mózgową człowieka i szczura oraz linię komórkową HEK, że wenlafaksyna jest silniejszym antagonistą

transportera serotoniny, mimo że w badaniach na zwierzętach wykazywała podobne powinowactwo do NAT i 5-HTT. Klinicznie wenlafaksyna wykazuje własności antagonistyczne także wobec NAT. Podobnie Owens stwierdził znacznie wyższe powinowactwo imipraminy i amitryptyliny do 5-HTT u człowieka w porównaniu z transporterem w mózgu szczura, mimo bardzo dużej homologii obu transporterów – 92%. To zjawisko jest prawdopodobnie związane z różnicą między tymi transporterami w 12 domenie cząsteczki. Ogólnie, większość SSRI nie wiąże się do innych receptorów neuroprzekaźnikowych z wyjątkiem paroksetyny, która wykazuje umiarkowane powinowactwo do receptora muskarynowego i sertraliny, która wiąże się do receptora alfa-1 (53, 32).

Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny stosowane są nie tylko w leczeniu depresji, gdzie ich skuteczność jest porównywalna z lekami trójpierścieniowymi. Znalazły zastosowanie również w farmakoterapii napadów paniki, zaburzeniach kontroli impulsywności, zespołach natręctw, fobii społecznej i zaburzeniach łaknienia. Działanie wszystkich leków przeciwdepresyjnych tłumaczy się wzrostem dostępności amin biogennych w synapsach (49, 76). Stosunkowo niedawno zaproponowano udział w patofizjologii depresji oraz w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych receptorów z grupy 5HT_{1A}. Te somatodendrytyczne receptory w jądrach szwu kontrolują uwalnianie 5-HT. W przedklinicznych modelach depresji wykazują nadwrażliwość, tzn. pobudzone niewielkimi dawkami 5-HT hamują jej uwalnianie (ujemne sprzężenie zwrotne), co hamuje przekaznictwo serotoninergiczne. Hamowanie transportera serotoniny przez leki antydepresyjne powoduje, poprzez długotrwałe podwyższanie ilości serotoniny w synapsie, odwrażliwienie receptorów 5-HT_{1A} (tzw. regulacja w „dół”) (76).

8. Wpływ substancji psychostymulujących na funkcję transportera

Szereg substancji psychostymulujących zmienia aktywność transportera dopaminy, serotoniny i noradrenaliny (21, 61). Niektóre np. kokaina, hamują wychwyt zwrotny neuroprzekaźników. Inne, jak podstawione amfetaminy, ułatwiają uwalnianie serotoniny do szczeliny synaptycznej poprzez odwrócenie funkcji transporterów, powodując na drodze jeszcze niepoznanego do końca mechanizmu, wymianę jednej cząsteczki serotoniny do synapsy na jedną cząsteczkę środka stymulującego do wnętrza komórki. Związki te odwracają więc funkcję transporterów. Należy zauważyć, że pomimo hamowania aktywności transportowej 5-HTT i wydłużenia przez to czasu działania serotoniny w synapsie, substancje z tej kategorii nie mają działania przeciwdepresyjnego.

Na transporter serotoniny środki psychostymulujące działają podobnie jak na dopaminowy, aczkolwiek dużo słabiej. Pojedyncza dawka metamfetaminy, metkatonu lub MDMA powoduje bardzo szybki spadek funkcji 5-HTT w prądkowiu szczurów o blisko 20%. Po wielokrotnych dawkach amfetaminy, katonu, MDMA i metamfetaminy aktywność transportera spada o 40 do 60%

(tabela 5) (21). Fleckestein i wsp. (1999, 2000) postuluje, że wpływ środków psychostymulujących na inaktywację 5-HTT odbywa się poprzez aktywowanie kinazy białkowej typu C (PKC), która katalizuje fosforylację transportera i redukuje transport serotoniny. Uważa się, że kokaina jest, podobnie jak inhibitory wychwyty serotoniny, kompetycyjnym antagonistą transportera serotoniny, a Bauman (2000) znalazł dowody, że kokaina na poziomie molekularnym związana jest w kompleks z enzymem – fosfatazą białkową typu 2A. Wiadomo także, że wysokie dawki metamfetaminy i innych analogów amfetaminy powodują długotrwałe uszkodzenie neuronów serotonergiczných, spada stężenie serotoniny i jej wychwyt zwrotny oraz wiązanie ligandów do receptorów 5-HT.

Tabela 5. Wpływ substancji psychoaktywnych na funkcję transportującą 5-HTT (IC 50 w uM) (wg Fleckestein i wsp. 1999)

Lek	IC50	Pojedyncza dawka (%)	Wielokrotna dawka (%)
Amfetamina	8+/-3	92+/-5	60+/-3
Metylofenidat	26+/-3	87+/-5	100
Metamfetamina	9+/-3	83+/-4	49+/-2
Kokaina	0,5+/-0,05	115+/-7	89+/-4
Metkatinon	21,2+/-4	79+/-3	62+/-7
Katinon	14+/-4	93+/-4	42+/-6
MDMA	2,6+/-0,3	80+/-3	62+/-3
Fenfluramina	5+/-2	99+/-5	94+/-4

Badano także wpływ substancji psychoaktywnych na wiązanie radioligandów do 5-HT. U szczurów, którym podawano kokainę, wzrastało wiązanie imipraminy w niektórych obszarach mózgu np. w jądrze grzbietowym szwu (15). Belej (1996) stwierdził wzrost wiązania paroksetyny w 53 regionach mózgu u szczurów, które same pobierały kokainę (self-administration). Do roku 1998 ukazała się tylko jedna praca zajmująca się wpływem chronicznie stosowanej kokainy na funkcję transportera 5-HT u ludzi (39). Autor metodą ilościowej autoradiografii wykazał obniżoną gęstość wiązania [125-J]-beta-CIT w regionach śródmózgowia: w jądrach szwu i w istocie czarnej, w badaniu postmortem u osób uzależnionych od kokainy.

Interesujące, że nadużywanie alkoholu powoduje przeciwne skutki względem 5-HTT, a jednoczesne chroniczne stosowanie kokainy i alkoholu w niezmiennym stopniu zmienia wiązanie CIT w badanych strukturach (39).

9. Podsumowanie

Badania nad ekspresją i aktywnością 5-HTT w płytkach krwi i mózgu chorych na zaburzenia afektywne oraz w mózgu zwierząt w modelach psychopatologii afektywnej, pomimo wielu lat badań, pozostawiają wiele kwestii

nie rozstrzygniętych i ciągle zawierają duży potencjał poznawczy, związany z analizą patomechanizmu depresji. Wprowadzenie nowych metod badawczych (funkcjonalny NMR, SPECT, PET) oraz selektywnych ligandów 5-HTT, otwiera nowe perspektywy badawcze. Także postępy w diagnostyce i klasyfikacji różnych zaburzeń afektywnych przyczyniają się do zmniejszenia rozrzutów wyników, tworzenia bardziej homogenicznych grup badanych, a co za tym idzie, lepszej interpretacji zmian w wiązaniu ligandów do 5-HTT. Otrzymane do tej pory wyniki sugerują szczególnie silny związek genetycznie uwarunkowanych zmian w ekspresji 5-HTT z depresją jednobiegunową i dwubiegunową oraz tendencjami samobójczymi. Nie ulega wątpliwości, że biorąc pod uwagę mechanizm działania najpopularniejszej grupy leków antydepresyjnych – SSRI, dalsze badania nad 5-HTT zasługują na szczególną uwagę.

Piśmiennictwo

1. Alvarez J.C., Gluck N., Arnulf I., Quintin P., Leboyer M., Pecquery R., Launay J.-M., Perez-Diaz F., Spreux-Varoquaux O. Decreased platelet serotonin transporter sites and increased platelet inositol triphosphate levels in patients with unipolar depression: effects of clomipramine and fluoxetine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999; 66, 617–624
2. Arango V., Underwood M.D., Gubbi A.V., Mann J.J. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 1995; 688, 121–133
3. Arora R.C., Meltzer H.Y. [3H]Imipramine binding in the frontal cortex of suicides. *Psych. Research.* 1989; 30, 125–135
4. Arranz B., Rosel P., Sarro S., Zaldivar E., Cano R., i wsp. Platelet serotonergic binding sites in alcohol-dependent patients. *Alcohol.* 1999; 34, 726–732
5. Bakish D., Cavazzoni P., Chudzik J., Ravindran A., Hrdina P.D. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* 1997; 41, 184–190
6. Bauman A.L., Apparsundaram S., Ramamoorthy S., Wadzinski B.E. Cocaine and antidepressant-sensitive biogenic amine transporters exist in regulated complexes with protein phosphatase 2A. *J. Neurosci.* 2000; 20, 7571–7578
7. Belej T., Manji D., Sioutis S., Barros H.M.T., Nobrega J.N. Changes in serotonin and norepinephrine uptake sites after chronic cocaine: pre- vs post-withdrawal effects. *Brain Res.* 1996; 736, 287–296
8. Benkert O., Wetzel H., Szegedi A. Serotonin dysfunction syndromes: a functional common denominator for classification of depression, anxiety and obsessive-compulsive disorder. *International Clinical Psychopharmacology*, 1993; 8 Suppl. 1, 3–14
9. Biessen E.A., Norder J.A., Horn A.S., Robillard G.T. Evidence for the existence of at least two different binding sites for 5-HT reuptake inhibitors within the 5-HT reuptake system from human platelets. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37, 3959–3966
10. Black D.W., Kelly M., Meyers C. Tritiated imipramine binding and serotonin uptake in obsessive-compulsive volunteers and psychiatric normal control. *Biol Psychiatry*, 1990, 27, 319–327
11. Blakely E.D., Ramamoorthy S., Schroeter S., Qian Y., Apparsundaram S., Galli A., DeFelice L.J. Regulated fosorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry*, 1998; 44, 169–178
12. Bligh-Glover W., Kolli T.N., Shapiro-Kulnane L., Dilley G.E., Friedman L., Balraj E., Rajkowska G., Stockmeier C.A. The serotonin transporter in the midbrain of suicide victims with major depression. *Biol. Psychiatry*, 2000; 47, 1015–1024

13. Braddock L.E., Cowen P.J., Elliott J.M. Changes in the binding to platelets [3-H]imipramine and [3-H]yohimbine in normal subjects taking amitriptyline. *Neuropharmacology*, 1984; 23, 285–286
14. Cowen P.J., Geany D.P., Schachter M.: Desipramine treatment in normal subjects. Effects on neuroendocrine responses to tryptophan and on platelet serotonin (5-HT) – related receptors. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1986; 43, 61–67
15. Cunningham K.A., Paris J.M., Goeders N.E.: Chronic cocaine enhances serotonin autoregulation and serotonin uptake binding. *Synapse*, 1992; 11, 112–123
16. D'Haenen H., De Waele M., Leysen J.E. Platelet 3-H paroxetine binding in depressed patients. *Psychiatry Res.* 1988; 26, 11–17
17. D'Hondt P., Maes M., Leysen J.E., Gommeren W., Scharpe S., Cosyns P.: Binding of [3-H]paroxetine to platelets of depressed patients: seasonal differences and effects of diagnostic classification. *J. Affective Disord.* 1994; 32, 27–35
18. Ellis P.M. Salmond C. Is platelet imipramine binding reduced in depression? A meta-analysis. *Biol. Psychiatry*, 1994; 36, 292–299
19. Faludi I., Magyar I., Tekes K. Measurement of 3-H-serotonin uptake in blood platelets in major depressive episodes. *Biol. Psychiatry*, 1988; 23, 829–834
20. Fleckenstein A.E., Haughey H.M., Metzger R.R., Kokoshka J.M., Riddle E.L., Hanson J.E., Gibb J.W., Hanson G.R. Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Europ. J. Pharmacol.* 1999; 382, 45–49
21. Fleckenstein A.E., Gibb J.W., Hanson G.R. Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. *Europ. J. Pharmacol.* 2000; 406, 1–13
22. Gay C., Langer S.Z., Loo H., Raisman R., Sechter D., Zariffian E.: 3-H-imipramine binding to platelets: a state dependent or independent biological markers. *Br. J. Pharmacol.* 1983; 78
23. Greenberg B.D., Tolliver T.J., Huang S., Li Q., Bengel D., Murphy D.L. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets, *American Journal of Medical Genetics*, 1999; 88, 83–87
24. Healy D., Theodorou A.E., Whitehouse A.M. *in vivo* [3-H]-imipramine binding to previously frozen platelet membranes from depressed patients, before and after treatment. *Br. J. Psychiatry*. 1990; 157, 208–215
25. Heinz A., Ragan P., Jones D.W., Hommer D., Geyer C., Lee K.S., Coppola R., Weinberger D.R., Linnoila M. Reduced central serotonin transporters in alcoholism. *Am. J. Psychiatry*. 1998; 155, 1544–1549
26. Hrdina P.D. General principles of receptor binding. *NeuroMethods*, 1986; tom 4, 1–23. red. A.A. Boulton, G.B. Baker, P.D. Hrdina wyd. Humana Press. Inc. Clifton, New Jersey
27. Hrdina P.D., Bakish D., Chudzik, J., Ravindran A., Lapierre, Y.D. Serotonin markers in platelets of patients with major depression: upregulation of 5-HT₂ receptors. *J. Psychiatry Neurosci.* 1995; 20, 11–19
28. Iny L.J., Pecknold J., Suranyi-Cadotte B.E., Bernier B., Luthe L., Nair N.P.V., Meaney M.J. Studies of neurochemical link between depression, anxiety and stress from [3-H]imipramine and [3-H]paroxetine binding on human platelets. *Biol. Psychiatry*, 1994; 36, 281–291
29. Iversen L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery, *Molecular Psychiatry* 2000; 5, 357–362
30. Kostowski W. Neuroprzekązniki i neuromodulatory w ośrodkowym układzie nerwowym. Kostowski W., Pużyński S.: *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna*. PZWL, 1996; 54–129
31. Langer S.Z., Zariffian E., Briley M. et al. High affinity binding of [3H]imipramine in brain and platelets and its relevance to the biochemistry of affective disorders, *Life sciences*, 1981; 21, 211–215
32. Langer S. Z., Schoemaker H. Effects of antidepressants on monoamine transporters. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1988; 12, 193–216
33. Lawrence K. M., De Paermentier F., Cheetham S.C., Crompton M.R., Katona C.L.E., Horton R.W. Brain 5-HT uptake sites, labelled with [3H]paroxetine in antidepressant-free depressed suicides. *Brain Res.*, 1990; 526, 17–22

34. Lawrence K.M., Katona C.L.E., Abou-Saleh M.T., Robertson, M.M., Nairac, B.L., Edwards D.R.L., Lock T., Burns R.A., Harrison D.A., Horton R.W. Platelet 5-HT uptake sites labeled with 3-H paroxetine, in controls and depressed patients before and after treatment with fluoxetine and lofepramine. *Psychopharmacology*, 1994; 115, 261–264
35. Lawrence K.M., Falkowski J., Jacobson R.R., Horton R.W. Platelet 5-HT uptake sites in depression: three concurrent measures using [3-H]imipramine and [3-H]paroxetine. *Psychopharmacology*, 1993; 110, 235–239
36. Lesch K. P. Mossner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental and neurodegenerative disorders? *Society of Biological Psychiatry*, 1998; 44, 179–192
37. Lewy A.J., Sack R.L., Singer C.M., White D.M., Hoben T.M. Winter depression and the phase-shift hypothesis for bright light's therapeutic effects: history, theory, and experimental evidence. *J. Biol. Rhythms*, 1988; 3, 121–134
38. Lieberman H.R., Garfield G., Waldhauser F., Lynch H.J., Wurtman R.J. Possible behavioral consequences of light-induced changes in melatonin availability. *Ann. NY Acad. Sci.* 1985; 453, 241–252
39. Little, K.Y., McLaughlin D.P., Zhang, L., Livermore C.S., Dalack G.W., McFinton P.R., i wsp. Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. *Am. J. Psychiatry*, 1998; 155, 207–213
40. Malison R.T., Price L.H., Berman R., van Dyke C.H., Pelton G., Carpenter L. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123 I]-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*, 1998; 44, 1090–1098
41. Marazziti D., Cesari A., Masala I., Baroni S., Giannaccini G., Dell'Osso L., Cosenza A., Pfanner P., Cassano G.B. Increased density of the platelet serotonin transporter in autism. *Pharmacopsychiatry*, 2000; 33, 165–168
42. Marazziti D., Dell'Osso L., Presta S., Pfanner C., Rossi A., Masala I., Baroni S., Giannaccini G., Lucacchini A., Cassano G.B. Platelet [3H]paroxetine binding in patients with OCD-related disorders. *Psychiatry Research*, 1999; 89, 223–228
43. Marazziti D., Rossi A., Dell'Osso L., Palego L., Placidi G.P., Giannacci G., Lucacchini A., Cassano G.B. Decreased platelet 3-H-paroxetine binding in untreated panic disorder patients. *Life Sci*, 1999; 65, 2735–2741
44. Marcusson J. O., Ross S. B. Binding of some antidepressants to the 5-hydroxytryptamine transporter in brain and platelets. *Psychopharmacology*. 1990; 102, 145–155
45. Mellerup E. T., Errebo I., Molin J., Plenge P., Dam H.: Platelet paroxetine binding and light therapy in winter depression. *J. Affect. Disord.* 1993, 29, 11–15
46. Mellerup E.T., Dam H., Lauritzen L., Plenge P. Platelet 3H-imipramine and 3H-paroxetine binding during treatment with psychoactive drugs. *Biol Psychiatry*, 1991; 30, 1056–1058
47. Nalepa I. Molekularne aspekty działania leków przeciwdepresyjnych. *Depresja i leki przeciwdepresyjne – 10 lat później. XIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 1996*
48. Nankai M., Yamada S., Yoshimoto S., Watanabe A., Mori H., Asai K., Toru M. Platelet 3-H paroxetine binding in control and depressed patients: relationship to serotonin uptake and age. *Psychiatry Res.* 1994; 51, 147–155
49. Nelson J.C. A review of efficacy of serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors for treatment of major depression. *Biol. Psychiatry*, 1999; 46, 1391–1308
50. Nelson N. The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *Journal of Neurochemistry*, 1998; Vol. 71, 5, 1785–1803
51. Nemeroff C.B., Knight D.L., Franks J., Craighead W.E., Krishnan K. Ranga R. Further studies on platelet serotonin transporter binding in depression. *Am.J.Psychiatry*, 1994; 151, 1623–1625
52. Owens M.J., Nemeroff C.B.: Role of serotonin in the psychophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin. Chem.* 1994; 40, 288–295
53. Owens M.J., Morgan W.N., Plott S.J., Nemeroff C.B. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J. Pharmacol. Ex. Ther.* 1997; 283, 1305–1322

54. Ozaki N., Rosentahl N.E., Mazzola O., Chiueh C.C., Hardin T., Garcia-Borreguero D., Schwartz P.J., Turner E., Oren D.A., Murphy D.L. Platelet [3H] paroxetine binding, 5-HT stimulated Ca^{2+} response, and 5-HT content in winter seasonal affective disorder. *Biol. Psychiatry*, 1994; 36, 458-466
55. Pacholczyk T., Blakely R.D., Amara S.G. Expression cloning of an antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Nature*, 1991; 350, 350-353
56. Paul S.M., Rehavi M., Skolnik P., Goodwin F.K. Demonstration of specific "high affinity" binding sites for 3-H-imipramine on human platelets. 1980; 26, 953-959
57. Paul S.M., Rehavi M., Skolnick P., Ballenger J.C., Goodwin F.K. Depressed patients have decreased binding of tritiated imipramine to platelet serotonin "transporter". *Arch. Gen. Psychiatry*, 1981; 38, 1315-1317
58. Penev P.D., Zee P.C., Turek F.W. Serotonin in the spotlight. 1997; 385, 123
59. Perry E.K., Marshall E.F., Blessed G., Tomlinson B.E., Perry R.M. Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness. *Br. J. Psychiatry*, 1983; 142, 188-192
60. Pickar D., Rubinow K. Pharmacogenomics of psychiatric disorders, *Pharmacological Sciences*, 2001; Vol. 22, 2, 75-83
61. Plenge P., Mellerup E.T. An affinity-modulating site on neuronal monoamine transport proteins. *Pharmacol. Toxicol.* 1997; 80, 197-201
62. Poirier M-F., Galzin A-M., Loo H., i wsp. Changes in [3-H] 5-HT uptake and [3-H]imipramine binding in platelets after chlorimipramine in healthy volunteers. Comparison with maprotyline and amineptine. *Biol. Psychiatry*, 1987; 22, 287-302
63. Preuss U. W., Soyka M., Bahlmann M., Wenzel K., Behrens K., de Jong S., Kruger M., Bondy B. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR), [3H]paroxetine binding in healthy control subjects and alcohol-dependent patients and their relationships to impulsivity. *Psychiatry Res.*, 2000; Sep, 25, 96 (1): 51-61
64. Raisman R., Sechter D., Briley M.S., Zarifian E., Langer S.Z. High affinity 3-H-imipramine binding in platelets from untreated and treated depressed patients compared to healthy volunteers. 1982; *Psychopharmacology*, 75, 268-271
65. Ramamoorthy S., Blakely R.D. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants, 1999; *Science*, 285, 763-766
66. Risch S.C. Recent advances in depression research: from stress to molecular biology and brain imaging. *J Clin Psychiatry*, 1997; 5, 10, 3-6
67. Rausch J.L., Shah N.S., Burch E.A., Donald A.G. Platelet serotonin uptake in depressed patients. Circadian effect. *Biol. Psychiatry*, 1982; 17, 121-125
68. Rosel P., Arranz B., Vallejo J., Menchon J.M., Palencia T., Navarro M.A. Altered [3-H]imipramine and 5-HT₂ but not [3-H]paroxetine binding sites in platelets from depressed patients. *J. Affective Disord.* 1999; 52, 225-233
69. Rosenthal N.E., Sack D.A., Gillin J.C., Lewy A.J., Goodwin F.K., Davenport Y. Seasonal affective disorder: description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. 1984; 41, 72-80
70. Rubenstein J.L.R. Development of serotonergic neurons and their projections, 1998; *Society of Biological Psychiatry*, 44, 145-150
71. Ruhrman S., Kasper S., Hawellek B., Martinez B., Hoflich G., Nickelsen T. Fluoxetine as a treatment alternative to light therapy in seasonal affective disorder (SAD). 1993; 26, 193
72. Sallee F.R., Hilal R., Dougherty D., Beach K., Nesbitt L. Platelet serotonin transporter in depressed children and adolescents: 3H-paroxetine binding before and after sertraline. *J. Am. Acad. Child Adolesc Psychiatry*, 1998; 37, 777-784
73. Sallee F.R., Richman H., Beach K., Sethuraman G., Nesbitt L. Platelet serotonin transporter in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder or Tourette's syndrome. *J. Am. Acad. Child Adolesc Psychiatry*. 1996; 35, 1647-1656
74. Smedh K., Spigset O., Allard P., Mjorndal T., Adolfsson R. Platelet [3-H]paroxetine and [3-H]lysergic acid diethylamide binding in seasonal affective disorder and the effect of bright light therapy. *Biol. Psychiatry*, 1999; 45, 464-470

75. Sneddon J.M. Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. 1973; *Progr. Neurobiol.* 1, 151–198
76. Stahl S.M. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J. Affective Disord.* 1998; 51, 215–235
77. Stahl S.M. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurological disorders. 1977; *Arch. Gen. Psychiat.* 34, 509–516
78. Stain-Malmgren R., Kjellman B.F., Aberg-Wistedt A. Platelet serotonergic function and light therapy in seasonal affective disorder. *Psychiatry Res.* 1998; 78, 163–172
79. Stanley M., Virgilio J., Gershon S. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science*, 1982; 216, 1337–1338
80. Stein M.B., Delaney S.M., Chartier M.J., Kroft C.D.L., Hazen A. [3H]paroxetine binding to platelets with social phobia: comparison to patients with panic disorder and healthy volunteers. *Biol. Psychiatry*, 1995; 37, 224–228
81. Suranyi-Cadotte B.E., Quirion R., Nair N.P. Imipramine treatment differentially affects 3-H imipramine binding and serotonin uptake in depressed patients. *Life Sci.* 1985; 36, 795–799
82. Szadoczky E., Falus A., Arato A., Nemeth A., Teszeri G., Moussong-Kovacs E. Phototherapy increased platelet [3-H]imipramine binding sites in patients with winter depression. *J. Affect. Disord.* 1989; 16, 121–125
83. Tatsumi M., Groshan K., Blakely R.D., Richelson E. Pharmacological profile of antidepressant and related compounds at human monoamine transporters. *Europ. J. Pharmacol.* 1997; 30, 249–258
84. Thompson M.D., Gonzales N., Nguyen T., Comings D.E., George S.R., O'Dowd B.F. Serotonin transporter gene polymorphisms in alcohol dependence. *Alcohol* 2000; 22, 61–67
85. Verkes R.J., Van der Mast R.C., Hengeveld M.W., Tuyl J.P., Zwinderman A.H., Van Kempen G.M. Reduction by paroxetine of suicidal behavior in patients with repeated suicide attempts but not major depression. *Am. J. Psychiatry*, 1998; 155, 543–547
86. Wagner A., Aberg-Wistedt A., Asberg, M. Effects of antidepressant treatments on platelet tritiated imipramine binding in major depressive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1987; 44, 870–877
87. Whale R., Quedsted D. J., Laver D., Harrison P. J., Cowen P. J. *Psychopharmacology*, 2000; 150, 120–122
88. Whiteford H.H., Jarvis M.R., Stedman T.J., Pond S., Csernansky J.G. Mianserin-induced up-regulation of serotonin receptors on normal human platelets in vivo. *Life Sci*, 1993; 53, 371–376
89. Willeit M., Praschak-Rieder N., Neumeister A., Pirker W., Asenbaum S., Vitouch O., Tauscher J., Hilger E., Stastny J., Brucke T., Kasper S. [123-I]-beta-CIT SPECT imaging shows reduced brain serotonin transporter availability in drug-free depressed patients with seasonal affective disorder. *Biol. Psychiatry*, 2000; 47, 482–489
90. Wood P.L., Suranyi-Cadotte B.E., Nair N.P.V., LaFaille F., Schwartz G. Lack of association between [3-H]imipramine binding sites and uptake of serotonin in control, depressed and schizophrenic patients. *Neuropharmacology*, 1983; 22, 1211–1214
91. Worrall D.W., Williams D.C. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochem. J.*, 1994; 297, 425–436
92. Zahorodna A., Tokarski K., Bijak M. Badania elektrofizjologicznego wpływu leków przeciwdepresyjnych i kortykosteronu na reaktywność receptorów serotoninowych w hipokampie. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2000; 54, 391–401
93. Zhou F.C., Tao-Cheng J., Segu L., Patel T., Wang Y. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res.*, 1998; 241–254