



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΨΥΧΩΤΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ**

**ΜΑΡΙΑΝΘΗ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2
(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).*

Ημερομηνία αίτησης της κ. Σωτηροπούλου Μαριάνθης: 13-5-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 353^α/16-6-1998

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μαρσέλος Μάριος Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Μέλη

Μάλαμας Μιχαήλ Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Κωνσταντή Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 677^α/9-2-2010

Επιβλέπων

Μαρσέλος Μάριος Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Μέλη

Κωνσταντή Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Αντωνίου Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 2-3-2010

«Νευροβιολογικές παράμετροι στην προσέγγιση δεικτών συσχέτισης με το Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 753^α/18-6-2013

1. Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μαρσέλος Μάριος Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μαυρέας Βενετσάνος Καθηγητής Ψυχιατρικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Κωνσταντή Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Υφαντής Θωμάς Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχιατρικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Αντωνίου Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Παππιάς Περικλής Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-6-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τσαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Στη μνήμη του πατέρα μου

**Στη μητέρα, την αδερφή μου,
το σύζυγο και τις κόρες μου**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2010-2013. Πολλοί άνθρωποι, καθένας από τη δική του πλευρά, συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της συγκεκριμένης έρευνας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. **Μάριο Μαρσέλο**, Επιβλέποντα της διατριβής μου, για την ανάθεση σε μένα του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής, την παροχή υλικοτεχνικής υποδομής στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, την υποστήριξή του και τις πολύτιμες συμβουλές του. Η συνεργασία μας τα δεκαπέντε χρόνια που βρίσκομαι στο Εργαστήριο υπήρξε πάντα άψογη και δεν μπορώ παρά να εκφράσω τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου για όλα όσα μου έχει προσφέρει.

- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. **Μαρία Κωνσταντή**, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εποικοδομητική κριτική της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την άριστη συνεργασία μας όλα τα χρόνια που βρίσκομαι στο Εργαστήριο.

- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. **Αικατερίνη Αντωνίου**, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, χωρίς τη βοήθεια της οποίας δεν μπορώ να θυμηθώ κανένα στάδιο της διδακτορικής μου διατριβής, αφού ήταν δίπλα μου, με την μεγάλη πείρα της, από το σχεδιασμό των πειραμάτων, μέχρι την τελική εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Η ουσιαστική παρουσία, διδασκαλία και φιλία της με βοήθησαν αφάνταστα. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη, για την χωρίς όρια μετάδοση της γνώσης της και για τη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια. Η κ. Αντωνίου μου έμαθε ότι όταν είναι κανείς πραγματικός Δάσκαλος, με άριστη γνώση του αντικειμένου του, ακόμα και το πολύπλοκο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα μοιάζει απλό.

- Τον Καθηγητή Ψυχιατρικής κ. **Βενετσάνο Μαυρέα**, μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την ένθερμη υποστήριξη του θέματος της διατριβής, την ουσιαστική βοήθεια και την άριστη συνεργασία μας.

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχιατρικής κ. **Θωμά Υφαντή**, μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την ανεκτίμητη βοήθειά του τα τρία αυτά χρόνια. Ο κ. Υφαντής ήταν πάντα πρόθυμος να λύσει τις όποιες απορίες μου σχετικά με τα θέματα της Ψυχιατρικής, αλλά και να βοηθήσει με τις γνώσεις του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στη διεξαγωγή συμπερασμάτων από τη συγκεκριμένη έρευνα.
- Τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. **Άγγελο Ευαγγέλου**, μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την εποικοδομητική κριτική και τις συμβουλές του.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. **Περικλή Παππά**, μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για τη βοήθεια που όποτε του ζήτησα μου παρείχε απλόχερα, για τη συνεργασία και τη φιλία μας, από την πρώτη μέρα που ήρθα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, μέχρι σήμερα.
- Τον Λέκτορα Ψυχιατρικής κ. **Χρήστο Μαντά**, για τη μεγάλη βοήθειά του στη συλλογή των δειγμάτων αίματος από ασθενείς και υγιείς εθελοντές, καθώς και για όλες τις πληροφορίες που χρειάστηκα σχετικά με την κλινική εκτίμηση των ασθενών.
- Το συνάδελφο και φίλο κ. **Πέτρο Μποζίδη**, Μοριακό Βιολόγο, χωρίς τη συνεργασία του οποίου το πειραματικό μέρος δεν θα είχε πραγματοποιηθεί με τόση ακρίβεια. Ο κ. Μποζίδης, με τις άριστες γνώσεις του, συνέβαλε ουσιαστικά στην αντιμετώπιση των όποιων προβλημάτων προέκυπταν και ήταν πάντα παραπάνω από πρόθυμος να βοηθήσει.
- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. **Ευαγγελία Ντζάνη**, για τις πολύτιμες συμβουλές, τη φιλία και τη συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα.
- Όλους τους γιατρούς και νοσηλευτές της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που πραγματοποίησαν τη συλλογή δειγμάτων αίματος από ασθενείς πρώτου επεισοδίου και υγιείς εθελοντές.
- Τις κυρίες **Ακυλίνα Μπαλωμένου** και **Όλγα Τσουμάνη**, για τη βοήθειά τους σε οτιδήποτε χρειάστηκα και για τη φιλία που μας συνδέει όλα αυτά τα χρόνια.

- Τους υποψηφίους διδάκτορες κ. **Παναγιώτη Χαρκίτη**, κ. **Φωτεινή Μάλλιου** και κ. **Αικατερίνη Τουλούπη**, και τις φοιτήτριες κ. **Αλλένα Κατσογριδάκη** και κ. **Στέλλα Ζάικου**, για την υποστήριξη και την εμπύχωση τους, ειδικά το τελευταίο επίπονο διάστημα της συγγραφής.

-Τους γονείς μου, για την αγάπη και την αφοσίωσή τους. Η στήριξή τους σε όποια απόφαση κι αν έπαιρνα, μου έδινε πάντα τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τους στόχους και τα όνειρά μου.

- Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύζυγό μου, **Ιωάννη Παπαγιάννη**, γιατί χωρίς τη βοήθειά του, η διατριβή αυτή θα ήταν δύσκολο, αν όχι αδύνατο να πραγματοποιηθεί. Η συμπαράσταση και η πίστη του σε μένα, αλλά και η ατελείωτη βοήθειά του σε πρακτικά ζητήματα, μου έδωσαν τη δύναμη να προχωρήσω και να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη μελέτη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 9 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 11 |
| 1.1 Ντοπαμίνη και Ντοπαμινεργικό Σύστημα..... | 11 |
| 1.1.1. Σύνθεση..... | 11 |
| 1.1.2 Αποθήκευση..... | 12 |
| 1.1.3 Απελευθέρωση..... | 12 |
| 1.1.4 Αποικοδόμηση..... | 13 |
| 1.1.5 Υποδοχείς ντοπαμίνης..... | 14 |
| 1.1.6 Κατανομή υποδοχέων..... | 16 |
| 1.1.7 Ντοπαμινεργικές οδοί..... | 17 |
| 1.2 Σεροτονίνη και Σεροτονινεργικό σύστημα..... | 19 |
| 1.2.1 Σύνθεση, κατανομή και αποθήκευση..... | 20 |
| 1.2.2 Επαναπρόσληψη σεροτονίνης και μεταφοράς της σεροτονίνης..... | 21 |
| 1.2.3 Υποδοχείς σεροτονίνης..... | 22 |
| 1.2.4 Σεροτονινεργικές οδοί..... | 22 |
| 1.3 Νευροτροφίνες και BDNF..... | 23 |
| 1.3.1 Ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)..... | 25 |
| 1.4. Σχιζοφρένεια..... | 26 |
| 1.4.1 Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο..... | 30 |
| 1.4.2 Φαρμακοθεραπεία της σχιζοφρένειας..... | 31 |
| 1.5 Γενετικές προσεγγίσεις της Σχιζοφρένειας και του Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου...32 | |
| 1.5.1 Μελέτες σύνδεσης..... | 32 |
| 1.5.2 Μελέτες συσχέτισης αλληλομόρφων..... | 33 |
| 1.5.2.1 Λειτουργικός γενετικός πολυμορφισμός..... | 33 |
| 1.5.3 Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος..... | 37 |
| 1.5.4 Ενδιάμεσοι φαινότυποι (ενδοφαινότυποι)..... | 38 |
| 1.5.5 Κληρονομικότητα..... | 39 |
| 1.5.6 Επιγενετική..... | 41 |
| 1.5.7 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος..... | 42 |
| 1.5.8 Πρωτεωμικές μελέτες..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 1.6 Σχιζοφρένεια και COMT | 43 |
| 1.7 Σχιζοφρένεια και MAOB | 48 |
| 1.8 Σχιζοφρένεια και HTTLPR | 50 |
| 1.9 Σχιζοφρένεια και BDNF | 52 |
| ΣΚΟΠΟΣ | 54 |
| 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ | 55 |
| 2.1 Κλινική εκτίμηση..... | 56 |
| 2.2 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος ασθενών με FEP και υγιών ατόμων | 56 |
| 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) | 58 |
| 2.3.1 Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)..... | 61 |
| 2.3.2 Μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System, PCR-ARMS)..... | 62 |
| 2.4 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης | 63 |
| 2.4.1 Τα διαλύματα της ηλεκτροφόρησης..... | 64 |
| 2.5 Βασικές αρχές προσδιορισμού των συγκεκριμένων πολυμορφισμών..... | 65 |
| 2.6 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό Val158Met στο γονίδιο της COMT..... | 66 |
| 2.7 Προσδιορισμός γονοτύπου A644G για το γονίδιο MAOB | 67 |
| 2.8 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR στο μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HTT)..... | 69 |
| 2.9 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό Val66Met του BDNF | 70 |
| 2.10 Εξίσωση Hardy-Weinberg | 71 |
| 2.11 Ανοσοχημικός προσδιορισμός (ELISA)-Μέτρηση συγκέντρωσης BDNF στον ορό.. | 72 |
| 2.12 Στατιστική Επεξεργασία | 75 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 77 |
| 3.1 Προφίλ ασθενών | 77 |
| 3.2 COMT | 78 |
| 3.2.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο ένζυμο της COMT για τον πολυμορφισμό Val158Met..... | 78 |
| 3.2.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό στους Val158Met ασθενείς πρώτου επεισοδίου..... | 81 |
| 3.3 MAOB..... | 82 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο ένζυμο της MAOB για τον πολυμορφισμό A644G | 82 |
| 3.3.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό στους A644G ασθενείς πρώτου επεισοδίου | 84 |
| 3.4 5-HTTLPR..... | 86 |
| 3.4.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στον μεταφορέα της 5-HT για τον πολυμορφισμό 5-HTT-linked polymorphic region, 5-HTTLPR | 86 |
| 3.4.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου..... | 89 |
| 3.5 BDNF..... | 91 |
| 3.5.1 Μέτρηση συγκεντρώσεων BDNF στον ορό και προσδιορισμός γονοτύπου στο BDNF για τον πολυμορφισμό Val66Met | 91 |
| 3.5.2 Παράγοντες που σχετίζονται με το πρώτο επεισόδιο | 92 |
| 3.5.3 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό Val66Met στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου | 93 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 95 |
| 4.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο γονίδιο της COMT για το πολυμορφισμό Val158Met | 96 |
| 4.2 Προσδιορισμός γονοτύπου στο γονίδιο της MAOB για το πολυμορφισμό A644G | 100 |
| 4.3 Προσδιορισμός γονοτύπου στον μεταφορέα της 5-HT για τον πολυμορφισμό 5-HTT-linked polymorphic region, 5-HTTLPR..... | 102 |
| 4.4 Συγκεντρώσεις BDNF στον ορό και γονότυπος BDNF για τον πολυμορφισμό Val66Met..... | 104 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 109 |
| 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 111 |
| 7. ABSTRACT | 113 |
| 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 115 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A: αδενίνη

ARMS: Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System)

BDNF: προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor)

CNV: παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variation)

COMT: κατεχολ-ο-μεθυλτρανσφεράση (catechol-o-methyltransferase)

D1: υποδοχείς ντοπαμίνης τύπου 1

D2: υποδοχείς ντοπαμίνης τύπου 2

DA: ντοπαμίνη

dNTP: Δεσοξυ τριφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο (Deoxynucleotide Triphosphate)

DOPAC: διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (Dihydroxyphenylacetic Acid)

DUP: διάρκεια μη θεραπευόμενης ψύχωσης (Duration of Untreated Psychosis)

ELISA: συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FEP: πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο (First Episode Psychosis)

G: γουανίνη (Guanine)

GWAS: Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies)

5-HT: σεροτονίνη (Serotonin)

5-HT₁ - 5-HT₇: υποδοχείς σεροτονίνης

5-HTT: μεταφορέας της σεροτονίνης

5-HTTLPR: περιοχή πολυμορφισμού συνδεδεμένη με το μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HTT-Linked Polymorphic Region)

HVA: ομοβανιλλικό οξύ (Homovanillic Acid)

HW: Hardy –Weinberg

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

L-dopa: 3, 4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (3, 4-dihydroxyphenylalanine)

MAOB: μονοαμινοξειδάση Β (Monoamine Oxidase)

Met: μεθειονίνη (Methionine)

3-MT: 3-μεθοξυτρυπταμίνη (3-Methoxytryptamine)

NGF: αυξητικός παράγοντας των νεύρων (Nerve Growth Factor)

NT3, NT4, 5: νευροτροφίνες (Neurotrophins)

p75NTR: υποδοχέας νευροτροφινών p75 (p75 Neurotrophin Receptor)

PANSS: κλίμακα εκτίμησης των θετικών και αρνητικών συμπτωμάτων της ψύχωσης (Positive and Negative Syndrome Scale)

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

PFC: προμετωπιαίος φλοιός (Prefrontal Cortex)

RFLP: πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism)

SANS: κλίμακα για την εκτίμηση των αρνητικών συμπτωμάτων (Scale for the Assessment of Negative Symptoms)

SNP: πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism)

TBE: Tris / Borate / EDTA

Trk: κινάση του υποδοχέα της τροπομυοσίνης (Tropomyosine Receptor Kinase)

UTR: μη μεταφραζόμενη περιοχή (Untranslated Region)

Val: βαλίνη (Valine)

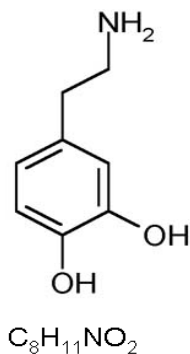
VNTR: ποικίλος αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeats)

ZKPQ: Ερωτηματολόγιο προσωπικότητας Zuckerman-Kuhlman (Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ντοπαμίνη και Ντοπαμινεργικό Σύστημα

Η ντοπαμίνη (dopamine, DA) ανήκει μαζί με την επινεφρίνη (ή αδρεναλίνη) και τη νορεπινεφρίνη (ή νοραδρεναλίνη) στις κατεχολαμίνες. Οι κατεχολαμίνες ανήκουν στις μονοαμίνες και η ονομασία τους οφείλεται στο γεγονός ότι η χημική τους δομή περιλαμβάνει μια αμινομάδα και τον πυρήνα της κατεχόλης (βενζολικός δακτύλιος με δύο γειτονικά υδροξύλια). Οι κύριοι κατεχολαμινεργικοί νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο είναι η ντοπαμίνη και η νορεπινεφρίνη, ενώ η επινεφρίνη είναι κυρίως νευροδιαβιβαστής του περιφερικού νευρικού συστήματος.

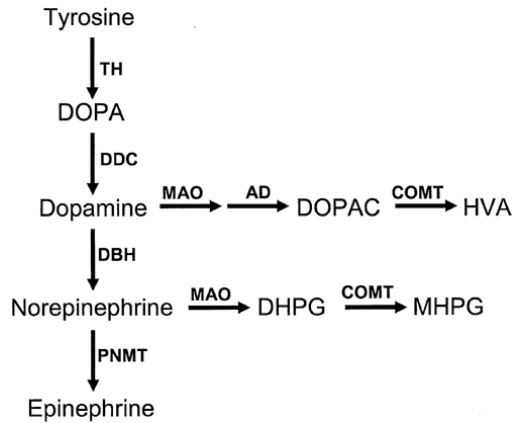


Εικόνα 1: Η χημική δομή του μορίου της ντοπαμίνης

1.1.1 Σύνθεση

Η σύνθεση των κατεχολαμινών ξεκινάει με την πρόδρομη ουσία τυροσίνη, ένα αρωματικό αμινοξύ που προσλαμβάνουμε από τη διατροφή μας. Η τυροσίνη στο πρώτο στάδιο υδροξυλιώνεται σε 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη, πιο γνωστή ως L-Dopa. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης. Στη συνέχεια η L-Dopa μετατρέπεται σε ντοπαμίνη από την αποκαρβοξυλάση της ντόπα.

Η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης στους νοραδρενεργικούς νευρώνες, προσθέτει ένα υδροξύλιο στην ντοπαμίνη και τη μετατρέπει σε νορεπινεφρίνη.



Εικόνα 2: Στάδια σύνθεσης και αποικοδόμησης των κατεχολαμινών (C. Schroeder et al., 2004)

1.1.2 Αποθήκευση

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι κατεχολαμίνες με την επίδραση ενός μονοαμινικού φορέα, αποθηκεύονται σε μικρού μεγέθους συναπτικά κυστίδια. Τα κυστίδια βρίσκονται κοντά στη σύναψη, κι έτσι είναι έτοιμα προς σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη και εξωκύττωση. Η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης βρίσκεται μέσα στα κυστίδια κι αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ντοπαμίνη να μεταβολιστεί σε νορεπινεφρίνη, αφού πρώτα μεταφερθεί μέσα στα κυστίδια.

1.1.3 Απελευθέρωση

Η απελευθέρωση των κατεχολαμινών γίνεται με εξωκύττωση, διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου (εξαρτώμενη συναπτική εξωκύττωση). Η εξωκύττωση γίνεται στις συναπτικές απολήξεις των κατεχολαμινεργικών αξόνων που διατρέχουν την περιοχή-στόχο τους.

Υπάρχουν όμως δύο ακόμη τρόποι απελευθέρωσης: πρώτον οι κατεχολαμίνες μπορούν να απελευθερωθούν με αναστροφή του κατεχολαμινικού μεταφορέα (μηχανισμός-αντίδραση σε ορισμένα φάρμακα όπως η αμφεταμίνη) (Arbuthnott et al, 1990, Raiteri et al, 1979). Δεύτερον, οι κατεχολαμίνες μπορούν να απελευθερωθούν από τους δενδρίτες με μη ασβεστιοεξαρτώμενη απελευθέρωση (Cheramy et al, 1981, Santiago and Westernick, 1991). Η **σύνθεση και η απελευθέρωση** των κατεχολαμινών, μπορεί να ρυθμιστεί μέσω αλληλεπίδρασης των κατεχολαμινών με προσυναπτικούς αυτοϋποδοχείς.

1.1.4 Αποικοδόμηση

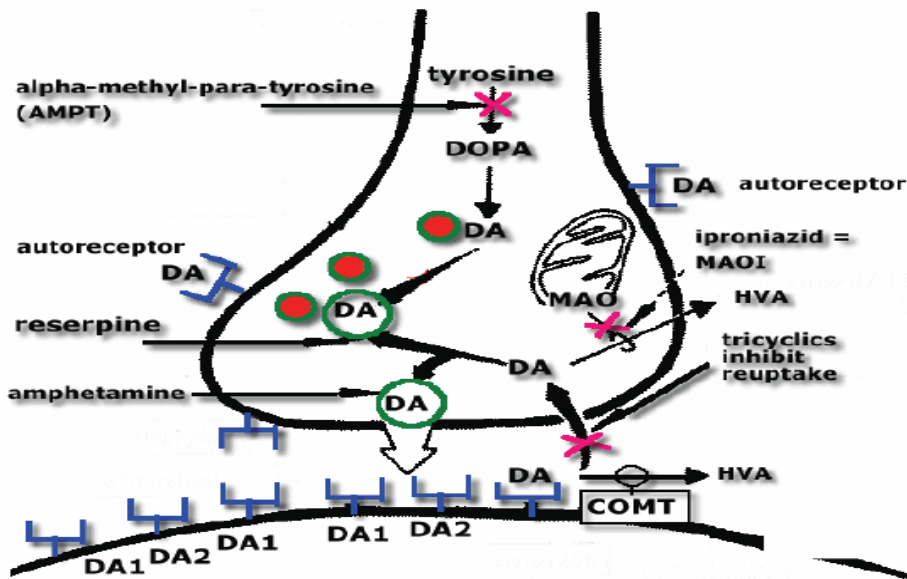
Οι κατεχολαμίνες καταβολίζονται μέσω των ενζύμων μονοαμινοξειδάση (monoamine oxidase, MAO) και κατεχολ-ο-μεθυλ-τρανσφεράση (catechol-o-methyl transferase, COMT). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι η λειτουργική αποικοδόμηση των κατεχολαμινών και της ντοπαμίνης ειδικότερα, πραγματοποιείται κυρίως μέσω της επαναπρόσληψής της στους νευρώνες και επαναποθήκευσης στα συναπτικά κυστίδια.

Μονοαμινοξειδάση (MAO)

Η μονοαμινοξειδάση (MAO) εντοπίζεται ενδοκυτταρικά αλλά και εξωκυτταρικά. Η ενδοκυττάρια μορφή είναι ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εμφανίζεται σε δύο τύπους: τη MAO-A, που εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τη νορεπινεφρίνη και τη σεροτονίνη και τη MAO-B που έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την ντοπαμίνη. Η MAO απαμινώνει τα υποστρώματά της μετατρέποντας τα σε ασταθή και ανενεργά αλδεϋδικά παράγωγα, τα οποία, στη συνέχεια, καταβολίζονται μέσω αφυδρογονασών και αναγωγασών στα αντίστοιχα οξέα και αλκοόλες. Συγκεκριμένα, η MAO καταβολίζει τη DA σε διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC).

Κατεχολ-ο-μεθυλτρανσφεράση (catechol-o-methyl transferase, COMT)

Η COMT εντοπίζεται στην περιοχή της σύναψης (εκτός νευρώνα). Μεταφέρει μια μεθυλομάδα στην m-υδροξυλομάδα του κατεχολικού δακτυλίου και μετατρέπει τη DA σε 3-μεθοξυτριπταμίνη (3-methoxytryptamine, 3-MT). Τα προϊόντα DOPAC και 3-MT καταβολίζονται περαιτέρω σε ομοβανιλλικό οξύ (homovanillic acid, HVA) (Webster, 2001) (εικόνα 3).

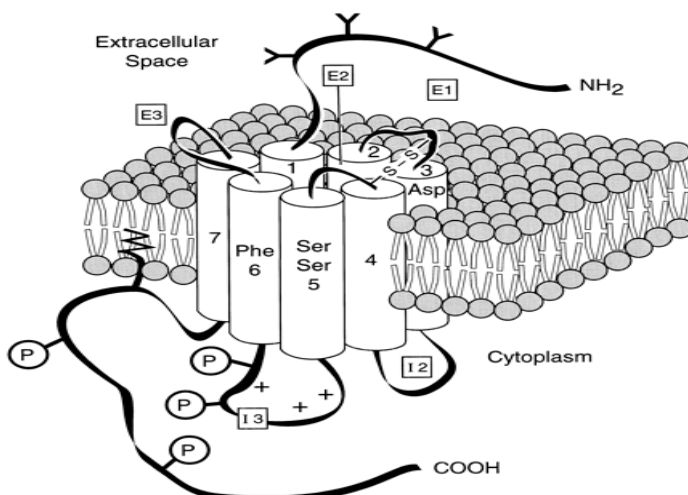


Εικόνα 3: Ντοπαμινεργική σύνταξη. Σύνθεση, απελευθέρωση, μεταβολισμός και επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης από τον προσυναπτικό νευρώνα.

1.1.5 Υποδοχείς ντοπαμίνης

Οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς είναι μεταβολοτροπικοί και εντοπίζονται τόσο προσυναπτικά όσο και μετασυναπτικά.

Α) Οι μετασυναπτικοί υποδοχείς (εικόνα 4) εντοπίζονται σε μη ντοπαμινεργικούς νευρώνες και η ντοπαμίνη εκλύεται προσυναπτικά από αντίστοιχους ντοπαμινεργικούς νευρώνες.



Εικόνα 4: Η δομή του μετασυναπτικού υποδοχέα της ντοπαμίνης. Ο νευροδιαβιβαστής δεσμεύεται σε μία «εσοχή» της πρωτεΐνης η οποία συγκροτείται από διαμεμβρανικά αμινοξέα των περιοχών 2, 3, 5 και 6 (Missale et al, 1998).

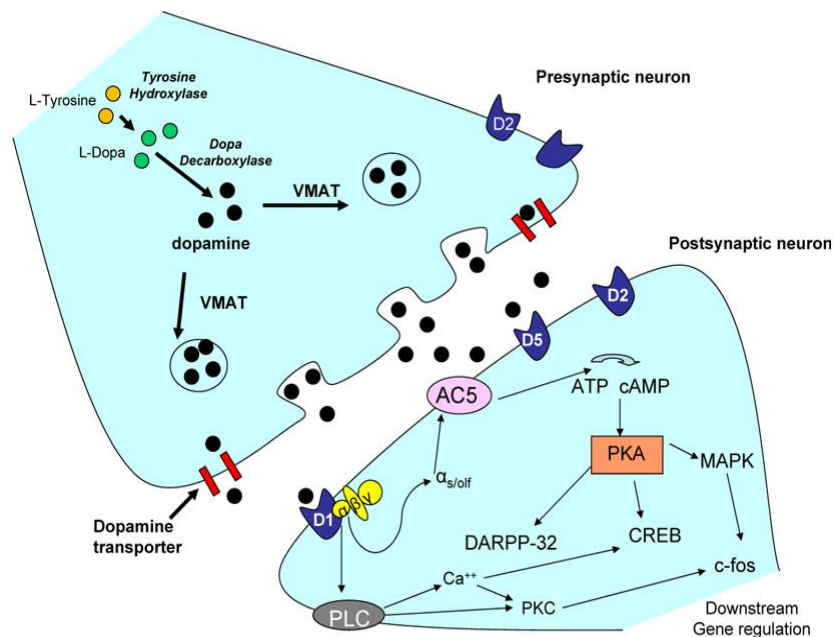
B) Οι προσυναπτικοί ντοπαμινεργικοί υποδοχείς (αυτούποδοχείς) παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης και απελευθέρωσης της DA καθώς είναι μέρος του ανατροφοδοτικού βρόγχου (feedback loop) στη νευροδιαβίβαση. Εντοπίζονται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία για τον νευροδιαβιβαστή που εκλύεται από τον νευρώνα στον οποίο τη μεμβράνη εντοπίζεται ο αυτούποδοχέας. Οι ντοπαμινεργικοί αυτούποδοχείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν λειτουργικά σε 3 ομάδες: σε αυτούς που ρυθμίζουν τη σύνθεση της DA, σε αυτούς που ρυθμίζουν την απελευθέρωσή της και σε αυτούς που ρυθμίζουν την ώση της ντοπαμίνης. Ο λειτουργικός τους ρόλος διαφέρει ανάλογα με το σημείο που εντοπίζονται στον νευρώνα. Έτσι, οι αυτούποδοχείς του σώματος των ντοπαμινεργικών κυττάρων όταν διεγερθούν επιβραδύνουν την ταχύτητα εκφόρτισης των νευρώνων αυτών, ενώ οι αυτούποδοχείς των νευρικών απολήξεων αναστέλλουν τη σύνθεση και απελευθέρωση της DA. Με τον τρόπο αυτό οι αυτούποδοχείς των δύο περιοχών συνεργάζονται για να προκαλέσουν ανάδραση στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση.



Εικόνα 5: Παρουσία ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα ντοπαμινεργικά σώματα, στη μέλαινα ουσία και στις απολήξεις στο ραβδωτό σώμα (πορτοκαλί χρώμα) Το πράσινο χρώμα παρουσιάζει GABAεργικούς υποδοχείς (Gleason et al, 2011).

Οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς, είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που έχει το αμινοτελικό άκρο στον εξωκυττάριο χώρο και το καρβοξυτελικό άκρο ενδοκυτταρικά και ελέγχουν έμμεσα διαύλους ιόντων ασβεστίου (Vallone et al, 2000). Οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με μια πρωτεΐνη G. Στη συνέχεια πραγματοποιείται

ενεργοποίηση ενζύμων λόγω πρόσδεσης με την G πρωτεΐνη, που επιδρούν ως δευτεροί αγγελιοφόροι. Το ενδοκυτταρικό δεύτερο μήνυμα, δρα συνήθως μέσω κάποιας πρωτεϊνικής κινάσης, που ρυθμίζει μέσω αντιδράσεων φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών τη δραστηριότητα των διαύλων ιόντων. Οι πέντε υπότυποι των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, έχουν χωριστεί σε δύο οικογένειες: την οικογένεια των D1 και την οικογένεια των D2 υποδοχέων (Emilien et al, 1999, Lachowicz and Sibley, 1997, Vallone et al, 2000). Στην πρώτη ομάδα συμπεριλαμβάνονται οι D1 και D5 υποδοχείς, ενώ στη δεύτερη οι D2, D3 και D4 υποδοχείς. Η βασική διαφορά των δύο οικογενειών είναι ότι οι υποδοχείς της D1 διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση, ενώ της D2 την αναστέλλουν.



Εικόνα 6: Μονοπάτια σηματοδότησης μέσω των οποίων οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική διαδικασία (Knab and Lightfoot, 2010).

1.1.6 Κατανομή υποδοχέων

Οι D1 υποδοχείς εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα εκφράζονται στο ραβδωτό σώμα, στον επικλινή πυρήνα, στο οσφρητικό φύμα, στη μέλαινα ουσία, στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή αλλά και στον εγκεφαλικό φλοιό, με υψηλότερα επίπεδα στον πρόσθιο φλοιό συγκριτικά με τον οπτικό

φλοιό. Στις περισσότερες περιοχές, οι D1 υποδοχείς εντοπίζονται μετασυναπτικά, δηλαδή η πρωτεΐνη συνεντοπίζεται με το αντίστοιχο mRNA. Εξαιρέση αποτελεί η μέλαινα ουσία, στην οποία οι D1 υποδοχείς εντοπίζονται στις αξονικές απολήξεις των προβολών του ραβδωτού σώματος στη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας (Levy et al, 1993, Khan et al, 1998). Οι D5 υποδοχείς συγκεντρώνονται κυρίως στον ιππόκαμπο και στον φλοιό.

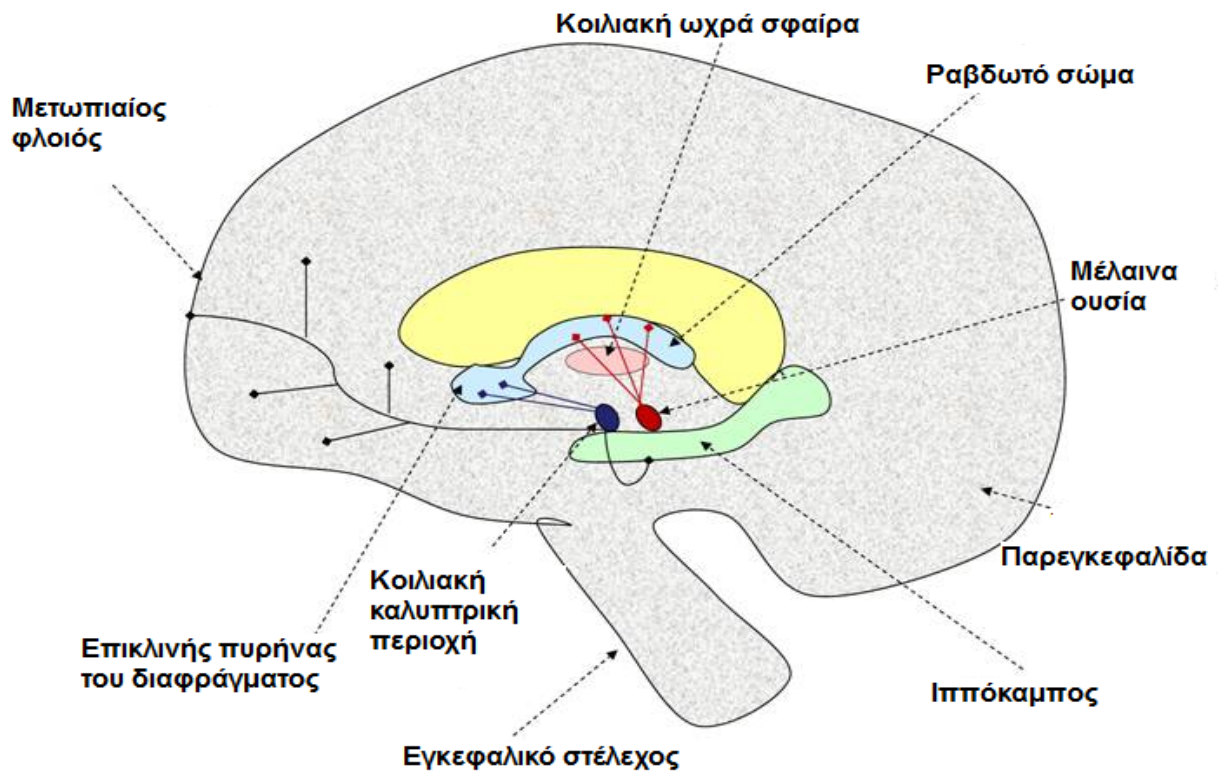
Οι D2 υποδοχείς εντοπίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους οσφρητικούς βολβούς, στο ραβδωτό σώμα, στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, στα οσφρητικά φύματα, στην υπόφυση, στη μέλαινα ουσία και στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής, στο διάφραγμα, στα άνω διδύμια, στη μοριώδη στοιβάδα του ιπποκάμπου και στον ενδορρινικό φλοιό.

1.1.7 Ντοπαμινεργικές οδοί

Οι οδοί της ντοπαμίνης προέρχονται από τρεις κύριες ομάδες κυττάρων που εντοπίζονται στην περιοχή του στελέχους του εγκεφάλου: A8, A9 και A10. Τα περισσότερα κυτταρικά σώματα της DA (περίπου 400.000) στον ανθρώπινο εγκέφαλο βρίσκονται στην A9 περιοχή που διαμορφώνει τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας αν και πολλά κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στην A8 περιοχή και στην A10 που απαρτίζει την κοιλιακή καλυπτική περιοχή. Οι ντοπαμινεργικές οδοί προβάλλουν από τα κυτταρικά σώματα σε πολλές εγκεφαλικές περιοχές και απαρτίζουν τέσσερις κύριες οδούς: τη μελαινοραβδωτή, τη μεσομεταιχμιακή, τη μεσοφλοιώδη και τη φυματοχοανική (Παναγής, 2002) (σχήμα 8).

- Η μελαινοραβδωτή οδός ξεκινά από τα κυτταρικά σώματα των περιοχών A9 και A8 και προβάλλει κυρίως σε δομές του ραβδωτού σώματος και στην ωχρά σφαίρα. Η οδός αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση και το συντονισμό των κινήσεων.
- Οι προβολές που συνιστούν τη μεσοφλοιώδη οδό προβάλλουν σε περιοχές του προμετωπιαίου και ενδορρινικού φλοιού και ξεκινούν από τα κυτταρικά σώματα της A10 περιοχής. Ο ρόλος αυτής της οδού αφορά στην γενικότερη οργάνωση και έκφραση της συμπεριφοράς και στην εκδήλωση των γνωστικών λειτουργιών όπως είναι η προσοχή, η εγρήγορση, η μνήμη και η μάθηση.

- Η μεσομεταιχμιακή οδός χαρακτηρίζεται από τα κυτταρικά σώματα της A10 κυρίως περιοχής και προβάλλει σε δομές του κοιλιακού ραβδωτού, στον ιππόκαμπο, στην αμυγδαλή, στον ενδορρινικό φλοιό και στα οσφρητικά φύματα. Η οδός αυτή συμμετέχει κυρίως στην εκδήλωση συναισθημάτων και κινήτρων.
- Οι προβολές που συνιστούν τη φυματοχοανική οδό έχουν ως αφετηρία τα A12 κύτταρα του παρακοιλιακού και του τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Οι νευρικές προβολές φθάνουν στο μέσο έπαρμα και απελευθερώνουν ντοπαμίνη στον περιαγγειακό χώρο του τριχοειδικού πλέγματος του υποθαλαμο-υποφυσιακού πυλαίου συστήματος. Έτσι, η ντοπαμίνη μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση όπου και δρα στα λακτοτρόφα κύτταρα, προκειμένου να αναστείλει την έκκριση της προλακτίνης.



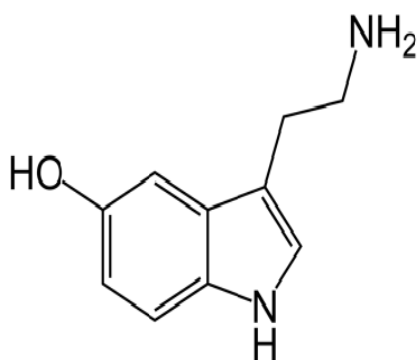
Εικόνα 7. Ντοπαμινεργικές οδοί

Πίνακας 1. Φαρμακολογία των κεντρικών ντοπαμινεργικών συστημάτων

| Βασικά χαρακτηριστικά | Μελαινοραβδωτό | Μεσομεταιχμιακό | Μεσοφλοιώδες |
|---|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Απόκριση σε ντοπαμινεργικούς ανταγωνιστές | Ναι | Ναι | Ναι (περιορισμένη) |
| Απόκριση σε ντοπαμινεργικούς αγωνιστές | Ναι | Ναι | Ναι (περιορισμένη) |
| Απόκριση στους αναστολείς της ΜΑΟ | Ναι | Ναι | Ναι |
| Παρουσία αυτούποδοχέων στις τελικές νευρικές απολήξεις | Ναι | Ναι | Όχι |

1.2 Σεροτονίνη και Σεροτονινεργικό σύστημα

Η σεροτονίνη απομονώθηκε στο ΚΝΣ για πρώτη φορά από τον Page (1954). Είναι μια ινδολαμίνη και κατατάσσεται στις μονοαμίνες.

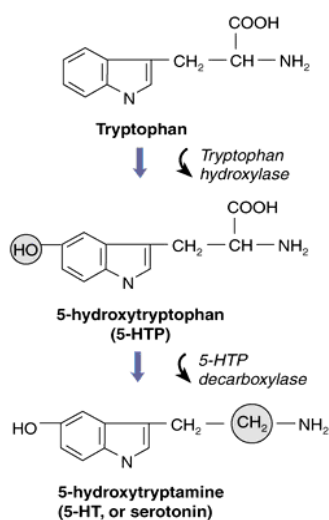


Εικόνα 8. Χημική δομή της σεροτονίνης

1.2.1 Σύνθεση, κατανομή και αποθήκευση

Η 5-HT συντίθεται στους σεροτονινεργικούς νευρώνες από το αμινοξύ 5-υδροξυ-τρυπτοφάνη (5-HTP). Η τρυπτοφάνη προσλαμβάνεται από τις τροφές, μέσω πρωτεΐνης μεταφοράς αμινοξέων και η ποσότητα που προσλαμβάνεται εξαρτάται από το ποσό της ελεύθερης 5-HTP στο πλάσμα. Μια διαδικασία ενεργού πρόσληψης διευκολύνει την είσοδο της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο. Κατά την είσοδό της στους σεροτονινεργικούς νευρώνες, η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε 5-υδροξυτρυπτοφάνη από την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης, η οποία αποτελεί το ρυθμιστικό ένζυμο σύνθεσης της 5-HT. Στη συνέχεια, μέσω της αποκαρβοξυλάσης των L-αρωματικών αμινοξέων, μεταβολίζεται σε 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) (Elhwuegi, 2004).

► Biosynthesis of Serotonin



Εικόνα 9. Βιοσύνθεση σεροτονίνης

Η σεροτονίνη εντοπίζεται και σε πολλά κύτταρα εκτός του νευρικού συστήματος, όπως τα αιμοπετάλια και τα εντεροχρωμόφιλα κύτταρα, αλλά η ανακάλυψή της στο νευρικό σύστημα ήταν αυτή που οδήγησε ορισμένους ερευνητές να υποστηρίξουν ότι λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής. Στην πραγματικότητα, μόνο το 1-2% περίπου της ολικής σεροτονίνης εντοπίζεται στον εγκέφαλο. Επειδή όμως η 5-HT δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, οι νευρώνες θα πρέπει να συνθέσουν την 5-HT.

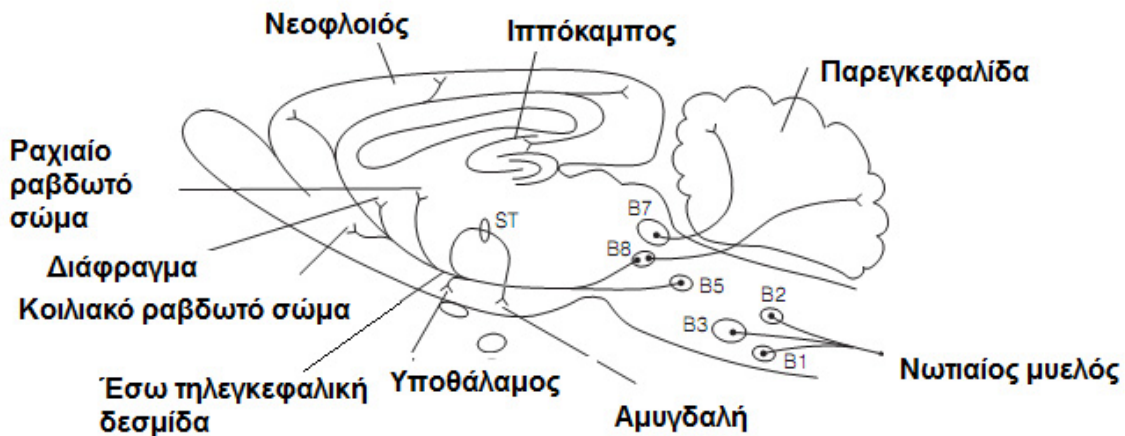
Η σεροτονίνη, όπως και οι κατεχολαμίνες, αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια στις νευρικές απολήξεις. Η απελευθέρωσή της γίνεται με εξωκύτωση εξαρτώμενη από ιόντα

ασβεστίου, ενώ η επαναπρόσληψη γίνεται με ειδικό μηχανισμό, από τους εκλεκτικούς μεταφορείς επαναπρόσληψης 5-HT (SERT).

Η 5-HT μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA) από τη μονοαμινοξειδάση A (MAO-A), τόσο ενδοκυττάρια, όσο και εξωκυττάρια.

1.2.2 Επαναπρόσληψη σεροτονίνης και μεταφορέας της σεροτονίνης

Η επαναπρόσληψη της σεροτονίνης χρησιμεύει σαν ένας σημαντικός μηχανισμός για τον τερματισμό της δράσης της συναπτικής σεροτονίνης. Έτσι, ρυθμίζεται η δράση του νευροδιαβιβαστή, αλλά και η ομοιόστασή του. Η επαναπρόσληψη αυτή, επιτυγχάνεται μέσω ενός μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη, που είναι ικανός να μεταφέρει τη σεροτονίνη και προς τις δύο κατευθύνσεις, ανάλογα με τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης. Ενδείξεις γονιδιακής ρύθμισης του μεταφορέα της σεροτονίνης που ακολουθούν ορμονικές μεταβολές, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση των γενωμικών ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την έκφραση του μεταφορέα, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικές με τη σημασία του στις νευροψυχιατρικές διαταραχές.



Εικόνα 10. Σεροτονινεργικές οδοί

1.2.3 Υποδοχείς σεροτονίνης

Το νευροδιαβιβαστικό σύστημα της σεροτονίνης φαίνεται να έχει το πιο σύνθετο προφίλ ομάδων υποδοχέων. Έχουν αναγνωριστεί 7 πληθυσμοί υποδοχέων μέχρι σήμερα (5-HT₁-5-HT₇), ενώ κάποιοι από αυτούς έχουν διαχωριστεί σε υποπληθυσμούς (Hoyer and Martin, 1996; Hoyer et al, 2002). Εντοπίζονται σε πολλές περιοχές, όπως στη ραφή, την παρεγκεφαλίδα, το φλοιό, τον κερκοφόρο πυρήνα του ραβδωτού σώματος, τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και το οσφρητικό φυμάτιο. Έχει παρατηρηθεί ότι οι υποδοχείς 5-HT διαφέρουν ως προς τη λειτουργία τους. Η 5-HT δεν εμφανίζει την ίδια χημική συγγένεια προς όλους τους υποδοχείς της (Vergé and Calas, 2000).

1.2.4 Σεροτονινεργικές οδοί

Στο εγκεφαλικό στέλεχος βρίσκονται 9 ομάδες (πυρήνες) σεροτονινεργικών κυττάρων (B1-B9) και κατανέμονται στη μέση γραμμή του στελέχους, από τον προμήκη μέχρι το μεσεγκέφαλο. Αυτοί οι πυρήνες, ονομάζονται πυρήνες της ραφής. Κάθε πυρήνας προβάλλει και σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Έτσι, οι σεροτονινεργικοί νευρώνες εκτείνονται στο νωτιαίο μυελό μέσω της κατιούσας οδού, ενώ μέσω της ανιούσας οδού (B7-B9) εκτείνονται στο μεταχιακό σύστημα, στα βασικά γάγγλια, στο φλοιό και στον υποθάλαμο (Cooper et al, 1996).

- Η προβολή των ραχιαίων πυρήνων ραφής B7, καταλήγει κυρίως στο ραβδωτό σώμα, τον πρόσθιο φλοιό και τον κοιλιακό ιππόκαμπο.
- Οι νευρώνες που ξεκινούν από τους μέσους και κοιλιακούς πυρήνες (B8/B9) καταλήγουν κυρίως στο ραχιαίο ιππόκαμπο, τους πυρήνες διαφράγματος, την αμυγδαλή, τη μέλανα ουσία, το θάλαμο, τον υποθάλαμο και το φλοιό (Εικόνα 10).

Η σεροτονίνη εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες (ύπνος, όρεξη, πόνος, σεξουαλική συμπεριφορά), καθώς και σε βασικές ψυχιατρικές διαταραχές (άγχος, κατάθλιψη, σχιζοφρένεια) (Benkelfat, 1993; Jacobs and Fornal, 1995; Maes and Meltzer, 1995).

Οι πρώτες υποθέσεις που αφορούσαν τη συμμετοχή της σεροτονίνης στην εκδήλωση της σχιζοφρένειας, έγιναν από τους Woolley και Shaw (1954), καθώς και από τους Gaddhum

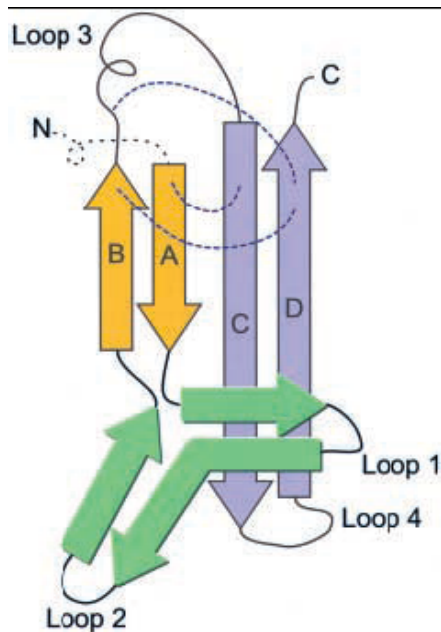
και Hameed, την ίδια χρονιά και βασίστηκαν στην ψυχοσεωμμητική δράση της διαιθυλαμίδης του λυσεργικού οξέος (LSD, που έχει δομή παρόμοια με την 5-HT) και τους ανταγωνιστές της στους εγκεφαλικούς υποδοχείς της σεροτονίνης. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε ξεκάθαρη υπόθεση για το συσχετισμό σεροτονίνης – σχιζοφρένειας, μέχρι τη διατύπωση της 'σεροτονινεργικής-ντοπαμινεργικής' υπόθεσης της σχιζοφρένειας, που υποστήριξε ότι μπορεί να υπάρχει αυξημένη ντοπαμινεργική και σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση σε υποφλοιώδεις περιοχές στη σχιζοφρένεια, που οδηγεί σε θετικά συμπτώματα, καθώς και μειωμένη ντοπαμινεργική και σεροτονινεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό, που οδηγεί σε εκδήλωση αρνητικών συμπτωμάτων (Meltzer, 1989, Breier, 1995; Abi-Dargham et al, 1997).

1.3 Νευροτροφίνες και BDNF

Οι νευροτροφίνες είναι μια μεγάλη οικογένεια διμερών πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων, απαραίτητων για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στα σπονδυλωτά. Στα θηλαστικά, οι νευροτροφίνες περιλαμβάνουν τον αυξητικό παράγοντα των νευρών, τον προερχόμενο από τον εγκέφαλο νευροτροφικό παράγοντα (brain derived neurotrophic factor, BDNF, τη νευροτροφίνη (NT-3) και τη νευροτροφίνη NT-4/5 (Barde, 1994; Sofroniew et al, 2001). Οι κυριότερες λειτουργίες τους αφορούν στην εμπλοκή τους στην ανάπτυξη, αναγέννηση, διαφοροποίηση, επιβίωση και απόκριση στο στρες του ΚΝΣ.

Οι νευροτροφίνες πρώτα συντίθενται σαν πρόδρομες πρωτεΐνες 30-35kDa, γνωστές ως προνευροτροφίνες, που διασπώνται είτε ενδοκυττάρια στους νευρώνες είτε εξωκυττάρια, μετά την απελευθέρωσή τους από τις προκονβεργτάσες (PC 1-7), οδηγώντας στο σχηματισμό των νευροτροφινών (Mowla et al, 2001). Η έκκριση τόσο των προ- όσο και των ώριμων νευροτροφινών στα νευρικά κύτταρα, ρυθμίζεται από τη νευρική δραστηριότητα καθώς και από τα επίπεδα ενδοκυττάρια ασβεστίου. Οι ώριμες νευροτροφίνες έχουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες και σχηματίζουν σταθερά διμερή.

Η κύρια δομική μορφή τους (Εικόνα 11) αποτελείται από 2 ζεύγη από διαπλέκουσες, δίκλωνες β-δομές συνδεδεμένες με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς και από 3 ελάσσονες β-αλυσίδες που οδηγούν σε βρόγχους.



Εικόνα 11. Δομή νευροτροφινών όπου διακρίνονται τα 2 ζεύγη από δίκλωνες β-δομές (A, B, C, D) που συνδέονται με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς και οι 3 ελάσσονες β-αλυσίδες (πράσινα βέλη) που οδηγούν σε θηλειές (Loop 1, 2, 4).

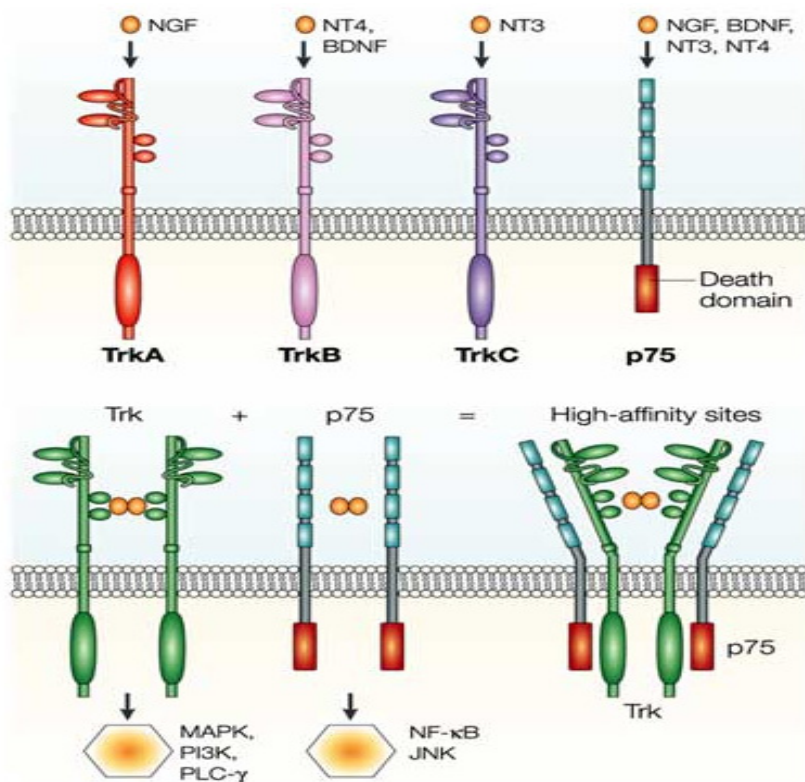
Οι νευροτροφίνες έχουν παρόμοια βασική δομή αλλά οι διαφορετικές περιοχές που καθορίζουν την ειδική πρόσδεσή τους με διαφορετικούς υποδοχείς, καθορίζουν τη βιολογική τους δράση (Huang and Reichardt, 2003).

Οι λειτουργίες λοιπόν των νευροτροφινών, πραγματοποιούνται μέσω της δέσμευσής τους σε δύο είδη μεμβρανικών υποδοχέων. Οι νευροτροφίνες επιλεκτικά συνδέονται με την οικογένεια των υποδοχέων Trk (tropomyosine receptor kinase) (κινάση του υποδοχέα της τροπομυοσίνης). Επιπλέον, όλες οι νευροτροφίνες μπορούν να συνδεθούν με χαμηλή συγγένεια και με έναν άλλον υποδοχέα, τον p75NTR, που ανήκει στην υπεροικογένεια υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF).

Οι ώριμες νευροτροφίνες (NGF, BDNF και NT-3) εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τον ειδικό Trk υποδοχέα τους και χαμηλή συγγένεια με τον υποδοχέα p75NTR. Η πρόσδεση μιας νευροτροφίνης σε ένα συγκεκριμένο υποδοχέα Trk ενεργοποιεί την κινάση της τυροσίνης, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση των μονοπατιών της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνositόλης (PI3K), της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιημένης από μιτογόνα (MAPK) και της φωσφολιπάσης C-γ. Ο υποδοχέας Trk οδηγεί σε μονοπάτια επιβίωσης.

Υπάρχουν 3 υπότυποι (TrkA, TrkB και TrkC) στην οικογένεια υποδοχέων Trk (εικόνα 12). Ο υποδοχέας TrkB ενεργοποιείται από τον BDNF και τον NT-4. Ο TrkB βρίσκεται στο

χρωμόσωμα 9q22.1 (Nakagawara et al, 1995). Το γονίδιο είναι μεγάλου μεγέθους, 590kbp και περιέχει 24 εξόνια (Stoilov et al, 2002, Yeo et al, 2004).



Εικόνα 12: Υποδοχείς νευροτροφινών (Chao, 2003)

1.3.1 Ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)

Ο BDNF είναι ένα ομοδιμερές πολυπεπτίδιο που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον αυξητικό παράγοντα των νευρών (NGF) (51 ίδια αμινοξέα) (Maisonpierre et al, 1991). Είναι μια βασική πρωτεΐνη (pI=9.99) 250 αμινοξέων, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13. Συμμετέχει στην ανάπτυξη, την αναγέννηση, την επιβίωση και τη διατήρηση της λειτουργίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Cohen-Cory et al, 2010; Huang and Reichardt 2001; Yoshi and Constantine-Paton 2010). Συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνος για τη νευρωνική επιβίωση και πλαστικότητα των ντοπαμινεργικών, χολινεργικών και σεροτονινεργικών νευρώνων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Angelucci et al, 2005). Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο BDNF αλληλεπιδρά με τους νευροδιαβιβαστές όπως η

ντοπαμίνη, το γλουταμινικό, η σεροτονίνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (Shoval and Wiseman, 2005) που εμπλέκονται κυρίως στις διαταραχές του ΚΝΣ (Alleva and Francica 2009; Angelucci et al, 2004; Buckley et al, 2007b). Ειδικά για την ντοπαμίνη, έχουν αναφερθεί πολλές αλληλεπιδράσεις με το BDNF. Ο BDNF μειώνει την υδροξυλάση της τυροσίνης, (που είναι η πρόδρομος ουσία για όλες τις κατεχολαμίνες) σε καλλιέργειες εμβρυονικών κυττάρων μεσεγκεφάλου ανθρώπου και αρουραίου. Επίσης, προστατεύει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες από νευροτοξικές ουσίες όπως η 6-υδροξυντοπαμίνη (6-OHDA) και το 1-μεθυλοφαινυλο-πυριδίνιο (MPP+) (Hyman et al, 1991; Spenger et al, 1995; Spina et al, 1992). Καταστροφή ντοπαμινεργικών κυττάρων, μειώνει τα επίπεδα mRNA του BDNF, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες στο μεσεγκέφαλο είναι απαραίτητοι ώστε να διατηρηθεί η σύνθεση του mRNA του BDNF (Seroogy et al, 1994). Νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο BDNF ρυθμίζει την έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του υποδοχέα D1 (Do et al, 2007), καθώς και την έκφραση του υποδοχέα D5 σε αναπτυσσόμενα αστροκύτταρα ραβδωτού (Brito et al, 2004). Παρόλο που διάφορες μελέτες έχουν δείξει μια αλληλεπίδραση μεταξύ της ντοπαμίνης και του BDNF, οι μηχανισμοί που συνδέουν το νευροδιαβιβαστή με τη νευροτροφίνη δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι Hasbi et al, (2009) περιέγραψαν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι στον εγκέφαλο ενηλίκων αρουραίων, όπου η ντοπαμινεργική οδός ρυθμίζει τη νευρωνική ανάπτυξη και ωρίμανση μέσω του BDNF. Οι συγγραφείς τόνισαν την ιδιαίτερη σημασία που μπορεί να έχει αυτός ο μηχανισμός σε ασθένειες όπως η σχιζοφρένεια.

Επιπλέον σε κλινικό επίπεδο, η συγκέντρωση στον ορό του BDNF έχει συσχετιστεί με χαρακτηριστικά προσωπικότητας που μπορούν να εκτιμηθούν τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε ασθενείς με ψυχιατρικές νόσους (Lang et al, 2004, Minelli et al, 2011).

1.4. Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι μια σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή με ποσοστό εμφάνισης στον πληθυσμό 1%. Η έναρξή της ηλικιακά εντοπίζεται στο τέλος της δεύτερης δεκαετίας και στις αρχές της τρίτης, ενώ οι άντρες έχουν κατά 5 περίπου χρόνια μικρότερη ηλικία έναρξης συγκριτικά με τις γυναίκες (Gottesman, 1984). Οι άντρες παρουσιάζουν επίσης μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σχιζοφρένειας, σε ποσοστό 40% μεγαλύτερο από των γυναικών, όπως υποστηρίζει μια μετα-ανάλυση (Aleman et al, 2003). Εκτός από το φύλο, οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταλήξει και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες

κινδύνου που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια, όπως είναι η εγκυμοσύνη και οι επιπλοκές του τοκετού (Jablensky et al, 2005, Preti et al, 2000) η γέννηση κατά το τέλος του χειμώνα/αρχές της άνοιξης (Davies et al, 2003), η γέννηση και η διαμονή σε μεγάλα αστικά κέντρα (McGrath et al, 2009), η προχωρημένη ηλικία του πατέρα (Malaspina et al, 2002), η έκθεση σε *Toxoplasma gondii* (Arias et al, 2012) και τέλος η μετανάστευση και η χρήση κάνναβης (van Os and Karur, 2009). Πάντως, ο πιο ισχυρός παράγοντας κινδύνου μέχρι τώρα θεωρείται το οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας.

Η σχιζοφρένεια χαρακτηρίζεται από 3 κατηγορίες ψυχωτικών συμπτωμάτων, τα θετικά, τα αρνητικά και τα γνωστικού τύπου. Στα θετικά περιλαμβάνονται οι ψευδαισθήσεις (οπτικές και ακουστικές) και το παραλήρημα, ενώ στα αρνητικά το μειωμένο ενδιαφέρον, η μειωμένη εκφορά του λόγου, η απάθεια και η έλλειψη κινήτρων, η κοινωνική απόσυρση, η επιπέδωση του συναισθήματος και η αποδιοργανωμένη συμπεριφορά. Στα γνωστικού τύπου ελλείμματα, τέλος, περιλαμβάνονται διαταραχές στην αντίληψη, τη μνήμη, την προσοχή και την μάθηση. Ενώ τα ψυχωτικά συμπτώματα μπορεί να είναι ιδιαίτερα σοβαρά, η παρουσία και διάρκεια των αρνητικών συμπτωμάτων είναι αυτή που συνδέεται ισχυρότερα με φτωχή έκβαση της νόσου. Κάποιοι δείκτες στη συμπεριφορά και στα γνωστικού τύπου ελλείμματα μπορεί να εμφανίζονται πριν, ακόμη και στην παιδική ηλικία, αλλά τα χαρακτηριστικά της ασθένειας έχουν την αρχή τους στο τέλος της εφηβείας και λίγο μετά τα 20 χρόνια.

Η 10^η αναθεώρηση της Διεθνούς Ταξινόμησης των Νόσων και των Συνδεόμενων Προβλημάτων Υγείας (ICD-10), είναι το επίσημο ταξινομικό σύστημα που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη (πίνακας 2). Στο ICD-10, βρίσκονται όλες οι κατηγορίες της τέταρτης έκδοσης του Διαγνωστικού και Στατιστικού Εγχειριδίου των Ψυχικών Διαταραχών (DSM-IV), χωρίς όμως το εγχειρίδιο αυτό να περιλαμβάνει όλες τις κατηγορίες του ICD-10. Το ICD-10 αποτελείται από ένα επίσημο σύστημα κωδικοποίησης και άλλα συνδεδεμένα κλινικά και ερευνητικά εργαλεία και ντοκουμέντα. Η διαίρεση αυτή, αφορά κυρίως την κλινική εικόνα που εμφανίζει ο ασθενής (Kaplan et al, 2000).

Πίνακας 2. ICD-10: Ταξινόμηση των F20-F29 Ψυχικών Διαταραχών

| |
|---|
| F20-F29 Σχιζοφρένεια, σχιζότυπη και παραληρητική διαταραχή |
| F20 Σχιζοφρένεια |
| F20.0 Παρανοειδής σχιζοφρένεια |
| F20.1 Ηβηφρενική σχιζοφρένεια |
| F20.2 Κατατονική σχιζοφρένεια |
| F20.3 Αδιαφοροποίητη σχιζοφρένεια |
| F20.4 Μετασχιζοφρενική κατάθλιψη |
| F20.5 Υπολειμματική σχιζοφρένεια |
| F20.6 Απλή σχιζοφρένεια |
| F20.8 Άλλη σχιζοφρένεια |
| F20.9 Σχιζοφρένεια, απροσδιόριστη |
| F21 Σχιζότυπη Διαταραχή |
| F22 Επίμονες παραληρητικές διαταραχές |
| F23 Οξείες και παροδικές ψυχωτικές διαταραχές |
| F24 Προκλητή παραληρητική διαταραχή |
| F25 Σχιζοσυναισθηματικές διαταραχές |
| F28 Άλλες μη οργανικές ψυχωτικές διαταραχές |
| F29 Απροσδιόριστη μη οργανική ψύχωση |

Στους ασθενείς με σχιζοφρένεια υπάρχουν διαφορετικοί συνδυασμοί συμπτωμάτων με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μεγάλη ετερογένεια στην πορεία και την έκβαση της νόσου. Πάντως, δεν είναι γνωστό αν η σχιζοφρένεια είναι μια μοναδική διαταραχή με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις, ή μια ομάδα συνδρόμων, που το καθένα έχει μια μοναδική ή αλληλοεπικαλυπτόμενη παθοφυσιολογία (Kirov et al, 2005).

Για πολλά χρόνια, οι ιδέες σχετικά με την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας ήταν βασισμένες σε φαρμακολογικές μελέτες. Η κλασική 'ντοπαμινεργική υπόθεση', στην οποία η σχιζοφρένεια δημιουργούνταν λόγω υπερντοπαμινεργικής λειτουργίας, προέκυψε από την διαπίστωση ότι η ισχύς των κλασικών αντιψυχωτικών φαρμάκων ήταν ανάλογη με την

ικανότητά τους να δεσμεύονται στους υποδοχείς της ντοπαμίνης (Seeman et al, 1975). Η θεωρία που υποστηρίζεται σήμερα είναι πιο πολύπλοκη και προτείνει αυξημένη ντοπαμινεργική διαβίβαση σε υποφλοιώδεις περιοχές που συνδέεται με τα θετικά συμπτώματα της ψύχωσης (Abi-Dargham et al, 2000) και μειωμένη ντοπαμινεργική λειτουργία στον προμετωπιαίο φλοιό που σχετίζεται με τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωστικού τύπου ελλείμματα (Weinberger et al, 2001). Ψυχοφαρμακολογικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι στη σχιζοφρένεια μεταβάλλονται επίσης η σεροτονινεργική λειτουργία, όπως ήδη αναφέρθηκε, αλλά κυρίως η γλουταμινεργική διαβίβαση (Meltzer et al, 1989, Javitt et al, 1991). Καθώς όμως αυτά τα συστήματα αλληλεπιδρούν, κάποιες από τις ντοπαμινεργικές αλλαγές πιθανά ακολουθούν τη μεταβαλλόμενη γλουταμινεργική διαβίβαση στο φλοιό (Laguette et al, 2003).

Η αιτιοπαθογένεια της διαταραχής φαίνεται όμως να σχετίζεται και με τη νευροαναπτυξιακή διαδικασία και όχι αποκλειστικά με το νευροβιολογικό υπόστρωμα που υπάρχει κατά την έναρξη της νόσου (Weinberger et al, 1995, Murray et al, 1987). Αυτό υποστηρίζεται από πολλά επιδημιολογικά δεδομένα, όπως παρατηρήσεις σε παιδιά που στη συνέχεια εκδηλώνουν σχιζοφρένεια και τα οποία είχαν υψηλότερες τιμές νευροφυσιολογικών και κινητικών ελλειμμάτων, καθώς και από νευροαπεικονιστικές μελέτες που δείχνουν κοιλιακή μεγέθυνση, επιμήκυνση και μείωση στον όγκο του φλοιού κατά την έναρξη της ασθένειας (Pantelis et al, 2003) και σε ομάδες υψηλού κινδύνου λόγω γενετικών παραγόντων (Lawrie et al, 1999). Η μείωση του μεγέθους κάποιων εγκεφαλικών δομών, όπως φαίνεται σε νευροαπεικονιστικές μεθόδους, μπορεί να οφείλεται σε νευροαναπτυξιακές ή νευροεκφυλιστικές διαδικασίες ή σε συνδυασμό και των δύο. Η ύπαρξη νευροαναπτυξιακού μηχανισμού ενισχύεται από την αποτυχία των νευροπαθολογικών μελετών να ανιχνεύσουν νευροεκφυλιστικούς δείκτες (Harrison et al, 1999). Πάντως, έχει δειχθεί η ύπαρξη ανομοιομορφων μειώσεων στο νευροπίλημα και στο μέγεθος του νευρώνα, με τον κροταφικό λοβό, τον προμετωπιαίο φλοιό και το ραχιαίο τμήμα του θαλάμου να επηρεάζονται περισσότερο (Harrison et al, 1999). Αυτές οι αλλαγές, μαζί με τις μειώσεις στους συναπτικούς και δενδριτικούς δείκτες και τις ανωμαλίες στη λευκή ουσία (Davis et al, 2003), υποδεικνύουν ελλείμματα στη συναπτική δομή, στη λειτουργία και στην ικανότητα επικοινωνίας μεταξύ των νευρώνων (Harrison et al, 1999).

Η σχιζοφρένεια όμως, δεν επηρεάζει μόνο την ψυχική υγεία. Οι ασθενείς με διάγνωση σχιζοφρένειας πεθαίνουν 12-15 χρόνια πριν το μέσο πληθυσμό, με τη διαφορά

θνησιμότητας να αυξάνεται τις τελευταίες δεκαετίες (Saha et al, 2007). Παρόλο που κάποιοι θάνατοι οφείλονται σε αυτοκτονία, η κύρια αιτία για την αυξημένη θνησιμότητα, σχετίζεται με φυσικές αιτίες, που ποικίλουν από μειωμένη πρόσβαση σε ιατρικές υπηρεσίες, μέχρι αυξημένη συχνότητα καθημερινών παραγόντων κινδύνου (φτωχή διαίτα, λίγη άσκηση, παχυσαρκία και κάπνισμα) (Saha et al, 2007).

1.4.1 Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο

Η θεραπεία και η γενικότερη προσέγγιση των ασθενών που εκδηλώνουν το πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο είναι πολύ σημαντική. Η έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας και η ολοκληρωμένη θεραπεία που παρέχεται σε οργανωμένες μονάδες έγκαιρης παρέμβασης, δίνει στους ασθενείς και τις οικογένειές τους τη δυνατότητα καλύτερης έκβασης της νόσου. Ο συνδυασμός της φαρμακοθεραπείας με τις ψυχοκοινωνικές παρεμβάσεις αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την δυνατότητα ύφεσης και κατά συνέπεια μειώνει τη διάρκεια της θεραπείας (Petersen et al, 2005). Παρόλα αυτά, τα σύνθετα ψυχοκοινωνικά προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι συγκεκριμένοι ασθενείς, μπορεί να περιορίσουν την πιθανότητα αποθεραπείας, τουλάχιστον σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών αυτών.

Στην οξεία φάση, ο σημαντικότερος στόχος είναι να προληφθούν και να ελεγχθούν φαινόμενα ευερεθιστότητας, εχθρικής συμπεριφοράς, βίας, παθολογικού ενθουσιασμού ή αυτοκτονικού ιδεασμού, με τέτοιο τρόπο, ώστε να μην υπάρξουν τραύματα στον ασθενή και στην οικογένειά του. Οι διαταραχές στη συμπεριφορά μπορούν να προκληθούν από διάφορες αιτίες, όπως αποδιοργανωμένη σκέψη, ψευδαισθήσεις, δυσφορία, μανιακά σύνδρομα, αντικοινωνική συμπεριφορά, κατατονία, ή φαρμακευτική δηλητηρίαση (Allen et al, 2001). Η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση και η γρήγορη, κατάλληλη θεραπεία στο πρώτο επεισόδιο, είναι απαραίτητα ώστε να προληφθούν οι βλάβες και να μειωθούν οι τραυματικές εμπειρίες, που μπορούν να καταστρέψουν τις προσπάθειες για την ανάπτυξη και εδραίωση μιας σχέσης εμπιστοσύνης με το γιατρό.

Πολλοί ασθενείς με πρώτο επεισόδιο αρχικά εμφανίζουν σύνθετα ψυχοκοινωνικά προβλήματα και μια ποικιλία ψυχωτικών και άλλων συμπτωμάτων (π.χ. θετικά, αρνητικά, γνωστικού τύπου, κατάθλιψη, μανία, άγχος), που συνοδεύονται από έλλειψη ικανοτήτων (απραξία, έλλειψη απασχόλησης, αδυναμία ανεξαρτησίας και προβληματικές κοινωνικές επαφές) και από γενικά χαμηλή ποιότητα ζωής (Law et al, 2005). Οι ασθενείς αυτοί,

λαμβάνοντας την κατάλληλη θεραπεία, μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα της ζωής τους από τους τρεις πρώτους μήνες (Lambert et al, 2006, 2007; Malla et al, 2006).

Ας σημειωθεί ότι η πλευρική κοιλιακή μεγέθυνση είναι η πιο σταθερή παρατηρούμενη αλλαγή στο πρώτο επεισόδιο εκδήλωσης σχιζοφρένειας (Vita et al, 2006). Η αύξηση του κοιλιακού όγκου σε νεαρή ηλικία, που επηρεάζει τις παρακείμενες δομές, δηλαδή την μετωπιαία, την κροταφική και τη θαλαμική δομή, αποτελεί ένδειξη διαταραχών σε νευροαναπτυξιακές διαδικασίες (Fannon et al, 2000). Η απόκριση τις πρώτες 12 εβδομάδες της θεραπείας, είναι ενδεικτική για την περαιτέρω έκβαση της νόσου. Με άλλα λόγια, ασθενείς που δεν έχουν έγκαιρη θεραπεία στην αρχή, είναι δύσκολο να έχουν επιτυχή έκβαση της ασθένειας μακροπρόθεσμα (Lambert et al, 2006, 2007). Πολύ σημαντική είναι η διάγνωση της διαταραχής (εάν είναι συναισθηματικού τύπου ή όχι), καθώς η κατάλληλη για κάθε περίπτωση θεραπεία θα πρέπει να αρχίσει όσο το δυνατόν συντομότερα.

1.4.2 Φαρμακοθεραπεία της σχιζοφρένειας

Τα φάρμακα πρώτης γενιάς, που ανακαλύφθηκαν στο τέλος της δεκαετίας του 50, δηλαδή τα κλασικά αντιψυχωτικά (όπως η αλοπεριδόλη και η χλωροπρομαζίνη), είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των θετικών ψυχωτικών συμπτωμάτων, συχνά όμως οδηγούν σε ανεπιθύμητες ενέργειες εξωπυραμιδικού τύπου ενώ παρουσιάζουν έλλειψη ικανοποιητικής αποτελεσματικότητας ως προς τα αρνητικά συμπτώματα και τα ελλείμματα γνωστικού τύπου.

Τα νεότερα αντιψυχωτικά φάρμακα, που αναστέλλουν τόσο τους D2 ντοπαμινεργικούς υποδοχείς όσο και τους 5-HT₂ σεροτονινεργικούς υποδοχείς (Kapur and Mamo, 2003), αποτελούν την κυριότερη σύγχρονη θεραπεία της σχιζοφρένειας. Την τελευταία δεκαετία, οι νέες φαρμακευτικές ουσίες, γνωστές ως άτυπα αντιψυχωτικά (αντιψυχωτικά δεύτερης γενιάς) -ρισπεριδόνη, ολανζαπίνη, κουετιαπίνη, ζιπρασιδόνη και αριπιπραζόλη- χρησιμοποιούνται στη καθημερινή κλινική πράξη και προκαλούν σε μικρότερο βαθμό κινητικές διαταραχές. Αρχικά υπήρξε μεγάλη αισιοδοξία ότι τα νεότερα φάρμακα θα βελτιώναν όχι μόνο τα θετικά ψυχωτικά συμπτώματα, αλλά και τα αρνητικά, καθώς και τα γνωστικού τύπου ελλείμματα της σχιζοφρένειας. Παρόλο που τα αντιψυχωτικά δεύτερης γενιάς είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία των θετικών συμπτωμάτων, παρουσιάζουν και αυτά μειωμένης έκτασης κινητικές ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ η ελπίδα για την

αποτελεσματικότητά τους έναντι των αρνητικών και των γνωστικού τύπου συμπτωμάτων δεν επαληθεύτηκε πλήρως (Leucht et al, 2009, Agid et al, 2008). Επιπρόσθετα, τα νέα αντιψυχωτικά έχουν μεταβολικές ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. αύξηση βάρους, αυξημένα τριγλυκερίδια και χοληστερίνη). Μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου αναφέρει ότι πάνω από τους μισούς ασθενείς είχαν σημαντική αύξηση βάρους (πάνω από 7%), με μέση αύξηση βάρους 4-7 κιλά, γεγονός που οδήγησε σε ανάπτυξη οξέος μεταβολικού συνδρόμου λόγω της θεραπείας σε έναν στους δέκα ασθενείς (Patel et al, 2009). Συνεπώς, η επιλογή μεταξύ αντιψυχωτικών φαρμάκων χρειάζεται προσοχή, ώστε να εκτιμηθούν πιθανά οφέλη, κίνδυνοι και κόστος (Leucht et al, 2009).

1.5 Γενετικές προσεγγίσεις της Σχιζοφρένειας και του Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου

1.5.1 Μελέτες σύνδεσης

Οι μελέτες σύνδεσης βασίζονται στην αρχή ότι μεγάλα τμήματα DNA κληρονομούνται αμετάβλητα από κάθε γονέα και ότι ορισμένοι DNA δείκτες μπορούν να εντοπίσουν την κληρονομικότητα αυτών των τμημάτων χωριστά σε κάθε απόγονο. Συνεπώς οι μελέτες σύνδεσης, μπορούν να χρησιμοποιήσουν κάποιες εκατοντάδες από τέτοιους δείκτες ώστε να αποδείξουν τη μεταβίβαση αυτών των τμημάτων DNA από τους γονείς στους απογόνους και να ελέγξουν ολόκληρο το γονιδίωμα προκειμένου να εντοπίσουν συγκεκριμένες περιοχές που κληρονομούνται από τον απόγονο που εμφανίζει τη νόσο. Αν ένα τέτοιο τμήμα συμβαδίζει με την εμφάνιση της νόσου σε μια οικογένεια, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι ένα υπεύθυνο για την ασθένεια γονίδιο βρίσκεται μέσα στο συγκεκριμένο τμήμα DNA. Τέτοιες μελέτες έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε διάφορες ασθένειες, στη σχιζοφρένεια όμως και στις συγγενείς νόσους, δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί γονίδια που να αποδεικνύεται ότι παίζουν καταλυτικό ρόλο.

Από μελέτες μέσα σε οικογένειες, έχει αναφερθεί ένας περιορισμένος αριθμός γονιδίων, με μέτριο αποτέλεσμα ως προς το φαινότυπο της σχιζοφρένειας (Risch and Merikangas, 1996). Η μικρή αυτή επίδραση των υποψηφίων γονιδίων σε συνδυασμό με την ετερογένεια στο φαινότυπο της σχιζοφρένειας, πρέπει να αποτελούν τους κύριους λόγους για τους οποίους οι μελέτες σάρωσης γονιδιώματος έχουν ελάχιστη επαναληψιμότητα (Owen et al, 2004). Παρόλα αυτά, διάφορες μετα-αναλύσεις, έδωσαν ισχυρές ενδείξεις για τα περισσότερα από τα υποψήφια για τη σχιζοφρένεια γονίδια τα οποία μελετούμε μέχρι και

σήμερα και έχουν δώσει αρκετό φως στη νευροβιολογία αυτών των νόσων. Σε δύο μεταanalύσεις που πραγματοποιήθηκαν έχουν αναφερθεί δύο περιοχές: η 8p και η 22q στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Badner & Gershon, 2002; Lewis et al, 2003). Σ' αυτές τις περιοχές συνεπώς, φαίνεται να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να εντοπίζονται υποψήφια γονίδια για ψυχωτικές διαταραχές.

1.5.2 Μελέτες συσχέτισης αλληλομόρφων

1.5.2.1 Λειτουργικός γενετικός πολυμορφισμός

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα συναντώνται 3.1 εκατομμύρια πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Στους πολυμορφισμούς αυτούς, γίνεται αντικατάσταση μιας νουκλεοτιδικής βάσης από μια άλλη. Η ανάλυση των πολυμορφισμών αυτών, μας οδηγεί στην κατανόηση της συμβολής της γενετικής όσον αφορά σημαντικά γνωρίσματα, όπως προδιάθεση σε ασθένειες, μολυσματικούς παράγοντες, διαφορετική απόκριση στη χορήγηση φαρμάκων κτλ.

Προκειμένου να καταλάβουμε το πώς ένας πολυμορφισμός συνδέεται με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο ή με μια συγκεκριμένη συμπεριφορά, θα πρέπει να ξέρουμε αν ο πολυμορφισμός είναι λειτουργικός, αν δηλαδή αλλάζει τη λειτουργία ενός ή μιας ομάδας γονιδίων. Μπορεί όμως να είναι είναι δυναμικά ρυθμιστικός, όταν εντοπίζεται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή (που βρίσκεται ανοδικά ή καθοδικά) και των εσωνίων και μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή.

Ένας πολυμορφισμός θα μπορούσε να συνδυαστεί με μια από τις παρακάτω κατηγορίες:

- να σχετίζεται με μία μη καθορισμένη λειτουργία (είτε δεν είναι γνωστή, είτε έχει προταθεί αλλά δεν μπορεί να αποδειχτεί ερευνητικά)
- να είναι λειτουργικός *in vitro*, αλλά η έκφραση του γονιδίου *in vivo* να είναι άγνωστη
- να είναι λειτουργικός *in vivo*
- να είναι λειτουργικός και αυτό να αποδεικνύεται από τις διαφορές στο φαινότυπο (λειτουργική φαινομίμηση) (Albert, 2011)

Οι μελέτες συσχέτισης συγκρίνουν τη συχνότητα εμφάνισης διαφόρων αλληλομόρφων σε ομάδες ασθενών και μαρτύρων αντίστοιχα. Οι μελέτες συσχέτισης αλληλομόρφων, ελέγχουν συγκεκριμένα γονίδια που φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

Σε αντίθεση με τις μελέτες σύνδεσης, όπου μελετάται η πιθανή σχέση ενός γενετικού τύπου με ένα φαινότυπο, οι μελέτες συσχέτισης ελέγχουν τη σχέση ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου, συνήθως πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου, σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, με έναν συγκεκριμένο φαινότυπο. Οι μελέτες συσχέτισης βασίζονται στη θεωρία ότι μια προγονική μετάλλαξη στο DNA οδήγησε στην ασθένεια, ή στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας στον πληθυσμό. Αυτή η μετάλλαξη πέρασε από τη μια γενιά στις επόμενες. Αυτοί οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να είναι λειτουργικοί, ή μπορεί να χρησιμεύουν σαν πιθανοί δείκτες για ένα πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου που βρίσκεται κοντά και θεωρείται υπεύθυνος για την ασθένεια. Σ' αυτή την περίπτωση, οι δύο πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου θεωρείται ότι βρίσκονται σε ανισοροπία σύνδεσης, γιατί κληρονομούνται πάντα μαζί, στο ίδιο τμήμα του χρωμοσώματος. Οι μελέτες συσχέτισης αλληλομόρφων ελέγχουν αν ένα υποθετικά ύποπτο για την ασθένεια αλληλόμορφο εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς από ότι στους μάρτυρες. Το μεγάλο πλεονέκτημα των μελετών συσχέτισης είναι ότι μπορούν να εντοπίσουν αποτελέσματα γονιδίων, που δεν μπορούν να εντοπιστούν από μελέτες σύνδεσης. Επίσης, οι μελέτες συσχέτισης είναι ένας καλός τρόπος να ελεγχθεί αν οι μεταλλάξεις ενός γονιδίου συνδέονται με την ασθένεια που εξετάζεται. Τα γονίδια επιλέγονται:

α/ με θεωρητικά κριτήρια, όπως η φαρμακολογική αποτελεσματικότητα των αντιψυχωτικών φαρμάκων (π.χ. σύστημα υποδοχέων ντοπαμίνης),

β/ με βάση τα μοντέλα για το νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας (όπως η νευροαναπτυξιακή υπόθεση της σχιζοφρένειας, που υπέδειξε τον πιθανά ενεργό ρόλο του προερχόμενου από τον εγκέφαλο νευροτροφικού παράγοντα),

γ/ με την υπόθεση που αφορά στη συσχέτιση υπεύθυνων γονιδίων με καταστάσεις που συνδέονται με τις ψυχώσεις (όπως το βελοκαρδιοπροσωπικό σύνδρομο),

δ/ με βάση την αυξανόμενη ακρίβεια των μελετών σύνδεσης και την ακριβή χαρτογράφηση των υποψηφίων γενετικών τόπων (δυσβιδίνη) (Weinberger and Berger, 2009).

Πώς η γενετική διαφοροποίηση συμβάλλει στην εκδήλωση της σχιζοφρένειας

Η γενετική διαφοροποίηση μπορεί να συσχετιστεί με μια ασθένεια με δύο τρόπους: είτε με αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης (με αντικατάσταση αμινοξέος ή με μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου), είτε με αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου (με αλλαγή κάποιου παραμέτρου της μεταγραφής ή της μετάφρασης) που οδηγεί σε μεταβολή της ποσότητας της πρωτεΐνης που κατανέμεται. Οι δύο διαδικασίες, έχουν το ίδιο αποτέλεσμα: αλλαγή στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Ένα παράδειγμα αλλαγής στη δομή της πρωτεΐνης (με αντικατάσταση ενός αμινοξέος), είναι ο πολυμορφισμός Val158Met του γονιδίου της COMT, όπως περιγράφεται παρακάτω. Αλλαγές στον υποκινητή, μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου (Laws et al, 2002; Greenwood and Kelsoe, 2003). Πολυμορφισμοί σε εσόνια μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη μεταγραφή ή να διαταράξουν τη σταθερότητα του mRNA και άρα την αφθονία της πρωτεΐνης (Greenwood and Kelsoe, 2003). Τέλος, πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR), επηρεάζουν τη σταθερότητα του mRNA και συνεπώς τη μετάφραση (Miller and Madras, 2002).

Συνοψίζοντας, η κατανόηση της συσχέτισης των γενετικών διαφοροποιήσεων με τη σχιζοφρένεια, θα πρέπει να εστιάσει κατ' αρχήν στην αναγνώριση των υποψηφίων αλληλομόρφων σε κάθε γονίδιο και στη συνέχεια στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το κάθε ένα από αυτά τα αλληλόμορφα αλλάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης την οποία κωδικοποιεί (Harrison and Weinberger, 2005).

Κάποια χαρακτηριστικά γονίδια που φαίνεται να σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια, είναι αυτά που κωδικοποιούν για:

1/ τη **νευρεγουλίνη-1 (neuregulin, NRG1)**, που εμπλέκεται στην νευροανάπτυξη, συμβάλλει στη νευρωνική μετανάστευση και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Επίσης ρυθμίζει τη συναπτική πλαστικότητα, αλληλεπιδρώντας με μετασυναπτικές πρωτεΐνες, με τις οποίες συνδέονται οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος (Buonanno A and Fischbach 2001).

2/ το **ρυθμιστή της G σηματοδότησης (regulator of G protein signalling-4, RGS4)**, που είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες

(συμπεριλαμβανομένου του μεταβολοτροπικού υποδοχέα του γλουταμινικού (de Blasi et al, 2001) και μπορεί να διαδραματίζει νευροαναπτυξιακό ρόλο (de Vries et al, 2000).

3/ **τη δυσβιδίνη (dysbidin)**, που εντοπίζεται σε προσυναπτικές απολήξεις και πιθανά συμμετέχει στη διαμόρφωση και διατήρηση των συνάψεων και στη μετάδοση σήματος (Straub et al, 2002, Benson et al, 2001).

4/ **την αφυδρογονάση της προλίνης (proline dehydrogenase, PRODH)**, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22q11 και δυνητικά επηρεάζει τις γλουταμινεργικές συνάψεις μέσω διαφόρων μηχανισμών (Liu et al, 2002, Gogos et al, 1999).

5/ **την κατεχολ-ο-μεθυλτρανσφεράση (catechol-o-methyltransferase, COMT)**, που δρα απ' ευθείας στην μονοαμινεργική νευροδιαβίβαση (Gogos et al, 1998) και πιθανά επηρεάζει και άλλους συναπτικούς νευροδιαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένων των γλουταμινεργικών, μέσω αλληλεπίδρασης της ντοπαμίνης με συστήματα νευροδιαβίβασης αμινοξέων (Weinberger, 1987).

6/ **τη μονοαμινοξειδάση Β (monoamine oxidase Β, MAOB)**, που καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση διαφόρων βιογενών αμινών, με μεγαλύτερη συγγένεια για τη φαινυλαιθυλαμίνη και την ντοπαμίνη. Έτσι, θεωρείται υποψήφια για την εμπλοκή της στην εμφάνιση της σχιζοφρένειας, τόσο λόγω της ντοπαμινεργικής υπόθεσης (Winterer and Weinberger, 2004; Iversen and Iversen, 2007; Talkowski et al, 2007), όσο και γιατί σε ευρείες μελέτες σάρωσης γονιδιώματος το γονίδιο της MAOB ήταν ένα από τα γονίδια με το ισχυρότερο σήμα (Carrera et al, 2008).

7/ **το μεταφορέα της σεροτονίνης (serotonin transporter, 5-HTT)**, που εμπλέκεται έντονα στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (Breier, 1995) και ειδικά στην εκδήλωση δύο κύριων συμπτωμάτων, της κατάθλιψης και των ψευδαισθήσεων (Golimbet et al, 2004; Malhotra et al, 1998).

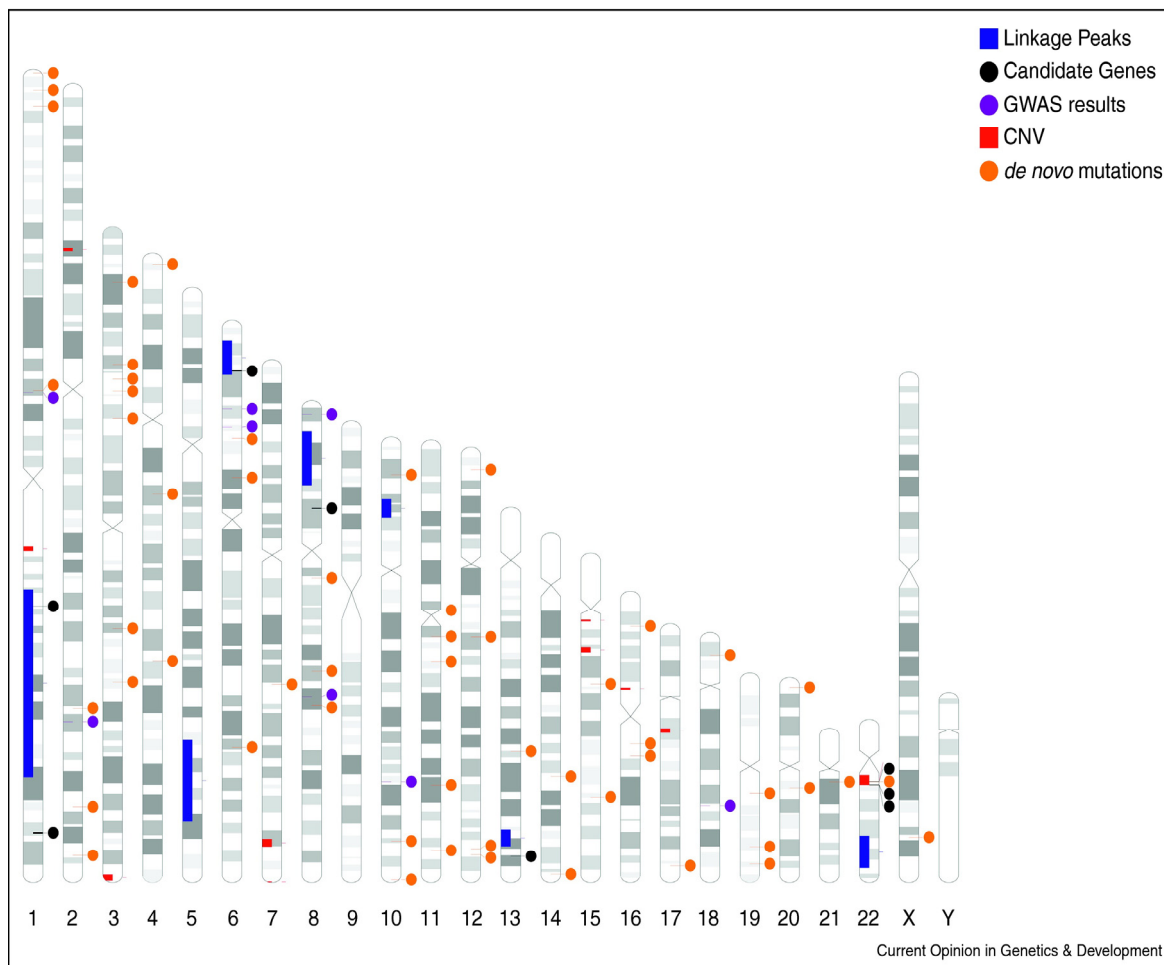
8/ **τους υποδοχείς της σεροτονίνης τύπου 2, (5-HT_{2A})**, που έχουν συσχετιστεί με σχιζοφρένεια, διπολική διαταραχή και ψυχωτική συμπτωματολογία (Inayama et al, 1996; Williams et al, 1996; Du et al, 1999; Joober et al, 1999; Nacmias et al, 2001; Araga and Narasu, 2002; Golimbet et al, 2002).

9/ **τον προερχόμενο από τον εγκέφαλο νευροτροφικό παράγοντα (brain derived neurotrophic factor, BDNF)**, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των νεύρων, του σχηματισμού των συνάψεων και της συναπτικής πλαστικότητας (Chao, 2003; McAllister et al, 1999; Ohba et al, 2005; Poo, 2001; Webster et al, 2002).

Τα γνωστά μέχρι σήμερα υποψήφια γονίδια, είναι πιθανότερο ότι αποτελούν τμήμα μιας πολυγονιδιακής ομάδας και όχι κυρίαρχους γενετικούς δείκτες, παρόλο που χρειάζεται εκτενέστερη έρευνα προκειμένου να γίνει αντιληπτός με ακρίβεια ο τρόπος με τον οποίο η γενετική ποικιλομορφία αυτών των γονιδίων συμβάλλει στην έναρξη ψυχωτικών διαταραχών (Owen et al, 2004).

1.5.3 Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος

Το πλεονέκτημα των υψηλής ποιότητας γενοτυπικών μεθόδων οδήγησε στη δυνατότητα διερεύνησης ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και στην ανακάλυψη όλο και περισσότερων γενετικών δεικτών. Οι μελέτες σάρωσης γονιδιώματος (genome wide association studies, GWAS) στη σχιζοφρένεια άρχισαν να εμφανίζονται το 2008, αλλά δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής σημαντικοί γενετικοί τόποι, ακόμα και με δείγματα 7000 ή υψηλότερα (Sullivan et al, 2008, Need et al, 2009). Θα μπορούσε λοιπόν κανείς εύκολα να συμπεράνει, ότι δεν υπάρχουν κάποια αλληλόμορφα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όμως, η αδυναμία προσδιορισμού συγκεκριμένων γενετικών τόπων με αυτή τη μέθοδο, οφείλεται περισσότερο σε αδυναμία της μεθόδου. Το 2009, η Παγκόσμια Οργάνωση για τη Σχιζοφρένεια, χρησιμοποίησε δεδομένα για πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNP) ολόκληρου του γονιδιώματος για να υποστηρίξει μια εναλλακτική θεωρία: ότι η σχιζοφρένεια οφείλεται σε μια συσσώρευση πολλών αλληλομόρφων κινδύνου, σε χιλιάδες γενετικών τόπων. Η θεωρία αυτή αναφέρεται σαν 'πολυγονιδιακό μοντέλο σχιζοφρένειας'. Αυτή η θεωρία ενισχύεται από το γεγονός ότι γύρω στους 37000 πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον κίνδυνο ανάπτυξης σχιζοφρένειας (Purcell et al, 2009).



Εικόνα 13. Διαφοροποίηση των υποψηφίων γενετικών τόπων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Αποτελέσματα από διάφορες μεθόδους γονιδιακών μελετών αποτυπώθηκαν στα ιδιογράμματα των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων.

1.5.4 Ενδιάμεσοι φαινότυποι (ενδοφαινότυποι)

Η αδυναμία σταθερότητας στις γενετικές μελέτες, ερμηνεύτηκε συχνά ως πολυπλοκότητα του φαινοτύπου της σχιζοφρένειας και ως αδυναμία των συνηθών γενετικών προσεγγίσεων. Ο Irving Gottesman πρότεινε στο τέλος της δεκαετίας του 1960 ότι η σχιζοφρένεια είναι πολυγονιδιακή νόσος και ότι πρέπει να προσδιοριστούν ενδοφαινότυποι που μπορεί να δώσουν ένα ισχυρότερο σήμα γονιδιακής δράσης από ότι ο φαινότυπος σχιζοφρένεια (Gottesman and Shields, 1967). Η προσδοκία ήταν τα χαρακτηριστικά που είναι 'ενδιάμεσα' μεταξύ του βιολογικού υποστρώματος στο επίπεδο του κυττάρου και του φαινομενολογικού φαινοτύπου, δυνητικά να μπορούν να κατηγοριοποιήσουν πολύπλοκες διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια και η διπολική

διαταραχή σε βιολογικά σημαντικές υποομάδες (Gottesman and Gould, 2003). Τέτοιοι ενδιάμεσοι φαινότυποι θα πρέπει να περιλαμβάνουν ποσοτικοποιημένες μεταβλητές, που να σχετίζονται πιο άμεσα με τον «παθογενή» γονότυπο από ότι ο κλινικός φαινότυπος στο σύνολό του. Οι ενδοφαινότυποι δηλαδή, εντοπίζονται μεταξύ γονοτύπου και διαταραχής. Στις νευροψυχιατρικές νόσους, ο ενδοφαινότυπος μπορεί να είναι νευροφυσιολογικός, βιοχημικός, ενδοκρινολογικός, νευροανατομικός, γνωστικού τύπου ή νευροψυχολογικός. Οι Gottesman and Gould έθεσαν κάποια κριτήρια σχετικά με την ισχύ πιθανών ενδοφαινοτύπων:

- 1/ Ο ενδοφαινότυπος συνδέεται με την διαταραχή στον πληθυσμό
- 2/ Ο ενδοφαινότυπος είναι κληρονομικός
- 3/ Ο ενδοφαινότυπος είναι ανεξάρτητος από το αν η διαταραχή είναι ενεργή
- 4/ Ο ενδοφαινότυπος και η διαταραχή θα πρέπει να συνυπάρχουν σε οικογένειες που εκδηλώνουν την ασθένεια
- 5/ Ο ενδοφαινότυπος που παρατηρείται σε μέλη οικογενειών που νοσούν, εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα υγιή μέλη των οικογενειών από ότι στο γενικό πληθυσμό

Έχουν προταθεί πολλοί πιθανοί ενδοφαινότυποι για τη σχιζοφρένεια. Υπάρχουν όμως και πολλά εμπόδια στην χρήση τους, όπως η αδυναμία συλλογής του μεγάλου αριθμού δειγμάτων που απαιτούνται για τις συγκεκριμένες μεθόδους ανίχνευσης ενδοφαινοτύπων και οι αποκλίσεις μεταξύ των εργαστηρίων/κλινικών στις μετρήσεις (Gottesman and Gould, 2003).

1.5.5 Κληρονομικότητα

Η σχιζοφρένεια είναι το αντικείμενο πολλών ερευνών ανάμεσα σε οικογένειες, διδύμους και υιοθετημένα παιδιά. Οι έρευνες αυτές έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος να εμφανίσουν σχιζοφρένεια οι συγγενείς ασθενών είναι μεγάλος, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη γενετικού υποβάθρου (Owen 2002). Σημαντική είναι πάντως και η επίδραση του

περιβάλλοντος, αφού παρόλο που η κληρονομικότητα φτάνει το 80%, μειώνεται στο 50% σε μονοζυγωτικούς διδύμους.

Η αναλογία ανάμεσα στην κληρονομικότητα και το περιβάλλον όσον αφορά τη σχιζοφρένεια, δεν είναι με ακρίβεια καθορισμένη. Τις προηγούμενες δεκαετίες, πολλές συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ σχιζοφρένειας και γενετικών παραγόντων κινδύνου. Η προσέγγιση υποψηφίων γονιδίων εξέτασε πάνω από 800 γονίδια για την πιθανή εμπλοκή τους στη σχιζοφρένεια (Harrison and Weinberger, 2005; Gogos and Gerber, 2006), προτείνοντας διάφορες περιοχές γονιδίων, όπως ήδη αναφέρθηκε. Πάντως, κανένα από αυτά τα ευρήματα δεν είχε επαναληψιμότητα σε όλες τις έρευνες και τα αποτελέσματα ήταν αδύναμα κι εξηγούσαν ένα μικρό μόνο ποσοστό των περιπτώσεων των ασθενών.

Μετά την παραδοχή ότι τόσο τα υποψήφια γονίδια όσο και οι ευρείες μελέτες συσχέτισης απέτυχαν να δώσουν ισχυρές αποδείξεις ότι υπάρχει ‘μια διαταραχή-μία παραλλαγή’, η θεωρία ‘μία διαταραχή, πολλές παραλλαγές’, έγινε το επόμενο αντικείμενο έρευνας για το γενετικό υπόβαθρο της σχιζοφρένειας, με τη μελέτη των παραλλαγών αριθμού αντιγράφων. Πρόκειται για δομικές παραλλαγές στο DNA (ελλείμματα ή διπλασιασμοί μεγέθους από μια κιλοβάση ως μερικές μεγαβάσεις) που οδηγούν το κύτταρο σε ένα μη φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων, ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA.

Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι ένα μικρό ποσοστό εκδήλωσης σχιζοφρένειας μπορεί να εξηγηθεί από σπάνιες δομικές παραλλαγές (παραλλαγές αριθμού αντιγράφων, που προκαλούνται από μικρούς διπλασιασμούς ή ελλείμματα ή αναστροφές). Αυτές οι παραλλαγές στο γονιδίωμα είναι γενικά σπάνιες, αλλά έχουν παρατηρηθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό στον αυτισμό (Williams et al, 1996) και στη σχιζοφρένεια σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Williams et al, 2004).

Λαμβάνοντας υπ’ όψιν ότι σε σύνθετες διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια, πιθανά υπάρχει ετερογένεια σε γενετικούς τόπους αλλά και σε αλληλόμορφα ενός γονιδίου, στην επίσταση (αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων), στον πλειοτροπισμό (διαφορετικές δράσεις του ίδιου γονιδίου) και στην περιβαλλοντική τροποποίηση, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η σύνδεση της κλινικής διάγνωσης με το γονότυπο να είναι αδύναμη. Γι αυτό το λόγο, οι μελέτες σύνδεσης μέσα σε οικογένειες είναι δύσκολο να βρουν με βεβαιότητα υποψήφια γονίδια (Risch and Merikangas 1996). Ο έλεγχος των υποψηφίων γονιδίων, που βασίζεται στην κατανόηση της βιολογικής δράσης ενός λειτουργικού αλληλομόρφου του γονιδίου και στη σύνδεση αυτής της δράσης με τη βιολογία της διαταραχής, είναι ένα σημαντικό

βήμα στην αναζήτηση υποψηφίων γονιδίων για κοινές, πολυγονιδιακές ασθένειες (Altshuler et al, 2000, Weiss and Terwilliger 2000).

Το πρόβλημα της συσχέτισης γονοτύπων-φαινοτύπων περιπλέκεται περισσότερο από το γεγονός ότι τα γονίδια που φαίνεται να σχετίζονται με τις διανοητικές διαταραχές, δεν είναι συνδεδεμένα με τα διαγνωστικά χαρακτηριστικά τους. Τα γονίδια δεν κωδικοποιούν για τις ψευδαισθήσεις, τις παραληρηματικές ιδέες ή την αποδιοργανωμένη σκέψη. Τα γονίδια επηρεάζουν τη βασική βιολογία των κυττάρων και η συσχέτιση τέτοιων κυτταρικών φαινομένων με σύνθετα ψυχιατρικά φαινόμενα δεν μπορεί να είναι άμεση (Weinberger et al, 2001).

1.5.6 Επιγενετική

Ο όρος επιγενετική αναφέρεται γενικά σε κληρονομήσιμες μεταβολές στη γονιδιακή λειτουργία, που όμως δεν έχουν σχέση με αλλαγές στην ακολουθία του DNA. Συμπεριλαμβάνει πολλές έννοιες, από μηχανισμούς που οδηγούν σε φαινοτυπική έκφραση της γενετικής πληροφορίας σε ένα άτομο, μέχρι μηχανισμούς μέσω των οποίων τα κύτταρα δημιουργούν συγκεκριμένη μορφή ή λειτουργία και αυτή η δομική ή λειτουργική κατάσταση μεταφέρεται στις κυτταρικές γενιές (Jablonka and Lamb, 2002). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη διαδικασία, όπως είναι η μεθυλίωση μιας κυτοσίνης (ή γουανίνης) σε μια ακολουθία DNA, η ακετυλίωση των ιστονών και οι αναδιατάξεις της χρωματίνης (Fraga et al, 2005). Η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών είναι δυναμικές διαδικασίες που διευκολύνουν την έναρξη ή τη διακοπή της γονιδιακής μεταγραφής. Οι μεταβολές στη στερεοδιάταξη της χρωματίνης που βασίζονται στις ιστόνες και η μεθυλίωση του DNA, μπορούν να μεταβιβαστούν σαν σταθερά κληρονομήσιμα μοριακά χαρακτηριστικά. Αυτός είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει πώς, για παράδειγμα, τα ομοζυγωτικά δίδυμα δεν εκδηλώνουν και τα δύο τη σχιζοφρένεια (ή άλλες ασθένειες), παρόλη την εξαιρετικά υψηλή γενετική ομοιότητα που σχετίζεται με τη νόσο (Petronis et al, 2003). Μεγάλου ενδιαφέροντος είναι η μελέτη που ανέφερε διαφορετική μεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή της COMT (σε δύο CpG θέσεις), πράγμα που υποδεικνύει έναν άλλο πιθανό λόγο για τα μη επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα στις μελέτες συσχέτισης της COMT (Mill et al, 2006).

Κατανοώντας το ρόλο των επιγενετικών τροποποιήσεων, αποκαλύπτεται η σημασία που έχουν ως προς την προσέγγιση του νευροβιολογικού υποστρώματος αλλά και της θεραπευτικής στρατηγικής. Τα επιστημονικά ερωτήματα εστιάζουν στο γεγονός ότι συγκεκριμένοι επιγενετικοί δείκτες, όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, μπορεί να οδηγήσουν σε εκτίμηση του περιβαλλοντικού στρες ή της κληρονομικής προδιάθεσης για ψυχικές νόσους.

1.5.7 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος

Οι προσπάθειες να βρεθούν γονίδια που συνδέονται άμεσα με ψυχωτικές διαταραχές, δεν δίνουν ξεκάθαρα αποτελέσματα, ενώ κάποιες φορές είναι απογοητευτικές. Με δεδομένα τα αποτελέσματα σε άλλα ερευνητικά πεδία της Ψυχιατρικής, οι ερευνητές φαίνεται να στρέφουν την προσοχή τους στη βελτίωση της κατανόησης των πολύπλοκων μηχανισμών μέσω των οποίων το περιβάλλον αλληλεπιδρά με το γονότυπο ώστε να προκύψει η ψύχωση. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι χρήσιμη για την κατανόηση της ανάπτυξης της ψύχωσης, αφού είναι γνωστό ότι συνδέεται με περιβαλλοντικούς κινδύνους (Cannon & Clarke, 2005, van Os et al, 2005). Παρόλα αυτά, οι άνθρωποι εμφανίζουν ετερογένεια όσον αφορά την απόκρισή τους στους κινδύνους αυτούς.

Οι πρόσφατες μελέτες στην ψυχιατρική προτείνουν ότι τα γονίδια επηρεάζουν τη νόσο έμμεσα, μέσω της επίδρασής τους σε φυσιολογικά μονοπάτια και αυξάνουν ή μειώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης μιας ψυχιατρικής διαταραχής, αλλά δεν αποτελούν την αιτία της ασθένειας.

Εφόσον οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν (Gene x Environment, GXE), οι διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο μπορούν να εξηγήσουν την διαφορετική απόκριση κάθε ανθρώπου στο ίδιο περιβάλλον. Η μεγαλύτερη απόδειξη για την αλληλεπίδραση GXE στην ψύχωση, έρχεται από μελέτες διδύμων και υιοθετημένων παιδιών. Οι μελέτες αυτές, έχουν δείξει μέτρια προς υψηλή κληρονομικότητα για τη σχιζοφρένεια, αλλά ακόμη και τα μονοζυγωτικά δίδυμα δείχνουν μόνο 50% συμφωνία, υπογραμμίζοντας έτσι τη σημασία των περιβαλλοντικών επιρροών. Συνεπώς, είναι πιο πιθανό το γενετικό υπόβαθρο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες να δρουν συνεργιστικά ώστε να παραχθούν τα ψυχωτικά συμπτώματα και η διαταραχή (van Os & Sham, 2003). Ευρήματα από διάφορες μελέτες υιοθεσίας συμφωνούν με την αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος στην ανάπτυξη ψυχωτικών διαταραχών. Για παράδειγμα, οι Carter et al.

(2002), σε μια μακροχρόνια μελέτη 25 ετών, σύγκρινε 212 παιδιά από σχιζοφρενείς μητέρες με 99 παιδιά από φυσιολογικούς γονείς, μελετώντας έτσι την έκθεση στον περιβαλλοντικό κίνδυνο. Ελάχιστες περιπτώσεις ψύχωσης καταγράφηκαν στις οικογένειες χωρίς ιστορικό σχιζοφρένειας, αλλά ισχυρή περιβαλλοντική επίδραση παρατηρήθηκε ανάμεσα στα παιδιά με οικογενειακό ιστορικό.

1.5.8 Πρωτεωμικές μελέτες

Με τον όρο Πρωτεωμική, αναφερόμαστε στη μελέτη της συνολικής γονιδιακής έκφρασης ενός οργάνου, σωματικού συστήματος, υγρού ή κυτταρικού διαμερίσματος, σε επίπεδο πρωτεϊνών. Τα πρωτεωμικά ευρήματα είναι αντιπροσωπευτικά των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος και η σημασία τους στη μελέτη της σχιζοφρένειας εκτιμάται όλο και περισσότερο. Η κλινική νευροπρωτεωμική, είναι το τμήμα της πρωτεωμικής που ερευνά την ύπαρξη βιοδεικτών σχετικών με τις διαταραχές ή την απόκριση στα φάρμακα, οι οποίοι θα βοηθήσουν στην ενίσχυση των γνώσεων γύρω από την παθοφυσιολογία των διαταραχών του εγκεφάλου (English et al, 2011).

Το πρωτέωμα των σχιζοφρενών, έχει επίσης εξετασθεί για την πιθανή ύπαρξη βιοδεικτών μέσα σε αυτό, εστιάζοντας σε κλινικά προσβάσιμα δείγματα ιστών, όπως είναι ο ορός του αίματος και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) (Schwarz et al, 2008; English et al, 2011). Οι μελέτες δείχνουν επαναληψιμότητα και πολλές φορές επιβεβαιώνουν τα υπάρχοντα γενετικά ευρήματα (English et al, 2011). Μεταβολές πρωτεϊνών που παρουσιάζουν κάποιο ρόλο στην μεταβολική λειτουργία, ειδικά στη γλυκόλυση (ENO1, ENO2, ALDOC, PGAM1, TPI1 και LDHB) και στον κυτταροσκελετό (INA, NEFL, SEPT3), είναι συνδεδεμένες με τη σχιζοφρένεια (Levin et al, 2010; Martins-de-Souza et al, 2010; Martins-de-Souza et al, 2009; Johnston-Wilson et al, 2000; English et al, 2009). Η SEPT3 έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού το γονίδιό της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22q, που αποτελεί πιθανό γενετικό τόπο υπεύθυνο για την εκδήλωση σχιζοφρένειας (English et al, 2011).

1.6 Σχιζοφρένεια και COMT

Τα επίπεδα της ντοπαμίνης, όπως ήδη έχει περιγραφεί, ελέγχονται από διάφορους μηχανισμούς, ένας από τους οποίους είναι ο καταβολισμός της από το ένζυμο κατεχολ-ο-

μεθυλτρανσφεράση (COMT). Ο μεταβολισμός των κατεχολαμινών εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών διαταραχών του ΚΝΣ. Το γονίδιο της COMT είναι ένα από τα βασικά γονίδια που εξετάζονται για την πιθανή εμπλοκή τους στη σχιζοφρένεια, όχι μόνο γιατί είναι ένζυμο-κλειδί στον καταβολισμό της ντοπαμίνης, αλλά και γιατί βρίσκεται στην περιοχή του χρωμοσώματος 22q11 (χρωμοσωμική περιοχή 22q11.1- 11.2, εξώνιο 4) που είναι υπεύθυνη για το βελοκαρδιοπροσωπικό σύνδρομο, που από καιρό είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με προδιάθεση για σχιζοφρένεια (Handoko et al, 2005).

Το γονίδιο της COMT κωδικοποιεί δύο τουλάχιστον πρωτεϊνικές ισομορφές που δημιουργούνται από διαφορετικά κωδικόνια έναρξης: την συνδεδεμένη με τη μεμβράνη COMT (MB-COMT) και την διαλυτή COMT (S-COMT), που διαφέρουν ως προς τη συγγένεια για διαφορετικές κατεχόλες. Σε αντίθεση με την κυριαρχία της διαλυτής μορφής στους περισσότερους περιφερικούς ιστούς, η συνδεδεμένη στη μεμβράνη COMT είναι η πιο άφθονη ισομορφή στον εγκέφαλο, αφού διαθέτει μεγάλη συγγένεια με τις κατεχολαμίνες. Η συσχέτιση της COMT με τη ρύθμιση της εγκεφαλικής λειτουργίας και την εμπλοκή της στην εμφάνιση ψυχικών διαταραχών, προκύπτει κυρίως από τον ρόλο της στη ρύθμιση της ντοπαμίνης στο φλοιό (Tunbridge et al, 2004a; Yavich et al, 2007).

Το γονίδιο της COMT περιέχει διάφορους πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs, single nucleotide polymorphisms), γνωστής ή πιθανολογούμενης λειτουργικής σημασίας. Ο πιο γνωστός από τους πολυμορφισμούς αυτούς, είναι ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs4680, μια 472 G/A αντικατάσταση στο κωδικόνιο 158 της MB-COMT (108 κωδικόνιο της S-COMT), που οδηγεί σε κωδικοποίηση βαλίνης (Val) ή μεθειονίνης (Met) αντίστοιχα και ο οποίος αναφέρεται ως Val158Met. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός επηρεάζει τη θερμοσταθερότητα της COMT. Έτσι, στους 37° C, η Val μορφή είναι πιο σταθερή και συνεπώς περισσότερο ενεργή από ότι η Met. Στον προμετωπιαίο φλοιό, αυτή η αντικατάσταση οδηγεί σε περίπου 40% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στους Met/Met ομοζυγώτες σε σχέση με τους Val/Val ομοζυγώτες. Οι ετεροζυγώτες Val/Met εμφανίζουν ενδιάμεση ενζυμική δραστηριότητα της COMT (Chen et al, 2004), αφού πρόκειται για συνεπικρατή αλληλόμορφα. Συνεπώς, το περισσότερο σταθερό Val αλληλόμορφο, συνδέεται με μεγαλύτερη αποικοδόμηση της ντοπαμίνης και κατά συνέπεια λιγότερη ντοπαμίνη στις συνάψεις, ενώ η Met μορφή της COMT, που είναι λιγότερο δραστική σε φυσιολογική θερμοκρασία (Lotta et al, 1995), οδηγεί σε λιγότερο

αποτελεσματικό καταβολισμό της ντοπαμίνης (Lachman et al, 1996; Weinshilboum et al, 1999). Υποστηρίζεται ότι η υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου οδηγεί σε υποντοπαμινεργική λειτουργία, ενώ η χαμηλή δραστηριότητα έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Δεδομένης της απουσίας αυτούποδοχέων στο μεσοφλοιώδες ντοπαμινεργικό σύστημα, όπως ήδη αναφέρθηκε (πίνακας 1) είναι αντιληπτό ότι το εξωκυττάριο ενζυμικό αποικοδομητικό σύστημα της ντοπαμίνης στο μετωπιαίο φλοιό αποκτά ιδιαίτερη σημασία λόγω της εμπλοκής της συγκεκριμένης εγκεφαλικής περιοχής σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες. Η δυσλειτουργία στην ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση στον μετωπιαίο φλοιό, αποκτά όπως ήδη αναφέρθηκε ιδιαίτερη σημασία για το νευροβιολογικό υπόστρωμα και την ψυχοπαθολογία της σχιζοφρένειας. Στον εγκέφαλο, ο ρόλος της COMT περιορίζεται κυρίως στον προμετωπιαίο φλοιό, όπως φαίνεται από διάφορες φαρμακολογικές μελέτες (Tunbridge et al, 2004), συγκριτικές μελέτες περιοχών του εγκεφάλου σε knock out ποντίκια (Okuyama et al, 2000) και σε μετρήσεις του επιπέδου της έκφρασης του mRNA σε μεταθανάτιους ανθρώπινους εγκεφάλους (Matsumoto et al, 2003). Στην περιοχή αυτή, η COMT διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της ντοπαμίνης (Meyer-Linderberg and Winberger 2006; Weinberger et al, 2001; Tunbridge et al, 2004), καθώς οι υπόλοιποι ρυθμιστές της συναπτικής ντοπαμίνης (όπως οι αυτούποδοχείς και οι μεταφορείς της ντοπαμίνης) συναντώνται σπάνια στις συνάψεις του προμετωπιαίου φλοιού. Η εμφανώς επιλεκτική δράση της COMT στη ρύθμιση της ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, δεν οφείλεται όπως ήδη συζητήθηκε στην περιορισμένη κατανομή του ενζύμου, αφού εκφράζεται ευρύτατα στον εγκέφαλο, σε μη ντοπαμινεργικούς νευρώνες και στη γλοία.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε οικογένειες, έχουν δείξει ότι το υψηλής δραστηριότητας αλληλόμορφο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, κληρονομείται σε μεγαλύτερο βαθμό από τους σχιζοφρενείς απογόνους (Li et al, 1996, 2000, Kunugi et al, 1997, Egan et al, 2001), ενώ άλλες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι δεν υπάρχει τέτοιος συσχετισμός (Strous et al, 1997, Karayiorgou et al, 1998, Wei and Hemmings, 1999). Το Met αλληλόμορφο του γονιδίου της COMT φαίνεται να υπάρχει αποκλειστικά στον άνθρωπο, καθώς αντίστοιχος πολυμορφισμός δεν έχει βρεθεί σε κανένα άλλο είδος που έχει μελετηθεί (Palmatier et al, 1999). Από το γεγονός αυτό, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της COMT έχει μειωθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Chen et al, 2004; Palmatier et al, 1999). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ευεργετικό αποτέλεσμα που έχει η χαμηλή δραστηριότητα της COMT στη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού (Chen et al, 2004).

Πάντως, αξίζει να αναφερθεί ότι η συχνότητα των αλληλομόρφων του γονιδίου της COMT, εξαρτάται από την εθνικότητα και μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφόρων λαών (Palmatier et al, 1999).

Διάφορες μελέτες, έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου καθορίζεται από δομικές αλλαγές στη νουκλεοτιδική ακολουθία του αντίστοιχου γονιδίου. Η επίδραση του Val158Met πολυμορφικού δείκτη στη λειτουργική δραστηριότητα της πρωτεΐνης και η διάδοσή του μέσα στον πληθυσμό, οδήγησαν σε εκτεταμένη έρευνα προκειμένου να βρεθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ αυτών των αλληλομόρφων, των γονοτύπων που προκύπτουν και διαφόρων ψυχολογικών και ψυχοπαθολογικών χαρακτηριστικών στους ανθρώπους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές μελέτες, ο πολυμορφισμός Val158Met έχει συνδεθεί με διάφορα χαρακτηριστικά προσωπικότητας, όπως η συμπεριφορά αποφυγής κινδύνου (harm avoidance) (Enoch et al, 2003), η επιθετικότητα (aggressiveness) (Rujescu et al, 2003) και ο νευρωτισμός (neuroticism) (Eley et al, 2003), αν και κάποιες άλλες μελέτες δεν έχουν βρει κάποια συσχέτιση με το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (Henderson et al, 2000).

Ένας σημαντικός αριθμός ερευνών, έχει επισημάνει την επίδραση του γονιδίου της COMT στις γνωστικού τύπου λειτουργίες, τόσο σε πνευματικά υγιείς ανθρώπους, όσο και σε ασθενείς με διάφορες νοητικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας. Συγκεκριμένα, πολλές μελέτες έχουν συνδέσει τον πολυμορφισμό Val158Met με τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες και ειδικότερα με τη λειτουργική μνήμη που συνδέεται με τη ντοπαμινεργική λειτουργία στον πλαγιοπίσθιο προμετωπιαίο φλοιό (Aguilera et al, 2008; Bruder et al, 2005; Diaz-Asper et al, 2008; Egan et al, 2001; Mattay et al, 2003). Οι περισσότερες δημοσιεύσεις καταλήγουν στην άποψη ότι οι φορείς του Met αλληλομόρφου, έχουν καλύτερη επίδοση στις γνωστικού τύπου λειτουργίες που αφορούν στην προσοχή και τον έλεγχο, από ότι οι Val/Val ομοζυγώτες (Malhotra et al, 2002; Weinberger et al, 2001). Μια εξήγηση για αυτό το γεγονός και σε συνέπεια με όσα ήδη αναφέρθηκαν, είναι η άποψη που συσχετίζει την παρουσία του Val/Val γονοτύπου με τα μειωμένα επίπεδα της ντοπαμίνης στην προμετωπιαία περιοχή του εγκεφάλου.

Τα χαμηλά επίπεδα ντοπαμίνης στις πρόσθιες περιοχές του φλοιού μπορεί να θεωρηθούν ως μια από τις δυσλειτουργίες που σχετίζονται με την εμφάνιση της σχιζοφρένειας και ικανοποιητικός αριθμός μελετών έχει στοχεύσει στη συσχέτιση του Val αλληλόμορφου με τη διαταραχή (Herken et al, 2001; Shifman et al, 2002). Επιπλέον μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σχιζοφρενείς και διερεύνησαν τη συσχέτιση συχνότητας εμφάνισης γονοτύπων και ψυχοπαθολογίας, έδειξαν ότι οι φορείς του Met αλληλομόρφου παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές σε ερωτηματολόγια που αξιολογούν τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωστικού τύπου ελλείμματα (Bertolino et al, 2004, 2007).

Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς που εκδήλωσαν πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, οι ομοζυγώτες για το Val αλληλόμορφο είχαν υψηλότερες τιμές στα αρνητικά συμπτώματα, καθώς και μικρότερη ηλικία έναρξης της ψύχωσης (Pelayo-Teran et al, 2008). Οι φορείς του Met αλληλομόρφου, εμφάνισαν μεγαλύτερο όγκο πλάγιων κοιλιών, κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε σχιζοφρενείς, εκτός από ασθενείς πρώτου επεισοδίου ((Shenton et al, 2001; Vita et al, 2006). Η ηλικία έναρξης της ψύχωσης έχει επίσης βρεθεί να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό. Συγκεκριμένα, στους Val/Val ομοζυγώτες παρατηρήθηκε μικρότερη ηλικία έναρξης σε σχέση με τους Met φορείς (Pelayo-Teran et al, 2008). Ο Val/Met πολυμορφισμός, έχει τέλος βρεθεί να αλληλεπιδρά με την χρήση της κάνναβης και να επηρεάζουν την ηλικία έναρξης της ψύχωσης και την έκβασή της (Veen et al, 2004; Pelayo Teran et al, 2010).

Όσον αφορά την απόκριση στη φαρμακευτική αγωγή, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά. Έτσι, κάποιοι ερευνητές αναφέρουν συσχέτιση του πολυμορφισμού με την απόκριση στην φαρμακευτική αγωγή (Illi et al, 2003) ενώ μια άλλη ομάδα ερευνητών οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι οι φορείς του Met αλληλομόρφου είχαν καλύτερη απόκριση όσον αφορά τη συμπτωματολογία των αρνητικών συμπτωμάτων στις 8 εβδομάδες φαρμακοθεραπείας, χωρίς όμως η σοβαρότητα της ψυχοπαθολογίας στο ίδιο χρονικό διάστημα να συνδέεται με τον πολυμορφισμό (Bertolino et al, 2004, 2007). Άλλοι ερευνητές όμως, δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης στην αντιψυχωτική θεραπεία και του πολυμορφισμού Val158Met, είτε σε χρόνιους ασθενείς (Inada et al, 2003), είτε σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου (Pelayo-Teran, 2011).

1.7 Σχιζοφρένεια και MAOB

Η μονοαμινοξειδάση, MAO, όπως ήδη αναφέρθηκε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της ντοπαμίνης. Οι δύο βιοχημικά διακριτές μορφές του ενζύμου (MAOA και MAOB) εντοπίζονται στους νευρώνες και την αστρογλοία, ενώ εκτός του ΚΝΣ, η MAOA βρίσκεται στο ήπαρ, στη γαστρεντερική οδό και στον πλακούντα και η MAOB εντοπίζεται κυρίως στα αιμοπετάλια (Shih et al, 2004). Οι δύο μορφές διαφέρουν στα υποστρώματα και στους αναστολείς τους και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, που βρίσκονται στις περιοχές Xp11.23-11.4 του X χρωμοσώματος και περιλαμβάνουν και τα δύο 15 εξώνια (Grimsby J et al, 1991). Στην περιοχή Xp11 έχουν εντοπιστεί διάφοροι δείκτες που μπορεί να σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια (Dann et al, 1997, Williams, 1999). Το γεγονός ότι η MAO βρίσκεται στο X χρωμόσωμα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις γονοτυπικές αναλύσεις, καθώς τα αρσενικά διαθέτουν ένα X και ένα Y φυλετικό χρωμόσωμα, ενώ τα θηλυκά 2 X φυλετικά χρωμοσώματα.

Παρόλο που η MAOA και η MAOB εμφανίζουν διαφορές τόσο στα μεταβολικά τους υποστρώματα όσο και στους αναστολείς τους, και τα δύο ένζυμα συμβάλλουν στην απαμίνωση της ντοπαμίνης με την MAOB να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα δραστηριότητας της MAO, εμφανίζουν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ανθρώπων. Μεταξύ υγιών ατόμων, έχουν παρατηρηθεί μέχρι και τριακονταπλάσιες διαφορές στα επίπεδα βασικής δραστηριότητας της MAOB των αιμοπεταλίων (Murphy et al, 1976). Επίσης, μέχρι και εκατονταπλάσιες διαφορές αναφέρθηκαν στη δραστηριότητα της MAOA σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος (Castro Costa et al, 1980). Έχει προταθεί ότι η διακύμανση στα επίπεδα δραστηριότητας της MAO καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες (Hotamisligil and Breakefield 1991; Pedersen et al, 1993), αλλά οι γνώσεις μας σχετικά με τη ρύθμιση της δραστηριότητας της MAO στον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι ακόμη περιορισμένες.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις μονοαμινοξειδάσες A και B (MAOA και MAOB) έχουν χαρακτηριστεί υποψήφια γονίδια για τις νευροψυχιατρικές διαταραχές και τα χαρακτηριστικά προσωπικότητας (Shih and Thompson, 1999). Προκειμένου να εκτιμηθεί αν οι DNA πολυμορφισμοί έχουν λειτουργικό ρόλο στη δραστηριότητα της MAO στους ανθρώπους, είναι σημαντικό να ερευνηθεί αν η παρουσία διαφορετικών αλληλομόρφων

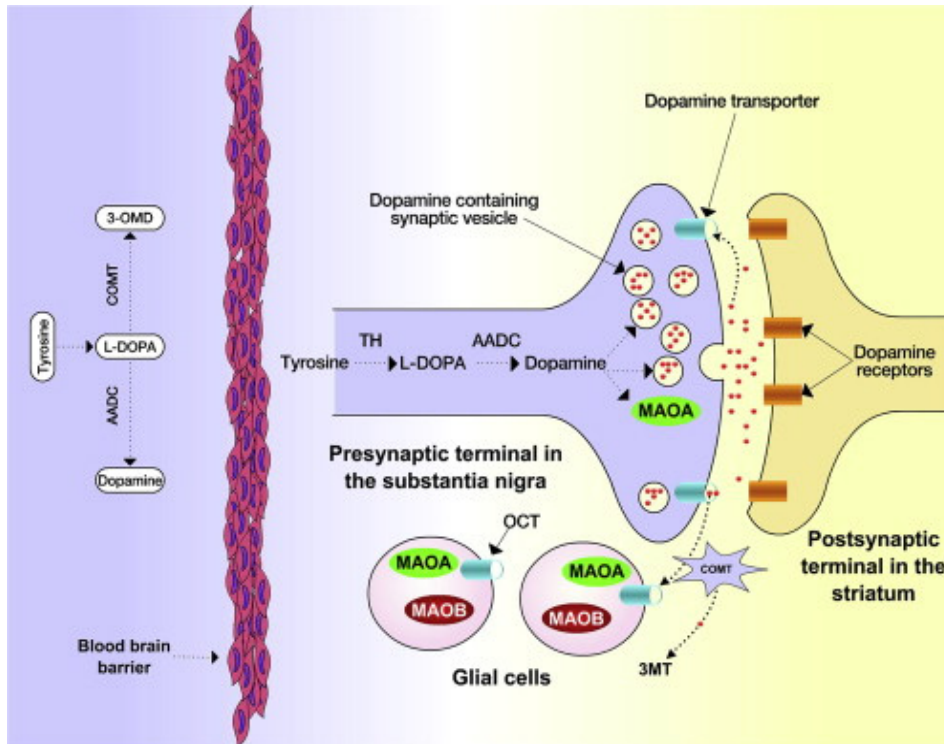
τροποποιεί την έκφραση και/ή τη δραστικότητα αυτών των ενζύμων στον ανθρώπινο εγκέφαλο.

Η MAOB εντοπίζεται κυρίως ενδοκυττάρια και γι' αυτό θεωρείται δείκτης σε υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου. Αυξημένη δραστικότητα της MAOB σημαίνει ότι αποικοδομεί περισσότερη DA, ενώ μειωμένη δραστικότητα της MAOB συνεπάγεται αύξηση της DA στις υποφλοιώδεις περιοχές. Η δραστικότητα του ενζύμου αυτού διαφέρει τόσο στις διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, όσο και στα διαφορετικά είδη οργανισμών.

Η μελέτη ενός πολυμορφισμού της MAOB υπομορφής, αποτελεί αντικείμενο μελέτης γιατί η MAOB εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τη ντοπαμίνη και σύμφωνα με τη ντοπαμινεργική θεωρία για την νευροβιολογία της σχιζοφρένειας, χαμηλότερη δραστικότητα του ενζύμου θα οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης, ειδικότερα στις υποφλοιώδεις περιοχές και άρα θα αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της διαταραχής ((Winterer and Weinberger, 2004; Iversen and Iversen, 2007; Wyatt RJ, 1973, Gassó P, 2008). Ο πιο κοινός πολυμορφισμός της MAOB είναι η αλλαγή μιας βάσης. Η αντικατάσταση αυτή, είναι της αδερίνης με γουανίνη (A644G) στο εσόνιο 13 (rs1799836) (Kurth JH et al, 1993). Παρόλο που αυτή η A→G αντικατάσταση δεν αλλάζει την πρωτεϊνική ακολουθία, συνδέεται με αλλαγή στην ενζυμική δραστικότητα. In vitro, το G αλληλόμορφο συνδέεται με υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα (Costa-Mallen P et al, 2005). In vivo, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα στα αιμοπετάλια. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο όμως, το G αλληλόμορφο σχετίζεται με χαμηλότερη δραστικότητα του ενζύμου (Balciuniene J, 2002). Έτσι, ομοζυγώτες για το χαμηλής δραστικότητας G αλληλόμορφο (G/G) θα έχουν χαμηλή δραστικότητα του ενζύμου MAOB και επομένως αναμένονται αυξημένα επίπεδα ντοπαμίνης σε αντίθεση με τους ομοζυγώτες για το A/A, που εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα για τη MAOB.

Περιορισμένες είναι οι μελέτες που συσχετίζουν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό με τη σχιζοφρένεια, ενώ απουσιάζουν οι μελέτες εκείνες που εστάζουν στο πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο. Μια μελέτη σύγκρισης υγιών-ασθενών από τους Gassó et al. (2008), δείχνει ότι το G αλληλόμορφο εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους ασθενείς, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης, όταν έγινε ανάλυση σε κάθε φύλο χωριστά, το G αλληλόμορφο βρέθηκε να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της σχιζοφρένειας μόνο στις γυναίκες. Μάλιστα, υψηλότερο κίνδυνο εμφάνιζαν οι γυναίκες που ήταν ομόζυγες ως προς το αλληλόμορφο αυτό (G/G).

Η πολυπλοκότητα της έρευνας γονιδίων που εντοπίζονται στο X χρωμόσωμα, αλλά και η δυσκολία της ένταξης ασθενών με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο σε αντίστοιχες μελέτες, πιθανώς αποτελούν τους κύριους παράγοντες για την έλλειψη πληροφορίας στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.



Εικόνα 14. Σύνθεση και μεταβολισμός της ντοπαμίνης. 3-OMD, 3-Ο-μεθυλντόπα, 3MT, 3μεθοξυτυραμίνη, AADC, αποκαρβοξυλάση του αρωματικού L-αμινοξέος, COMT, κατεχολ-ο-μεθυλτρανσφεράση, L-DOPA: λεβοντόπα, TH, υδροξυλάση της τυροσίνης (Youdim et al, 2006).

1.8. Σχιζοφρένεια και 5-HTTLPR

Ο μεταφορέας της σεροτονίνης (5-HTT), όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ο κύριος παράγοντας απενεργοποίησης της σεροτονίνης που ακολουθεί την απελευθέρωσή της στις συνάψεις και αποτελεί το σημείο δράσης των νεότερων αντικαταθλιπτικών, όπως είναι οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης.

Έχει αναφερθεί εκτεταμένα μια σεροτονινεργική δυσλειτουργία στην μείζονα κατάθλιψη που αφορά στον μεταφορέα της 5-HT (5-HTT) (Owens and Nemeroff, 1994). Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης, που

αποτελούν τον κύριο στόχο στη φαρμακολογική θεραπεία της κατάθλιψης, συνδέονται στο μεταφορέα της σεροτονίνης (Ginovart et al, 2003). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταφορέα της σεροτονίνης έχει κλωνοποιηθεί, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q11.2 (Ramamoorthy et al., 1993; Lesch et al, 1994) και δύο κοινοί πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί: ένας ποικίλος αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων (variable number tandem repeat, VNTR) που βρίσκεται στο εσώνιο 2 (5-HTT VNTR) (Lesch et al, 1994) και ένα έλλειμμα/ένθεση 44 ζευγών βάσεων στην περιοχή ελέγχου μεταγραφής, περίπου 1 κιλοβάση ανοδικά του σημείου έναρξης μεταγραφής (5-HTT-linked polymorphic region, 5-HTTLPR) (Heils et al, 1996). Αρχικά προτάθηκε ότι ο πολυμορφισμός του υποκινητή μπορεί να επηρεάζει τη μεταγραφή καθώς και τη λειτουργία του μεταφορέα της σεροτονίνης. In vivo μελέτες έδειξαν ότι η βραχεία μορφή (short, 's' αλληλόμορφο) σχετίζεται με χαμηλή βασική και επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου του μεταφορέα της σεροτονίνης, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλότερη επαναπρόσληψη σεροτονίνης σε σύγκριση με τη μακρά μορφή (long, 'l' αλληλόμορφο) (Collier et al, 1996; Greenberg et al, 1999; Heils et al, 1996, 1997; Little et al, 1998). Συγκεκριμένα οι Heils et al. (1996), βρήκαν ότι η βασική δραστηριότητα του l αλληλομόρφου ήταν πάνω από διπλάσια από αυτή του s, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μεταγραφή του γονιδίου του μεταφορέα της σεροτονίνης, ρυθμίζεται από τα διαφορετικά αλληλόμορφα του 5-HTTLPR. Ο γονότυπος l/l οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα λειτουργίας και έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης από ότι οι γονότυποι s/l και s/s που δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Τόσο in vivo όσο και in vitro, το s αλληλόμορφο οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή και έκφραση.

Σε μελέτη στην οποία συνδυάστηκαν οι διαφορετικοί γονότυποι του 5-HTTLPR και μεταβλητές συμπεριφοράς (Lesch et al, 1996), αναφέρθηκε ότι τα άτομα με ένα ή δύο s αλληλόμορφα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα νευρωτισμού, που εκφράζονται σαν αυξημένα επίπεδα άγχους, εχθρικότητας και κατάθλιψης σε σχέση με τους ομοζυγώτες για τον l γονότυπο. Επίσης οι ασθενείς εμφάνισαν υψηλά επίπεδα συμπεριφορά άγνοιας κινδύνου στο τρισδιάστατο ερωτηματολόγιο προσωπικότητας (Cloninger et al, 1991). Επόμενες ερευνητικές προσπάθειες, κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα (Mazzanti et al., 1998; Greenberg et al, 2000), ενώ άλλες βρήκαν διαφορετικά αποτελέσματα (Ebstein et al, 1997, Jorm et al, 1998; Flory et al, 1999). Στη συνέχεια, έρευνες εξέτασαν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των 5-HTTLPR αλληλομόρφων και διαφόρων νευροψυχιατρικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των: συναισθηματικού τύπου διαταραχή (Collier et al,

1996; Bellivier et al, 1997; Rees et al, 1997), διαταραχής πανικού (Collier et al, 1996; Bellivier et al, 1997; Rees et al, 1997), διαταραχής πανικού συνδυασμένης με διπολική διαταραχή (Rotondo et al, 2002), αυτισμού (Cook et al, 1997), καταναγκαστικής διαταραχής (Mc Dougle et al, 1998), σχιζοφρένειας (Malhotra et al, 1998), αλκοολισμού (Sander et al, 1997) και τέλος της νόσου Alzheimer (Li et al, 1997; Oliveira et al, 1998).

Οι ασθενείς με σχιζοφρένεια, παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στην απόκριση στη φαρμακευτική θεραπεία, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορα γονίδια που σχετίζονται με τους νευροδιαβιβαστές.

Γενετικές διαφορές στον 5-HTTLPR πολυμορφισμό, βρέθηκαν να σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια (Mata et al, 2004), καθώς και με την απόκριση σε αντιψυχωτικά φάρμακα (Arranz et al, 2000; Wang et al, 2007; Bozina et al, 2007; Dolzan et al, 2008). Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι οι φορείς του 1 αλληλομόρφου είχαν καλή απόκριση στην αντιψυχωτική θεραπεία.

Σε μια πιο πρόσφατη δημοσίευση, οι Vazquez-Bourgon et al. (2010), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ετεροζυγώτες (s/l) για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR, έχουν καλύτερη απόκριση στην αντιψυχωτική θεραπεία, ειδικά με ολανζαπίνη, όσον αφορά τα αρνητικά συμπτώματα. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς εκδήλωναν το πρώτο ψυχωτικό τους επεισόδιο και δεν είχαν λάβει άλλη φορά φαρμακευτική αγωγή.

1.9 Σχιζοφρένεια και BDNF

Όπως ήδη έχει αναφερθεί αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην εμπλοκή του BDNF στη παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (Buckley et al, 2011; Pillai, 2008). Ειδικότερα, μειωμένα επίπεδα ορού έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (που δεν λαμβάνουν αντιψυχωτική θεραπεία) σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (Green et al, 2011). Μειωμένες συγκεντρώσεις ορού BDNF βρέθηκαν επίσης σε ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου που δεν είχαν λάβει κανένα φάρμακο (Buckley et al, 2007a; Chen et al, 2009; Jindal et al, 2010; Pillai et al, 2010; Rizos et al, 2008). Πάντως η συσχέτιση μεταξύ επιπέδων ορού του BDNF και ψυχωτικής συμπτωματολογίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις στον ορό του BDNF, έχουν επίσης συνδεθεί με χαρακτηριστικά προσωπικότητας όπως η νεύρωση. Συγκεκριμένα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του ορού μπορούν να αποτελέσουν ένα βιοδείκτη που αντιστοιχεί σε μια προσωπικότητα ευάλωτη σε ψυχικές νόσους (Lang et al, 2004, 2005; Minelli et al, 2011;

Terracciano et al, 2010). Ενδιαφέροντα ευρήματα τα οποία συνδέονται με τα παραπάνω, αφορούν στους ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου που διέφεραν από μια ομάδα μαρτύρων ως προς το νευρωτισμό (neuroticism) (Beauchamp et al, 2006), ενώ οι ασθενείς που υποτροπίασαν είχαν υψηλότερες τιμές στο νευρωτισμό από ότι εκείνοι στους οποίους παρατηρήθηκε ύφεση της νόσου (Gleeson et al, 2005).

Οι γενετικές μελέτες επίσης αναφέρουν ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του BDNF, κυρίως ο κοινός πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου G196A (rs6265), που οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος στο κωδικεύον εξώνιο το γονιδίου του BDNF στη θέση 66 (Val66Met), μπορεί επίσης να συμβάλλει στην παθογένεση της σχιζοφρένειας, την έκφραση των ψυχοπαθολογικών συμπτωμάτων και την απόκριση στη θεραπεία (Krebs et al, 2000; Muglia et al, 2003; Nanko et al, 2003; Rosa et al, 2006; Whalley et al, 2010). Ασθενείς φορείς του Met αλληλομόρφου, εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση στον όγκο της φαιάς ουσίας στο μετωπιαίο φλοιό, με αντίστοιχη αύξηση του όγκου των πλάγιων κοιλιών, σε σύγκριση με τους Val/Val ομοζυγώτες (Ho et al, 2006; Wassink et al, 1999; Szeszko et al, 2005). Επίσης, σε μελέτες συσχέτισης μεταξύ σχιζοφρενών και υγιών εθελοντών, αναφέρθηκε ότι οι φορείς του Met αλληλομόρφου είχαν μικρότερο ιππόκαμπο σε σχέση με τους Val/Val ομοζυγώτες (Szeszko et al, 2005; Takahashi et al, 2008). Μια μετα-ανάλυση που συνδύασε δεδομένα από 11 δημοσιευμένες μελέτες ασθενών-υγιών (6217 άτομα συνολικά), κατέληξε επίσης σε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της σχιζοφρένειας, επισημαίνοντας όμως και την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες (Jonsson et al, 2006).

Παρόλο που τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο BDNF σχετίζεται με την έναρξη της σχιζοφρένειας, τη συμπτωματολογία της και τα χαρακτηριστικά της προσωπικότητας, δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη μελέτες που να συνδυάζουν μεταβολές στις συγκεντρώσεις του ορού του BDNF με τον Val66Met πολυμορφισμό και τα χαρακτηριστικά προσωπικότητας σε ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου και μάρτυρες.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη των πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή ένζυμα του ντοπαμινεργικού και σεροτονινεργικού συστήματος ή νευροτροφικούς παράγοντες και η συσχέτισή τους με τη σχιζοφρένεια, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει απασχολήσει εκτενώς τη διεθνή βιβλιογραφία.

Για αρκετές από αυτές τις προσεγγίσεις, τα δεδομένα σχετικά με το πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο είναι ιδιαίτερα ελλιπή ή απουσιάζουν εντελώς. Παρουσιάζει λοιπόν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο η προσπάθεια για την γενετική αποτύπωση του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου σε σχιζοφρενείς ασθενείς, όσο και η συσχέτιση των πιθανών διαφορών σε επίπεδο πολυμορφισμών με την ψυχοπαθολογία των ασθενών. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανίχνευση των διαφορών μεταξύ υγιών και ασθενών ως προς τη συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ντοπαμινεργική-σεροτονεργική λειτουργία και το BDNF και στην αναζήτηση δεικτών που μπορεί να αναδείξουν πιθανότητες στατιστικά σημαντικές για να την ανάπτυξη της ψύχωσης.

Ειδικότερα οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

1. Να εστιάσει στις πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών σχετικά με τους πολυμορφισμούς Val158Met της COMT και A644G της MAOB υπομορφής (ντοπαμινεργικοί δείκτες).
2. Να εστιάσει στις πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών σχετικά με τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR του μεταφορέα της σεροτονίνης 5-HTT (σεροτονινεργικός δείκτης).
3. Να εστιάσει στις πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών σχετικά με τον πολυμορφισμό Val66Met του BDNF (νευροτροφίνη). Επίσης να ελέγξει πιθανές διαφορές στα επίπεδα στον ορό του BDNF.
4. Να ερευνήσει αν υπάρχουν διαφορές στην ψυχοπαθολογία των ασθενών που να συνδέονται με τους διαφορετικούς γονοτύπους που εμφανίζονται σε κάθε έναν από τους παραπάνω πολυμορφισμούς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Κλινικό δείγμα

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα Ιωάννινα, μια πόλη της Δυτικής Ελλάδας με πληθυσμό περίπου 120.000 κατοίκους. Το 2007, συστάθηκε μια εξειδικευμένη υπηρεσία έγκαιρης παρέμβασης για την ψύχωση, στην Ψυχιατρική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με στόχο την εκτίμηση και τη θεραπεία των ασθενών με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο. Το δείγμα μας περιλάμβανε 67 Έλληνες ασθενείς με πρώτο επεισόδιο, στους οποίους διαγνώσθηκε σχιζοφρένεια.

Τα κριτήρια εξαίρεσης ήταν: έλλειψη ικανότητας του ασθενούς να γράφει και να διαβάζει Ελληνικά, προηγούμενη διάγνωση πνευματικής υστέρησης, οργανικής προέλευσης εγκεφαλική διαταραχή ή νευρολογική νόσος και ιστορικό άνοιας. Οι ασθενείς πρώτου επεισοδίου που εντάσσονται στην έρευνα δεν είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη αντιψυχωτική θεραπεία. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά την άφιξη του πάσχοντος στο νοσοκομείο και πριν από τη χορήγηση οποιουδήποτε φαρμάκου.

Η δεύτερη ομάδα που περιλάμβανε 76 υγιείς εθελοντές, χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Η ομάδα των υγιών συμμετεχόντων προήλθε από ένα δείγμα 423 ατόμων από το προσωπικό του νοσοκομείου που είχαν συμμετάσχει παλιότερα σε μελέτη για την στάθμιση του ερωτηματολογίου που αφορά στη μελέτη του Αμυντικού Προφίλ με βάση τους Μηχανισμούς Άμυνας του Εγώ (Defense Style Questionnaire) στον ελληνικό πληθυσμό (Hyphantis 2010). Οι 91 από τους 423 συμμετέχοντες παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα ψυχικής καταπόνησης, υψηλότερα του ορίου που έχει τεθεί για τον Ελληνικό πληθυσμό, όπως εκτιμώνται από το ερωτηματολόγιο γενικής υγείας που τους χορηγήθηκε (GHQ-28) (Garyfalos et al, 1991; Goldberg and Hillier, 1979). Η ομάδα αυτή εξαιρέθηκε κατά τη διαδικασία επιλογής. Συνεπώς, για κάθε ασθενή επιλέχθηκε ένας μάρτυρας που αντιστοιχούσε στον ασθενή ως προς το φύλο και την ηλικία, από τους υπόλοιπους 332 συμμετέχοντες. Συγκεκριμένα, το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο αντιστοίχισης επέλεγε όλους τους μάρτυρες που ταίριαζαν ως προς το φύλο και την ηλικία με κάθε ασθενή. Σε περίπτωση αντιστοίχισης περισσότερων του ενός μαρτύρων στον ίδιο ασθενή, ο υπολογιστής επέλεγε ένα τυχαίο νούμερο από τους μάρτυρες που πληρούσαν τα

συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση μη ύπαρξης μαρτύρων για κάποιον ασθενή, χρησιμοποιούνταν εναλλακτικά μάρτυρες που εμφάνιζαν διαφοροποίηση ως προς μία κατηγορία. Κατόπιν πλήρους ενημέρωσης των σκοπών της μελέτης, και οι 76 εργαζόμενοι του Νοσοκομείου που επιλέχθηκαν συμφώνησαν να συμμετάσχουν, συναίνεσαν εγγράφως και συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα δείγματα αίματος. Όλες οι διαδικασίες που ακολούθησαν ήταν σε απόλυτη συμφωνία με τα ηθικά κριτήρια για τις κλινικές μελέτες (Διακήρυξη της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας του Ελσίνκι) και εγκρίθηκαν από την αντίστοιχη κατάλληλη επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου μας.

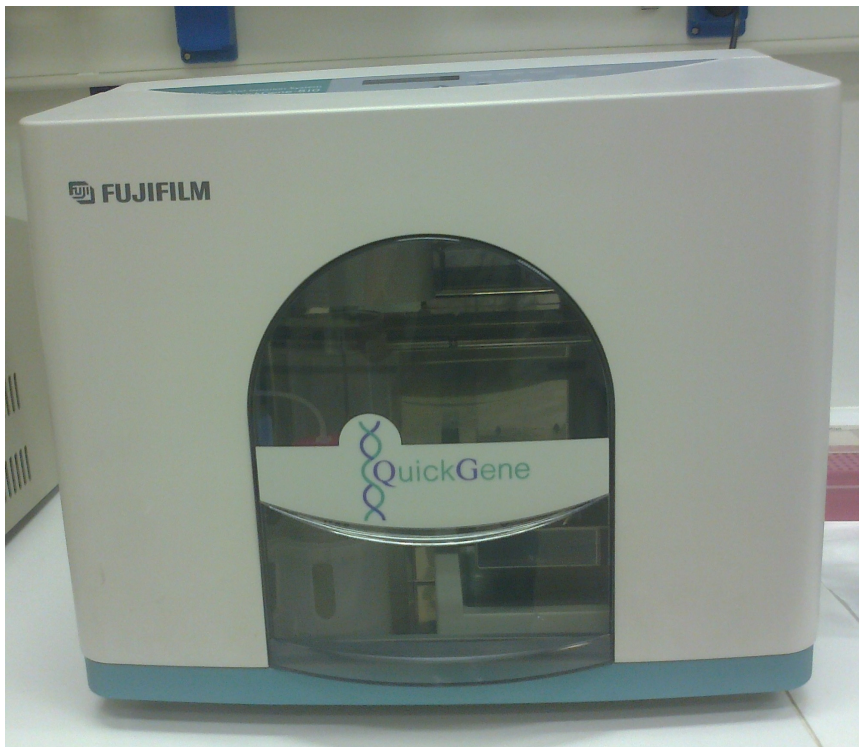
2.1 Κλινική εκτίμηση

Οι ασθενείς της μελέτης μας υποβλήθηκαν σε μια σειρά συναντήσεων με δύο κλινικούς ιατρούς, ενώ πραγματοποιήθηκαν η λήψη ενός λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού, η φυσική εξέταση και οι κατάλληλες εργαστηριακές δοκιμασίες. Η διάρκεια της μη θεραπευόμενης ψύχωσης εκτιμήθηκε από τις συνεντεύξεις με τον ασθενή, τους συγγενείς και άλλα πρόσωπα προσφιλή τους ασθενούς, που ήταν κοντά του κατά την έναρξη της εκδήλωσης της νόσου. Τα ψυχωτικά συμπτώματα εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας την Κλίμακα Εκτίμησης των Θετικών και Αρνητικών Συμπτωμάτων του Συνδρόμου (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS) (Kay et al, 1987). Επίσης, εκτιμήθηκαν μεταβλητές που σχετίζονται με χαρακτηριστικά προσωπικότητας (Νευρωτισμός-Άγχος, Αναζήτηση Ευχαρίστησης, Επιθετικότητα-Εχθρότητα, Δραστηριότητα, Κοινωνικότητα) χρησιμοποιώντας την σταθμισμένη ελληνική έκδοση του ερωτηματολογίου Alternative Five Factor Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire (ZKPQ) (Joireman and Kuhlman 2004; Zuckerman 2002, 2008; Hyphantis et al, 2013).

2.2 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος ασθενών με FEP και υγιών ατόμων

Τα δείγματα ολικού αίματος των ασθενών και των μαρτύρων φυλάχθηκαν στην κατάψυξη (-20° C) μέχρι την ανάλυση και την απομόνωση του γενετικού υλικού. Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από περιφερικά δείγματα αίματος, χρησιμοποιώντας το Gene DNA Whole Blood Kit S (FUJIFILM, cat.no. DB-S).

Το Kit περιέχει τα ακόλουθα: Πρωτεάση (Protease, EDB), Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer LDB), Διάλυμα Έπλυσης (Wash Buffer, WDB), Διάλυμα Έκλουσης (Elution Buffer CDB), Ειδικά Δοχεία (cartridges, CA), Μικροσωληνάρια Συλλογής (Collection Tubes, CT), Καπάκια (Caps, CAP), Μικροσωληνάρια Αποβλήτων (Waste Tubes, WT). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Nucleic Acid Isolation System Quick Gene-810 της FUJIFILM.



Εικόνα 15. Η συσκευή “Nucleic Acid Isolation System Quick Gene-810 της FUJIFILM”

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής :

- 1) Προσθήκη 30μl πρωτεάσης σε μικροσωληνάριο (για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες από το αίμα), 200μl από το δείγμα αίματος και 250μl διάλυμα λύσης.
- 2) Έντονη ανάδευση για τη λύση των κυττάρων.
- 3) Ομογενοποίηση στη μέγιστη ταχύτητα για 15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια σύντομη φυγοκέντρηση με στόχο να απομακρυνθούν όσες σταγόνες έχουν απομείνει στο καπάκι του μικροσωληναρίου.
- 4) Επώαση των δειγμάτων στους 56° C για 2 λεπτά.
- 5) Προσθήκη στα δείγματα 250μl αιθανόλης (>99%), έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και πάλι σύντομη φυγοκέντρηση. Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την καθίζηση του DNA από το διάλυμα.

- 6) Προσεκτική μεταφορά του διαλύματος στα ειδικά δοχεία της συσκευής Nucleic Acid Isolation System Quick Gene-810.
- 7) Εκκίνηση του προγράμματος.
- 8) Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος και καταγραφή της ποσότητας DNA, πραγματοποιείται η μεταφορά του γενωμικού DNA σε νέο μικροσωληνάριο και ακόλουθη αποθήκευση.

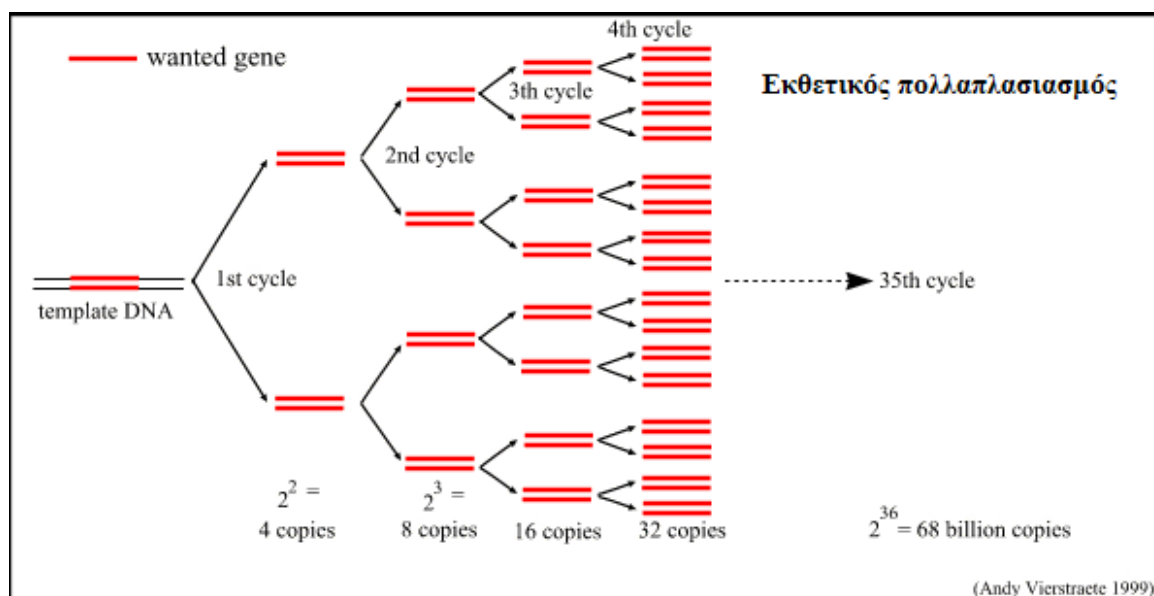
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η PCR είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από το Mullis KB, ο οποίος και κέρδισε το Nobel Χημείας το 1993 (Mullis, 1990).

Με την PCR μπορούμε να παράγουμε πολύ μεγάλες ποσότητες μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο εκκινητές, χρησιμοποιώντας μια DNA πολυμεράση για τον πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού αντιγράφων της αλληλουχίας αυτής. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για να συνθέσει ένα συμπληρωματικό νέο κλώνο.

Στην περίπτωση που η αντίδραση γίνεται με δίκλωνο DNA, το μονόκλωνο DNA προκύπτει μετά από θέρμανση του δίκλωνου σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι χρησιμοποιούνται ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Στην αντίδραση προστίθενται δύο ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, ανάμεσα στους οποίους βρίσκεται η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός για μια περιοχή ενός από τους κλώνους του DNA στόχου, ώστε να προσδέεται σε αυτή. Με τον τρόπο αυτό, καθορίζουμε τα σημεία έναρξης της σύνθεσης DNA in vitro προσθέτοντας στην αντίδραση εκκινητές με την κατάλληλη ακολουθία, ώστε να υβριδοποιούνται με τη μήτρα στις επιθυμητές περιοχές (μέσω δεσμών υδρογόνου). Κάθε νέος κλώνος που δημιουργείται από τον ένα εκκινητή, περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Έτσι δημιουργούνται νέες θέσεις πρόσδεσης σε κάθε καινούριο κλώνο. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά, διαχωρίζονται οι κλώνοι, υβριδοποιούνται οι εκκινητές στις θέσεις πρόσδεσης που δημιουργήθηκαν από την αποδιάταξη και συντίθενται νέοι κλώνοι. Οι κύκλοι θέρμανσης, προσκόλλησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασής τους ώστε να δημιουργηθούν νέα μόρια επαναλαμβάνονται. Μετά από n κύκλους, το μίγμα θεωρητικά περιέχει έως 2^n δίκλιωνα

μόρια. Η απόδοση της αντίδρασης επηρεάζεται από το μήκος και την αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η DNA πολυμεράση δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC. Τα αντίγραφα που παράγονται, είναι εύκολο στη συνέχεια να τα δει κανείς σε πηκτή αγαρόζης βαμμένη με βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική που προσδέεται στο DNA) (Keohavong and Thilly, 1989). Παράμετροι που πρέπει οπωσδήποτε να ρυθμιστούν για να υπάρχει το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, η σωστή επιλογή τους, η χρονική διάρκεια κάθε βήματος της αντίδρασης, καθώς και οι συγκεντρώσεις των αλάτων. Επίσης, η ποσότητα γενωμικού DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην PCR είναι μεταξύ 100ng και 1μg. Η σωστή πρόσδεση ενός εκκινητή, εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία και από το μήκος του. Εκκινητές με μήκος 18-24 νουκλεοτίδια παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, προσδέονται δηλαδή με το DNA στόχο σε μια μοναδική περιοχή με την οποία είναι συμπληρωματικά, εφόσον η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι κοντά στη θερμοκρασία τήξης τους (T_m). Ως θερμοκρασία τήξης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια του εκκινητή ζευγαρώνουν με τη μήτρα DNA, ενώ τα άλλα μισά δεν σταθεροποιούνται πάνω σε αυτήν και παραμένουν ελεύθερα. Σημαντικό είναι επίσης οι T_m των δύο εκκινητών να είναι παραπλήσιες, ώστε να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά και οι δυο στην ίδια θερμοκρασία (Watson et al, 2007).



Εικόνα 16. Ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αντιγράφων του δείγματος DNA

Θερμοσταθερές πολυμεράσες. Η χρήση πολυμερασών από θερμοφιλά βακτήρια έδωσε μεγάλη ώθηση στη μέθοδο PCR και επέτρεψε την αυτοματοποίησή της. Έτσι, ενώ με την πολυμεράση από *E.coli* έπρεπε να προστίθεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης νέο ένζυμο γιατί καταστρεφόταν από τις θερμοκρασίες, με την πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus* μπορούν να χρησιμοποιούνται διαδικασίες που εκτελούν τους κύκλους της μεθόδου στους χρόνους και τις θερμοκρασίες που απαιτούνται. Η πολυμεράση Taq από το βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει στο νερό στους 75° C, είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94° C. Έχει μόνο 5'→3' και όχι 3'→5' εξωνουκλεοτιδική δράση. Η προτεινόμενη συγκέντρωση του ενζύμου κυμαίνεται από 1 έως 2.5 μονάδες ανά 100μl αντίδρασης. Παρόλα αυτά, η πολυμεράση κάθε εταιρείας μπορεί να συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο (Eckert and Kunkel, 1990).

Για τη διαδικασία της PCR λοιπόν, απαιτούνται: το δείγμα DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε, απεσταγμένο-απιονισμένο νερό (ddH₂O), ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), το μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs), εκκινητές (primers), DNA πολυμεράση και χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂). Με όλα τα αντιδραστήρια (χωρίς τη μήτρα DNA) παρασκευάζουμε στην αρχή ένα κεντρικό μίγμα, το οποίο μοιράζουμε στα μικροφρεάτια. Στο τέλος προσθέτουμε στο κάθε ένα από αυτά τα μικροφρεάτια, το DNA από κάθε ασθενή ή μάρτυρα, που θέλουμε να ενισχύσουμε.



Εικόνα 17. Ο θερμοκυκλοποιητής C1000 που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

2.3.1 Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Η μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (RFLP), αναφέρεται στην ποικιλομορφία ομόλογων αλληλουχιών DNA που εντοπίζεται με την παρουσία διαφορετικών μηκών τμημάτων DNA μετά από πέψη τους με ένζυμα περιορισμού (Kan and Dozy, 1978; Asmussen et al, 1982). Τα ένζυμα (ενδονουκλεάσες περιορισμού) εντοπίζονται στα βακτήρια και τα προστατεύουν από τους ιούς. Υπάρχουν διάφορες ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιούνται στη Μοριακή Βιολογία, και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, συνήθως εξωνουκλεοτιδικές, παράγοντας είτε τυφλά άκρα, είτε προεξέχοντα 5' ή 3' άκρα.

Αν αλλάξουν ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια, το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει τους κλώνους στην τροποποιημένη θέση και έτσι δημιουργείται τμήμα μεγαλύτερου μήκους. Έτσι, αν μια συγκεκριμένη θέση περιορισμού υπάρχει στο μόριο του DNA του ενός χρωμοσώματος αλλά όχι του άλλου, το ένζυμο θα κόψει το DNA σε μικρότερα τμήματα στο πρώτο χρωμόσωμα, ενώ το δεύτερο θα έχει μεγαλύτερα τμήματα.

Όταν σε ένα άτομο υπάρχουν δύο διαφορετικές παραλλαγές ενός γενετικού τόπου, τότε το άτομο είναι ετερόζυγο ως προς τον πολυμορφισμό RFLP. Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, ώστε να βγάλουμε συμπεράσματα για τον τρόπο κληρονομής των χρωμοσωμάτων που τους φέρουν, από γενιά σε γενιά.

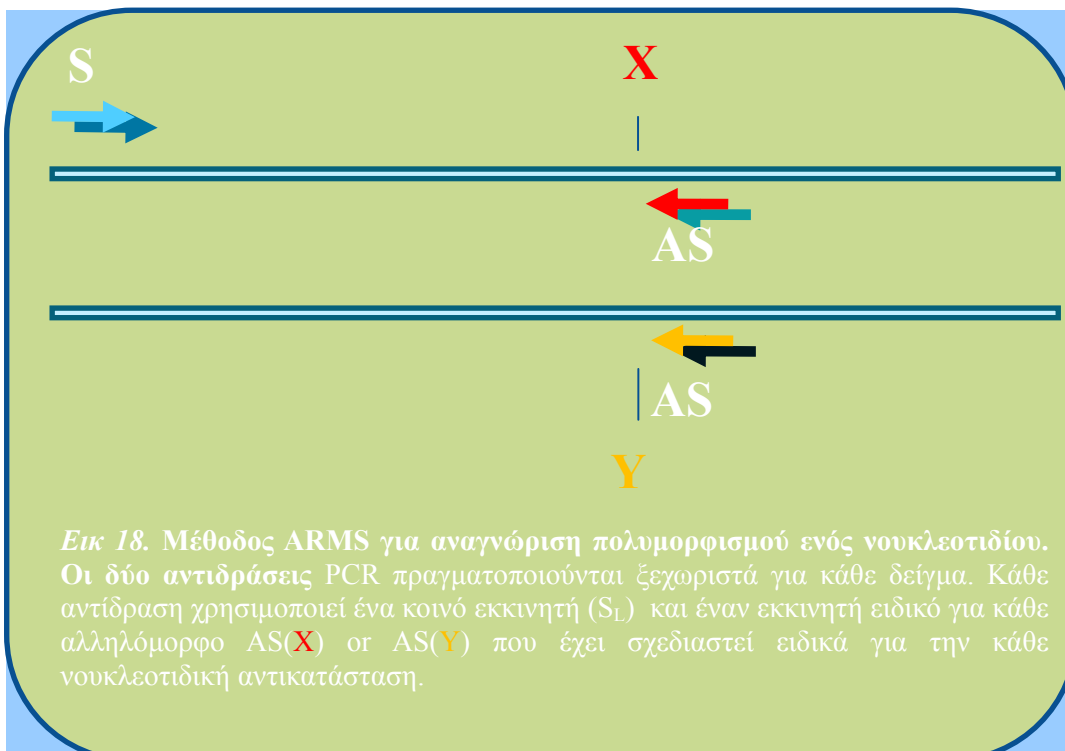
Μια γενετική ανωμαλία που διαπιστώνεται σε μια ασθένεια, δεν οφείλεται απαραίτητα σε έναν πολυμορφισμό RFLP. Κάποιες φορές πάντως, ο πολυμορφισμός βρίσκεται μέσα και όχι κοντά στο υπεύθυνο για την ασθένεια γονίδιο και μπορεί να αποτελεί την ίδια τη μετάλλαξη που οδηγεί στη γενετική ανωμαλία.

Μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο, τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται σε πηκτή αгарόζης με βάση το μήκος τους. Η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο σε χαμηλή συγκέντρωση, επιτρέπει την απευθείας εξέταση του DNA (ακόμα και πολύ μικρών ποσοτήτων) σε λάμπα UV.

2.3.2 Μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System, PCR-ARMS)

Η μέθοδος ARMS βασίζεται στο γεγονός ότι η ενίσχυση DNA με PCR αποτυγχάνει ή έχει πολύ μικρή απόδοση αν υπάρχει ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3' νουκλεοτίδιο ενός εκκινητή και στην αντίστοιχη μήτρα. Έτσι, μειώνεται ή εμποδίζεται η επιμήκυνση του εκκινητή από την *Taq* πολυμεράση.

Η *Taq* DNA πολυμεράση δεν έχει 3'→5' εξωνουκλεοτιδική δράση, άρα δεν μπορεί να διορθώσει ασυμφωνίες ζευγαρώματος στο 3' άκρο του εκκινητή. Θα πρέπει λοιπόν να υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του εκκινητή ώστε να γίνει ενίσχυση του DNA. Προκειμένου να ενισχυθεί το φυσιολογικό αλληλόμορφο, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο κι ο οποίος θα εμφανίζει παράλληλα μια ασυμφωνία στο ζευγάρωμα με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο στο 3' νουκλεοτίδιο. Αντίστοιχα, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο θα ενισχυθεί αν το 3' τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Με τη βοήθεια αυτής της μεθόδου, προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια η συχνότητα συγκεκριμένων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό (Newton et al, 1989).



2.4 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης είναι μια πολύ σημαντική μέθοδος που χρησιμοποιείται προκειμένου να διαχωριστούν, να απομονωθούν και να αναγνωριστούν τμήματα DNA. Ζώνες δίκλωνου DNA μεγέθους μέχρι και 20pg, μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν με απ' ευθείας εξέταση της πηκτής σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός. Οι ζώνες του DNA μπορούν αν χρειαστεί, να ανακτηθούν από την πηκτή και να επαναχρησιμοποιηθούν.

Ο εντοπισμός του DNA μέσα στην πηκτή γίνεται εύκολα με χρώση με χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμβαλλόμενων χρωστικών που φθορίζουν, όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από τα φύκη. Επιβραδύνει την κίνηση του DNA και επιτρέπει το διαχωρισμό των διαφορετικών μεγεθών. Έτσι, η μετακίνηση του DNA εξαρτάται από το ηλεκτρικό πεδίο, το μέγεθος, το ρυθμιστικό διάλυμα και την ποιότητα της αγαρόζης.

Οι πηκτές αγαρόζης έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα (πολύ μεγαλύτερους πόρους) από τις πηκτές πολυακρυλαμίδης αλλά διαθέτουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού. Τμήματα DNA από 50bp ως μερικές μεγαβάσεις μήκος, μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτές αγαρόζης. Τα μικρότερα τμήματα, από 50bp ως 20000bp, διαχωρίζονται καλύτερα σε πηκτή οριζόντιας διάταξης, στην οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης και κατεύθυνσης. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και άρα μετακινείται προς την άνοδο (θετικό πόλο). Σ' αυτές τις συνθήκες, η ταχύτητα των θραυσμάτων του DNA μειώνεται όσο αυξάνεται το μέγεθός τους και είναι ανάλογη με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου.

Η παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή αγαρόζης. Η παρεμβολή του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή προκαλεί μείωση του αρνητικού φορτίου του δίκλωνου DNA και αύξηση του μήκους και της δυσκαμψίας του. Το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει και έτσι γίνεται ορατό στο υπεριώδες φως.

Η τάση που εφαρμόζεται. Σε χαμηλές τάσεις, ο ρυθμός της μετανάστευσης των γραμμικών τμημάτων DNA είναι ανάλογος της τάσης που εφαρμόζεται. Όσο όμως η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου ανεβαίνει, η κινητικότητα των τμημάτων μεγάλου μοριακού βάρους, διαφοροποιείται. Άρα η αύξηση της τάσης μειώνει την ικανότητα διαχωρισμού στην πηκτή (Sambrook and Russel, Molecular cloning).

2.4.1 Τα διαλύματα της ηλεκτροφόρησης

1/ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris/Borate/ EDTA, TBE)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αλλά αποτελεί και το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Πρώτα δημιουργήθηκε μητρικό διάλυμα 10X με την παρακάτω σύσταση:

1lt TBE buffer 10X

108g ρυθμιστικό διάλυμα Tris base

55g boric acid

40ml 0.5M EDTA (pH 8)

2/ Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, LB)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα φόρτωσης αναμιγνύονται με τα δείγματα πριν αυτά φορτωθούν στις οπές της πηκτής. Τα διαλύματα αυτά εξυπηρετούν τους εξής σκοπούς:

α/ να αυξήσουν την πυκνότητα του δείγματος, ώστε αυτό να μετακινηθεί ομοιόμορφα μέσα στην πηκτή. Η γλυκερόλη είναι το παχύρρευστο υγρό που βοηθά το δείγμα να βυθιστεί στον πάτο της οπής της πηκτής.

β/ να προσθέσουν χρώμα στο δείγμα, κάνοντας πιο απλή τη διαδικασία φόρτωσης, αλλά και την παρακολούθηση της μετακίνησης του δείγματος.

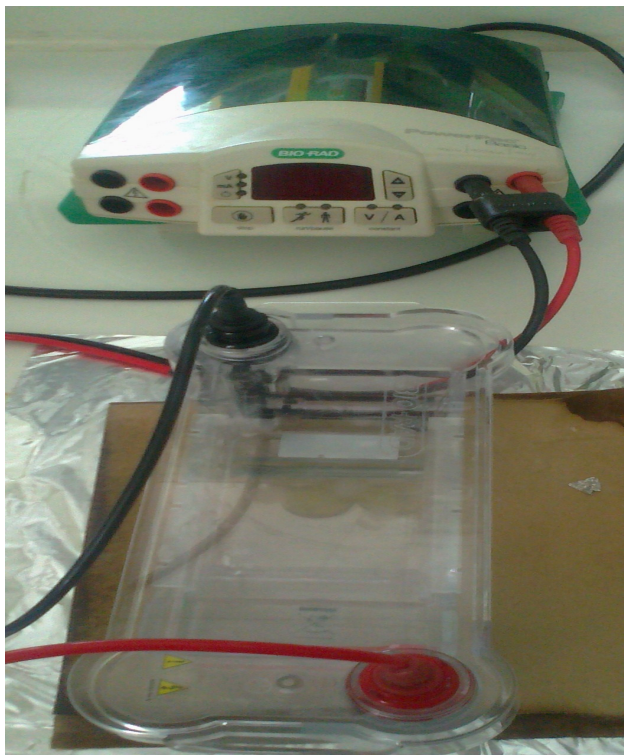
LB

50% glycerol

0.1% bromophenol blue

dH₂O (αποστειρωμένο)

Το μητρικό διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο 0.45μm για την αποφυγή ή την καθυστέρηση δημιουργίας ιζήματος.



Εικόνα 19: Συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήσαμε στην πειράματά μας

2.5 Βασικές αρχές προσδιορισμού των συγκεκριμένων πολυμορφισμών

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από δείγματα περιφερικού αίματος όπως ήδη αναφέρθηκε.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Στο διάλυμα υπήρχαν 500ng ανθρώπινου γενωμικού DNA, 2-2.5mM MgCl₂, 0.2mM από κάθε dNTP (HT Biotechnologies), 2-10ng/μl από κάθε εκκινητή, 1X ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης (Phusion buffer, Finnzymes, ή kapa buffer, Kapa Biosystems, ή Gold buffer, Applied Biosystems) και 0.02-0.05 U/μl της DNA πολυμεράσης (Phusion Hot Start DNA polymerase, Finnzymes, ή KapaTaq DNA polymerase, Kapa Biosystems ή AmpliTaq Gold DNA polymerase, Applied Biosystems). Σε ένα μικροφρεάτιο, το γενωμικό DNA αντικαταστάθηκε από νερό, ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων από ξένο DNA (τυφλό δείγμα).

Όπως φαίνεται παρακάτω, οι συνθήκες της PCR ήταν κάθε φορά διαφορετικές, ανάλογα με τους εκκινητές και την πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκαν. Στα προϊόντα της αντίδρασης, είτε έγινε πέψη με συγκεκριμένο ένζυμο (μέθοδος RFLP, για τους πολυμορφισμούς Val158Met της COMT και Val66Met του BDNF), είτε έγινε απ' ευθείας παρατήρηση σε πηκτή αγαρόζης (προϊόντα της μεθόδου ARMS-PCR για τον

πολυμορφισμό A644G της MAOB και προϊόντα PCR για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR του 5-HTT).

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε 3% πηκτή αραρόζης (3g αραρόζης σε 100ml 1X TBE σημασμένου με βρωμιούχο αιθίδιο 2.5μM ή 1μg/ml). Σε όλα τα δείγματα, πριν τρέξουν στην πηκτή, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στο πρώτο μικροφρεάτιο τοποθετήθηκε ο κατάλληλος δείκτης με γνωστές συγκεντρώσεις DNA (DNA ladder Takara, 50bp).

2.6 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό Val158Met στο γονίδιο της COMT

Η αναγνώριση της νουκλεοτιδικής αλλαγής (G►A) που έχει σαν συνέπεια την αλλαγή αμινοξέος (Val158Met), πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, που ακολουθήθηκε από τη μέθοδο RFLP (Cerasa, 2010).

Η αντίδραση ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 98° C για 1 λεπτό. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που περιλάμβαναν τα εξής στάδια: 98° C για 10 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη DNA-διαχωρισμός των κλώνων), 58° C για 15 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών) και 72° C 1 λεπτό (επιμήκυνση νέων κλώνων από τη DNA πολυμεράση), ενώ η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72° C για 5 λεπτά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, ήταν οι εξής (Serretti et al, 2002):

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-ACT GTG GCT ACT CAG CTG TG-3'

Ανάστροφος εκκινητής: 5'-CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA-3'

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για τον πολυμορφισμό Val158Met της COMT

| Αντιδραστήρια (αρχικές συγκεντρώσεις) | Όγκος |
|--|-------------|
| Ανθρώπινο Γενομικό DNA | 2μl |
| ddH ₂ O | 12,25μl |
| 5X Phusion HF buffer | 5μl |
| dNTPs (10mM each) | 0,5μl |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (sense, 100ng/μl) | 2,5μl |
| Ανάστροφος εκκινητής (antisense, 100ng/μl) | 2,5μl |
| Phusion Hot Start DNA polymerase (2U/μl) | 0,25μl |
| Τελικός Όγκος | 25μl |

Στα προϊόντα της αντίδρασης έγινε πέψη με το ένζυμο περιορισμού NlaIII (New England Biolabs) (Yim et al., 2001). Συγκεκριμένα, 15μl από το προϊόν της αντίδρασης αναμίχθηκαν με 2.3μl νερό, 2μl 1X NE buffer 4 (New England Biolabs), 0.2μl BSA (New England Biolabs) και 0.5μl ενζύμου Eco721 (New England Biolabs). Έγινε δίωρη επώαση στους 37° C. Στην πηκτική αгарόζης, δίπλα σε κάθε δείγμα στο οποίο έγινε πέψη, τοποθετήθηκε δείγμα από το αρχικό προϊόν της PCR (χωρίς πέψη), ώστε να ελεγχθεί αν έγινε σωστά η αντίδραση. Στα δείγματα που δεν είχαν επωαστεί με το ένζυμο περιορισμού, παρατηρήθηκε μια ζώνη 169 ζευγών βάσεων. Μετά την πέψη, το αλληλόμορφο A εμφάνισε 4 ζώνες, στα 27, 96, 18, 28bp (εμφανής είναι μόνο η ζώνη των 96bp). Το αλληλόμορφο G, εμφάνισε ζώνες στα 27, 114, και 28bp (διακρίνεται μόνο η ζώνη των 114bp).

Συνεπώς, μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο, οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 96bp, οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 114bp και οι ετεροζυγώτες 2 ζώνες, μια στα 96 και μια στα 114bp.

2.7 Προσδιορισμός γονοτύπου A644G για το γονίδιο MAOB

Στην περίπτωση του γονιδίου της MAOB, η μέθοδος PCR-ARMS χρησιμοποιείται για τον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου, συγκεκριμένα για τον A644G πολυμορφισμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο χωριστών αναλύσεων ARMS, από τις οποίες η μία είναι ειδική για το αλληλόμορφο A (με εκκινητή που έχει θυμίνη (T) στο 3' άκρο του) και η άλλη ειδική για το αλληλόμορφο G (με εκκινητή που έχει κυτοσίνη (C) στο 3' άκρο του).

Για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις, μια με εμπρόσθιο εκκινητή με T στο 3' νουκλεοτίδιο, και μια με εμπρόσθιο εκκινητή με C στο 3' νουκλεοτίδιο. Ο ανάστροφος εκκινητής ήταν ο ίδιος και στις δύο αντιδράσεις.

Η αντίδραση ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 94° C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που περιλάμβαναν τα εξής στάδια: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη DNA-διαχωρισμός των κλώνων), 63° C για 20 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών), 72° C για 30 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση νέων κλώνων από τη DNA πολυμεράση), ενώ η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72° C, για 10 λεπτά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (Gassó et al, 2008):

Εμπρόσθιοι εκκινητές: 5'-CACTGGCAAATAGCAAAAAGT-3' (A-specific)

5'-CACTGGCAAATAGCAAAAAGC-3' (G-specific)

Ανάστροφος εκκινητής: 5'-GGATTTACTTTGCAGGCACC-3'

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για τον πολυμορφισμό A644G της MAOB

| Αντιδραστήρια για αλληλόμορφο A (αρχικές συγκεντρώσεις) | Αντιδραστήρια για αλληλόμορφο G (αρχικές συγκεντρώσεις) | Όγκος |
|--|--|--------------|
| Ανθρώπινο γενωμικό DNA | Ανθρώπινο γενωμικό DNA | 2μl |
| MgCl ₂ (25mM) | MgCl ₂ (25mM) | 2.5μl |
| ddH ₂ O | ddH ₂ O | 12.75μl |
| 5X KapaTaq buffer D | 5X KapaTaq buffer D | 5μl |
| dNTPs (10mM each) | dNTPs (10mM each) | 0.5μl |
| Εμπρόσθιος εκκινητής A (sense, 100ng/μl) | Εμπρόσθιος εκκινητής G (sense, 100ng/μl) | 1μl |
| Ανάστροφος εκκινητής (antisense, 100ng/μl) | Ανάστροφος εκκινητής (antisense, 100ng/μl) | 1μl |
| KapaTaq DNA polymerase (5U/μl) | KapaTaq DNA polymerase (5U/μl) | 0.25μl |
| Τελικός Όγκος | Τελικός Όγκος | 25μl |

Τα διαφορετικά αλληλόμορφα και οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, έγιναν με απευθείας παρατήρηση των ζωνών της πηκτής αγαρόζης σε λάμπα UV. Οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 663bp, στην PCR στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί εμπρόσθιος εκκινητής με T στο 3' νουκλεοτίδιο. Οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 663bp στην PCR στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί εμπρόσθιος εκκινητής με C στο 3' νουκλεοτίδιο, ενώ οι ετεροζυγώτες εμφάνισαν ζώνες στα 663bp και στις δύο αντιδράσεις PCR.

2.8 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR στο μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HTT)

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού 5-HTTLPR, λόγω της διαφοράς 44bp ανάμεσα στα δύο αλληλόμορφα, η αναγνώρισή τους έγινε με απ' ευθείας παρατήρηση των ζωνών στην πηκτική αγαρόζη.

Η αντίδραση ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 94° C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που περιλάμβαναν τα εξής στάδια: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη DNA-διαχωρισμός των κλώνων), 55° C για 30 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών), 72° C για 30 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση νέων κλώνων από τη DNA πολυμεράση), ενώ η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72° C, για 10 λεπτά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (Serretti et al, 1999):

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3'

Ανάστροφος εκκινητής: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR του 5-HTT

| Αντιδραστήρια (αρχικές συγκεντρώσεις) | Όγκος |
|--|-------------|
| Ανθρώπινο γενωμικό DNA | 2μl |
| MgCl ₂ (25mM) | 2μl |
| ddH ₂ O | 14.25μl |
| 5X KapaTaq buffer D | 5μl |
| dNTPs (10mM each) | 0.5μl |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (sense, 100ng/μl) | 0.5μl |
| Ανάστροφος εκκινητής (antisense, 100ng/μl) | 0.5μl |
| KapaTaq DNA polymerase (5U/μl) | 0.25μl |
| Τελικός Όγκος | 25μl |

Τα διαφορετικά αλληλόμορφα και οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, έγιναν με απευθείας παρατήρηση των ζωνών της πηκτικής αγαρόζης σε

λάμπα UV. Οι ομοζυγώτες για το μακρό (large, l) αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 528bp, οι ομοζυγώτες για το βραχύ (short, s) αλληλόμορφο εμφάνισαν μια ζώνη στα 484bp, ενώ οι ετεροζυγώτες εμφάνισαν δυο ζώνες, μια στα 528bp και μια στα 484bp (Serretti et al., 1999).

2.9 Προσδιορισμός γονοτύπου για τον πολυμορφισμό Val66Met του BDNF

Η αναγνώριση της νουκλεοτιδικής αλλαγής (G►A) που έχει σαν συνέπεια την αλλαγή αμινοξέος (Val66Met), πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, που ακολουθήθηκε από τη μέθοδο RFLP (Cerasa, 2010).

Η αντίδραση ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 95° C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν 35 κύκλοι που περιλάμβαναν τα εξής στάδια: 95° C για 1 λεπτό (αποδιάταξη DNA-διαχωρισμός των κλώνων), 60° C για 30 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών) και 72° C 1 λεπτό (επιμήκυνση νέων κλώνων από τη DNA πολυμεράση). Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72° C για 10 λεπτά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (Nakata et al, 2003):

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-ACT CTG GAG AGC GTG AAT GG-3'

Ανάστροφος εκκινητής: 5'-ACT ACT GAG CAT CAC CCT GGA-3'

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για τον πολυμορφισμό Val66Met του BDNF

| Αντιδραστήρια (αρχικές συγκεντρώσεις) | Όγκος |
|--|-------------|
| Ανθρώπινο Γενομικό DNA | 2μl |
| MgCl ₂ (25mM) | 2μl |
| ddH ₂ O | 12,75μl |
| 10X PCR Gold buffer | 2,5μl |
| dNTPs (10mM each) | 0,5μl |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (sense, 100ng/μl) | 2,5μl |
| Ανάστροφος εκκινητής (antisense, 100ng/μl) | 2,5μl |
| AmpliTaq Gold DNA polymerase (5U/μl) | 0,25μl |
| Τελικός Όγκος | 25μl |

Στα προϊόντα της αντίδρασης έγινε πέψη με το ένζυμο περιορισμού Eco721 (Fermentas). 15μl από το προϊόν της αντίδρασης αναμίχθηκαν με 2.5μl νερό, 2μl 1X Tango buffer (Fermentas) και 0.5μl ενζύμου Eco721 (Fermentas). Έγινε 12ωρη επώαση στους 37° C και στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Στα δείγματα που δεν είχαν επωαστεί με το ένζυμο περιορισμού, παρατηρήθηκε μια ζώνη 171 ζευγών βάσεων. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο A που δεν κόβεται από το ένζυμο περιορισμού. Στα δείγματα που έγινε πέψη εμφανίστηκαν μια, δύο, ή τρεις ζώνες. Μια ζώνη είχαν οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο, δύο ζώνες οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο (γιατί το ένζυμο περιορισμού κόβει σε δύο κομμάτια, 99 και 72 ζευγών βάσεων) και τρεις ζώνες (171, 99 και 72 ζεύγη βάσεων) οι ετεροζυγώτες, που είχαν και τα δύο αλληλόμορφα (Nakata et al, 2003).

2.10 Εξίσωση Hardy-Weinberg (HW equilibrium)

Αποτελεί την πιο βασική σχέση στη γενετική πληθυσμών. Χρησιμοποιείται για να περιγράψει γονιδιακές συχνότητες σε στατικούς από πλευράς εξέλιξης πληθυσμούς. Τέτοιοι πληθυσμοί ονομάζονται «πληθυσμοί που βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg». Σύμφωνα με το θεώρημα αυτό, οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό παραμένουν σταθερές κατά τις διάφορες γενιές, αν δεν επιδράσουν άλλοι παράγοντες εκτός από την ανακατανομή των γονιδίων κατά τη διαδικασία της γαμετογένεσης. Για την περίπτωση χαρακτηριστικού που καθορίζεται από δύο αλληλόμορφα (A και a), η εξίσωση ορίζει ότι:

(1) $p+q=1$, όπου p η συχνότητα του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου (A) και q η συχνότητα του άλλου (a), και

(2) $p^2+2pq+q^2=1$, όπου p^2 η συχνότητα των AA ατόμων, 2pq η συχνότητα των Aa και aA ατόμων και q^2 η συχνότητα των aa ατόμων.

Το θεώρημα των Hardy-Weinberg επιτρέπει τον υπολογισμό της συχνότητας των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό, αν γνωρίζουμε τη συχνότητα των γονότυπων, και αντίστροφα.

Ανεξάρτητα από τις αρχικές συχνότητες των αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό, αν διατηρείται η τυχαία αναπαραγωγή, τότε ισχύει πάντα η εξίσωση HW και οι συχνότητες των αλληλομόρφων παραμένουν σταθερές. Αποκλίσεις από την εξίσωση HW έχουμε όταν

κάποια από τις προϋποθέσεις δεν ισχύει (π.χ. επιλογή, ροή γονιδίων, μη τυχαία αναπαραγωγή).

Στην παρούσα εργασία, ελέγξαμε αν οι δυο πληθυσμοί μας (ασθενείς-μάρτυρες) ακολουθούν την εξίσωση HW.

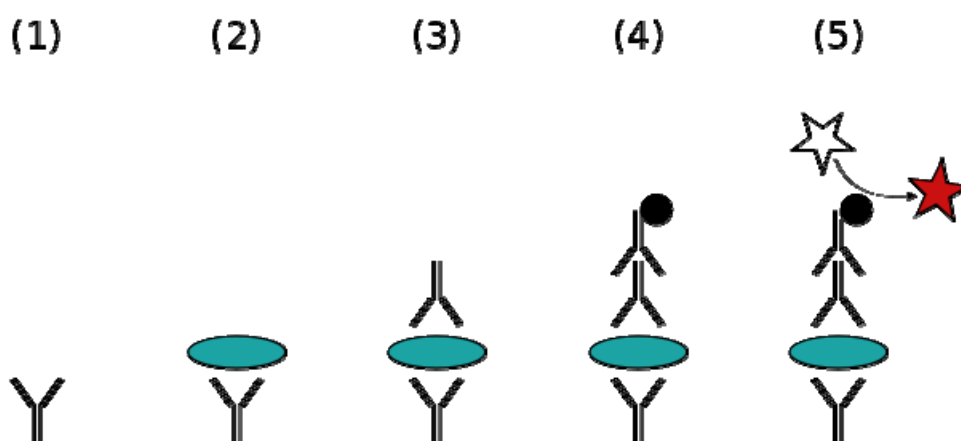
2.11 Ανοσοχημικός προσδιορισμός (ELISA) - Μέτρηση συγκέντρωσης BDNF στον ορό

Ο ορός απομονώθηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος στα 5400g για 15 λεπτά και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -70°C μέχρι να γίνει η ανάλυση. Τα επίπεδα στον ορό ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA (συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσοφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο) και το kit BDNF Emax Immunoassay System (Promega, cat.no G7610). Η μέθοδος ELISA είναι μια πολύ διαδεδομένη βιοχημική μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία μιας ουσίας, συνήθως αντιγόνου, σε ένα υγρό δείγμα.

1. Πραγματοποιείται η προετοιμασία ενός πλακιδίου, στο οποίο έχει προσδεθεί ένα ειδικό αντίσωμα σύνδεσης.
2. Αποκλείονται οι μη ειδικές περιοχές πρόσδεσης.
3. Το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο εφαρμόζεται στην επιφάνεια.
4. Ακολουθεί έκπλυση ώστε να απομακρυνθεί το αντιγόνο που δεν προσκολλήθηκε στην επιφάνεια.
5. Ένα ειδικό αντίσωμα εφαρμόζεται στο πλακίδιο, ώστε να συνδεθεί με το αντιγόνο (γι' αυτό η μέθοδος λέγεται «σάντουιτς»: το αντιγόνο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα).
6. Δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με ένζυμα χρησιμοποιούνται ως αντισώματα ανίχνευσης που συνδέονται με τη μη ειδική περιοχή του αντισώματος.
7. Ακολουθεί έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα σύμπλοκα αντισώματος-ενζύμου.
8. Μια χημική ουσία προστίθεται ώστε να μετατραπεί η σύνδεση με το ένζυμο σε χρωματικό, φθορίζον ή ηλεκτροχημικό σήμα.
9. Η απορρόφηση, ο φθορισμός ή το ηλεκτροχημικό σήμα σε κάθε μικροφρεάτιο του πλακιδίου, καταγράφεται ώστε να καθοριστεί η παρουσία και η ποσότητα του αντιγόνου.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο (Promega) ακολουθήθηκαν τα ακόλουθα στάδια.

- Αντιγόνο BDNF επιστρώνεται σε πλακίδια πολυστυρενίου σε τελικό όγκο 100μl ανά μικροφρεάτιο ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού, pH 9.7. Ακολουθεί επώαση στους 4° C για 12 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα και γίνεται έκπλυση μια φορά με διάλυμα TBST (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 0.05% v/v Tween 20).
- Οι ελεύθερες θέσεις δεσμεύονται με 200μl Block and Sample 1X Buffer με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Ακολουθεί έκπλυση μια φορά με TBST.
- Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό πρότυπο διάλυμα BDNF. Το κάθε μικροφρεάτιο περιέχει 100μl. Ακολουθεί επώαση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
- Ετοιμάζεται διάλυμα αντισώματος BDNF έναντι ανοσοσφαιρινών ανθρώπου και προστίθενται 100μl ανά μικροφρεάτιο. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια γίνεται 5 φορές έκπλυση.
- Προστίθεται στα μικροφρεάτια αντιορός όνου έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένος με ραφανιδική υπεροξειδάση (Anti IgY HRP conjugate) (100μl). Ακολουθεί επώαση με ανάδευση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια έκπλυση 5 φορές.
- Στο τελευταίο στάδιο προστίθεται το υπόστρωμα της ραφανιδικής υπεροξειδάσης (διάλυμα TMB). Ακολουθεί η επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταματάει με προσθήκη 100μl HCl (1N) ανά μικροφρεάτιο. Η απορρόφηση μετράται σε μήκος κύματος 450nm σε μετρητή ELISA (Plate reader, Das) χρησιμοποιώντας ως μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται ένα μικροφρεάτιο στο οποίο δεν έχει γίνει επίστρωση αντιγόνου κι έχει προστεθεί μόνο στο τελικό στάδιο το υπόστρωμα (Lindsay et al, 1985; Okragly et al, 1997; Szapacs et al, 2004).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ELISA



Εικόνα 21. Σύσκευή Elisa που χρησιμοποιήθηκε (Plate reader, Das)

2.12 Στατιστική Επεξεργασία

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν και εκτιμήθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS, 17.

Δοκιμασίες χ^2 χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των διαφορών μεταξύ των υγιών εθελοντών και των ασθενών ως προς τη συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων. Επιπλέον δοκιμασίες χ^2 , διερεύνησαν το ρόλο του φύλου στα συγκεκριμένα ερωτήματα.

Δοκιμασίες t-tests πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη ποσοτικών, παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των υγιών και των ασθενών (επίπεδα ορού BDNF, σύγκριση υγιών-ασθενών και μετρήσεις κλίμακας PANSS για τη σύγκριση μεταξύ γονοτύπων).

Η Λογιστική Ανάλυση Πολλαπλής Παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη Νόσο και ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο, την ηλικία, και το γονότυπο, χρησιμοποιήθηκε για όλους τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς με σκοπό την αναζήτηση στατιστικά σημαντικών δεικτών που σχετίζονται ανεξάρτητα με την εμφάνιση ενός πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου. Πίνακες και επιφάνειες κύκλου (πίτες) έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν όλα τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

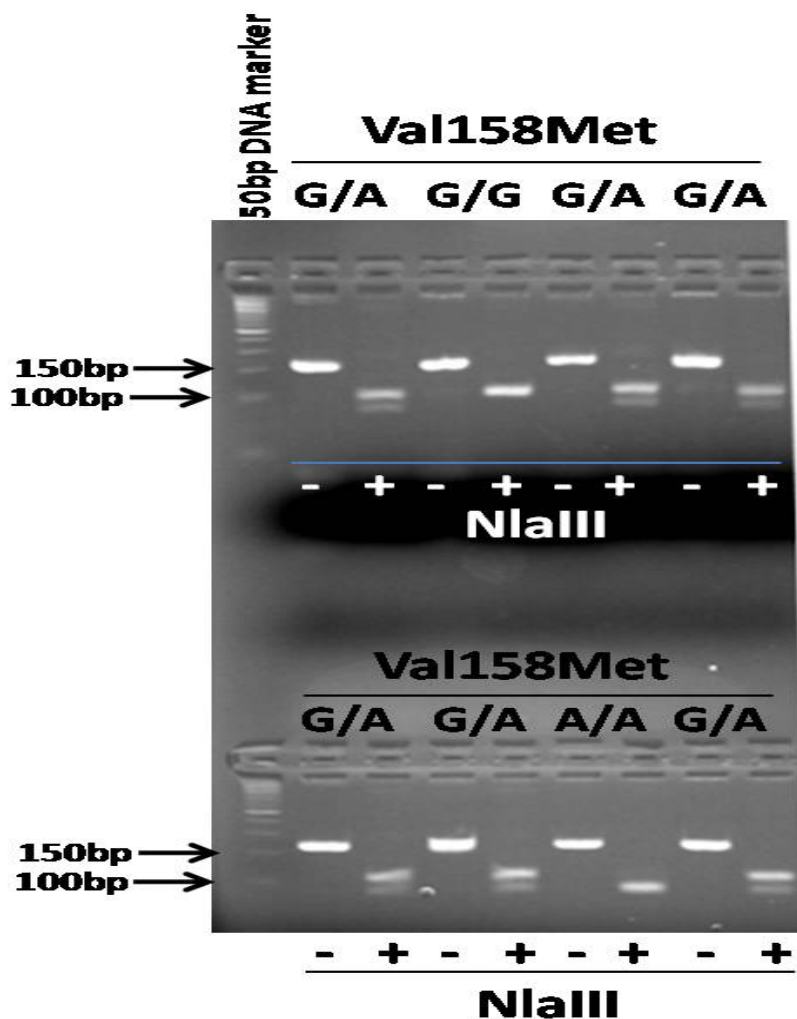
3.1 Προφίλ ασθενών

Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν άντρες (66%), χωρίς σύντροφο (94%) και σε ποσοστό 46.7% ήταν απόφοιτοι ανώτερων ή ανώτατων σχολών. Οι ηλικίες κυμαίνονταν από 16 έως 45 ετών (μέσος όρος \pm SD= 28.84 \pm 8.2, διάμεση τιμή=28.5 ετών), ενώ 19 ασθενείς (38%) ήταν κάτω των 25 ετών. Την περίοδο της εκτίμησης, η πλειοψηφία των ασθενών ήταν άνεργοι (46%), 34% ήταν υπάλληλοι πλήρους ωραρίου και οι υπόλοιποι ήταν φοιτητές. Ο μέσος χρόνος διάρκειας μη θεραπευόμενης ψύχωσης (DUP) ήταν 23.9 \pm 38.5 μήνες (διάμεση τιμή=12 μήνες). Οι περισσότεροι ασθενείς (n=52, 78%) είχαν DUP μεγαλύτερη από 12 μήνες, έξι ασθενείς (9%) είχαν DUP μεταξύ 3 και 12 μηνών και 9 ασθενείς (13%) είχαν DUP λιγότερη από 3 μήνες. Οι υγιείς εθελοντές οι οποίοι επιλέχθηκαν ανάλογα με το φύλο και την ηλικία παρουσίασαν αντίστοιχα ποσοστά και μέσες τιμές όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν.

3.2 COMT

3.2.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο ένζυμο της COMT για τον πολυμορφισμό Val158Met

Οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι που αφορούν στον πολυμορφισμό Val158Met αποτυπώνονται στην εικόνα 22.



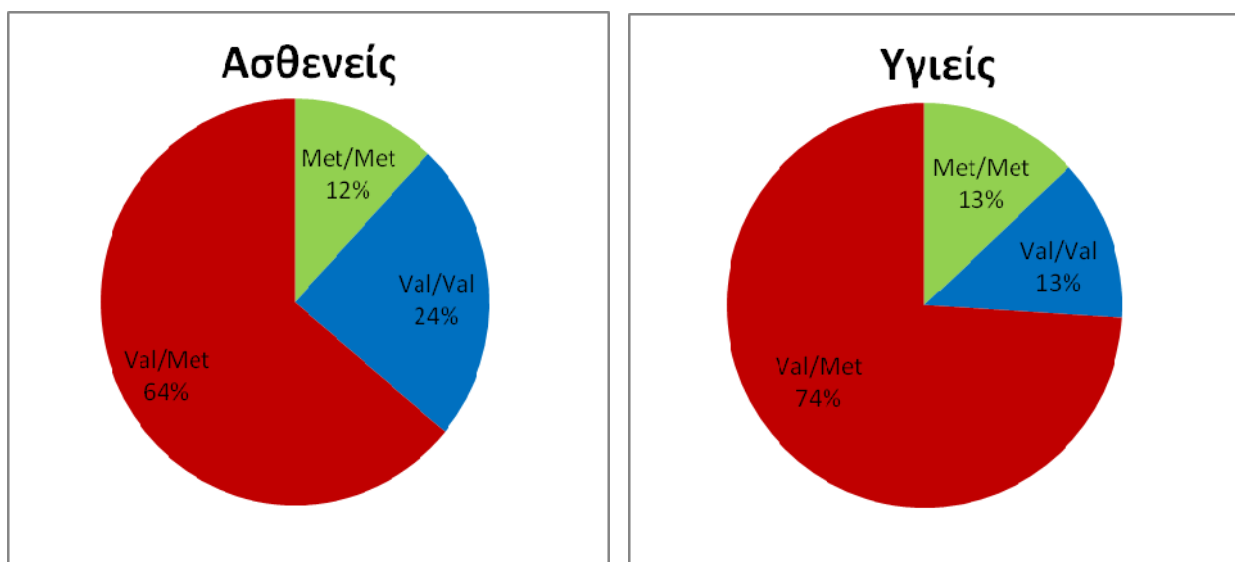
Εικόνα 22. Φωτογραφία πηκτής αγαρόζης για τον προσδιορισμό COMT γονοτύπου όπου εμφανίζονται τόσο ομοζυγώτες (G/G, A/A), όσο και ετεροζυγώτες (G/A). Ειδικότερα, το κάθε δείγμα απεικονίζεται πριν την πέψη και ακριβώς δίπλα ακολουθεί το ίδιο δείγμα μετά την πέψη. Οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο (A/A), μετά την πέψη, έχουν μια ζώνη στα 96bp, οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο (G/G) μια ζώνη στα 114bp, ενώ οι ετεροζυγώτες (G/A) εμφανίζουν και τις 2 ζώνες (96 και 114bp).

Το προφίλ των ασθενών με πρώτο επεισόδιο και των υγιών εθελοντών ως προς τον πολυμορφισμό Val158Met συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 7. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Πίνακας 7. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού Val158Met

| Γονότυπος | Ασθενείς | Υγιείς |
|---------------|------------|------------|
| G/G(Val/Val) | 16 (23.9%) | 10 (13.2%) |
| G/A(Val/Met) | 43 (64.2%) | 56 (73.7%) |
| A/A (Met/Met) | 8 (11.9%) | 10 (13.2%) |

Η δοκιμασία χ^2 δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών και ασθενών πρώτου επεισοδίου ως προς τον πολυμορφισμό Val158Met αν και παρατηρήθηκε μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του G/G γονοτύπου (Val/Val) στους ασθενείς (σχήμα 1). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δραστηριότητα του ενζύμου της COMT είναι τέσσερις φορές μεγαλύτερη στους G/G (Val/Val) ομοζυγώτες συγκριτικά με τους A/A ομοζυγώτες (Met/Met), ενώ οι ετεροζυγώτες G/A (Val/Met) παρουσιάζουν ενδιάμεση δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό προκαλεί μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στους G/G ομοζυγώτες, ειδικά στην περιοχή του μετωπιαίου φλοιού που ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης ασκεί κυρίαρχο ρόλο στην αποκωδότησή της λόγω έλλειψης προσυναπτικού ελέγχου (αυτούποδοχείς, επαναπρόσληψη).



Σχήμα 1: Παρουσίαση γονοτύπων: Val/Val, Val/Met και Met/Met, του πολυμορφισμού Val158Met των ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

Η στατιστική επεξεργασία προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του φύλου δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, αλλά εμφανίστηκε και στους άντρες και στις γυναίκες ασθενείς, αυξημένη τάση ως προς τη συχνότητα εμφάνισης των G/G ομοζυγωτών, συγκριτικά με τους υπόλοιπους γονοτύπους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, επιλέχθηκε επόμενη δοκιμασία χ^2 για να ανιχνευθούν διαφορές μεταξύ υγιών και ασθενών ως προς τους γονοτύπους G/G (Val/Val, υψηλής ενζυμικής δραστηριότητας) και φορείς A (Met, χαμηλής και ενδιάμεσης δραστηριότητας). Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι στους ασθενείς είναι αυξημένη η συχνότητα εμφάνισης των G/G (Val/Val) ομοζυγωτών (πίνακας 8). Επιπλέον στατιστικές αναλύσεις για τους άντρες και τις γυναίκες ασθενείς, έδειξαν επίσης αυξημένη συχνότητα των G/G (Val/Val) ομοζυγωτών, γεγονός που ήταν πιο εμφανές στους άντρες.

Πίνακας 8. Διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών.

| Val158Met | FEP | Υγιείς | test value | P-value |
|-----------------------------------|------------|------------|---------------------|----------------------------|
| γονότυποι | | | 3.75 ^(a) | 0.05 ^(a) |
| G/G (Val/Val) | 16 (23.9%) | 10 (13.2%) | | |
| Φορείς A (Val/Met και Met/Met) | 51 (76.1%) | 66 (86.8%) | | |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται επί τοις εκατό (%) ^(a)δοκιμασία χ^2

Ακολούθησε για τον πολυμορφισμό Val158Met, η πολυπαραγοντική ανάλυση με σκοπό την αναζήτηση στατιστικά σημαντικών δεικτών, που σχετίζονται ανεξάρτητα, με την εμφάνιση ενός πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου. Όπως φαίνεται στον πίνακα 9, η πολυπαραγοντική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή τη νόσο και ανεξάρτητες μεταβλητές το γονότυπο, το φύλο και την ηλικία έδειξε πως η πιθανότητα ενός G/G ομοζυγώτη να παρουσιάζει FEP είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς A, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του.

Πίνακας 9. Λογιστική Ανάλυση Πολλαπλής Παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη Νόσο

| Εξαρτημένη Μεταβλητή=Νόσος (Υγιείς=0, Ασθενείς=1) (N=143) | | |
|--|--|----------------|
| | Odds Ratios (95% Conf. Intervals) | P-value |
| Ηλικία | 1.0 (0.95 – 1.04) | 0.862 |
| Φύλο | 1.8 (0.91 – 3.74) | 0.087 |
| G/G ομοζυγώτες vs. Φορείς A | 2.2 (1.01 – 5.85) | 0.050 |

Σημείωση: Η προβλεπτική ισχύς υπολογίστηκε με βάση την πιθανότητα κάποιος συμμετέχων να εμφανίζει FEP και το σημείο αποκοπής μεταξύ «περίπτωσης» και «μη-περίπτωσης» ήταν 0.500. Η ανάλυση κατέταξε ορθώς το 56.7% των περιπτώσεων και ο δείκτης Nagelkerke R square βρέθηκε 0.062.

3.2.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό Val158Met στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου

Η στατιστική επεξεργασία (t-test) που πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των ασθενών έδειξε υψηλότερα επίπεδα ως προς τη συνολική PANSS στους G/G ομοζυγώτες συγκριτικά με τους φορείς A (πίνακας 10).

Πίνακας 10. Κλίμακα Αξιολόγησης PANSS στους διαφορετικούς γονοτύπους του Val158Met πολυμορφισμού

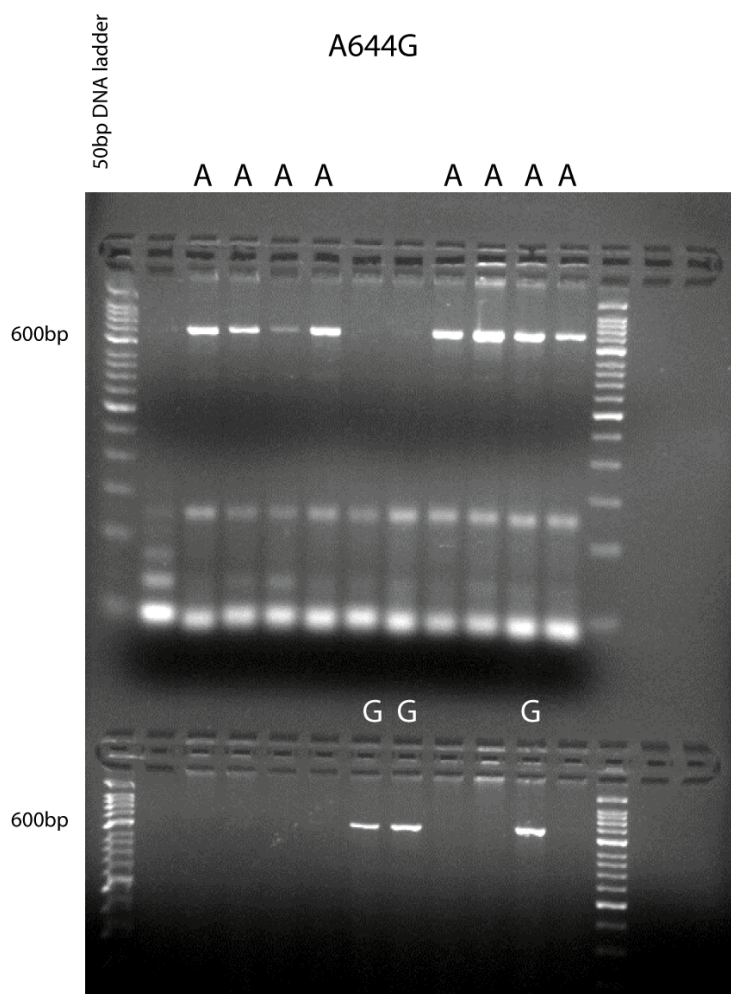
| | G/G | G/A+A/A |
|---------------|--------------|----------------|
| PANSSP | 31.71±7.4 | 29.±5.6 |
| PANSSN | 25.42±5.94 | 24.44±6.7 |
| PANSST | 100.71±24.64 | 97.08±20.27 |

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των G/G ομοζυγωτών στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές. Η πιθανότητα ενός G/G ομοζυγώτη να εκδηλώσει πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς A, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του. Οι γονότυποι δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την αντίστοιχη ψυχοπαθολογία, αν και αυξημένα επίπεδα ολικών συμπτωμάτων εμφανίζονται στους ασθενείς G/G ομοζυγώτες συγκριτικά με τους φορείς A.

3.3 MAOB

3.3.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο ένζυμο της MAOB για τον πολυμορφισμό A644G

Οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι για τις γυναίκες και δύο για τους άντρες που αφορούν στον πολυμορφισμό **A644G**, αποτυπώνονται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης για τον προσδιορισμό του MAOB γονοτύπου όπου εμφανίζονται τόσο ομοζυγώτες (G/G, A/A), όσο και ετεροζυγώτες (G/A). Οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο έχουν μια ζώνη στα 663bp, στο πάνω μισό της πηκτής, όπου φαίνονται τα δείγματα στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί εμπρόσθιος εκκινητής με T στο 3' νουκλεοτίδιο. Οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο αντίστοιχα, εμφανίζουν μια ζώνη στα 663bp, στο δεύτερο μισό, όπου φαίνονται τα δείγματα στα οποία η αντίδραση έγινε με C στο 3' νουκλεοτίδιο. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν ζώνες και στις δύο αντιδράσεις.

Το προφίλ των ασθενών με πρώτο επεισόδιο και των υγιών μαρτύρων ως προς τον πολυμορφισμό της MAOB παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες. Η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Όπως έχει εκτενώς αναφερθεί, το γονίδιο της MAOB βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις γονοτυπικές αναλύσεις, καθώς τα αρσενικά διαθέτουν ένα X και ένα Y φυλετικό χρωμόσωμα, ενώ τα θηλυκά 2X φυλετικά χρωμοσώματα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την ιδιαιτερότητα είναι προφανές ότι στις γυναίκες εμφανίζονται τρεις διαφορετικοί γονότυποι G/G, G/A, A/A ενώ στους άντρες εμφανίζονται μόνο δύο γονότυποι, οι G και A. Αρχικά, στον πίνακα 11 περιγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του καθενός από τα δύο αλληλόμορφα A, G τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες. Η στατιστική επεξεργασία (δοκιμασία χ^2), δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα είτε ως προς το σύνολο της συχνότητας αλληλομόρφων είτε ως προς τη συχνότητα εμφάνισής τους, ξεχωριστά στους άντρες από τις γυναίκες.

Πίνακας 11. Συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων

| Αλληλόμορφο | Ασθενείς | | | Υγιείς | | |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Άντρες | Γυναίκες | Σύνολο | Άντρες | Γυναίκες | Σύνολο |
| G | 21 (47.7%) | 22 (47.8%) | 43 (47.8%) | 18 (48.6%) | 32 (42.1%) | 50 (44.2%) |
| A | 23 (52.3%) | 24 (52.2%) | 47 (52.2%) | 19 (51.4%) | 44 (57.9%) | 63 (55.8%) |

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η ομάδα των γυναικών όπου εξετάστηκε η ύπαρξη διαφορών μεταξύ υγιών και ασθενών με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο ως προς τη συχνότητα εμφάνισης των τριών γονοτύπων. Η ανάλυσή μας δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (πίνακας 12).

Πίνακας 12. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού A644G στις γυναίκες

| Γονότυπος | Ασθενείς | Υγιείς |
|------------|------------|------------|
| G/G | 6 (26.1%) | 11 (28.9%) |
| G/A | 10 (43.5%) | 11 (28.9%) |
| A/A | 7 (30.4%) | 16 (42.1%) |

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το G αλληλόμορφο συνδέεται με χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου η οποία προκαλεί όπως αναφέρθηκε αύξηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθούν οι πιθανές διαφορές μεταξύ υγιών και ασθενών ως προς τους γονοτύπους φορείς G και A/A ομοζυγώτες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία τάση εμφάνισης υψηλότερης συχνότητας στους φορείς G συγκριτικά με τους A/A ομοζυγώτες και ειδικότερα στους ασθενείς ($p=0.10$) (πίνακας 13).

Πίνακας 13. Κατανομή των φορέων G και των ομοζυγωτών A/A του πολυμορφισμού A644G στις γυναίκες.

| Γονότυπος | Ασθενείς | Υγιείς |
|-----------------|------------|------------|
| Φορείς G | 16 (69.6%) | 22 (57.9%) |
| A/A | 7 (30.4%) | 16 (42.1%) |

Η πολυπαραγοντική ανάλυση για τον πολυμορφισμό **A644G**, με σκοπό την αναζήτηση στατιστικά σημαντικών δεικτών, που σχετίζονται ανεξάρτητα με την εμφάνιση ενός πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

3.3.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό A644G στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου

Η στατιστική επεξεργασία (t-test) που πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των ασθενών γυναικών, έδειξε διαφορετική ψυχοπαθολογία μεταξύ των φορέων G αλληλομόρφου και των A/A ομοζυγωτών. Ειδικότερα, η συνολική αξιολόγηση κατά την κλίμακα PANSS παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα στις γυναίκες ασθενείς φορείς G συγκριτικά με τις ομοζυγώτες A/A (πίνακας 14).

Πίνακας 14. Κλίμακα Αξιολόγησης PANSS στους διαφορετικούς γονοτύπους του A644G πολυμορφισμού στις γυναίκες ασθενείς

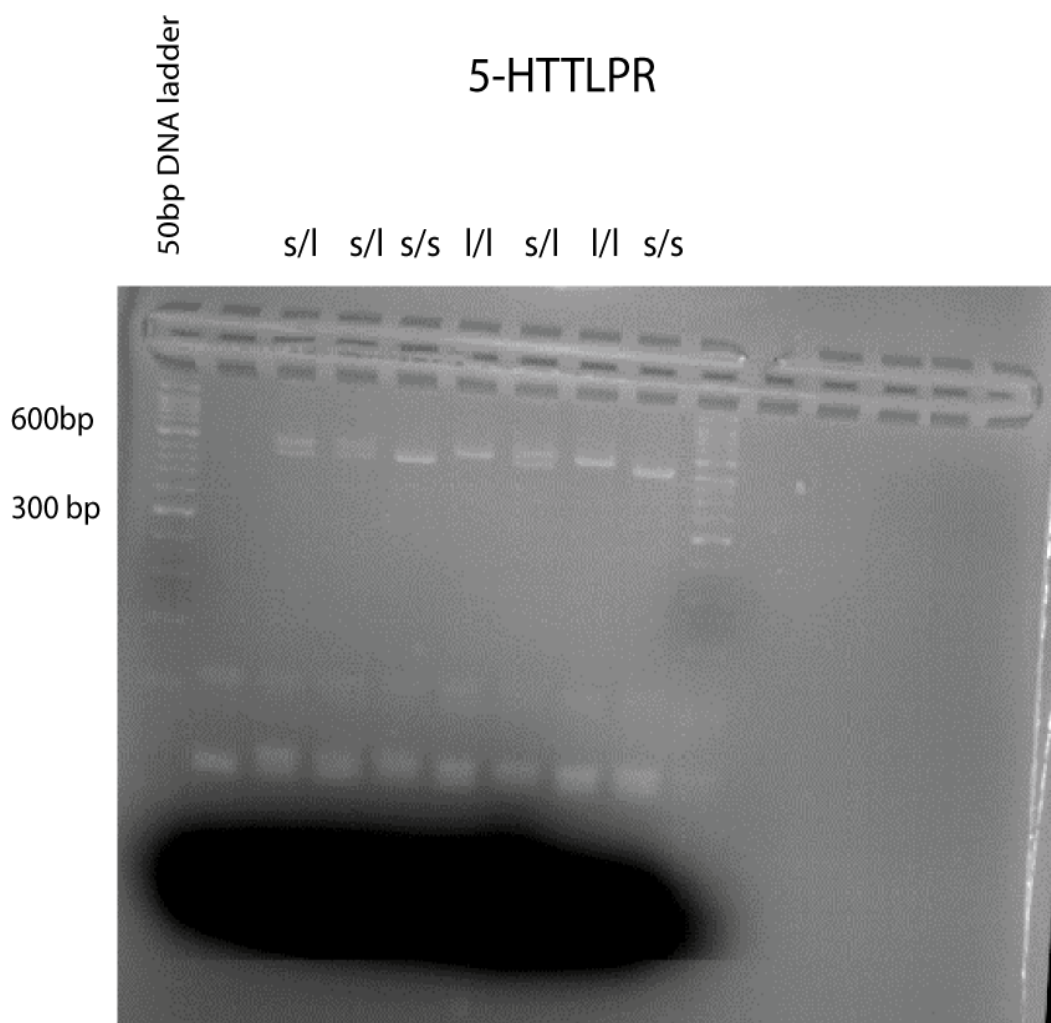
| | G/G+G/A | A/A | t-value | p |
|---------------|----------------|------------|----------------|-------------|
| PANSSP | 33.33±5.85 | 29.20±7.82 | | n.s. |
| PANSSN | 26.00±6.16 | 23.80±6.83 | | n.s. |
| PANSST | 110.88±30.475 | 81.20±3.34 | 2.13 | 0.04 |

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας ως προς το αλληλόμορφο G μεταξύ υγιών και ασθενών. Ακόλουθη στατιστική επεξεργασία όμως μόνο στις γυναίκες έδειξε ότι υπάρχει μια αυξημένη τάση υψηλότερης εμφάνισης φορέων G συγκριτικά με τους A/A ομοζυγώτες και ειδικά στους ασθενείς. Το ενδιαφέρον εύρημα σχετικά με τον πολυμορφισμό A644G της MAOB, αφορά στη συσχέτιση της ψυχοπαθολογίας με τον γονότυπο στις γυναίκες. Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ολικής PANSS στους φορείς G συγκριτικά με τους ομοζυγώτες A/A.

3.4 5-HTTLPR

3.4.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στον μεταφορέα της 5-HT για τον πολυμορφισμό 5-HTT-linked polymorphic region, 5-HTTLPR.

Οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι που αφορούν στον πολυμορφισμό 5-HTTLPR αποτυπώνονται στην ακόλουθη εικόνα 24.



Εικόνα 24. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης για τον προσδιορισμό του 5-HTTLPR γονοτύπου όπου εμφανίζονται τόσο ομοζυγώτες (l/l και s/s), όσο και ετεροζυγώτες (s/l). Οι ομοζυγώτες για το l αλληλόμορφο εμφανίζουν μια ζώνη στα 528bp, οι ομοζυγώτες για το s αλληλόμορφο μια ζώνη στα 484bp, ενώ οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν και τις 2 ζώνες (528 και 484bp).

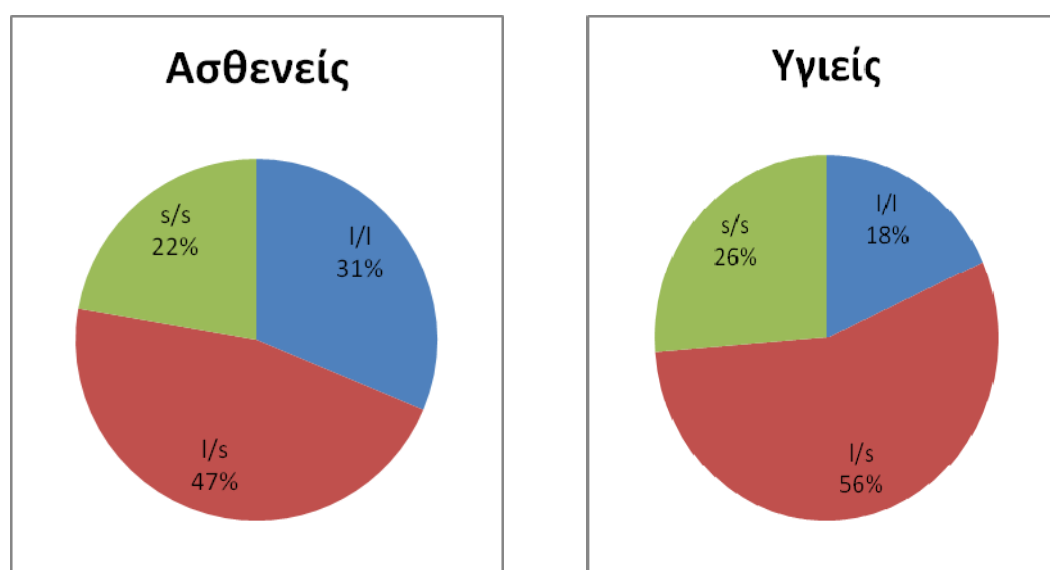
Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με πρώτο επεισόδιο και των υγιών μαρτύρων για τις διάφορες παραμέτρους που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 14. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ασθενείς και οι υγιείς δεν διέφεραν σημαντικά ως προς την ηλικία και το φύλο.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών-υγιών εθελοντών ως προς την κατανομή των αλληλομόρφων (πίνακας 15, σχήμα 2). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Πίνακας 15. Διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

| | FEP | Υγιείς | test value | P-value |
|-------------------------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|
| Age | 30.78 ± 8.15 | 30.25 ± 7.80 | 0.145 ^(a) | 0.700 ^(a) |
| Φύλο (γυναίκες) | 23 (35%) | 38 (50%) | 1.000 ^(b) | 1.000 ^(b) |
| 5-HTTLPR γονότυποι | | | 3.21 ^(b) | 0.200 ^(b) |
| s/s | 15 (22.4%) | 20 (26.3%) | | |
| s/l | 31 (46.3%) | 42 (55.3%) | | |
| l/l | 21 (31.3%) | 14 (18.4%) | | |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται είτε επί τοις εκατό (%) ή με τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD)
^(a) δοκιμασία student's t-test; ^(b)δοκιμασία χ^2



Σχήμα 2. Παρουσίαση γονοτύπων: l/l, s/l, s/s ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τόσο στο δείγμα των ασθενών όσο και στους υγιείς εθελοντές δύο υποομάδες, που αφορούσαν στους φορείς s αλληλομόρφου και στους 'I/I ομοζυγώτες' αντίστοιχα. Έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή η εμπλοκή του s αλληλομόρφου στην παθογένεια της ψύχωσης και της σχιζοφρένειας (Cloninger et al, 1991). Οι ομοζυγώτες του μακρού αλληλομόρφου I/I, του μεταφορέα της σεροτονίνης ήταν περισσότεροι στο δείγμα των ασθενών συγκριτικά με εκείνο των υγιών εθελοντών ($p < 0.05$) (πίνακας 16). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Πίνακας 16. Διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

| | Φορείς 's' | I/I | test value | P-value |
|-----------------|------------|------------|----------------------|---------------------------|
| Υγιείς | 62 (81.6%) | 14 (18.4%) | | |
| Ασθενείς | 46 (68.7%) | 21 (31.3%) | 3.217 ^(b) | 0.05^(b) |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται επί τοις εκατό (%), ^(b)δοκιμασία χ^2

Σχετικά με το φύλο και τους 'φορείς s αλληλομόρφου' και 'I/I ομοζυγώτες' δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους ασθενείς και υγιείς εθελοντές. Αξίζει όμως να αναφερθεί, ότι στις γυναίκες ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, παρατηρήθηκε μία τάση αυξημένης εμφάνισης των ομοζυγωτών I/I, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στους άντρες ασθενείς με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο (πίνακας 17).

Πίνακας 17. Διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών, ανά φύλο

| | Φορείς 's' | I/I | test value | P-value |
|-----------------|------------|------------|----------------------|----------------------|
| Υγιείς | | | | |
| Άντρες | 30 (78.9%) | 8 (21.1%) | | |
| Γυναίκες | 32 (84.2%) | 6 (15.8%) | | |
| Ασθενείς | | | | |
| Άντρες | 31 (70.5%) | 13 (29.5%) | 0.772 ^(b) | 0.250 ^(b) |
| Γυναίκες | 15 (65.2%) | 8 (34.8%) | 2.923 ^(b) | 0.080 ^(b) |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται επί τοις εκατό (%), ^(b)δοκιμασία χ^2

Ακολούθησε για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR η πολυπαραγοντική ανάλυση με σκοπό την αναζήτηση στατιστικά σημαντικών δεικτών, που σχετίζονται ανεξάρτητα με την εμφάνιση ενός πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου. Όπως φαίνεται στον πίνακα 18, η πολυπαραγοντική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή τη νόσο και ανεξάρτητες μεταβλητές το γονότυπο, το φύλο και την ηλικία έδειξε πως η πιθανότητα ενός I/I ομοζυγώτη να παρουσιάσει FEP είναι 2.6 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς s, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του.

Πίνακας 18. Λογιστική Ανάλυση Πολλαπλής Παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη νόσο

| | Εξαρτημένη Μεταβλητή=Νόσος (Υγιείς=0, Ασθενείς=1) (N=143) | |
|------------------------------------|--|----------------|
| | Odds Ratios (95% Conf. Intervals) | P-value |
| Ηλικία | 1.0 (0.95 – 1.04) | 0.736 |
| Φύλο | 1.9 (0.94 – 3.91) | 0.073 |
| I/I ομοζυγώτες vs. Φορείς s | 2.6 (1.13 – 6.10) | 0.024 |

Σημείωση: Η προβλεπτική ισχύς υπολογίστηκε με βάση την πιθανότητα κάποιος συμμετέχων να εμφανίζει FEP και το σημείο αποκοπής μεταξύ «περίπτωσης» και «μη-περίπτωσης» ήταν 0.500. Η ανάλυση κατέταξε ορθώς το 61.9% των περιπτώσεων και ο δείκτης Nagelkerke R square βρέθηκε 0.085.

3.4.2 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου

Στην ομάδα των ασθενών δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων ως προς την αξιολόγηση της κλίμακας PANSS (αρνητικά, θετικά συμπτώματα και συνολική βαθμολογία). Επίσης μεταξύ των ασθενών φορέων s αλληλομόρφου και ασθενών I/I ομοζυγωτών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την αξιολόγηση της κλίμακας PANSS (πίνακας 19).

Πίνακας 19. Κλίμακα Αξιολόγησης PANSS στους διαφορετικούς γονοτύπους του 5-HTTLPR

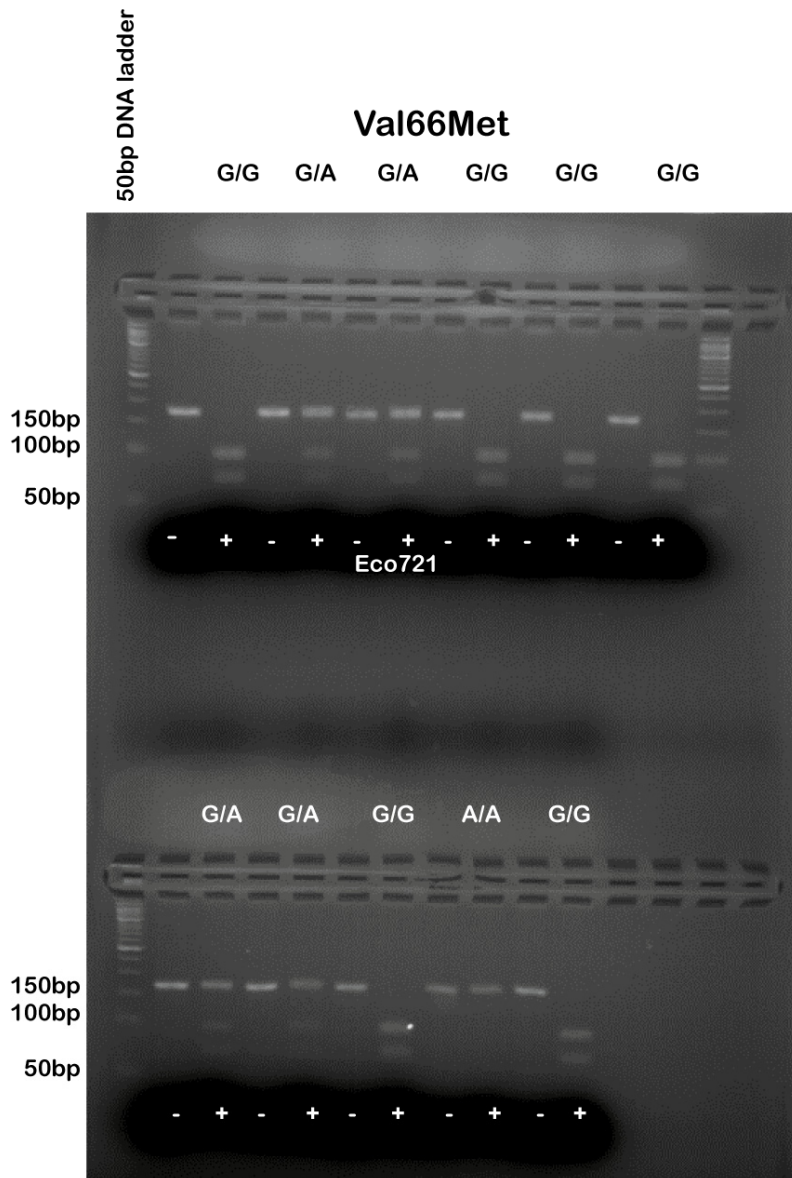
| | I/I | s/I | s/s | (s/s + s/I) | |
|---------------|-------------|-------------|------------|-------------|----|
| PANSSP | 30.27±6.79 | 29.65±6.13 | 29.46±6.45 | 29.57±1.07 | ns |
| PANSSN | 24.93±7.27 | 24.95±7.34 | 24.15±3.91 | 24.64±6.15 | ns |
| PANSST | 96.13±25.25 | 99.75±22.72 | 98±15.12 | 99.06±19.8 | ns |

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας έδειξαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των I/I ομοζυγωτών στους ασθενείς του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε στις γυναίκες και στους άντρες ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, στις γυναίκες όμως, η συχνότητα εμφάνισης των I/I ομοζυγωτών ήταν πιο υψηλή. Η πιθανότητα ενός I/I ομοζυγώτη να παρουσιάζει FEP είναι 2.6 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς s, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων ως προς την ψυχοπαθολογία.

3.5 BDNF

3.5.1 Μέτρηση συγκεντρώσεων στον ορό και προσδιορισμός γονοτύπων στο BDNF για τον πολυμορφισμό Val66Met

Οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι που αφορούν στον πολυμορφισμό Val66Met αποτυπώνονται στην ακόλουθη εικόνα 25.



Εικόνα 25. Φωτογραφία πηκτής αγαρόζης για τον προσδιορισμό BDNF γονοτύπου όπου εμφανίζονται τόσο ομοζυγώτες (G/G, A/A), όσο και ετεροζυγώτες (G/A) όσον αφορά τον πολυμορφισμό BDNF. Ειδικότερα, το κάθε δείγμα απεικονίζεται πριν την πέψη και ακριβώς δίπλα ακολουθεί το ίδιο δείγμα μετά την πέψη. Οι ομοζυγώτες για το A αλληλόμορφο έχουν μια ζώνη στα 171bp, οι ομοζυγώτες για το G αλληλόμορφο δύο ζώνες, στα 99 και 72bp, ενώ οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν και τις 3 ζώνες (72, 99, 171bp).

3.5.2 Παράγοντες που σχετίζονται με το πρώτο επεισόδιο

Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με πρώτο επεισόδιο και των υγιών μαρτύρων για τις διάφορες παραμέτρους που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 20.

Οι ασθενείς και οι υγιείς δεν διέφεραν σημαντικά ως προς την ηλικία και το φύλο, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί έχει πραγματοποιηθεί αντιστοίχιση μεταξύ των δύο ομάδων.

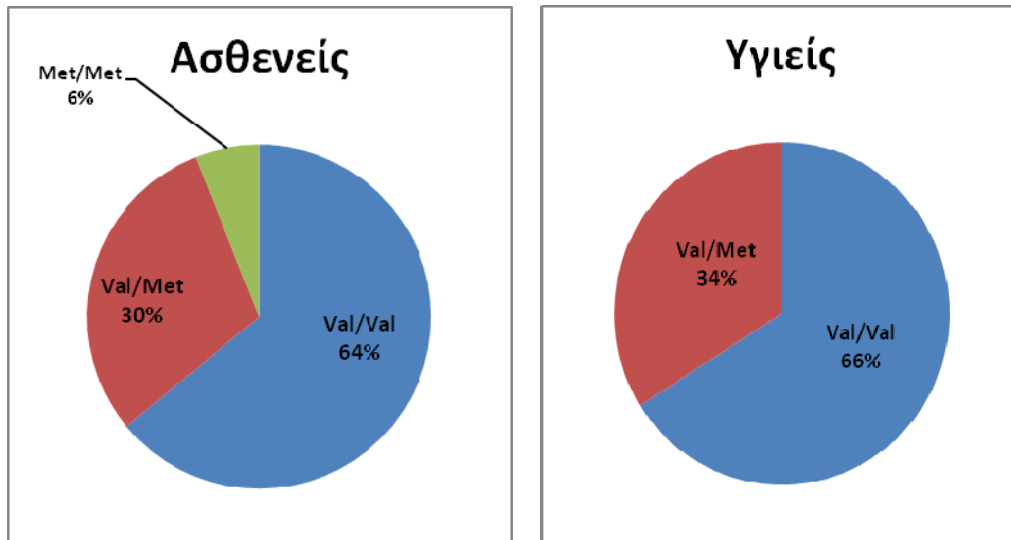
Οι συγκεντρώσεις στον ορό του BDNF, ήταν χαμηλότερες στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές ($p=0.002$). Στους υγιείς συμμετέχοντες, τα επίπεδα στον ορό του BDNF κυμάνθηκαν από 11.20 ως 20.5 ng/μl (διάμεση τιμή 14.61 ng/μl), με 16 άτομα (32%) να έχουν επίπεδα κάτω από το μέσο όρο (14.52 ng/μl). Στην ομάδα των ασθενών, οι συγκεντρώσεις στον ορό κυμάνθηκαν από 6.15 ως 16.25 ng/μl (διάμεση τιμή=12.13 ng/μl), με 24 ασθενείς (48%) να εμφανίζουν επίπεδα κάτω από το μέσο όρο (12.62 ng/μl) (πίνακας 20).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό BDNF Val66Met, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών-υγιών (πίνακας 20, σχήμα 3). Λαμβάνοντας υπόψιν το μικρό αριθμό των ομοζυγωτών ως προς το Met αλληλόμορφο (Met/Met) που εμφανίστηκε μόνο στους ασθενείς (σχήμα 3) πραγματοποιήθηκε σύγκριση (δοκιμασία χ^2) μεταξύ των δύο πληθυσμών ως προς τους φορείς Met αλληλομόρφου και Val/Val ομοζυγωτών, η οποία δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p>0.05$) (πίνακας 20).

Πίνακας 20. Διαφορές μεταξύ ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

| | FEP | Υγιείς | test value | P-value |
|--|--------------|--------------|-----------------------|----------------------------|
| Age | 29.84 ± 8.20 | 31.36 ± 7.96 | -0.940 ^(a) | 0.350 ^(a) |
| Φύλο (γυναίκες) | 16 (32.0%) | 16 (32.0%) | 1.000 ^(b) | 1.000 ^(b) |
| BDNF Val66Met γονότυποι | | | 3.140 ^(b) | 0.208 ^(b) |
| Val/Val | 32 (64%) | 33 (66%) | | |
| Val/Met | 15 (30%) | 17 (34%) | | |
| Met/Met | 3 (6%) | 0 | | |
| Συγκέντρωση στον ορό του BDNF (ng/μl) | 12.62 ± 1.86 | 14.52 ± 2.18 | -4.463 ^(a) | 0.002^(a) |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται είτε επί τοις εκατό (%) ή με τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD)
^(a) δοκιμασία student's t-test; ^(b)δοκιμασία χ^2



Σχήμα 3. Παρουσίαση γονοτύπων: G/G(Val/Val), G/A(Val/Met), A/A(Met/Met) ασθενών με πρώτο επεισόδιο και υγιών εθελοντών

Η πολυπαραγοντική ανάλυση για τον πολυμορφισμό Val66Met, με σκοπό την αναζήτηση στατιστικά σημαντικών δεικτών, που σχετίζονται ανεξάρτητα με την εμφάνιση ενός πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

3.5.3 Διαφορές ως προς την ψυχοπαθολογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό Val66Met στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου

Οι συγκεντρώσεις στον ορό του BDNF συσχετίστηκαν αρνητικά με τα συνολικά ($r=-0.22$), θετικά ($r=-0.135$) και αρνητικά ($r=-0.201$) ψυχωτικά συμπτώματα, όπως εκτιμώνται με την κλίμακα PANSS, αλλά οι συσχετίσεις αυτές δεν απέδωσαν σε στατιστική σημαντικότητα ($p=0.891$, 0.395 και 0.195 , αντίστοιχα).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το μικρό αριθμό των ομοζυγωτών ως προς το Met αλληλόμορφο (Met/Met) ($N=3$), κάτι που έχει επισημανθεί και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις (Minelli et al, 2011), δημιουργήθηκε μια ομάδα με τους ασθενείς με γονότυπο Val/Met και Met/Met. Η ομάδα ονομάστηκε 'φορείς Met αλληλομόρφου'. Πρέπει να τονιστεί ότι ομοζυγώτες Met/Met παρουσιάστηκαν μόνο στην ομάδα των ασθενών και όχι στους υγιείς εθελοντές. Όπως φαίνεται στον πίνακα 21, οι φορείς Met αλληλομόρφου παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις BDNF στον ορό σε σχέση με τους Val/Val ($p=0.018$), καθώς και υψηλότερες τιμές στην PANSS-αρνητική κλίμακα ($p=0.022$). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη συνολική τιμή της κλίμακας PANSS, χωρίς όμως να υπάρχει

στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων που να αφορά στη διάρκεια της μη θεραπευόμενης ψυχωτικής συμπτωματολογίας (DUP). Αντίστοιχη ανάλυση, έγινε και για τους υγιείς εθελοντές. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συγκέντρωση στον ορό του BDNF μεταξύ φορέων Met αλληλομόρφου και Val/Val ομοζυγωτών.

Πίνακας 21. Αλληλόμορφα του BDNF (φορείς Met αλληλομόρφου σε σύγκριση με ομοζυγώτες Val/Val) και δημογραφικές μεταβλητές, τιμές στον ορό του BDNF, κλινική εκτίμηση –PANSS στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου

| FEP patients | Met carriers | Val/Val homozygotes | Test value | P-value |
|---|----------------|---------------------|------------|-----------------------------|
| Ηλικία | 28.16 ± 9.33 | 30.78 ± 7.49 | 1.083 | 0.284 ^(a) |
| Φύλο | | | 0.613 | 0.434 ^(b) |
| Άντρες | 7 (38.88%) | 9 (28.12%) | | |
| Γυναίκες | 11 (61.11%) | 23 (71.87%) | | |
| Συγκέντρωση στον ορό του BDNF | 11.51 ± 2.45 | 13.06 ± 1.61 | 2.46 | 0.018 ^(a) |
| PANSS-Positive | 29.38 ± 6.00 | 30.41 ± 6.79 | 0.533 | 0.596 ^(a) |
| PANSS-Negative | 26.94 ± 5.73 | 23.00 ± 4.91 | -2.366 | 0.022 ^(a) |
| PANSS-Total | 104.29 ± 23.05 | 93.20 ± 16.42 | -1.899 | 0.064 ^(a) |
| Duration of untreated psychosis (DUP-months) | 20.26 ± 19.69 | 25.91 ± 34.13 | -0.643 | 0.523 ^(a) |

Τα δεδομένα παρουσιάζονται είτε επί τοις εκατό (%) ή με τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD)
^(a) δοκιμασία student's t-test; ^(b)δοκιμασία χ^2

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας έδειξαν μειωμένες συγκεντρώσεις του BDNF στον ορό ασθενών πρώτου επεισοδίου, που δεν είχαν λάβει καμία φαρμακευτική αγωγή, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Ως προς τον πολυμορφισμό Val66Met, τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς με πρώτο επεισόδιο και τους υγιείς εθελοντές.

Παρόλο όμως που ο πολυμορφισμός είχε παρόμοια ποσοστά για τον κάθε γονότυπο στους ασθενείς και τους υγιείς, οι ασθενείς-Met φορείς, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα στον ορό του BDNF (σε σύγκριση με τους Val/Val ομοζυγώτες), καθώς και τα υψηλότερα αρνητικά συμπτώματα (όπως μετρήθηκαν με την κλίμακα PANSS).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν:

1. Διαφορές μεταξύ ενός δείγματος υγιών εθελοντών και ασθενών πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου ως προς τη συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμών συγκεκριμένων γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ή πρωτεΐνες που εμπλέκονται **στη ντοπαμινεργική (COMT και MAOB) και σεροτονινεργική λειτουργία (5-HTT)**.
2. Διαφορές μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, σε έναν πολυμορφισμό στο γονίδιο του **νευροτροφικού παράγοντα BDNF**, καθώς και στα επίπεδά του στον ορό.
3. Συσχετίσεις μεταξύ των διαφορών ως προς τους πολυμορφισμούς των συγκεκριμένων γονιδίων και ψυχοπαθολογίας στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου.

Η **κλασική ντοπαμινεργική υπόθεση** για τη σχιζοφρένεια, υποστηρίζει ότι η αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα στις υποφλοιώδεις περιοχές σχετίζεται με τα θετικά συμπτώματα (ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις) ενώ η μειωμένη ντοπαμινεργική λειτουργία σε φλοιώδεις περιοχές σχετίστηκε με τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωστικού τύπου ελλείμματα της νόσου (Weinberger, 1987, Davis et al, 1991). Κλινικές και προκλινικές μελέτες έχουν προβάλει το ρόλο του **σεροτονινεργικού συστήματος** στην παθογένεια και φαρμακοθεραπεία της σχιζοφρένειας (Meltzer et al, 2003; Aghajanian and Marek, 2000; Li et al, 2013). Επίσης οι νευροτροφικοί παράγοντες και ειδικότερα ο **BDNF** εμπλέκονται ενεργά στην ανάπτυξη ψυχιατρικών διαταραχών και ειδικά της σχιζοφρένειας (Bukley et al, 2007, 2011).

Γενετικές προσεγγίσεις έχουν εντοπίσει διαφορές μεταξύ υγιών και σχιζοφρενών πρώτου επεισοδίου σε αρκετούς πολυμορφισμούς, αλλά η εικόνα της γενετικής αποτύπωσης της σχιζοφρένειας και ειδικότερα του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου είναι ακόμη πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, όπως δύσκολη είναι και η συσχέτισή της με την ψυχοπαθολογία και την ακόλουθη φαρμακοθεραπεία (McGuffin et al, 2002).

Λμαβάνοντας υπόψη τις δυσκολίες που υπάρχουν, πολλά δεδομένα οδηγούν προς διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές και γονίδια εμπλεκόμενα στη νόσο. Η δυνατότητα της Γενετικής να συσχετίζει νέα γονίδια και μονοπάτια με την παθογένεια της σχιζοφρένειας, έχει ήδη οδηγήσει σε νέες προοπτικές για νευροβιολογική έρευνα και μπορούμε να

αναμένουμε περισσότερα τα επόμενα χρόνια (Harrison and Owen, 2003). Παράλληλα όμως, θα πρέπει να είμαστε προετοιμασμένοι ότι υπάρχει πολυπλοκότητα σε διάφορα επίπεδα:

- α/ στο επίπεδο του γονιδιώματος, με πολλά γονίδια να εμπλέκονται,
- β/ στο επίπεδο του γονιδίου, με πολλούς πολυμορφισμούς στο ίδιο γονίδιο,
- γ/ στη συσχέτιση γονιδίων-περιβάλλοντος.

Παρόλα αυτά, με την πρόοδο της τεχνολογίας στη γονιδιωματική και σε συνδυασμό με τις ως τώρα γνώσεις, διαγράφονται επιτυχημένες μελλοντικές ερευνητικές προοπτικές. Ας σημειωθεί ότι σήμερα υπάρχουν τρεις κύριες κατευθύνσεις για τον έλεγχο των γονιδίων στη σχιζοφρένεια: α/ η βασιζόμενη σε μελέτες σάρωσης γονιδιώματος, β/ η αναγνώριση χρωμοσωμικών ανωμαλιών που σχετίζονται με σχιζοφρένεια και γ/ οι μελέτες που αφορούν λειτουργικά γονίδια που φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση σχιζοφρένειας (Kirov et al, 2005). Η μελέτη των παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNV), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτές οι παραλλαγές ήταν πιο συχνές στους σχιζοφρενείς ασθενείς από ότι στους υγιείς μάρτυρες (Walsh et al, 2008). Οι παραλλαγές αριθμού αντιγράφων είναι δομικές αλλαγές του DNA (ελλείμματα ή διπλασιασμοί), που έχουν σαν αποτέλεσμα το κύτταρο να έχει μη φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων, ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA. Το μέγεθός τους ποικίλει από μια κιλοβάση έως μερικές μεγαβάσεις. Δυστυχώς όμως και πάλι τα αποτελέσματα δεν ήταν ισχυρά ώστε να δικαιολογήσουν την κληρονομικότητα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των σχιζοφρενών (Vereckzei and Mirnics, 2011).

4.1 Προσδιορισμός γονοτύπου στο γονίδιο της COMT για το πολυμορφισμό Val158Met

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι ασθενείς του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης Val/Val ομοζυγωτών συγκριτικά με τους φορείς Met. Ως προς την ψυχοπαθολογία, ο Val/Val γονότυπος έδειξε να εμφανίζει υψηλότερες συνολικές τιμές στην Κλίμακα Εκτίμησης των Θετικών και Αρνητικών Συμπτωμάτων της Ψύχωσης (PANSST).

Το γονίδιο της COMT έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια ως προς τη συμβολή του στην εμφάνιση της σχιζοφρένειας. Είναι λογικό να υποθεθεί ότι ένας γενετικός

πολυμορφισμός, που επιδρά στην αποτελεσματικότητα των επιπέδων της DA στον προμετωπιαίο φλοιό, θα επηρέαζε την προμετωπιαία παθοφυσιολογία και τη συμπεριφορά ή/και τις διαταραχές της, που ρυθμίζονται από τον προμετωπιαίο φλοιό.

Διάφορες μελέτες έχουν επίσης εστιάσει σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου. Το χαμηλής δραστηριότητας αλληλόμορφο Met βρέθηκε να συνδέεται με αυξημένο όγκο των δύο πλάγιων κοιλιών. Παρόλο που η ομάδα των ασθενών που είχε το Met αλληλόμορφο έδειξε επίσης μειωμένο όγκο φαιάς ουσίας, μόνο η διαφορά στον όγκο των πλάγιων κοιλιών ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα οι φορείς του Met αλληλομόρφου εμφάνισαν 27.29% μεγαλύτερο όγκο πλάγιων κοιλιών από ότι οι ασθενείς με το Val αλληλόμορφο (Crespo Facorro, 2007). Η μεγέθυνση των πλευρικών κοιλιών, τόσο στο πρώτο επεισόδιο όσο και στη χρόνια σχιζοφρένεια, είναι ένα από τα πιο σταθερά ευρήματα στη δομική απεικονιστική έρευνα (Shenton et al, 2001; Vita et al, 2006). Ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφορά στα αλληλόμορφα του πολυμορφισμού Val158Met της COMT μπορεί να επηρεάζει τον όγκο της φαιάς ουσίας και των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου, δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως. Μια πιθανή εξήγηση για το μειωμένο όγκο της φαιάς ουσίας, είναι ότι αφού η COMT καταβολίζει την εξωκυττάρια ντοπαμίνη, τα άτομα με το Met αλληλόμορφο μπορεί να έχουν αυξημένο ντοπαμινεργικό τόνο (Grace, 1991). Έχει προταθεί ότι η υπερντοπαμινεργική κατάσταση που εμφανίζεται στους φορείς του Met αλληλομόρφου, μπορεί να έχει 'νευροτοξική δράση', προκαλώντας κλιμακούμενη μείωση στον εγκεφαλικό όγκο (Keshavan and Hogarty, 1999). Η μειωμένη φαιά ουσία που σχετίζεται με το Met αλληλόμορφο, μπορεί να αντικατοπτρίζει τη σχετικά συντομότερη έναρξη ωρίμανσης του εγκεφάλου (Zinkstock et al, 2006).

Η μεγέθυνση των πλάγιων κοιλιών, έχει επίσης συνδεθεί με τη σοβαρότητα των αρνητικών συμπτωμάτων (Andreasen et al, 1992), με γνωστικού τύπου δυσλειτουργίες (Toulopoulou et al, 2004), καθώς και με φτωχή έκβαση της νόσου (Davis et al, 1998). Διαφορές στο γονότυπο της COMT, έχουν συνδεθεί με κλινικά χαρακτηριστικά (Han et al, 2006) και γνωστικού τύπου ελλείμματα στη σχιζοφρένεια (Egan et al, 2001). Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν οριακές συσχετίσεις μεταξύ των Val/Val ομοζυγωτών (υψηλής δραστηριότητας COMT) και της εμφάνισης θετικών συμπτωμάτων. Ο μικρός αριθμός των ασθενών πρώτου επεισοδίου στο δείγμα μας, υποδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω μελέτης στο συγκεκριμένο ερευνητικό ερώτημα.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα γύρω από τον πολυμορφισμό Val158Met, είναι η πιθανή αλληλεπίδραση του γονιδίου της COMT με άλλους γενετικούς πολυμορφισμούς και/ή περιβαλλοντικές επιδράσεις, όπως έχει προταθεί από ορισμένους συγγραφείς (Craddock et al, 2006, Tunbridge et al, 2006). Η ηλικία παίζει επίσης σημαντικό ρόλο όσον αφορά την επίδραση της COMT. Όπως έχει αναφερθεί, η δραστηριότητα της COMT αυξάνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μέχρι να φτάσει σε ένα όριο στην εφηβεία (Tunbridge et al, 2006b). Συνεπώς στην ενήλικη ζωή, το γονίδιο της COMT έχει μια μέτρια επίδραση στις γνωστικού τύπου λειτουργίες που ελέγχονται από τον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου όμως, η επίδραση είναι μεγαλύτερη και αυτό επιβεβαιώνεται από θετικές (Bearden et al, 2004; Barnett et al, 2007a) και αρνητικές συσχετίσεις (Harris et al, 2005), που έχουν γίνει σε παιδιά και εφήβους, τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιείς εθελοντές.

Η έναρξη της ψύχωσης σε μικρή ηλικία, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκβαση της νόσου. Διάφοροι είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλικία έναρξης. Στις γυναίκες, η ηλικία έναρξης είναι μικρότερη από ότι στους άντρες (Leung and Chue, 2000). Επίσης, όπως έχει βρεθεί μετά από έρευνα σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου, οι Val/Val ομοζυγώτες εμφανίζουν ψύχωση σε μικρότερη ηλικία (Pelayo-Teran et al, 2008). Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση της ηλικίας με τους διαφορετικούς γονοτύπους, ένα γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο μικρό μέγεθος του δείγματος.

Η συσχέτιση της ηλικίας έναρξης της ψύχωσης και της χρήσης κάνναβης, έχει μελετηθεί αρκετά και έχει αποδειχτεί ότι η χρήση κάνναβης οδηγεί σε μικρότερη ηλικία έναρξης (Veen et al, 2004). Η χρήση της κάνναβης, μπορεί να επηρεάσει την ηλικία έναρξης θετικών συμπτωμάτων, σε άτομα που εμφανίζουν κίνδυνο να αναπτύξουν ψύχωση και μπορεί να χειροτερέψουν την έκβαση της νόσου (Degenhardt et al, 2003). Ο γονότυπος της COMT και η αλληλεπίδρασή του με την κάνναβη και την ηλικία έναρξης της ψύχωσης, έχουν μελετηθεί σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου. Έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτοί παράγοντες, αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν την ηλικία έναρξης και την εμφάνιση της ψύχωσης. Καθώς το Met αλληλόμορφο καθυστερεί την έναρξη της ψύχωσης, η παράλληλη χρήση κάνναβης φαίνεται να εξισορροπεί το αποτέλεσμα, αφού δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των γονοτύπων σε σχέση με την ηλικία στην ομάδα των χρηστών. Στην περίπτωση των Val ομοζυγωτών, η μείωση στην ηλικία έναρξης της ψύχωσης στους χρήστες κάνναβης, συνοδεύεται από μικρότερη διάρκεια της μη θεραπευόμενης ψύχωσης.

Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην αύξηση των θετικών συμπτωμάτων που έχει παρατηρηθεί στους χρήστες της κάνναβης, γεγονός που οδηγεί τους ασθενείς ή τις οικογένειές τους σε αναζήτηση ιατρικής βοήθειας σε συντομότερο χρονικό διάστημα (Pelayo Teran et al, 2010). Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει, ότι η χρήση κάνναβης αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης ψυχωτικών συμπτωμάτων σε υγιείς Val/Val ομοζυγώτες (Caspi et al, 2005), ή ότι οι φορείς του Val αλληλομόρφου είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην επίδραση της κάνναβης (Henquet et al, 2006; Henquet et al, 2008b).

Έχουν παρατηρηθεί επίσης διαφορές μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά την COMT. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο φύλων. Ας σημειωθεί όμως ότι εμφανίζεται μια τάση, οι διαφορές ως προς τους Val/Val ομοζυγώτες, να είναι πιο ισχυρές στους άντρες. Οι Chen et al, (2004) σε μελέτη που έκαναν σε μεταθανάτιους εγκεφαλικούς ιστούς, διαπίστωσαν 17% υψηλότερη δραστηριότητα της COMT στον προμετωπιαίο φλοιό στους άντρες (ανεξάρτητα από τους διάφορους πολυμορφισμούς). Οι γενετικές, επιδημιολογικές και άλλες μελέτες, καταλήγουν ότι οι φυλετικές διαφορές στη γενετική δομή πολλών ανθρώπινων φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένων των ψυχιατρικών διαταραχών, είναι κοινές. Η COMT φαίνεται να είναι ένα όμως από τα γονίδια που συμβάλλουν σε αυτούς τους σεξουαλικούς διμορφισμούς (Tunbridge and Harrison, 2011).

Ο πολυμορφισμός Val158Met φαίνεται να επηρεάζει και τα χαρακτηριστικά προσωπικότητας, αν και τα αποτελέσματα των ερευνών δεν βρίσκονται πάντα σε συμφωνία μεταξύ τους. Οι Tsai et al, (2004) έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη συμπεριφορά αναζήτησης (novelty seeking) και συγκεκριμένα υψηλότερες τιμές στον Val/Val γονότυπο, καθώς και με τη συμπεριφορά εξάρτησης που βασίζεται στην ανταμοιβή (reward dependence), όπου παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές στον Val/Met γονότυπο σε νεαρές κινέζες. Σημαντική συσχέτιση των γονοτύπων της COMT με τη συμπεριφορά αποφυγής (harm avoidance) (υψηλότερες τιμές στο Val/Val γονότυπο, χαμηλότερες στον Met/Met και ενδιάμεσες στον Val/Met) βρέθηκε σε γυναίκες από την Κορέα (Kim et al, 2006). Αυτά τα ευρήματα φαίνονται λογικά, καθώς οι Cloninger et al. (1993), πρότειναν ότι υψηλές τιμές στη συμπεριφορά αναζήτησης και ανταμοιβής, συνδέονται με χαμηλά επίπεδα ντοπαμίνης στις συνάψεις, που με τη σειρά τους σχετίζονται με το Val/Val γονότυπο. Αντίθετα, οι Reuter και Hennig (2005) δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων της COMT και των τιμών συμπεριφοράς αναζήτησης σε νεαρούς γερμανούς εθελοντές και των δύο φύλων. Το Val

αλληλόμορφο βρέθηκε επίσης να σχετίζεται με αποδιοργανωμένη συμπεριφορά σε έναν αντρικό ελληνικό πληθυσμό (Stefanis et al, 2004).

Συνοψίζοντας, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι ο πολυμορφισμός Val158Met φαίνεται να συμβάλλει στο γενετικό αποτύπωμα των ασθενών του πρώτου επεισοδίου ενώ μπορεί να συσχετίζεται με την ψυχοπαθολογία και χαρακτηριστικά προσωπικότητας. Η παρούσα έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη, στοχεύοντας κυρίως στα ερωτήματα που αφορούν στη συσχέτιση των διαφορετικών γονοτύπων με την ψυχοπαθολογία και τα χαρακτηριστικά προσωπικότητας.

4.2 Προσδιορισμός γονοτύπου στο γονίδιο της MAOB για το πολυμορφισμό A644G

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι τα πρώτα που συγκρίνουν τη συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών γονοτύπων του πολυμορφισμού A644G της MAOB στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου και τους υγιείς εθελοντές. Στους ασθενείς εμφανίζεται μια αυξημένη τάση υψηλότερης εμφάνισης φορέων G συγκριτικά με τους A/A ομοζυγώτες. Το πιο σημαντικό εύρημα σχετικά με τον πολυμορφισμό A644G της MAOB, σχετίζεται με την ψυχοπαθολογία και το γονότυπο στις γυναίκες. Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα PANSS στους φορείς G συγκριτικά με τους ομοζυγώτες A/A. Είναι πολύ πιθανό, το εύρημα αυτό να υποδηλώνει συσχέτιση αυξημένων επιπέδων ψυχοπαθολογίας με αυξημένη ντοπαμινεργική λειτουργία.

Συνολικά τα αποτελέσματά μας δείχνουν έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας ως προς το αλληλόμορφο G μεταξύ υγιών και ασθενών. Ακόλουθη στατιστική επεξεργασία όμως μόνο στις γυναίκες, έδειξε ότι υπάρχει μια αυξημένη τάση υψηλότερης εμφάνισης φορέων G συγκριτικά με τους A/A ομοζυγώτες και ειδικά στους ασθενείς. Όπως έχει εκτενώς αναφερθεί, το αλληλόμορφο G συνδέεται με υψηλή ντοπαμινεργική λειτουργία. Ας σημειωθεί ότι παρόλο που η A/G αντικατάσταση στο εσώνιο 13 δεν αλλάζει την ακολουθία των αμινοξέων, το G αλληλόμορφο έχει συνδεθεί με χαμηλότερη ενζυμική δραστηριότητα στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ένα cis-ρυθμιστικό στοιχείο που βρίσκεται σε ανισσοροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό στο εσώνιο 13 (Balciuniene et al, 2002). Στη συγκεκριμένη έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε σε μεταθανάτιους ιστούς μετωπιαίου φλοιού, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα mRNA δεν διέφεραν μεταξύ των φορέων G και των φορέων του A αλληλομόρφου. Λόγω όμως του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων (31), οι συγγραφείς δεν αποκλείουν την πιθανότητα να

υπάρχει μικρή διαφορά στα επίπεδα του mRNA που όμως δεν μπορεί να φανεί αν δεν υπάρξει μεγαλύτερο δείγμα. Αυτή όμως η μικρή αλλαγή μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αλλαγή στην ενζυμική δραστηριότητα. Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αιμοπετάλια (Garpenstrand et al, 2000), η συσχέτιση ήταν αντίθετη και οι φορείς του G αλληλομόρφου έδειχναν ελαφρά υψηλότερα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτό όμως δεν είναι παράξενο, αφού έχει από παλιά αναφερθεί ότι η MAOB ρυθμίζεται διαφορετικά στο αίμα και στον εγκέφαλο (Ekblom et al, 1998; Winblad et al, 1979; Young et al, 1986).

Σε συνέπεια με την παραπάνω υπόθεση που αφορά στην προφανή αλλαγή των επιπέδων της ντοπαμίνης η συσχέτιση του G αλληλομόρφου με τη σχιζοφρένεια ελέγχθηκε σε ένα ισπανικό πληθυσμό (Gassó et al, 2008; Karur, 2003). Το αλληλόμορφο αυτό, όπως έδειξαν οι παραπάνω μελέτες σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της σχιζοφρένειας μόνο στις γυναίκες. Επίσης, η συχνότητα του συγκεκριμένου αλληλομόρφου, ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς από ότι στους υγιείς εθελοντές, αλλά δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα αλλά πιθανώς ο περιορισμένος αριθμός δείγματος μας στερεί την εμφάνιση στατιστικής σημαντικότητας.

Όμως αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης σχιζοφρένειας λόγω του G αλληλομόρφου στις γυναίκες μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες, όπως είναι τα επίπεδα των οιστρογόνων που ρυθμίζουν την έκφραση της MAOB (Gundlah et al, 2002). Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φύλων όσον αφορά την ηλικία έναρξης της σχιζοφρένειας, τα συμπτώματα, τη θεραπεία και έχει προταθεί ότι αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στη διαμεσολάβηση των οιστρογόνων (Salem and Kring, 1998; Halbreich and Kahn, 2003). Έχει αναφερθεί σε πειραματικές μελέτες ότι η οιστραδιόλη μπορεί να ρυθμίζει την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση σε διάφορα επίπεδα, όπως η απελευθέρωση, ο μεταβολισμός, η απάντηση των υποδοχέων και η επαναπρόσληψη (Cyr et al, 2000). Η MAOB μπορεί λοιπόν να είναι ένας από τους πολλούς παράγοντες που φαίνεται να είναι υπεύθυνοι για το σεξουαλικό διμορφισμό που παρατηρείται στην σχιζοφρένεια. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φύλου και πολυμορφισμού A644G δεν έχει μελετηθεί επαρκώς σε μελέτες που αφορούν σε σχιζοφρενείς. Ενδιαφέρουσες όμως μελέτες σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, η οποία είναι μια νευρολογική διαταραχή που επίσης σχετίζεται με την ντοπαμινεργική λειτουργία, έδειξαν συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A644G και του φύλου (Kelada et al, 2002, Preisig et al, 2000).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε ένα κινεζικό πληθυσμό, όπου

επιπλέον ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη συχνότητα του G αλληλομόρφου τόσο στις γυναίκες όμως όσο και στους άντρες (Wei et al, 2011).

Υπάρχουν λοιπόν αρκετά δεδομένα που δείχνουν την πιθανή εμπλοκή της MAOB στη σχιζοφρένεια και γι αυτό θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν και άλλοι πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου σε μελλοντικές μελέτες με υψηλότερο αριθμό δειγμάτων.

4.3 Προσδιορισμός γονοτύπου στον μεταφορέα της 5-HT για τον πολυμορφισμό 5-HTT-linked polymorphic region, 5-HTTLPR

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας έδειξαν ότι οι ασθενείς του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των l/l ομοζυγωτών συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε στις γυναίκες και στους άντρες ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου αλλά στις γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης των l/l ομοζυγωτών ήταν πιο υψηλή.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο γονότυπος l/l οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα λειτουργίας και έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερη επαναπρόσληψη σεροτονίνης σε σύγκριση με τη βραχεία μορφή (Collier et al, 1996; Greenberg et al, 1999; Heils et al, 1996, 1997; Little et al, 1998). Συγκεκριμένα οι Heils et al. (1996), βρήκαν ότι η βασική δραστηριότητα του l αλληλομόρφου ήταν πάνω από διπλάσια από εκείνη του s αλληλομόρφου.

Οριακού τύπου συσχετίσεις των διαφορετικών αλληλομόρφων του 5-HTT έχουν βρεθεί για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR από τους Mata et al, (2004). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε, όπως και στην παρούσα εργασία, ελαφρώς υψηλότερη συχνότητα του μακρού (l) αλληλομόρφου στους ασθενείς. Αυτές οι συχνότητες διαφέρουν ελαφρώς από αυτές που παρατηρήθηκαν σε άλλους πληθυσμούς (Gutierrez et al, 1998) κι αυτό μπορεί να οφείλεται σε ετερογένεια του δείγματος.

Σε μια άλλη μελέτη (Goldberg et al, 2009), βρέθηκε επίσης ότι το l αλληλόμορφο του πολυμορφισμού 5-HTTLPR συσχετίζεται με σοβαρότερη ψυχοπαθολογία, που περιλαμβάνει κατάθλιψη και αρνητικά συμπτώματα, στους ψυχωτικούς ασθενείς. Γενικότερα το συγκεκριμένο αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με κατάθλιψη (Du et al, 1999) περιορισμένη συναισθηματική ανταπόκριση, ή/και δυσφορία (Goldberg et al, 2009) ενώ έχει επίσης αναφερθεί ότι το s αλληλόμορφο σχετίζεται με συναισθητικού τύπου συμπτωματολογία (Arango et al, 2003).

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα οι Malhotra et al, (1998) ανέφεραν ότι το I αλληλόμορφο συσχετίζεται με υψηλότερη ψυχοπαθολογία ως προς τα θετικά και αρνητικά συμπτώματα. Επίσης, υποστηρίχθηκε ότι οι I/I ομοζυγώτες ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφανίζουν υψηλότερη ψυχοπαθολογία ως προς τα θετικά συμπτώματα (Golimbet et al, 2004).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του εξεταζόμενου πολυμορφισμού 5-HTTLPR και της ψυχοπαθολογίας. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στη σύσταση του δείγματος (ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου) και επίσης στον μικρό αριθμό του δείγματος.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν λίγες μελέτες οι οποίες να εστιάζουν σε ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου και την εμπλοκή του 5-HTTLPR και οι περισσότερες κυρίως εξετάζουν τη συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού και την ακόλουθη απόκριση στην αντιψυχωτική θεραπεία.

Ειδικότερα αναφέρθηκε ότι οι ασθενείς που είναι ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR (s/l), είχαν καλύτερη απόκριση όσον αφορά τα αρνητικά συμπτώματα και έδειξαν ικανοποιητικότερη εξέλιξη μετά από 6 εβδομάδες αντιψυχωτικής θεραπείας. Όταν στη συγκεκριμένη έρευνα οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο για τους ασθενείς που λάμβαναν ολανζαπίνη, οι ετερόζυγοι ασθενείς (s/l) εμφάνισαν υψηλότερη πιθανότητα να παρουσιάζουν καλή απόκριση στη γενική ψυχοπαθολογία, ως προς τα αρνητικά και τα θετικά συμπτώματα (Vazquez-Bourgon et al, 2010).

Σε παλιότερη μελέτη σε καυκάσιο πληθυσμό (Dolzan et al, 2008), υποστηρίχθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βραχέος(s) αλληλομόρφου και του s/s γονοτύπου με μειωμένη βελτίωση μετά από χορήγηση ρισπεριδόνης ή αλοπεριδόλης. Επίσης σε μελέτη σε κινεζικό πληθυσμό, βρέθηκε συσχέτιση του I αλληλομόρφου και καλύτερης απόκρισης στη ρισπεριδόνη (Wang et al, 2007). Πάντως η απόκριση στη σχιζοφρένεια είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία, που δεν μπορεί να εξηγηθεί σαν το αποτέλεσμα που προκύπτει από αλλαγή ενός μόνο γενετικού τόπου.

Οι έρευνες που έχουν γίνει σε χρόνιους ασθενείς (όχι σε ασθενείς που εκδήλωσαν το πρώτο τους επεισόδιο), δείχνουν διαφορετικά αποτελέσματα: άλλες αναφέρουν μια συσχέτιση μεταξύ του I αλληλομόρφου και καλύτερης απόκρισης στη θεραπεία (Agran et al, 2000, Bozina et al, 2007), ενώ άλλες δεν διαπιστώνουν καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Tsai et al, 2000, Kaiser et al, 2001). Πιθανές εξηγήσεις για τα αντικρουόμενα

αυτά αποτελέσματα, μπορεί να είναι η ετερογένεια των δειγμάτων και οι διαφορετικές μέθοδοι εκτίμησης αυτών των μελετών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δείχνουν οριακές αλλά στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του πολυμορφισμού 5-HTTLPR με τη σχιζοφρένεια και υποδεικνύουν τη συμβολή του στη διαταραχή. Μελλοντικές προσεγγίσεις με αυξημένο αριθμό δείγματος οφείλουν να πραγματοποιηθούν για να ενισχύσουν τα συγκεκριμένα ευρήματα, να αποδώσουν συσχετίσεις μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού και της ψυχοπαθολογίας και να συνδυάσουν τους συγκεκριμένους γονοτύπους με την απόκριση στην ακόλουθη φαρμακοθεραπεία.

4.4 Συγκεντρώσεις BDNF στον ορό και γονότυπος BDNF για τον πολυμορφισμό Val66Met

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι ασθενείς πρώτου επεισοδίου, που δεν είχαν λάβει καμία φαρμακευτική αγωγή, παρουσίασαν μειωμένες τιμές της συγκέντρωσης του BDNF στον ορό σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές (Sotiropoulou et al, 2013). Τα συγκεκριμένα ευρήματα είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου (Buckley et al, 2007a, Chen et al, 2009, Green et al, 2011, Jindal et al, 2010, Palomino et al, 2006, Rizos et al, 2008, 2011). Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι μειωμένα επίπεδα έκφρασης του BDNF, παρατηρήθηκαν σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των επιπέδων των υγιών εθελοντών (Mondelli et al, 2011).

Όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του BDNF στον ορό και της ψυχωτικής συμπτωματολογίας στην ομάδα των ασθενών πρώτου επεισοδίου, τα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία δεν φαίνεται να είναι ξεκάθαρα (Jindal et al, 2010). Τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση, ενώ ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων BDNF και θετικών τιμών της PANSS (Buckley et al, 2007a, Pillai et al, 2010) και άλλες έχουν αναφέρει θετική συσχέτιση (Chen et al, 2009). Μια πρόσφατη δημοσίευση αναφέρει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του BDNF στον ορό και των τιμών τόσο της θετικής όσο και της αρνητικής υποκλίμακας της PANSS (Rizos et al, 2008). Είναι προφανές ότι προκειμένου να διευκρινιστεί με σαφήνεια η συσχέτιση των επιπέδων του BDNF στον ορό και της ψυχωτικής ψυχοπαθολογίας, χρειάζονται περισσότερες ερευνητικές μελέτες. Πρέπει όμως να επισημανθεί, ότι όλοι οι

ασθενείς που συμμετείχαν στις μελέτες που αναφέρονται παραπάνω (καθώς και στη δική μας) δεν είχαν λάβει ποτέ φαρμακευτική αγωγή κι αυτό κάνει πολύ σημαντική τη συμβολή των συγκεκριμένων ερευνών στο συγκεκριμένο πεδίο, καθώς η χορήγηση άτυπων αντιψυχωτικών φαρμάκων φαίνεται να επαναφέρει στα φυσιολογικά τα επίπεδα της συγκεντρώσεως του BDNF στον ορό (Gonzalez-Pinto et al, 2010).

Σχετικά με τον πολυμορφισμό Val66Met, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι ασθενείς με πρώτο επεισόδιο δεν παρουσιάζουν διαφορές συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές. Παρόλο όμως που ο πολυμορφισμός είχε παρόμοια ποσοστά για τον κάθε γονότυπο στους ασθενείς και στους υγιείς, τα χαμηλότερα επίπεδα στον ορό του BDNF καθώς και τα υψηλότερα αρνητικά συμπτώματα (όπως μετρήθηκαν με την κλίμακα PANSS), εμφανίστηκαν μόνο στους φορείς του Met αλληλομόρφου στους ασθενείς πρώτου επεισοδίου. Αυτά τα ευρήματα φαίνεται να επιβεβαιώνουν εν μέρει την υπόθεσή μας ότι υψηλότερες τιμές αρνητικών ψυχωτικών συμπτωμάτων σε συνδυασμό με χαμηλότερες συγκεντρώσεις BDNF, χαρακτηρίζουν μόνο τους φορείς του Met αλληλομόρφου στους ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου. Τα αποτελέσματα μίας μετα-ανάλυσης που βασίστηκαν σε συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και υγιών εντοπίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σχιζοφρένειας (19%) στους Met/Met ομοζυγώτες σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες Val/Met (Gratacos et al, 2007). Επιπλέον, τόσο οι υγιείς εθελοντές όσο και οι ασθενείς με σχιζοφρένεια που διαθέτουν το Met αλληλόμορφο, εμφάνισαν γνωστικού τύπου ελλείμματα και μικρότερο όγκο στον ιπόκαμπο (Egan et al, 2003, Hariri et al, 2003, Szeszko et al, 2005, Zhang et al, 2012).

Η συσχέτιση όμως του πολυμορφισμού Val66Met με τα επίπεδα του BDNF στον ορό, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Έχει προταθεί ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (στο κωδικόνιο 66), επηρεάζει την έκκριση του ώριμου BDNF (Egan et al, 2003). Σε μια πρόσφατη μελέτη και μετα-ανάλυση, αναφέρθηκε έλλειψη συσχέτισης μεταξύ του BDNF στον ορό και του πολυμορφισμού Val66Met (Terracciano et al, 2011b). Οι Zhang et al, (2012) ανέφεραν μια ασαφή σχέση μεταξύ των επιπέδων στον ορό του BDNF και των γνωστικών λειτουργιών στα διάφορα αλληλόμορφα του BDNF. Επίσης, μειωμένες συγκεντρώσεις BDNF παρατηρήθηκαν σε Val/Val ομοζυγώτες όταν συγκρίθηκαν με τους Val/Met συμμετέχοντες (Lang et al, 2009). Μια άλλη μελέτη, πάντως ανέφερε μια αλληλεπίδραση μεταξύ γονοτύπου και φύλου στα επίπεδα του BDNF στον ορό, δείχνοντας αυξημένα επίπεδα BDNF σε υγιείς αρσενικούς φορείς του Met αλληλομόρφου (Bus et al,

2012). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι προηγούμενες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα υγιών εθελοντών.

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη συσχέτισε τα μειωμένα επίπεδα του BDNF στον ορό με χαρακτηριστικά προσωπικότητας που συνδέονται με το άγχος και ενίσχυσε την υπόθεση ότι οι φορείς Met του πολυμορφισμού Val66Met είναι πιο ευαίσθητοι σε αλλαγές των επιπέδων του BDNF που προκαλούνται από το στρες (Minelli et al, 2011). Αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν επίσης σημαντικές διαφοροποιήσεις στα χαρακτηριστικά προσωπικότητας μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών. Ειδικότερα οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό του BDNF και οι υψηλότερες τιμές στην κλίμακα Νευρωτισμού διαχώρισαν με επιτυχία τους ασθενείς από τους υγιείς εθελοντές (Sotiropoulou et al, 2013). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενες θεωρίες που συσχετίζουν το BDNF με τη σχιζοφρένεια και ενισχύουν τις γνώσεις μας γύρω από τη συσχέτιση χαρακτηριστικών προσωπικότητας που σχετίζονται με το άγχος και την έναρξη της ψύχωσης. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα ερωτήματα χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την εμπλοκή του BDNF στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (Buckley et al, 2011), θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι τα μειωμένα επίπεδα BDNF στον ορό που αντανακλούν μη φυσιολογική λειτουργία του BDNF στο ΚΝΣ (Pillai et al, 2010), μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτης της σχιζοφρένειας ο οποίος σχετίζεται με διαδικασίες νευροπλαστικότητας που διαταράσσονται κατά την ανάπτυξη της ψύχωσης. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του BDNF στον ορό θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο συσχέτισης με την ψυχωτική συμπτωματολογία, ειδικά στους φορείς του Met αλληλομόρφου, που εμφανίζουν ένα διαφοροποιημένο προφίλ συγκριτικά με τους Val/Val ομοζυγώτες.

Αν λοιπόν η σχιζοφρένεια εμφανίζει 81% κληρονομικότητα, πού είναι τα βασικά εμπλεκόμενα με τη νόσο γονίδια; Η απάντηση στο ερώτημα είναι ότι μάλλον δεν υπάρχει κανένα που να συμμετέχει σε μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων. Το πρόβλημα μπορεί να εξηγηθεί με την πολυπλοκότητα της Βιολογίας και όχι με την έλλειψη των κατάλληλων τεχνικών. Θα πρέπει να δεχτούμε ότι η μελέτη της γενετικής της σχιζοφρένειας δεν πρόκειται να μας οδηγήσει σε ανακάλυψη υπεύθυνων γονιδίων-στόχων για τα φάρμακα ή αξιόπιστων γενετικών τεστ που θα προβλέπουν ποιοι θα εμφανίσουν σχιζοφρένεια. Η Γενετική είναι τόσο πολύπλοκη, ώστε το γενετικό υπόβαθρο σε συνδυασμό με τις περιβαλλοντικές επιδράσεις και την ευρύτητα των κλινικών διαγνώσεων, κάνει πολύ

δύσκολη την γενίκευση ατομικών ευρημάτων σε ολόκληρο τον πληθυσμό των σχιζοφρενών.

Τα τελευταία χρόνια, η εξατομικευμένη ιατρική και θεραπεία, αρχίζουν να καταλαμβάνουν κεντρικό ρόλο. Οι θεραπείες θα πρέπει να είναι προσαρμοσμένες για κάθε ασθενή προκειμένου να είναι περισσότερο αποτελεσματικές. Εδώ βρίσκεται το μέλλον της ψυχιατρικής γενετικής: προβλέποντας τη σχέση μεταξύ γενετικής και φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής, η φαρμακογενετική μπορεί να δώσει θεραπευτικές απαντήσεις (Vereckzei and Mirnics, 2011).

Το θέμα της διαφορετικής απόκρισης στο περιβάλλον είναι πολύ σημαντικό για την αντιμετώπιση του πρώτου επεισοδίου, καθώς η μεγάλη πρόκληση είναι να διακριθούν όσο το δυνατόν γρηγορότερα οι ασθενείς που κινδυνεύουν να μεταβούν από πρώιμες, μη ειδικές ψυχωτικές εμπειρίες σε πλήρη ψυχωτική διαταραχή. Συνεπώς, ο συνδυασμός των γενετικών κινδύνων, - είτε μετρώντας τους απ' ευθείας σαν γενετικούς πολυμορφισμούς, είτε έμμεσα σαν ενδοφαινοτύπους – με την έκθεση σε επικίνδυνα περιβάλλοντα, ώστε να γίνονται πιο ακριβείς προβλέψεις, είναι η μεγαλύτερη ελπίδα ανάπτυξης μεθόδων έγκαιρης παρέμβασης και θεραπείας στην ψύχωση.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν σε ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, πολυμορφισμοί τεσσάρων διαφορετικών γονιδίων (Val158Met της COMT, A644G της MAOB, 5-HTTLPR του 5-HTT και A644G της MAOB), που από τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία φαίνεται να εμπλέκονται στη σχιζοφρένεια. Επίσης, εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν τα επίπεδα στον ορό του BDNF σε υγιείς και ασθενείς. Τέλος, ελέγχθηκαν πιθανές διαφορές στην ψυχοπαθολογία των ασθενών ανάλογα με τους διαφορετικούς γονοτύπους τους.

Τα αποτελέσματά μας ως προς τους πολυμορφισμούς, έδειξαν τα εξής:

- Όσον αφορά τον πολυμορφισμό Val158Met της COMT, βρέθηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των Val/Val ομοζυγωτών στους ασθενείς. Η πιθανότητα ενός Val/Val ομοζυγώτη να εμφανίζει πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, βρέθηκε να είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς Met.
- Στον πολυμορφισμό 5-HTTLPR, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των I/I ομοζυγωτών στους ασθενείς του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου. Η πιθανότητα ενός I/I ομοζυγώτη να εκδηλώσει πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, είναι 2.6 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς s, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του.

Ως προς τις συγκεντρώσεις στον ορό του BDNF, τα αποτελέσματά μας έδειξαν μειωμένες συγκεντρώσεις στον ορό ασθενών πρώτου επεισοδίου, που δεν είχαν λάβει καμία φαρμακευτική αγωγή, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Ειδικότερα, οι ασθενείς-Met φορείς, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα στον ορό του BDNF σε σύγκριση με τους Val/Val ομοζυγώτες.

Οι διαφορές στην ψυχοπαθολογία που σχετίζονται με το γονότυπο, βρέθηκαν σε δύο από τους τέσσερις πολυμορφισμούς. Συγκεκριμένα:

- Όσον αφορά τον πολυμορφισμό Val158Met της COMT, παρατηρήθηκαν ως προς τη συνολική τιμή στην Κλίμακα Εκτίμησης των Θετικών και Αρνητικών Συμπτωμάτων της Ψύχωσης (PANSST), αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς Val/Val ομοζυγώτες, συγκριτικά με τους φορείς Met.

- Στον πολυμορφισμό A644G της MAOB, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα PANSST στις γυναίκες φορείς G συγκριτικά με τους ομοζυγώτες A/A.
- Στον Val66Met πολυμορφισμό του BDNF, οι ασθενείς Met φορείς, εμφάνισαν τα υψηλότερα αρνητικά συμπτώματα (PANSSN).

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα αποτελέσματά μας συνεισφέρουν στην αποτύπωση του γενετικού προφίλ του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου και παρέχουν νέες πληροφορίες, αφού ορισμένα από αυτά ελέγχονται για πρώτη φορά σε ασθενείς πρώτου επεισοδίου.

Υπάρχουν όμως κάποιοι σοβαροί περιορισμοί στη μελέτη μας, που θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνει με προσοχή, λόγω του περιορισμένου μεγέθους του δείγματος και του σχεδιασμού της συγχρονικής μελέτης. Παρόλα αυτά, η μελέτη μας είναι ισχυρή, αφού περιλαμβάνει δείγμα υγιών εθελοντών, οι ασθενείς δεν έχουν λάβει ποτέ πριν αντιψυχωτική θεραπεία, έχει γίνει χρήση έγκυρων και ευρέως αποδεκτών ερωτηματολογίων και τέλος όλοι οι ασθενείς έχουν εξεταστεί από τους ίδιους έμπειρους ψυχιάτρους. Πάντως, χρειάζονται περισσότερες μελέτες βασισμένες σε μεγαλύτερο μέγεθος δειγμάτων, στις οποίες θα έχουν συνεκτιμηθεί τόσο τα κλινικά δεδομένα, όσο και οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, εστίασαμε στην εξέταση δύο ντοπαμινεργικών δεικτών, ενός σεροτονινεργικού και μιας νευροτροφίνης, σε σχιζοφρενείς ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου και σε υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα, ελέγξαμε πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών, για τους πολυμορφισμούς Val158Met της COMT και A644G της MAOB υπομορφής (ντοπαμινεργικοί δείκτες), για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR του μεταφορέα της σεροτονίνης 5-HT (σεροτονινεργικός δείκτης), καθώς και για τον πολυμορφισμό Val66Met του BDNF (νευροτροφίνη). Επίσης, ελέγξαμε πιθανές διαφορές στα επίπεδα στον ορό του BDNF μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών. Τέλος, εξετάσαμε την ύπαρξη διαφορών στην ψυχοπαθολογία των ασθενών, που να σχετίζονται με τους διαφορετικούς γονοτύπους σε κάθε πολυμορφισμό.

Τα αποτελέσματά μας ως προς τον πολυμορφισμό Val158Met της COMT, έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των Val/Val ομοζυγώτων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές. Η πιθανότητα ενός Val/Val ομοζυγώτη να εκδηλώσει πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, είναι 2.2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς Met, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του.

Στον πολυμορφισμό A644G της MAOB, δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα ως προς το αλληλόμορφο G μεταξύ υγιών και ασθενών. Το ενδιαφέρον εύρημα σχετικά με τον πολυμορφισμό A644G της MAOB, αφορά τις γυναίκες, όπου παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές της PANSS στους φορείς G, συγκριτικά με τους ομοζυγώτες A/A.

Για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των l/l ομοζυγώτων στους ασθενείς. Η πιθανότητα ενός l/l ομοζυγώτη να εκδηλώσει πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, είναι 2.6 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους φορείς s.

Ως προς τον πολυμορφισμό Val66Met, τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς με πρώτο επεισόδιο και τους υγιείς εθελοντές. Στον ορό ασθενών πρώτου επεισοδίου, εμφανίστηκαν μειωμένες συγκεντρώσεις του BDNF, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Οι ασθενείς Met φορείς, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα στον ορό του BDNF (σε σύγκριση με τους Val/Val ομοζυγώτες), καθώς και υψηλότερη αρνητική τιμή στην κλίμακα PANSS.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας συμβάλλουν στην προσπάθεια της κατανόησης των πολύπλοκων μηχανισμών που ελέγχουν τη σχιζοφρένεια σε γενετικό επίπεδο. Καθώς όμως η ασθένεια αυτή είναι πολύπλοκη, θα πρέπει πάντα να λαμβάνουμε υπ' όψιν ότι δεν καθορίζεται από ένα μόνο γονίδιο, ότι οι περιβαλλοντικές επιδράσεις είναι εξίσου σημαντικός παράγοντας και ότι η γενίκευση ατομικών ευρημάτων σε ολόκληρο τον πληθυσμό των σχιζοφρενών, λόγω και της ευρύτητας των κλινικών διαγνώσεων, είναι πολύ δύσκολη.

7. ABSTRACT

NEUROBIOLOGICAL PARAMETERS IN FIRST PSYCHOTIC EPISODE DRUG NAÏVE SCHIZOPHRENIC PATIENTS

MARIANTHI SOTIROPOULOU

The aim of this study was to investigate four polymorphisms (Val158Met, A644G, 5-HTTLPR and Val66Met) in COMT, MAOB, 5-HTT and BDNF genes respectively, in drug-naïve schizophrenic patients with first-episode psychosis (FEP) and healthy participants. In addition, serum BDNF levels were compared between patients and healthy participants. Finally, differences in patients' psychopathology related to different genotypes, have been investigated for each polymorphism. This cross-sectional study, included 67 FEP patients recruited by the Early Intervention Service (EIS) for Psychosis of the Department of Psychiatry, Medical School, University of Ioannina, Greece and 76 healthy participants, who served as controls.

Concerning Val158Met polymorphism, FEP patients presented a higher frequency of Val/Val homozygotes than healthy participants. The odds of being assessed with FEP, were 2.2 times higher in Val/Val patients. Moreover, Val/Val patients presented higher PANSS total scores, as compared to Met carriers.

There was not any statistically significant difference concerning A644G polymorphism.

Concerning 5-HTTLPR polymorphism, our results presented a higher frequency of l/l homozygotes in FEP patients. The odds of being assessed with FEP were 2.6 times higher in patients with an l/l genotype.

As far as Val66Met polymorphism is concerned, there weren't any differences between patients and healthy participants. FEP patients presented lower BDNF serum concentrations, as compared to healthy participants. In particular, Met carriers had lower BDNF serum concentrations and higher PANSS-Negative Syndrome Scale scores than Val/Val homozygotes.

Present results confirm and extend previous findings related to the complex genetic substrate underlying schizophrenia and first psychotic episode. However, our study has specific limitations which need to be carefully addressed. In particular, current findings

must be carefully interpreted due to the cross-sectional design of the study and the limited sample size.

On the other hand, strengths of our study include the healthy control sample, the use of widely used validated questionnaires and the fact that our patients were drug-naive, and they were assessed by the same experienced clinicians.

Nevertheless, further prospective studies based on larger sample sizes adequately powered with specific clinical assessments and gene-environment interactions, are needed to replicate and extend current findings.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abi-Dargham A, Laruelle M, Aghajanian GK et al. The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **1997**; 9(1):1-17.
- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**; 97(14):8104–8109.
- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev* **2000**; 31(2-3):302-312.
- Agid O, Kapur S, Remington G. Emerging drugs for schizophrenia. *Expert Opin Emerg Drugs* **2008**; 13(3):479-495.
- Aguilera M, Barrantes-Vidal N, Arias B, et al. Putative role of the COMT gene polymorphism (Val158Met) on verbal working memory functioning in a healthy population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2008**; 147B(6):898-902.
- Albert PR. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *J Psychiatry Neurosci* **2011**; 36(6):363-365.
- Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* **2003**; 60(6):565–571.
- Allen MH, Currier GW, Carpenter D et al. Expert Consensus Panel for Behavioral Emergencies 2005. The expert consensus guideline series. Treatment of behavioral emergencies 2005. *J Psychiatr Pract* **2005**; 11 Suppl 1:5-108; quiz 110-112.
- Alleva E, Francia N. Psychiatric vulnerability: suggestions from animal models and role of neurotrophins. *Neurosci Biobehav Rev* **2009**; 33(4):525–536.
- Altshuler D, Daly M, Kruglyak L. Guilt by association. *Nat Genet* **2000**; 26(2):135-137.
- Andreasen NC, Cohen G, Harris G et al. Image processing for the study of brain structure and function: problems and programs. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **1992**; 4(2):125-133.
- Angelucci F, Mathe AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Prog Brain Res* **2004**; 146:151–165.
- Angelucci F, Brenè S, Mathé AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* **2005**; 10(4):345-352.

- Arango V, Huang YY, Underwood MD et al. Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res* **2003**; 37(5):375-386.
- Araga US, Narasu ML. Association between the 102T/C polymorphism of serotonin-2A receptor gene and schizophrenia among south Indians. *Mol Psychiatry* **2002**; 7(6):540-541.
- Arbuthnott GW, Fairbrother IS, Butcher SP. Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by 'in vivo' brain microdialysis. *Pharmacol Ther* **1990**; 48(3):281-293.
- Arias I, Sorlozano A, Villegas E et al. Infectious agents associated with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* **2012**; 136(1-3):128-136.
- Arranz MJ, Bolonna AA, Munro J et al. The serotonin transporter and clozapine response. *Mol Psychiatry* **2000**; 5(2):124-125.
- Arranz, MJ, de Leon, J. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research. *Mol Psychiatry* **2007**; 12(8):707-747.
- Asmussen MA, Clegg MT. Use of restriction fragment length polymorphisms for genetic counseling: population genetic considerations. *Am J Hum Genet* **1982**; 34(3):369-380.
- Azzam A, Mathews CA. Meta-analysis of the association between the catecholamine-O-methyl-transferase gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2003**; 123B(1):64-69.
- Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2002**; 7(4):405-411.
- Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L et al. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet* **2002**; 110(1):1-7.
- Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res* **1994**; 390:45-56.
- Barnett JH, Heron J, Ring SM et al. Gender-specific effects of the catechol-o-methyltransferase Val108/158Met polymorphism on cognitive function in children. *Am J Psychiatry* **2007a**; 164(1):142-149.
- Barnett JH, Jones PB, Robbins TW et al. Effects of the catechol-o-methyltransferase Val(158)Met polymorphism on executive function: A meta-analysis of the Wisconsin Card Sort Test in schizophrenia and healthy controls. *Mol Psychiatry* **2007b**; 12(5):502-509.

- Bearden CE, Jawad AF, Lynch DR et al. Effects of a functional COMT polymorphism on prefrontal cognitive function in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* **2004**; 161(9):1700–1702.
- Beauchamp MC, Lecomte T, Lecomte C et al. Do people with a first episode of psychosis differ in personality profiles? *Schizophr Res* **2006**; 85(1-3):162–167.
- Bellivier F, Laplanche JL, Leboyer M et al. Serotonin transporter gene and manic depressive illness: an association study. *Biol Psychiatry* **1997**; 41(6):750-752.
- Benkelfat C. Serotonergic mechanisms in psychiatric disorders: new research tools, new ideas. *Int Clin Psychopharmacol* **1993**; 2:53-56.
- Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E et al. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* **2001**; 276(26):24232-24241.
- Bertolino A, Caforio G, Blasi G et al. Interaction of COMT (Val(108/158)Met) genotype and olanzapine treatment on prefrontal cortical function in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* **2004**; 161(10):1798-1805.
- Bertolino A, Caforio G, Blasi G et al. COMT Val158Met polymorphism predicts negative symptoms response to treatment with olanzapine in schizophrenia. *Schizophr Res* **2007**; 95(1-3):253-255.
- Bilder RM, Volavka J, Czobor P et al. Neurocognitive correlates of the COMT Val(158)Met polymorphism in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* **2002**; 52(7):701–707.
- Blasi G, Mattay VS, Bertolino A et al. Effect of catechol-o-methyltransferase val158met genotype on attentional control. *J Neurosci* **2005**; 25(20):5038–5045.
- Bombin I, Arango C, Mayoral M et al. DRD3, but not COMT or DRD2, genotype affects executive functions in healthy and first-episode psychosis adolescents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2008**; 147B(6):873-879.
- Bozina N, Medved V, Kuzman MR, Sain I, Sertic J. Association study of olanzapine-induced weight gain and therapeutic response with SERT gene polymorphisms in female schizophrenic patients. *J Psychopharmacol* **2007**; 21(7):728-734.
- Breier A. Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. *Schizophr Res* **1995**; 14(3):187-202.

- Brito V, Beyer C, Küppers E. BDNF-dependent stimulation of dopamine D5 receptor expression in developing striatal astrocytes involves PI3-kinase signaling. *Glia* **2004**; 46(3):284-295.
- Bruder GE, Keilp JG, Xu H et al. catechol-o-methyltransferase (COMT) genotypes and working memory: associations with differing cognitive operations. *Biol Psychiatry* **2005**; 58(11):901-907.
- Buckley PF, Pillai A, Evans D et al. Brain derived neurotrophic factor in first episode psychosis. *Schizophr Res* **2007a**; 91(1-3):1-5.
- Buckley PF, Mahadik S, Pillai A et al. Neurotrophins and schizophrenia. *Schizophr Res* **2007b**; 94 (1-3):1-11.
- Buckley PF, Pillai A, Howell KR. Brain-derived neurotrophic factor: findings in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* **2011**; 24(2):122-127.
- Buonanno A, Fischbach GD. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **2001**; 11(3):287-296.
- Bus BA, Arias-Vasquez A, Franke B et al. Increase in serum brain-derived neurotrophic factor in met allele carriers of the BDNF Val66Met polymorphism is specific to males. *Neuropsychobiology* **2012**; 65(4):183-187.
- Cannon M, Clarke MC. Risk for schizophrenia--broadening the concepts, pushing back the boundaries. *Schizophr Res* **2005**; 79(1):5-13.
- Carrera N, Sanjuán J, Moltó MD et al. Recent adaptive selection at MAOB and ancestral susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **2009**; 150B(3):369-374.
- Carter JW, Schulsinger F, Parnas J et al. A multivariate prediction model of schizophrenia. *Schizophr Bull* **2002**; 28(4):649-682.
- Caspi A, Moffitt TE, Cannon M et al. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-o-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry* **2005**; 57(10):1117-1127.
- Castro Costa MR, Edelman SB, Castiglione CM et al. Properties of monoamine oxidase in control and Lesch-Nyhan fibroblasts. *Biochem Genet* **1980**; 18(5-6):577-590.

- Cerasa A, Cherubini A, Quattrone A et al. Met158 variant of the catechol-o-methyltransferase genotype is associated with thicker cortex in adult brain. *Neurosci* **2010**; 167(3):809-814.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **2003**; 4(4):299-309.
- Chen J, Lipska BK, Halim N et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-o-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* **2004**; 75(5):807-821.
- Chen da C, Wang J, Wang B et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve first-episode schizophrenia: relationship to clinical phenotypes. *Psychopharmacology (Berl)* **2009**; 207(3):375-380.
- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* **1981**; 289(5798):537-542.
- Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P et al. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet* **2002**; 11(12):1373-1380.
- Cloninger CR, Przybeck TR, Svrakic DM. The Tridimensional Personality Questionnaire: U.S. normative data. *Psychol Rep* **1991**; 69(3 Pt 1):1047-1057.
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* **2010**; 70(5):271–288.
- Collier DA, Stöber G, Li T et al. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* **1996**; 1(6):453-460.
- Cook EH Jr, Courchesne R, Lord C et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* **1997**; 2(3):247-250.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Seventh Edition. 1996; Oxford University Press, New York.
- Corvin AP, Morris DW, McGhee K et al. Confirmation and refinement of an 'at-risk' haplotype for schizophrenia suggests the EST cluster, Hs.97362, as a potential susceptibility gene at the Neuregulin-1 locus. *Mol Psychiatry* **2004**; 9(2):208-213.
- Costa-Mallen P, Keleda SN, Costa LG et al. Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene. *Neurosci Lett* **2005**; 383(1-2):171-175.

- Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC. The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: Evidence and lessons. *Mol Psychiatry* **2006**; 11(5): 446–458.
- Crespo-Facorro B, Roiz-Santiáñez R, Pelayo-Terán JM et al. Reduced thalamic volume in first-episode non-affective psychosis: correlations with clinical variables, symptomatology and cognitive functioning. *Neuroimage* **2007**; 35(4):1613-1623.
- Cyr M, Calon F, Morissette M et al. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Curr Pharm Des* **2000**; 6(12):1287-1312.
- Dann J, DeLisi LE, Devoto M et al. A linkage study of schizophrenia to markers within Xp11 near the MAOB gene. *Psychiatry Res* **1997**; 70(3):131-143.
- Davies G, Welham J, Chant D et al. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* **2003**; 29(3):587-593.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G et al. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* **1991**; 148 (11):1474-1486.
- Davis KL, Buchsbaum MS, Shihabuddin L et al. Ventricular enlargement in poor-outcome schizophrenia. *Biol Psychiatry* **1998**; 43(11):783-793.
- Davis KL, Stewart DG, Friedman JI et al. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* **2003**; 60(5):443-456.
- De Blasi A, Conn PJ, Pin J et al. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* **2001**; 22(3):114-120.
- de Frias CM, Annerbrink K, Westberg L et al. COMT gene polymorphism is associated with declarative memory in adulthood and old age. *Behav Genet* **2004**; 34(5):533–539.
- Degenhardt L, Hall W, Lynskey M. Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and psychosis. *Drug Alcohol Depend* **2003**; 71(1):37-48.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T et al. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2000**; 40:235-271.
- Diamond A, Briand L, Fossella J et al. Genetic and neurochemical modulation of prefrontal cognitive functions in children. *Am J Psychiatry* **2004**; 161(1):125–132.
- Diaz-Asper CM, Weinberger DR, Goldberg TE. Catechol-o-methyltransferase

- polymorphisms and some implications for cognitive therapeutics. *NeuroRx* **2006**; 3(1):97–105.
- Diaz-Asper CM, Goldberg TE, Kolachana BS et al. Genetic variation in catechol-O-methyltransferase: effects on working memory in schizophrenic patients, their siblings, and healthy controls. *Biol Psychiatry* **2008**; 63(1):72-79.
- Dinzeo TJ, Docherty NM. Normal personality characteristics in schizophrenia: a review of the literature involving the FFM. *J Nerv Ment Dis* **2007**; 195(5):421–429.
- Do T, Kerr B, Kuzhikandathil EV. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression of D1 dopamine receptors. *J Neurochem* **2007**; 100(2):416-428.
- Dolzan V, Serretti A, Mandelli L et al. Acute antipsychotic efficacy and side effects in schizophrenia: association with serotonin transporter promoter genotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2008**; 32(6):1562-1566.
- Domschke K, Freitag CM, Kuhlenbäumer G et al. Association of the functional V158M catechol-O-methyl-transferase polymorphism with panic disorder in women. *Int J Neuropsychopharmacol* **2004**; 7(2):183-188.
- Du L, Faludi G, Palkovits M et al. Frequency of long allele in serotonin transporter gene is increased in depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* **1999**; 46(2):196-201.
- Ebstein RP, Gritsenko I, Nemanov L et al. No association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and the Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) temperament of harm avoidance. *Mol Psychiatry* **1997**; 2(3):224-226.
- Eckert KA, Kunkel TA. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **1990**; 18(13):3739-3744.
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98(12):6917-6922.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH et al. The BDNF Val66Met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **2003**; 112(2):257–269.
- Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A et al. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype. *Am J Med Genet* **1999**; 88(5):497–502.

- Eklblom J, Garpenstrand H, Damberg M et al. Transcription factor binding to the core promoter of the human monoamine oxidase B gene in the cerebral cortex and in blood cells. *Neurosci Lett* **1998**; 258(2):101-104.
- Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T et al. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees. *Mol Psychiatry* **2004**; 9(11):1037-1041.
- Eley TC, Tahir E, Angleitner A et al. Association analysis of MAOA and COMT with neuroticism assessed by peers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2003**; 120B(1):90-96.
- Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2004**; 28(3):435-451.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ et al. ConVergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet* **2004**; 36(2):131-137.
- Emilien G, Maloteaux JM, Geurts M et al. Dopamine receptors-physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol Ther* **1999**; 84(2):133-156.
- English JA, Dicker P, Föcking M et al. 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *Proteomics* **2009**; 9(12):3368-3382.
- English JA, Pennington K, Dunn MJ et al. The neuroproteomics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **2011**; 69(2):163-172.
- Enoch MA, Xu K, Ferro E et al. Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-o-methyltransferase polymorphism. *Psychiatr Genet* **2003**; 13(1):33-41.
- Fannon D, Tennakoon L, Sumich A et al. Third ventricle enlargement and developmental delay in first-episode psychosis: preliminary findings. *Br J Psychiatry* **2000**; 177:354-359.
- Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE et al. Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism. *Mol Psychiatry* **1999**; 4(1):93-96.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102(30):10604-10609.
- Gaddhum JH, Hameed KA. Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother* **1954**; 9(2):240-248.

- Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K et al. Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *J Neural Transm* **2000**; 107(5):523-530.
- Garyfallos G, Karastergiou A, Adamopoulou A et al. Greek version of the General Health Questionnaire: accuracy of translation and validity. *Acta Psychiatr Scand* **1991**; 84(4):371-378.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **2003**; 4(12):1002-1012.
- Gassó P, Bernardo M, Mas S et al. Association of A/G polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with schizophrenia in a Spanish population. *Neuropsychobiology* **2008**; 58(2):65-70.
- Ginovart N, Wilson AA, Meyer JH et al. [11C]-DASB, a tool for in vivo measurement of SSRI-induced occupancy of the serotonin transporter: PET characterization and evaluation in cats. *Synapse* **2003**; 47(2):123-133.
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT. Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. *Am J psychiatry* **2003a**; 160(3):469-476.
- Glatt, SJ, Faraone SV, Tsuang MT. Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2003b**; 8(11):911-915.
- Gleeson JF, Rawlings D, Jackson HJ et al. Agreeableness and Neuroticism as predictors of relapse after first-episode psychosis: a prospective follow-up study. *J Nerv Ment Dis* **2005**; 193(3):160-169.
- Gogos JA, Morgan M, Luine V et al. Catechol-o-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95(17):9991-9996.
- Gogos JA, Santha M, Takacs Z et al. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet* **1999**; 21(4):434-439.
- Gogos JA, Gerber DJ. Schizophrenia susceptibility genes: emergence of positional candidates and future directions. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**; 27(4):226-233.
- Goldberg DP, Hillier VF. A scaled version of the General Health Questionnaire. *Psychol Med* **1979**; 9(1):139-145.

- Goldberg TE, Egan MF, Gscheidle T et al. Executive subprocesses in working memory: Relationship to catechol-o-methyltransferase Val158Met genotype and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **2003**; 60(9):889–896.
- Goldberg TE, Kotov R, Lee AT et al. The serotonin transporter gene and disease modification in psychosis: evidence for systematic differences in allelic directionality at the 5-HTTLPR locus. *Schizophr Res* **2009**; 111(1-3):103-108.
- Golimbet VE, Alfimova MV, Manandyan KK et al. 5HTR2A gene polymorphism and personality traits in patients with major psychoses. *Eur Psychiatry* **2002**; 17(1):24-28.
- Golimbet VE, Alfimova MV, Shcherbatikh T et al. Serotonin transporter gene polymorphism and schizoid personality traits in the patients with psychosis and psychiatrically well subjects. *World J Biol Psychiatry* **2004**; 4(1):25-29.
- Gonzalez-Pinto A, Mosquera F, Palomino A et al. Increase in brain-derived neurotrophic factor in first episode psychotic patients after treatment with atypical antipsychotics. *Int Clin Psychopharmacol* **2010**; 25(4):241–245.
- Gottesman II, Shields J. A polygenic theory of schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**; 58(1):199-205.
- Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* **2003**; 160(4):636-645.
- Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* **1991**; 41(1):1-24.
- Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case–control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders and schizophrenia. *Biol Psychiatry* **2007**; 61(7):911–922.
- Grayson DR, Jia X, Chen Y et al. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102(26):9341-9346.
- Green MJ, Matheson SL, Shepherd A et al. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Mol Psychiatry* **2011**; 16:960–972.
- Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ et al. Genetic variation in the serotonin transporter

- promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *Am J Med Genet* **1999**; 88(1):83-87.
- Greenberg BD, Li Q, Lucas FR et al. Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample. *Am J Med Genet* **2000**; 96(2):202-216.
- Greenwood TA & Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* **2003**; 82(5): 511–520.
- Grimsby J, Chen K, Wang LJ et al. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**; 88(9):3637-3641.
- Gundlah C, Lu NZ, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. *Psychopharmacology (Berl)* **2002**; 160(3):271-282.
- Gutiérrez B, Arranz MJ, Collier DA et al. Serotonin transporter gene and risk for bipolar affective disorder: an association study in Spanish population. *Biol Psychiatry* **1998**; 43(11):843-847.
- Halbreich U, Kahn LS. Hormonal aspects of schizophrenias: an overview. *Psychoneuroendocrinology* **2003**; 28(2):1-16.
- Hamilton SP, Slager SL, Heiman GA et al. Evidence for a susceptibility locus for panic disorder near the catechol-o-methyltransferase gene on chromosome 22. *Biol Psychiatry* **2002**; 51(7):591-601.
- Han DH, Kee BS, Min KJ et al. Effects of catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphism on the cognitive stability and aggression in the first-onset schizophrenic patients. *Neuroreport* **2006**; 17(1):95-99.
- Handoko HY, Nyholt DR, Hayward NK et al. Separate and interacting effects within the catechol-o-methyltransferase (COMT) are associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2005**; 10(6):589-597.
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* **2003**; 23(17):6690–6694.
- Harris SE, Wright AF, Hayward C et al. The functional COMT polymorphism, Val 158

- Met, is associated with logical memory and the personality trait intellect/imagination in a cohort of healthy 79 year olds. *Neurosci Lett* **2005**; 385(1):1–6.
- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* **1999**; 122(Pt 4):593–624.
- Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* **2003**; 361(9355):417-419.
- Harrison, PJ, Weinberger, DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* **2005**; 10(1):40-68.
- Hasbi A, Fan T, Alijaniam M et al. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**; 106(50):21377-21382.
- Heils A, Teufel A, Petri S et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* **1996**; 66(6):2621-2624.
- Heils A, Mössner R, Lesch KP. The human serotonin transporter gene polymorphism-- basic research and clinical implications. *J Neural Transm* **1997**; 104(10):1005-1014.
- Henderson AS, Korten AE, Jorm AF et al. COMT and DRD3 polymorphisms, environmental exposures, and personality traits related to common mental disorders. *Am J Med Genet* **2000**; 96(1):102-107.
- Hennah W, Varilo T, Kestila M et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet* **2003**; 12(23):3151-3159.
- Henquet C, Rosa A, Krabbendam L et al. An experimental study of catechol-o-methyltransferase Val158Met moderation of delta-9-tetrahydrocannabinol-induced effects on psychosis and cognition. *Neuropsychopharmacology* **2006**; 31(12):2748-2757.
- Henquet C, Rosa A, Delespaul P et al. COMT ValMet moderation of cannabis-induced psychosis: a momentary assessment study of 'switching on' hallucinations in the flow of daily life. *Acta Psychiatr Scand* **2009**; 119(2):156-160.
- Herken H, Erdal ME. catechol-o-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association between symptomatology and prognosis. *Psychiatr Genet* **2001**; 11(2):105-109.

- Ho BC, Milev P, O'Leary DS et al. Cognitive and magnetic resonance imaging brain morphometric correlates of brain-derived neurotrophic factor Val66Met gene polymorphism in patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry* **2006**; 63(7):731-740.
- Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J et al. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet* **2004**; 75(5):862-872.
- Hoyer D, Martin GR. Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. *Behav Brain Res* **1996**; 73(1-2):263-268.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **2002**; 71(4):533-554.
- Hotamisligil GS, Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet* **1991**; 49(2):383-392.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **2003**; 72:609-642.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* **2011**; 24:677-736.
- Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* **1993**; 14(6):233-236.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* **1991**; 350(6315):230-232.
- Hyphantis T. The Greek version of the Defense Style Questionnaire: psychometric properties in three different samples. *Compr Psychiatry* **2010**; 51(6):618-629.
- Illi A, Mattila KM, Kampman O et al. Catechol-o-methyltransferase and monoamine oxidase A genotypes and drug response to conventional neuroleptics in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* **2003**; 23(5):429-434.
- Inada T, Nakamura A, Iijima Y. Relationship between catechol-o-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2003**; 120B(1):35-39.
- Inayama Y, Yoneda H, Sakai T et al. Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet* **1996**; 67(1):103-105.

- Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosc* **2007**; 30(5):188–193.
- Jablensky AV, Morgan V, Zubrick SR et al. Pregnancy, delivery, and neonatal complications in a population cohort of women with schizophrenia and major affective disorders. *Am J Psychiatry* **2005**; 162(1):79–91.
- Jablonka E, Lamb MJ. The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci* **2002**; 981:82-96.
- Jacobs B, Fornal C. Serotonin and behavior. A general hypothesis. In: Bloom F, Kupfer D, (Eds), *Psychopharmacology. The fourth generation of progress*. Raven press, New York, **1995**; pp 461-469.
- Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **1991**; 148(10):1301–1308.
- Jindal RD, Pillai AK, Mhadik SP et al. Decreased BDNF in patients with antipsychotic naïve first episode schizophrenia. *Schizophr Res* **2010**; 119(1-3):47–51.
- Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* **2000**; 5(2):142-149.
- Joireman J, Kuhlman DM. The Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire: origin, development, and validity of a measure to assess an alternative Five-Factor Model of personality. In: Stelmack RM, (ed). *On the psychobiology of personality: essays in honor of Marvin Zuckerman*. New York: Elsevier Science, **2004**; pp49–64.
- Jönsson EG, Edman-Ahlbom B, Sillén A et al. Brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) variants and schizophrenia: an association study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2006**; 30(5):924-933.
- Joover R, Benkelfat C, Brisebois K et al. T102C polymorphism in the 5HT2A gene and schizophrenia: relation to phenotype and drug response variability. *J Psychiatry Neurosci* **1999**; 24(2):141-146.
- Jorm AF, Henderson AS, Jacomb PA et al. An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms. *Mol Psychiatry* **1998**; 3(5):449-451.
- Kaiser R, Tremblay PB, Schmider J et al. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the

- schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2001**; 6(2):179-185.
- Kan YW, Dozy AM: Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**; 75(11):5631-5635.
- Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2003**; 27(7):1081-1090.
- Kapur S. Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* **2003**; 160(1):13-23.
- Karayorgou M, Gogos JA, Galke BL et al. Identification of sequence variants and analysis of the role of the catechol-O-methyl-transferase gene in schizophrenia susceptibility. *Biol Psychiatry* **1998**; 43(6):425-431.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* **1987**; 13:261-276.
- Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG et al. Gender difference in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **2002**; 23(4-5):515-519.
- Keohavong P, Thilly WG. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci* **1989**; 86(23): 9253-9257.
- Keshavan MS, Hogarty GE. Brain maturational processes and delayed onset in schizophrenia. *Dev Psychopathol* **1999**; 11(3):525-543.
- Khan ZU, Mazljak L, Gutierrez A et al. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95:7731-7736.
- Kim SJ, Kim YS, Kim SY et al. An association study of catechol-o-methyltransferase and monoamine oxidase A polymorphisms and personality traits in Koreans. *Neurosci Lett* **2006**; 401(1-2):154-158.
- Kirov G, Ivanov D, Williams NM et al. Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. *Biol Psychiatry* **2004**; 55(10):971-975.
- Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest* **2005**; 115(6):1440-1448.

- Knab AM, Lightfoot JT. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *Int J Biol Sci* **2010**; 6(2):133–150.
- Kunugi H, Vallada HP, Sham PC et al. Catechol-o-methyltransferase polymorphisms and schizophrenia: a transmission disequilibrium study in multiply affected families. *Psychiatr Genet* **1997**; 7(3):97-101.
- Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE et al. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* **1993**; 33(4):368-372.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T et al. Human catechol-o-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* **1996**; 6(3):243-250.
- Lambert M, Schimmelmann BG, Naber D et al. Prediction of remission as a combination of symptomatic and functional remission and adequate subjective well-being in 2960 patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* **2006**; 67(11):1690-1697.
- Lambert M, Naber D, Eich FX et al. Remission of severely impaired subjective wellbeing in 727 patients with schizophrenia treated with amisulpride. *Acta Psychiatr Scand* **2007**; 115(2):106-113.
- Lanchowicz JE, Sibley DR. Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol* **1997**; 81(3):105-113.
- Lang UE, Hellweg R, Gallinat J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacol* **2004**; 29(4):795–798.
- Lang UE, Hellweg R, Kalus P et al. Association of a functional BDNF polymorphism and anxiety-related personality traits. *Psychopharmacol* **2005**; 180(1):95–99.
- Lang UE, Hellweg R, Sander T et al. The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Mol Psychiatry* **2009**; 14(2):120–122.
- Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *An N Y Acad Sci* **2003**; 1003:138–158.
- Law CW, Chen EY, Cheung EF et al. Impact of untreated psychosis on quality of life in patients with first-episode schizophrenia. *Qual Life Res* **2005**; 14(8):1803-1811.
- Lawrie SM, Whalley H, Kestelman JN et al. Magnetic resonance imaging of brain in people at high risk of developing schizophrenia. *Lancet* **1999**; 353(9146):30–33.

- Laws SM, Hone E, Taddei K et al. Variation at the APOE -491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Mol Psychiatry* **2002**; 7(8):886-890.
- Lesch KP, Balling U, Gross J et al. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect* **1994**; 95(2):157-162.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* **1996**; 274(5292):1527-1531.
- Levy D, Holzman PS, Matthyse S et al. Eye tracking dysfunction and schizophrenia: A critical perspective. *Schizophr Bull* **1993**; 19(3):461-536.
- Leucht S, Kissling W, Davis JM. Second-generation antipsychotics for schizophrenia: can we resolve the conflict? *Psychol Med* **2009**; 39(10):1591-1602.
- Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **2000**; 401:3-38.
- Levin Y, Wang L, Schwarz E et al. Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum. *Mol Psychiatry* **2010**; 15(11):1088-1100.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* **2003**; 73(1):34-48.
- Li T, Sham PC, Vallada H et al. Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia. *Psychiatr Genet* **1996**; 6(3):131-133.
- Li T, Holmes C, Sham PC et al. Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* **1997**; 8(3):683-686.
- Li T, Ball D, Zhao J et al. Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Mol Psychiatry* **2000**; 5(4):452.
- Lindsay RM, Thoenen H, Barde YA. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev Biol* **1985**; 112(2):319-328.
- Little KY, McLaughlin DP, Zhang L et al. Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. *Am J Psychiatry* **1998**; 155(2):207-213.
- Liu H, Heath SC, Sobin C et al. Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus

- presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99(6):3717-3722.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* **1995**; 34(13):4202-4210.
- Maes M, Meltzer H. The serotonin hypothesis of major depression. In: Bloom F, Kupfer D (Eds), *Psychopharmacology. The fourth generation of progress*. Raven press, New York, **1995**; pp. 933-944.
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R 3rd et al. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* **1991**; 10(3):558-568.
- Malaspina D, Corcoran C, Fahim C et al. Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet* **2002**; 114(3):299–303.
- Malhotra AK, Goldman D, Mazzanti C et al. A functional serotonin transporter (5-HTT) polymorphism is associated with psychosis in neuroleptic-free schizophrenics. *Mol Psychiatry* **1998**; 3(4):328-332.
- Malhotra AK, Kestler LJ, Mazzanti C et al. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am J Psychiatry* **2002**; 159(4):652-654.
- Malla A, Norman R, Schmitz N, et al. Predictors of rate and time to remission in first-episode psychosis: a two-year outcome study. *Psychol Med* 2006; 36(5):649-658.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A et al. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. *BMC Psychiatry* **2009**; 9:17.
- Martins-de-Souza D, Maccarrone G, Wobrock T et al. Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *J Psychiatr Res* **2010**; 44(16):1176-1189.
- Mata I, Arranz MJ, Patiño A et al. Serotonergic polymorphisms and psychotic disorders in populations from North Spain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2004**; 126B(1):88-94.
- Mata I, Perez-Iglesias R, Pelayo-Teran JM et al. Lack of influence of COMT Val158Met genotype on cognition in first-episode non-affective psychosis. *Schizophr Res* **2008**; 102(1-3):206-209.

- Matsumoto M, Weickert CS, Beltaifa S et al. Catechol O-methyltransferase (COMT) mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **2003**; 28(8):1521-1530.
- Mattay VS, Goldberg TE, Fera F et al. Catechol O-methyltransferase val158met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**; 100(10):6186-6191.
- Mazzanti CM, Lappalainen J, Long JC et al. Role of the serotonin transporter promoter polymorphism in anxiety-related traits. *Arch Gen Psychiatry* **1998**; 55(10):936-940.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **1999**; 22:(295–318).
- McDougle CJ, Epperson CN, Price LH et al. Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (SLC6A4) and obsessive compulsive disorder. *Mol Psychiatry* **1998**; 3(3):270-273.
- McGrath JJ, Susser ES. New directions in the epidemiology of schizophrenia. *Med J Aust* **2009**; 190 (4 Suppl):S7–9.
- McGuffin P, Owen MJ, Gottesman II. *Psychiatric Genetics and Genomics* 1st edn. Oxford: Oxford University Press **2002**.
- Meltzer HY. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* **1989**; 99 Suppl: S18-27.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin2 pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* **1989**; 251(1):238–246.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2003**; 27(7):1159-1172.
- Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **2006**; 7(10):818-827.
- Mill J, Dempster E, Caspi A et al. Evidence for monozygotic twin (MZ) discordance in methylation level at two CpG sites in the promoter region of the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2006**; 141B(4):421-425.

- Miller GM, Madras BK. Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol Psychiatry* **2002**; 7(1):44–55.
- Minelli A, Zanardini R, Bonvicini C et al. BDNF serum levels, but not BDNF Val66Met genotype, are correlated with personality traits in healthy subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **2011**; 261(5):323–329.
- Misalle C, Nash SR, Robinson SW et al. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **1998**; 78(1):189–225.
- Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD et al. Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2001**; 6(3):293-301.
- Mondelli V, Cattaneo A, Belvederi Murri M et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *J Clin Psychiatry* **2011**; 72(12):1677–1684.
- Morris DW, Rodgers A, McGhee KA et al. Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2004**; 125B(1):50-53.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **2001**; 276(16):12660-12666.
- Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **1990**; 48(8):579-582.
- Murphy DL, Wright C, Buchsbaum M et al. Platelet and plasma amine oxidase activity in 680 normals: sex and age differences and stability over time. *Biochem Med* 16:254-265.
- Murray RM, Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J* **1987**; 295(6600):681–682.
- Murray RM, Jones PB, Susser E et al. The epidemiology of schizophrenia. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom. **2002**; 454 pp.
- Nacmias B, Tedde A, Forleo P et al. Association between 5-HT(2A) receptor polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **2001**; 50(6):472-475.
- Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N et al. Cloning and chromosomal localization of the

- human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* **1995**; 25(2):538-546.
- Nakata K, Ujike H, Sakai A et al. Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* **2003**; 337:17–20.
- Need AC, Ge D, Weale ME et al. A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet* **2009**; 5 (2), p. e1000373.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **1989**; 17(7):2503-2516.
- Ohara K, Nagai M, Suzuki Y et al. No association between anxiety disorders and catechol-o-methyltransferase polymorphism. *Psychiatry Res* **1998**; 80(2):145-148.
- Ohba S, Ikeda T, Ikegaya Y et al. BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: target-selective circuit inhibition. *Cereb Cortex* **2005**; 15(3):291–298.
- Okragly AJ, Haak-Frendscho M. An acid-treatment method for the enhanced detection of GDNF in biological samples. *Exp Neurol* **1997**; 145(2 Pt 1):592-596.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Nankai M et al. Identification of a polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with the human novelty seeking personality trait. *Mol Psychiatry* **2000**; 5(1):64-69.
- Oliveira JR, Gallindo RM, Maia LG et al. The short variant of the polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene is a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **1998**; 3(5):438-441.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Gottesman II. Schizophrenia. In: McGuffin P, Owen MJ, Gottesman II (eds) *Psychiatric genetics and genomics*. Oxford University Press, Oxford, **2002**; pp 247–266.
- Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol Psychiatry* **2004**; 9(1):14-27.
- Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* **1994**; 40(2):288-295.
- Page IH. Serotonin (5-hydroxytryptamine). *Physiol Rev* **1954**; 34(3):563-588.
- Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-o-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry* **1999**; 46(4):557-567.
- Palomino A, Vallejo-Illarramendi A, González-Pinto A et al. Decreased levels of plasma

- BDNF levels in first-episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res* **2006**; 86(1-3):321–322.
- Παναγής Γ. Νευροεπιστήμη της Συμπεριφοράς **2002**, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Pantelis C, Velakoulis D, McGorry PD et al. Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison. *Lancet* **2003**; 361(9354):281–288.
- Patel JK, Buckley PF, Woolson S et al. Metabolic profiles of second-generation antipsychotics in early psychosis: findings from the CAFE study. *Schizophr Res* **2009**; 111(1-3):9-16.
- Pedersen NL, Orelund L, Reynolds C et al. Importance of genetic effects for monoamine oxidase activity in thrombocytes in twins reared apart and twins reared together. *Psychiatry Res* **1993**; 46(3):239–251.
- Pelayo-Terán JM, Crespo-Facorro B, Carrasco-Marín E et al. Catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical characteristics in first episode non-affective psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **2008**; 147B(5):550-556.
- Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Mata I et al. Catechol-o-methyltransferase (COMT) Val158Met variations and cannabis use in first-episode non-affective psychosis: clinical-onset implications. *Psychiatry Res* **2010**; 179(3):291-296.
- Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Vázquez-Vazquez-Bourgon J et al. Catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphism and negative symptoms after acute antipsychotic treatment in first-episode non-affective psychosis. *Psychiatry Res* **2011**; 185(1-2):286-289.
- Perry J, Da Cunha C, Anselmo-Franci J et al. No association between general cognitive ability and the A1 allele of the D2 dopamine receptor gene. *Behav Genet* **1997**; 27:29–31.
- Petersen L, Jeppesen P, Thorup A et al. A randomised multicentre trial of integrated versus standard treatment for patients with a first episode of psychotic illness. *BMJ* **2005**; 331(7517):602.
- Petronis A, Gottesman II, Kan P et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull* **2003**; 29(1):169-178.
- Pillai A, Kale A, Joshi S et al. Decreased BDNF levels in CSF of drug-naïve first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* **2010**;13(4):535–539.

- Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* **2001**; 2(1):24–32.
- Preisig M, Bellivier F, Fenton BT et al. Association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms: results of a multicenter study. *Am J Psychiatry* **2000**; 157(6):948-955.
- Preti A, Cardascia L, Zen T et al. Risk for obstetric complications and schizophrenia. *Psychiatry Res* **2000**; 96(2):127–139.
- Purcell SM, Wray NR, Stone JL et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* **2009**; 460 (7256):748–752.
- Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM et al. Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J Pharmacol Exp Ther* **1979**; 208(2):195-202.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**; 90(6):2542-2546.
- Rees M, Norton N, Jones I et al. Association studies of bipolar disorder at the human serotonin transporter gene (hSERT; 5HTT). *Mol Psychiatry* **1997**; 2(5):398-402.
- Reuter M, Hennig J. Association of the functional catechol-o-methyltransferase VAL158MET polymorphism with the personality trait of extraversion. *Neuroreport* **2005**; 16(10):1135-1138.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* **1996**; 273(5281):1516-1517.
- Rizos EN, Rontos I, Laskos E et al. Investigation of serum BDNF levels in drug-naïve patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2008**; 32(5):1308–1311.
- Rizos EN, Papathanasiou M, Michalopoulou PG et al. Association of serum BDNF levels with hippocampal volumes in first psychotic episode drug-naïve schizophrenic patients. *Schizophr Res* **2011**; 129(2-3):201–204.
- Rosa A, Peralta V, Cuesta MJ et al. New evidence of association between COMT gene and prefrontal neurocognitive function in healthy individuals from sibling pairs discordant for psychosis. *Am J Psychiatry* **2004**; 161:1110–1112.
- Rotondo A, Mazzanti C, Dell'Osso L et al. Catechol o-methyltransferase, serotonin transporter, and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in bipolar disorder

- patients with and without comorbid panic disorder. *Am J Psychiatry* **2002**; 159(1):23-29.
- Rujescu D, Giegling I, Gietl A et al. A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol Psychiatry* **2003**; 54(1):34-39.
- Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality inschizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry* **2007**; 64(10):1123–1131.
- Salem JE, Kring AM. The role of gender differences in the reduction of etiologic heterogeneity in schizophrenia. *Clin Psychol Rev* **1998**; 18(7):795-819.
- Sambrook & Russel (eds), *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. **2001**; Vol.1, Chapter 5
- Samochowiec J, Hajduk A, Samochowiec A et al. Association studies of MAO-A, COMT, and 5-HTT genes polymorphisms in patients with anxiety disorders of the phobic spectrum. *Psychiatry Res* **2004**; 128(1):21-26.
- Sander T, Harms H, Lesch KP et al. Association analysis of a regulatory variation of the serotonin transporter gene with severe alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **1997**; 21(8):1356-1359.
- Santiago M, Westerink BH. The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors. *Eur J Pharmacol* **1991**; 204(1):79-85.
- Schindler KM, Pato MT, Dourado A et al. Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population. *Mol Psychiatry* **2002**; 7(9):1002-1005.
- Schroeder C, Tank J, Goldstein DS et al. Influence of St John's wort on catecholamine turnover and cardiovascular regulation in humans. *Clin Pharmacol Ther* **2004**; 76(5):480-489.
- Schwab SG, Knapp M, Mondabon S et al. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* **2003**;72(1):185-190.
- Schwarz E, Bahn S. Cerebrospinal fluid: identification of diagnostic markers for schizophrenia. *Exp Rev Mol Diagn* **2008**; 8(2):209-216.

- Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* **1975**;188(4194):1217–1219.
- Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM et al. Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* **1994**; 342(3):321-334.
- Serretti A, Lattuada E, Catalano M et al. Serotonin transporter gene not associated with psychotic symptomatology of mood disorders. *Psychiatry Res* **1999**; 86(1):59-65.
- Serretti A, Lorenzi C, Lilli R et al. Pharmacogenetics of lithium prophylaxis in mood disorders: analysis of COMT, MAO-A, and Gbeta3 variants. *Am J Med Genet* **2002**; 114(4):370-379.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M et al. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* **2001**; 49(1-2):1-52.
- Shi J, Levinson DF, Duan JB et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* **2009**; 460(7256):753-757.
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* **2002**; 71(6):1296-1302.
- Shih JC, Thompson RF. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet* **1999**; 65(3):593–598.
- Shih JC, Chen K. Regulation of MAO-A and MAO-B gene expression *Curr Med Chem* **2004**; 11(15):1995–2005.
- Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* **2005**; 15(3):319-329.
- Spenger C, Hyman C, Studer L et al. Effects of BDNF on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic neurons in cultures of human fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol* **1995**; 133(1):50-63.
- Spina MB, Squinto SP, Miller J et al. Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem* **1992**; 59(1):99-106.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **2001**; 24:1217-1281.
- Sotiropoulou M, Mantas C, Bozidis P et al. BDNF serum concentrations in first psychotic episode drug-naïve schizophrenic patients: associations with personality and BDNF Val66Met polymorphism. *Life Sci* **2013**; 92(4-5):305-310.

- Stefanis NC, Van Os J, Avramopoulos D et al. Variation in catechol-o-methyltransferase val158met genotype associated with schizotypy but not cognition: a population study in 543 young men. *Biol Psychiatry* **2004**; 56(7):510-515.
- Stefanis NC, van Os J, Avramopoulos D et al. Effect of COMT Val158Met polymorphism on the Continuous Performance Test, Identical Pairs Version: tuning rather than improving performance. *Am J Psychiatry* **2005**; 162(9):1752-1754.
- Stefansson H, Sarginson J, Kong A et al. Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet* **2003**; 72(1):83-87.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* **2002**; 71(4):877-892.
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* **2009**; 460(7256):744-747.
- Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* **2002**; 71(2):337-348.
- Strous RD, Bark N, Woerner M et al. Lack of association of a functional catechol-o-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **1997**; 41(4):493-495.
- Sullivan PF, Lin D, Tzeng JY et al. Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Mol Psychiatry* **2008**; 13(6):570-584.
- Stoilov P, Castren E, Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**; 290(3):1054-1065.
- Szapacs ME, Mathews TA, Tessarollo L et al. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods* **2004**; 140(1-2):81-92.
- Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* **2005**; 10(7):631-636.
- Takahashi T, Suzuki M, Tsunoda M et al. Association between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and brain morphology in a Japanese

- sample of schizophrenia and healthy comparisons. *Neurosci Lett* **2008**; 435(1):34-39.
- Talkowski ME, Bamne M, Mansour H et al. Dopamine genes and schizophrenia: case closed or evidence pending? *Schizophr Bull* **2007**; 33(5):1071-1081.
- Terracciano A, Martin B, Ansari D et al. Plasma BDNF concentration, Val66Met genetic variant and depression-related personality traits. *Genes Brain Behav* **2010**; 9(5):512–518.
- Terracciano A, Lobina M, Piras MG et al. Neuroticism, depressive symptoms, and serum BDNF. *Psychosom Med* **2011a**; 73(8):638–642.
- Terracciano A, Piras MG, Lobina M et al. Genetics of serum BDNF: meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry* **2011b**.
- Toulopoulou T, Grech A, Morris RG et al. The relationship between volumetric brain changes and cognitive function: a family study on schizophrenia. *Biol Psychiatry* **2004**; 56(6):447-453.
- Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB et al. An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99(26):17095-17100.
- Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW et al. Association study of a functional serotonin transporter gene polymorphism with schizophrenia, psychopathology and clozapine response. *Schizophr Res* **2000**; 44(3):177-181.
- Tsai SJ, Yu YW, Chen TJ et al. Association study of a functional catechol-o-methyltransferase-gene polymorphism and cognitive function in healthy females. *Neurosci Lett* **2003**; 338: 123–126.
- Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW et al. Association study of catechol-o-methyltransferase gene and dopamine D4 receptor gene polymorphisms and personality traits in healthy young chinese females. *Neuropsychobiology* **2004**; 50(2):153-156.
- Tunbridge EM, Bannerman DM, Sharp T et al. Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* **2004**; 24(23):5331-5335.
- Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. 2006a. Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biol Psychiatry* **2006a**; 60(2): 141–151.

- Tunbridge EM, Weickert CS, Kleinman JE et al. Catechol-o-methyltransferase enzyme activity and protein expression in human prefrontal cortex across the postnatal lifespan. *Cereb Cortex* **2006b**; 17(5): 1206–1212.
- Tunbridge EM, Harrison PJ. Importance of the COMT gene for sex differences in brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Curr Top Behav Neurosci* **2011**; 8:119-140.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **2000**; 24(1): 125–132.
- van Os, Sham, P. Gene-environment correlation and interaction in schizophrenia. In: Murray RM, Jones PB, Susser E, van Os J, Cannon M (eds). *The epidemiology of schizophrenia*. **2003**; Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp 235-253.
- van Os J, Delespaul P. Toward a world consensus on prevention of schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* **2005**; 7(1):53-67.
- van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* **2009**; 374(9690):635–645.
- Vazquez-Bourgon J, Arranz MJ, Mata I et al. Serotonin transporter polymorphisms and early response to antipsychotic treatment in first episode of psychosis. *Psychiatry Res* **2010**; 175(3):189-194.
- Veen ND, Selten JP, van der Tweel I et al. Cannabis use and age at onset of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **2004**; 161(3):501-506.
- Vereczkei A, Mirnics K. Genetic predisposition to schizophrenia: what did we learn and what does the future hold? *Neuropsychopharmacol Hung* **2011**; 13(4):205-210.
- Vergé D, Calas A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat* **2000**; 18(1-2):41-56.
- Vita A, De Peri L, Silenzi C et al. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr Res* **2006**; 82(1):75-88.
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* **2008**; 320(5875):539-543.
- Wang L, Yu L, He G et al. Response of risperidone treatment may be associated with polymorphisms of HTT gene in Chinese schizophrenia patients. *Neurosci Lett* **2007**; 414(1):1-4.

- Wassink TH, Nelson JJ, Crowe RR et al. Heritability of BDNF alleles and their effect on brain morphology in schizophrenia. *Am J Med Genet* **1999**; 88(6):724-728.
- Watson JD, Caudy AA, Myers RM et al. Recombinant DNA (Genes and Genomes-A short course). Freeman WH and company (eds), New York **2007**.
- Webster RA. Neurotransmitters, Drugs and Brain Function. Webster RA(ed), University College London, UK, **2001**.
- Webster MJ, Weickert CS, Herman MM et al. BDNF mRNA expression during postnatal development, maturation and aging of the human prefrontal cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **2002**; 139(2):139–150.
- Wei J, Hemmings GP. Lack of evidence for association between the COMT locus and schizophrenia. *Psychiatr Gene* **1999**; 9(4):183-186.
- Wei YL, Li CX, Li SB et al. Association study of monoamine oxidase A/B genes and schizophrenia in Han Chinese. *Behav Brain Funct* **2011**; 7:42.
- Weinberger DR, 1987: Implications of the normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **1987**; 44(7): 660-669.
- Weinberger DR. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* **1995**; 346(8974):552–557.
- Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A et al. Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **2001**; 50(11):825-844.
- Weinberger and Berger. Genetic vulnerability. In: Jackson HG, McGorry P (eds), The recognition and management of early psychosis. Cambridge University Press **2009**; pp 33-34.
- Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1999**; 39:19-52.
- Weiss KM, Terwilliger JD. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet* **2000**; 26(2):151-157.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P et al. Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet* **1996**; 347(9011):1294-1296.
- Williams NM, Rees MI, Holmans P et al. A two-stage genome scan for schizophrenia

- susceptibility genes in 196 affected sibling pairs. *Hum Mol Genet* **1999**; 8(9):1729-1739.
- Williams NM, Preece A, Spurlock G et al. Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2003**; 8(5):485-487.
- Williams NM, Preece A, Mortis DW et al. Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1). *Arch Gen Psychiatry* **2004**; 61(4):336-344.
- Winblad B, Gottfries CG, Oreland L et al. Monoamine oxidase in platelets and brains of non-psychiatric and non-neurological geriatric patients. *Med Biol* **1979**; 57(2):129-132.
- Winterer G, Weinberger DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci* **2004**; 27(11):683-690.
- Woo JM, Yoon KS, Yu BH. Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *Am J Psychiatry* **2002**; 159(10):1785-1787.
- Woo JM, Yoon KS, Choi YH et al. The association between panic disorder and the L/L genotype of catechol-o-methyltransferase. *J Psychiatr Res* **2004**; 38(4):365-370.
- Woodward ND, Jayathilake K, Meltzer HY. COMT val108/158met genotype, cognitive function, and cognitive improvement with clozapine in schizophrenia. *Schizophr Res* **2007**; 90(1-3):86-96.
- Woolley DW, Shaw E. A Biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1954**; 40(4):228-231.
- Wyatt RJ, Murphy DL, Belmaker R et al. Reduced monoamine oxidase activity in platelets: a possible genetic marker for vulnerability to schizophrenia. *Science* **1973**; 179(4076):916-918.
- Yavich L, Forsberg MM, Karayiorgou M et al. Site-specific role of catechol-o-methyltransferase in dopamine overflow within prefrontal cortex and dorsal striatum. *J Neurosci* **2007**; 27(38):10196-10209.
- Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* **2004**; 7(11):1187-1189.
- Yim DS, Parkb SK, Yoo KY et al. Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol O-methyl transferase and breast cancer. *Pharmacogenetics* **2001**; 11(4):279-286.

- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, **2010**; 70 (5):304–322.
- Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* **2006**; 7(4):(395–309).
- Young WF Jr, Laws ER Jr, Sharbrough FW et al. Human monoamine oxidase. Lack of brain and platelet correlation. *Arch Gen Psychiatry* **1986**; 43(6):604-609.
- Zhang XY, Zhang WF, Zhou DF et al. Brain-derived neurotrophic factor levels and its Val66Met Gene polymorphism predict tardive dyskinesia treatment response to Ginkgo biloba. *Biol Psychiatry* **2012**; 72(8):700–706.
- Zinkstok J, Schmitz N, van Amelsvoort T et al. The COMT val158met polymorphism and brain morphometry in healthy young adults. *Neurosci Lett* **2006**; 405(1-2):34-39.
- Zuckerman M. Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire (ZKPQ): an alternative five-factorial model. In: de Raad B, Perugini M, (eds), Big Five assessment. Gottingen, Germany: Hogrefe & Huber, **2002**; pp 377–396.
- Zuckerman M. Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire (ZKPQ): an operational definition of the alternative five factorial model of personality. In: Boyle GJ, Matthews G, Saklofske DH, editors. The SAGE handbook of personality theory and assessment. Personality measurement and testing Sage: Thousand Oaks, CA **2008**; pp 219–238.

