



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ, ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΟ  
ΨΥΧΩΤΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ ΚΑΙ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ»**

**ΝΤΑΝΙΕΛΑ ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ, ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΟ  
ΨΥΧΩΤΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ ΚΑΙ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ»**

**ΝΤΑΝΙΕΛΑ ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Θεοδωρίδου Ντανιέλας: 11-05-2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 859/21-06-2018

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα:

Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής

Μέλη:

Πετρίκης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ψυχιατρικής

Φίλιου Μιχαέλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-10-2018

«Διερεύνηση γενετικών, επιγενετικών και πρωτεϊνικών παραμέτρων σε ασθενείς με Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο και σε Ζωικά Μοντέλα»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 993α/17-12-2021**

1. Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Πετρίκης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Φίλιου Μιχαέλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Σκαπινάκης Πέτρος, Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ζακοπούλου Βικτωρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στις Μαθησιακές δυσκολίες με ειδικευση στην ειδική αναπτυξιακή δυσλεξία του Τμήματος Λογοθεραπείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας-Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ
7. Χατζηκυριακίδου Ανθούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-05-2022

Ιωάννινα 27-05-2022

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατιστάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



*Στους γονείς μου*

## ***Πρόλογος - Ευχαριστίες***

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2018-2022, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Μαρίκας Σύρρου.

Η παρούσα διατριβή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια και την καθοδήγηση των καθηγητών και συνεργατών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και για το λόγο αυτό ευχαριστώ θερμά:

- Τον Καθηγητή Βενετσάνο Μαυρέα, διευθυντή της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την παροχή της υλικοτεχνικής υποδομής και του απαιτούμενου αριθμού των ασθενών για τη διεξαγωγή της διδακτορικής μου διατριβής.

- Την Καθηγήτρια Βιολογίας και Ιατρικής Γενετικής κ. Μαρίκα Σύρρου, επιβλέπουσα της διατριβής μου και μέντορα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς με υποδέχτηκε στο εργαστήριό της από την περίοδο εκπόνησης της προπτυχιακής μου εργασίας μέχρι και τα χρόνια του διδακτορικού, για όλη την καθοδήγησή της και τις συμβουλές κατά το σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και για όλη της τη βοήθεια και συμπαράσταση αυτά τα χρόνια.

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχιατρικής κ. Πέτρο Πετρίκη, για όλη του τη βοήθεια και καθοδήγηση γύρω από τη διεξαγωγή της εργασίας μου, για την παροχή του δείγματος ασθενών που ήταν απαραίτητοι για τη διεξαγωγή της έρευνας καθώς και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια.

- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Μιχαέλα Φίλιου για όλη της την καθοδήγηση και βοήθεια γύρω από το σχεδιασμό και εκπόνηση του μοντέλου πειραματοζώων της διατριβής μου, για όλες τις πολύτιμες διορθώσεις και τη βοήθειά της κατά τη συγγραφή και διόρθωση της διατριβής μου καθώς και για τη σπουδαία καθοδήγηση που μου προσέφερε αυτά τα χρόνια.

- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Ανοικτού Πανεπιστημίου Πατρών κ. Αργυρώ Σγουρού, για όλη της τη βοήθεια και καθοδήγηση γύρω από τη διεξαγωγή των πειραμάτων μεθυλίωσης, καθώς και την τεχνογνωσία που προσέφερε και τις πολύτιμες συμβουλές της, την περίοδο που πέρασα στο εργαστήριό της.

- Τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Γιώργο Λεονταρίτη, για όλη του την υποστήριξη κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και για τη συνεργασία του για τη διεξαγωγή των σχετιζόμενων με πρωτεΐνες πειραμάτων όλα αυτά τα χρόνια.

- Τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας κ. Δημήτρη Λιακόπουλο, που μου στάθηκε όλα τα χρόνια της διατριβής μου, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του, όποτε τον χρειάστηκα.

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Βαγγέλη Ευαγγέλου, για όλη του τη βοήθεια και καθοδήγηση γύρω από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μου.

- Τη Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αγγελική-Μαρία Βλάικου, για όλη της τη βοήθεια και καθοδήγηση σε κάθε ερευνητικό στάδιο, καθώς και για τη φιλία της όλα αυτά τα χρόνια.

- Τις Μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Βιολέττα Μαλταμπέ και Βένια Ρουπακιά για όλη τους τη βοήθεια, τη στήριξη και τη φιλία τους αυτά τα χρόνια.
- Τον Τεχνικό Πειραματοζώων κ. Markus Nussbaumer, για όλη του τη βοήθεια και τεχνογνωσία που παρείχε αναφορικά με τη διεξαγωγή του μοντέλου πειραματοζώων.
- Τους Καθηγητές και τις Καθηγήτριες των Εργαστηρίων Βιολογίας, Φαρμακολογίας και Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, καθώς και τους Καθηγητές και τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για όλη τους τη βοήθεια και την παροχή ειδικού εξοπλισμού όποτε υπήρχε ανάγκη.
- Την οικογένειά μου και τους φίλους μου ΜΚ, ΓΙ, ΒΤ, ΓΜ, ΒΧ, ΒΛ για την αμέριστη υπομονή τους, τη στήριξή τους και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Κοζάνη, Απρίλιος 2022

Ντανιέλα Θεοδορίδου



## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	11
Οι ψυχικές διαταραχές στο γενικό πληθυσμό .....	11
Η σχιζοφρένεια και τα κλινικά της χαρακτηριστικά.....	11
Αίτια της νόσου και αντιμετώπιση .....	12
Γενετική δομική ποικιλομορφία, περιβάλλον, σχιζοφρένεια και φαινότυποι ψυχικής υγείας .....	14
Οι τραυματικές εμπειρίες ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ).....	16
Επιγενετικά φαινόμενα και η πιθανή επίδρασή τους στο φαινότυπο.....	16
Η νευροενδοκρινική απόκριση στο στρες μέσω του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) και των μοριακών του τελεστών.....	18
Οι εγκεφαλικές δομές που επηρεάζονται στη σχιζοφρένεια-Ο προμετωπιαίος φλοιός.....	38
Η μελέτη σύνθετων φαινοτύπων του στρες σε τρωκτικά .....	41
Μοντέλα του στρες σε τρωκτικά: το επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού.....	42
Η θεραπεία της σχιζοφρένειας-Ιστορική αναδρομή.....	44
Βιοδείκτες-Προοπτικές .....	47
Σκοπός .....	48
Υλικά και Μέθοδοι.....	48
Συλλογή δειγμάτων Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ) – Μοριακές τεχνικές ...	48
Απομόνωση συνολικού RNA από περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs).....	48
Απομόνωση ολικού DNA από περιφερικό αίμα .....	50
Μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. ....	50
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων .....	51
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) με τις τεχνολογίες SYBRgreen και TaqMan assay.....	53
Ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	58
Πυροαλληλούχιση-Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης.....	59
Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες .....	63
Στατιστική Ανάλυση .....	67
Αποτελέσματα .....	67
Περιγραφική Στατιστική – Δείγματα Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ).....	67
Πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) – Δείγματα ΠΨΕ .....	68

Επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος – Δείγματα ΠΨΕ πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση.....	74
Επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 – Δείγματα ΠΨΕ πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση .....	77
Επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος – Δείγματα ΠΨΕ κατόπιν φαρμακευτικής παρέμβασης .....	78
Διερεύνηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος σε κοινά δείγματα με ΠΨΕ πριν και κατόπιν της φαρμακευτικής παρέμβασης .....	81
Επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 – Κοινά δείγματα ΠΨΕ πριν και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση.....	83
Συσχετίσεις των γονιδίων ενδιαφέροντος με περιγραφικούς δείκτες – Δείγματα ΠΨΕ .....	84
Πυροαλληλούχιση - Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης - Δείγματα ΠΨΕ .....	86
Συσχετίσεις επιπέδων μεθυλίωσης με μοριακούς και περιγραφικούς δείκτες – Δείγματα ΠΨΕ .....	89
Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Συμπεριφορικά ευρήματα .....	93
Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Μοριακά ευρήματα .....	99
Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Συσχετίσεις συμπεριφορικών και μοριακών ευρημάτων .....	101
Συζήτηση.....	103
Συμπεράσματα .....	106
Περίληψη.....	107
Abstract .....	108
Βιβλιογραφία.....	109

## Εισαγωγή

### Οι ψυχικές διαταραχές στο γενικό πληθυσμό

Η ψυχική υγεία αποτελεί έναν γενικό όρο που περιλαμβάνει έννοιες όπως η συναισθηματική, η ψυχολογική και η κοινωνική ευημερία και παίζει καθοριστικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο κάθε άτομο αντιμετωπίζει την καθημερινή ζωή και τα προβλήματά της. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 27% του ενήλικου πληθυσμού (ηλικίες 18-65) σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης έχει βιώσει τουλάχιστον μία νευροψυχιατρική διαταραχή στη ζωή του, καθώς και παρενέργειες από την κατάχρηση ουσιών, ψυχώσεις, κατάθλιψη, άγχος και διατροφικές διαταραχές (1). Φυσικά, τα πληθυσμιακά αυτά μεγέθη είναι πιθανό να μην περιλαμβάνουν ολόκληρο το φάσμα των νευροψυχιατρικών διαταραχών καθώς και άτομα άνω των 65 ετών, μία ομάδα υψηλού κινδύνου (2). Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν την αύξηση εμφάνισης αγχωδών διαταραχών σε παιδιά μικρής ηλικίας, μερικά εκ των οποίων έχουν λάβει θεραπεία κατά την προσχολική ηλικία (3, 4). Οι ψυχικές διαταραχές αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενειών που πλήττουν τον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (5). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τρεις στους τέσσερις ασθενείς με κατάθλιψη στην Ευρώπη, δεν λαμβάνουν επαρκή θεραπεία (6). Η διάγνωση και η θεραπευτική προσέγγιση των ψυχικών διαταραχών βασίζονται αποκλειστικά στα συμπτώματα. Οι αιτίες, οι πιθανοί ενδιάμεσοι φαινότυποι του φάσματος της νόσου, καθώς και το βασικό βιολογικό υπόβαθρό της παραμένουν κατά μείζονα λόγο άγνωστα. Άλλωστε η διπολική διαταραχή, η διαταραχή μετατραυματικού στρες (Post-traumatic Stress Disorder, PTSD) και η κατάθλιψη είναι πιθανό να προκαλούνται από όμοιους σε μεγάλο βαθμό βιολογικούς μηχανισμούς. Εκτός αυτού, η ικανότητα προσαρμογής του ατόμου στις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις φαίνεται να συσχετίζεται με την ψυχική υγεία, ενώ πολλές εξελικτικές προσεγγίσεις προτείνουν πως ορισμένες ψυχικές διαταραχές εν τέλει αντικατοπτρίζουν την προσπάθεια προσαρμογής σε αντίξοα περιβάλλοντα και καταστάσεις (7-10).

### Η σχιζοφρένεια και τα κλινικά της χαρακτηριστικά

Η σχιζοφρένεια αποτελεί μία χρόνια νευροψυχιατρική διαταραχή και επηρεάζει περίπου το 1% του γενικού πληθυσμού, δηλαδή περισσότερους από 21 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως (5). Αποτελεί τη βαρύτερη ψυχιατρική νόσο και η έναρξή της είναι οξεία και θεαματική ή βραδεία με προϊούσα πορεία. Η σχιζοφρένεια χαρακτηρίζεται από ψυχωτικά επεισόδια, δηλαδή διακριτές συχνά αναστρέψιμες νοητικές καταστάσεις, κατά τις οποίες οι διεργασίες σκέψης του ατόμου δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν σωστά την πραγματικότητα. Ως Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο (ΠΨΕ) ορίζεται η πρώτη νόσηση ή/και η πρώτη επαφή ενός ασθενούς με ψύχωση με τις υπηρεσίες υγείας. Οι ασθενείς αυτοί αποτελούν πρωτοδιαγνωσμένα άτομα, νέας ηλικίας, τα οποία ουδέποτε έχουν λάβει αντιψυχωτική αγωγή στο παρελθόν. Στη διάρκεια ενός ψυχωτικού επεισοδίου τα άτομα δεν είναι σε θέση να διαχειριστούν τις πεποιθήσεις και τις αντιλήψεις τους με ρεαλιστικό τρόπο και να τις συγκρίνουν με αυτά που συμβαίνουν γύρω τους. Αυτή η απώλεια της διαχείρισης της πραγματικότητας συνοδεύεται και από άλλες διαταραχές των ανώτερων λειτουργιών,

ιδίως παραληρητικές ιδέες (παρεκκλίνουσες πεποιθήσεις που αγνοούν τα γεγονότα και δεν αλλάζουν αν προσκομιστούν στοιχεία που αποδεικνύουν το ανεδαφικό της φύσης τους), ψευδαισθήσεις, ασυνάρτητη σκέψη και ενίοτε σύγχυση. Παραδείγματος χάριν, άτομα με σχιζοφρένεια ακούν εσωτερικές φωνές (ακουστικές ψευδαισθήσεις) και ισχυρίζονται πράγματα που δεν είναι αληθινά. Ψυχωτικά επεισόδια δεν εμφανίζονται μόνο στη σχιζοφρένεια, αλλά και στις συναισθηματικές διαταραχές, στις βραχείες αντιδραστικές διαταραχές και σε παραληρητικές ιδέες έπειτα από λήψη ψυχοτρόπων ουσιών. Σημαντικός δείκτης της διάγνωσης της νόσου είναι ο χρόνος άνευ θεραπείας (Duration of Untreated Psychosis, DUP). Όταν το χρονικό αυτό διάστημα είναι μικρό, δηλαδή λίγες εβδομάδες από την έναρξη των συμπτωμάτων μέχρι την έναρξη της θεραπείας, δεν είναι πιθανό να έχουν επέλθει αλλαγές στον τρόπο ζωής λόγω της νόσου που μπορεί να επηρεάσουν τα ευρήματα. Πρόδρομα συμπτώματα συχνά προηγούνται του αρχικού επεισοδίου της σχιζοφρένειας. Αυτά περιλαμβάνουν την κοινωνική απομόνωση και απόσυρση, την αδυναμία εκπλήρωσης των κοινωνικά αναμενόμενων ρόλων, την ιδιόμορφη συμπεριφορά και τις παράξενες ιδέες, την παραμέληση της ατομικής υγιεινής και την άμβλυση του συναισθήματος. Η πρόδρομη αυτή περίοδος ακολουθείται από ένα ή περισσότερα ψυχωτικά επεισόδια που μπορεί να περιλαμβάνουν απώλεια του ελέγχου της πραγματικότητας, παραληρητικές ιδέες και ψευδαισθήσεις. Τα επεισόδια αυτά διακόπτονται από περιόδους κατά τις οποίες το άτομο συμπεριφέρεται εκκεντρικά, είναι κοινωνικά απομονωμένο, εμφανίζει χαμηλό επίπεδο συναισθηματικής δόνησης, απόσυρση, μείωση της βούλησης, έκπτωση της λειτουργικότητας, μείωση του αυθόρμητου λόγου, μικρό φάσμα συγκέντρωσης της προσοχής και έλλειψη κινήτρων. Αυτά τα συμπτώματα της μη ψυχωτικής περιόδου χαρακτηρίζονται αρνητικά διότι αντανακλούν την απουσία κάποιων φυσιολογικών κοινωνικών και διαπροσωπικών συμπεριφορών. Αντιθέτως οι έντονες διαταραχές των ψυχωτικών επεισοδίων χαρακτηρίζονται ως θετικά συμπτώματα διότι αντανακλούν την παρουσία σαφώς παθολογικής συμπεριφοράς και υπερέχουν στην οξεία έναρξη της νόσου. Τα αρνητικά συμπτώματα υπερτερούν κατά τη βραδεία έναρξη και μετά την ύφεση των θετικών συμπτωμάτων. Τα γνωσιακά συμπτώματα αφορούν δυσχέρειες στην επεξεργασία των πληροφοριών, τη συγκέντρωση, την προσοχή και τις επιτελικές λειτουργίες. Η διάγνωση της σχιζοφρένειας τίθεται, σύμφωνα με το DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition), μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος έξι μηνών με ενεργό συμπτωματολογία (θετική ή/και αρνητική) (11). Στη διάρκεια του ψυχωτικού επεισοδίου πρέπει να υφίστανται μία ή και περισσότερες από τις τρεις ομάδες θετικών συμπτωμάτων:

- Παραληρητικές ιδέες (η πεποίθηση ότι κάποιος διώκουν το άτομο ή ότι τα συναισθήματα, οι σκέψεις και οι πράξεις του ελέγχονται από μια εξωτερική δύναμη).
- Εκσεσημασμένες ψευδαισθήσεις.
- Διάσπαση της σκέψης, ασάφεια, απώλεια του φυσιολογικού συνειρμού μεταξύ των ιδεών ή ένδεια λόγου που συνοδεύεται από άμβλυση του συναισθήματος.

Η αναλογία αντρών και γυναικών που νοσούν από σχιζοφρένεια είναι 1:1, με τις γυναίκες όμως να εμφανίζουν έναρξη της νόσου σε ελαφρά μεγαλύτερη ηλικία και να έχουν καλύτερη πορεία και πρόγνωση (12).

### **Αίτια της νόσου και αντιμετώπιση**

Η θεραπευτική διαχείριση της σχιζοφρένειας περιλαμβάνει φαρμακευτική αγωγή και ψυχοκοινωνική υποστήριξη. Παρόλα αυτά, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών δεν έχει πρόσβαση στην απαραίτητη θεραπεία. Μέτρα πρόληψης και διαχείρισης της κατάστασης αποτελούν η ειδική εκπαίδευση του προσωπικού υγείας, η βελτιστοποίηση της ικανότητας πρόσβασης στη φαρμακευτική αγωγή, η υποστήριξη των ασθενών και των οικογενειών τους σε συνδυασμό με τη σωστή πληροφόρηση καθώς και η ενημέρωση και ευαισθητοποίηση του ευρέως κοινού για την μείωση του στιγματισμού και στοχοποίησης των ευπαθών ομάδων. Η αλληλεπίδραση του κοινωνικού περιβάλλοντος, των ψυχολογικών χαρακτηριστικών, του γενετικού υποβάθρου, της αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος, καθώς και της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων (επιγενετική), αποτελούν παράγοντες αλληλεπίδρασης για την ευημερία αλλά και την πιθανή εμφάνιση νευροψυχιατρικών διαταραχών σε κάθε άτομο. Η μεγάλη πρόκληση της επιστημονικής έρευνας γύρω από την εμφάνιση της σχιζοφρένειας είναι ο εντοπισμός και η διαλεύκανση των παραγόντων αυτών αλλά και του μηχανισμού αλληλεπίδρασής τους στην αιτιοπαθολογία της νόσου. Η πρόληψη και η θεραπεία επίσης, θα έπρεπε να λαμβάνουν υπόψιν τις ατομικές διαφορές σε γενετικό, επιγενετικό και περιβαλλοντικό επίπεδο ώστε να είναι όσο το δυνατόν αποτελεσματικές. Αν και τα αντιψυχωτικά φάρμακα έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερος αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των αρνητικών και γνωσιακών συμπτωμάτων, που έχουν ως συνέπεια τη χρονιότητα της νόσου και τη χαμηλή λειτουργικότητα με μόνο το 15% των ασθενών με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο να έχει πλήρη αποκατάσταση της λειτουργικότητας (13, 14). Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στην αναγκαιότητα έρευνας γύρω από την ψυχοπαθολογία της σχιζοφρένειας και στη δημιουργία μοντέλων που περιγράφουν και διερευνούν το γενετικό υπόβαθρο, τη γονιδιακή ρύθμιση μέσω επιγενετικών μηχανισμών και την απορρύθμιση ενδοκρινικών μονοπατιών. Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής κανένα από τα υπάρχοντα μοντέλα δεν έχει καταφέρει να περιγράψει και να εξηγήσει τη φαινοτυπική ποικιλομορφία της σχιζοφρένειας ούτε και την ατομική απόκριση στη φαρμακευτική αγωγή (15). Φαίνεται πως η τυποποιημένη χορήγηση θεραπείας σε διαταραχές όπως η ψύχωση, δεν επαρκεί για την ύφεση των συμπτωμάτων, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η ελάχιστη δοσολογία σε συνδυασμό με τον περιορισμό στο χρόνο χορήγησης θεραπείας φαίνεται να συσχετίζονται με καλύτερα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (16-18). Ομοίως, παρόλο που το γενετικό υπόβαθρο έχει δείξει να επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισης της σχιζοφρένειας, δεν αποτελεί αποκλειστική αιτία αυτής, καθώς πρόκειται για μια πολυπαραγοντική διαταραχή στην οποία συμβάλλουν αλληλεπιδράσεις από το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο ταυτόχρονα (19). Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, κοινωνικοί παράγοντες όπως η ανεργία, οι συνθήκες οικονομικής εξαθλίωσης, το αντίξοο εργασιακό περιβάλλον και ο διαπροσωπικός εκφοβισμός, αποτελούν παράγοντες της καθημερινής ζωής που επιβαρύνουν την ψυχική υγεία (20). Η ύπαρξη κοινωνικών προγραμμάτων και προγραμμάτων ψυχολογικής υποστήριξης που οργανώνονται από ειδικούς ψυχικής υγείας μπορούν να βοηθήσουν τις πληθυσμιακές ομάδες που εκτίθενται σε στρεσογόνα περιβάλλοντα, παρόλα αυτά το αποτέλεσμα της ψυχολογικής υποστήριξης είναι πιθανό να επηρεάζεται και από βιολογικές παραμέτρους, χαρακτηριστικές κάθε ατόμου, όπως το γενετικό του υπόβαθρο ή το επιγενετικό του προφίλ. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση μη-γενετικών/περιβαλλοντικών παραγόντων με τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, περιλαμβανομένης της διατροφής, της μητρικής φροντίδας/συμπεριφοράς, του ψυχοκοινωνικού στρες καθώς και των αντίξοων συνθηκών κατά τη νεαρή ηλικία, υποδηλώνοντας πως το περιβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό νευρωνικών δικτύων του εγκεφάλου, από το επίπεδο των μεταβολιτών ενός κυττάρου έως τη δημιουργία

των συνάψεων (21, 22). Οι μοριακές επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο DNA στους πυρήνες των κυττάρων, μπορούν να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες εντυπώνονται στο γενετικό υλικό, επηρεάζοντας το φαινότυπο και την ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών ατόμων, αλλά και στο ίδιο άτομο σε διαφορετικές στιγμές της ζωής του. Η πολύπλοκη οργάνωση του εγκεφάλου δεν αποτελεί μονάχα αποτέλεσμα της έκφρασης γονιδίων αλλά επηρεάζεται επίσης από τη δημιουργία, εγκαθίδρυση και ενδυνάμωση των υπαρχουσών συνάψεων λόγω της αλληλεπίδρασης του ατόμου με το περιβάλλον, είτε αυτό είναι κοινωνικό, ψυχολογικό είτε πολιτισμικό. Ομοίως, η ομοιόσταση, περιλαμβανομένης της σύνθετης αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται ειδικά σε κάθε τύπο κυττάρου, καθώς και το σύνολο των μεταβολικών μονοπατιών μπορεί να επηρεάζονται επιγενετικά, με αποτέλεσμα μεταβολές στη λειτουργία τους. Οι επιγενετικοί αυτοί μηχανισμοί φαίνεται να έχουν μεγάλη εξελικτική σημασία, επιτρέποντας στους οργανισμούς να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων τους ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του οργανισμού, την ωρίμανση του εγκεφάλου και των λειτουργιών του καθώς και τη μεταβολική απόκριση στα εξωτερικά ερεθίσματα από τη μεταγεννητική ακόμη περίοδο (23). Το χαρακτηριστικό της επιγενετικής ρύθμισης είναι η αντιστρεψιμότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων, φαινόμενο το οποίο μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο, όχι μόνο αναφορικά με τα αντιψυχωτικά φάρμακα αλλά και σχετικά με την έκθεση σε αντίξοα ή ευχάριστα περιβάλλοντα τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων, συνεπώς και τη μεταβολική απόκριση του οργανισμού (24, 25).

### **Γενετική δομική ποικιλομορφία, περιβάλλον, σχιζοφρένεια και φαινότυποι ψυχικής υγείας**

Ο προσδιορισμός του μεγάλου ποσοστού δομικής ποικιλομορφίας του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτέλεσε μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στον τομέα της γενετικής. Αρχικά θεωρούνταν πως η δομική ποικιλομορφία, συμπεριλαμβανομένων των ελλειμμάτων, διπλασιασμών και αναστροφών των χρωμοσωμικών τμημάτων, ήταν παθολογική, ενώ το «φυσιολογικό» ανθρώπινο γονιδίωμα απαιτούσε την ύπαρξη δυο αντιγράφων κάθε γενετικού τόπου. Σε αυτό συνέβαλλε η άποψη πως η γενετική ανισορροπία συνδέεται με παθολογικό φαινότυπο. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών γονοτύπησης του DNA, σε μεγέθη έως και του ενός νουκλεοτιδίου, αποκάλυψαν το εύρος της δομικής ποικιλομορφίας του. Ως πολυμορφισμός ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων γενετικά καθορισμένων εναλλακτικών γονοτύπων σε ένα πληθυσμό, σε τέτοια συχνότητα ώστε ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με επαναλαμβανόμενες μεταλλαγές. Πρακτικά ένας γενετικός τόπος θεωρείται πολυμορφικός, εάν το σπάνιο αλληλόμορφο έχει μια συχνότητα τουλάχιστον 0,01, με αποτέλεσμα οι ετεροζυγότες που τα φέρουν, να εμφανίζονται σε συχνότητα μεγαλύτερη του 2%. Περισσότερο από το 1/3 των γενετικών τόπων του ανθρώπου που έχουν μελετηθεί, φαίνεται να είναι πολυμορφικοί. Γενικά θεωρείται πως οι περισσότεροι σταθεροί πολυμορφισμοί στον άνθρωπο είναι αποτέλεσμα επιλογής μεταλλαγμένων αλληλομόρφων που προσφέρουν κάποιο πλεονέκτημα, παρόλο που οι εναλλακτικές πιέσεις που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση τέτοιων πολυμορφισμών, στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένουν άγνωστες. Ο αριθμός και το μέγεθος των δομικά πολυμορφικών περιοχών του DNA ποικίλει, σε οποιονδήποτε φυσιολογικό φαινότυπο. Δεδομένου του ότι τέτοιου είδους ποικιλομορφία, εμφανίζεται σε κάθε γονιδίωμα, καθώς και το ότι η ύπαρξη αλληλομόρφων

μπορεί να συμβάλλει στο φαινότυπο, είναι λογικό να υποθεθεί πως τέτοιου είδους μεταλλαγές μπορεί να συνδέονται με την πιθανότητα εμφάνισης σύνθετων, πολυπαραγοντικών, ψυχιατρικών φαινοτύπων (26). Το οικογενειακό ιστορικό νόσου, αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες πιθανότητας εμφάνισης ψυχιατρικών φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας. Μελέτες διδύμων αποκαλύπτουν πως η κληρονομικότητα ή η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου λόγω γενετικών παραγόντων αγγίζει το 50% για τη σχιζοφρένεια. Μελέτες γενετικής σύνδεσης οικογενειών αποκαλύπτουν πως διάφοροι γενετικοί τόποι σε χρωμοσώματα όπως τα 1q, 5q, 6p και 22q είναι πιθανό να συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου. Οι ατομικές διαφορές στη συμπεριφορά είναι μερικώς κληρονομήσιμες και συνεπώς καθορίζονται από τη γενετική ποικιλομορφία, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζονται και από περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αναφορικά με τα συμπτώματα των ψυχιατρικών νοσημάτων, οι πιο σημαντικοί παράγοντες για την εμφάνισή τους είναι οι αντιξοότητες κατά τη νεαρή ηλικία. Το μοντέλο διάθεσης-στρες που αφορά τη συμπεριφορά, διαχωρίζει τα άτομα σε ευαίσθητα, δηλαδή σε άτομα επιρρεπή στα αρνητικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, και σε ανθεκτικά (27, 28). Επιπλέον, η γενετική συνιστώσα αλληλεπιδρά με τα εξωτερικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Το χρονικό πλαίσιο έκθεσης του ατόμου στα ερεθίσματα αυτά είναι εξίσου σημαντικό, καθώς τα άτομα μπορεί να εκτίθενται σε εναλλασσόμενα θετικά ή αρνητικά περιβάλλοντα κατά τη διάρκεια της ζωής τους (29). Τα αναπτυξιακά ερεθίσματα μπορεί να έχουν θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο για το άτομο, αναλόγως των μετέπειτα εμπειριών στη ζωή του. Το μοντέλο των τριών συνιστωσών (3-hit concept) περιγράφει πως η αλληλεπίδραση του γενετικού υποβάθρου (1<sup>η</sup> συνιστώσα) σε συνδυασμό με τις αντιξοότητες κατά τη νεαρή ηλικία (2<sup>η</sup> συνιστώσα), όπως παρουσιάζεται από τις νευροενδοκρινολογικές και επιγενετικές μεταβολές ενός ατόμου, είναι σε θέση να προγραμματίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, διαμορφώνοντας ανάλογα το φαινότυπο. Τέτοιου είδους φαινότυποι είναι πιθανό να μεταβάλλονται λόγω περιβαλλοντικών ερεθισμάτων κατά την ενήλικη ζωή (3<sup>η</sup> συνιστώσα) (30). Οι νοητικές λειτουργίες του ατόμου μπορεί να επηρεάζονται αρνητικά από ένα είδος περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, επηρεάζοντας την ευαισθησία του ατόμου (vulnerability), αλλά κατά την έκθεση σε εμπλουτισμένα περιβάλλοντα το άτομο μπορεί να καλλιεργεί ανθεκτικότητα (resilience). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί θεωρούνται οι κύριοι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, σε συνδυασμό με τη γενετική ποικιλομορφία. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, τροποποιήσεις ιστονών, μη-κωδικά RNAs) μπορούν να μεταβάλλουν τη μεταγραφή του γονιδιώματος, χωρίς να επηρεάζουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Είναι γνωστό πως ορισμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα μεταβάλλουν άμεσα την επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος, κατά τη διάρκεια ευαίσθητων αναπτυξιακών περιόδων αλλά και μετέπειτα (31-33). Επιπλέον, οι επιγενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα είναι πιθανό να μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην επόμενη (34). Τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερες έρευνες επικεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στην ανάπτυξη νευροψυχιατρικών διαταραχών συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας (35). Παρόλο που η πιθανότητα εμφάνισης της σχιζοφρένειας και άλλων ψυχωτικών διαταραχών επηρεάζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες και ανωμαλίες κατά την εμβρυική ανάπτυξη του εγκεφάλου, οι νευροαναπτυξιακές διαδικασίες κατά την εφηβεία φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην κλινική εμφάνιση της νόσου (36-38).

## **Οι τραυματικές εμπειρίες ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ)**

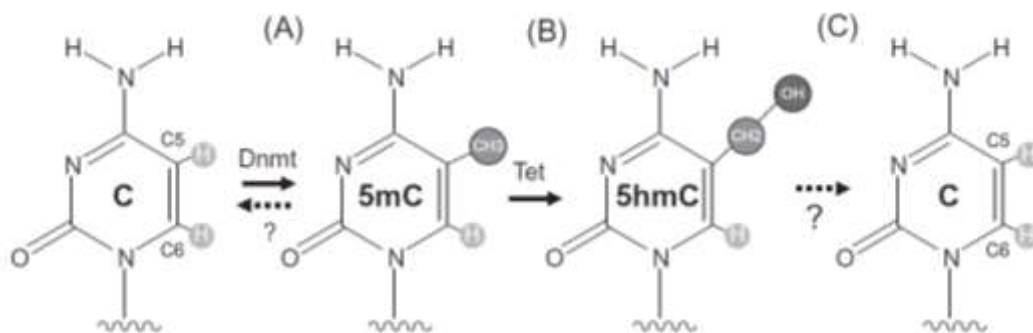
Οι τραυματικές εμπειρίες κατά τη διάρκεια της ζωής θεωρούνται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ενός Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ), για γνωσιακά ελλείμματα σε άτομα με σχιζοφρένεια αλλά και για γνωσιακές προκαταλήψεις και εμπειρίες του φάσματος της ψύχωσης σε υποκλινικές περιπτώσεις (39-43). Τέτοιου είδους εμπειρίες μπορεί να περιλαμβάνουν φυσική, συναισθηματική ή σεξουαλική κακοποίηση, συναισθηματική αμέλεια και απώλεια γονέα, ενώ άτομα που έχουν υποστεί δυσκολίες κατά τη νεαρή ζωή φαίνεται να έχουν σχεδόν τρεις φορές υψηλότερη πιθανότητα να εμφανίσουν συμπτώματα ψύχωσης (44). Πιθανούς συμπαράγοντες φαίνεται να αποτελούν η διαβίωση σε μεγάλες πόλεις, οι στρεσογόνες εμπειρίες, το οικογενειακό ιστορικό νοσημάτων ψυχικής υγείας και η χρήση κάνναβης ή άλλων ουσιών. Παρόλο που έχει παρατηρηθεί πως οι αρνητικές εμπειρίες κατά την παιδική ζωή μπορεί να συμβάλλουν στην εμφάνιση ψύχωσης, έχει επίσης παρατηρηθεί πως η συσσωρευτική δράση στρεσογόνων παραγόντων μπορεί να συντελέσει σημαντικά στην εμφάνισή της (45, 46). Οι εμπειρίες του φάσματος της ψύχωσης θεωρούνται φαινόμενα που προϋπάρχουν της εμφάνισης του ΠΨΕ (47). Αυτές οι εμπειρίες περιλαμβάνουν αντιληπτικές ανωμαλίες (ακοή ασυνήθιστων ήχων) και ιδέες που μοιάζουν με παραληρητικές (διωκτικοί ιδεασμοί ή μαγική σκέψη), οι οποίες κυμαίνονται από αντιληπτικές ψευδαισθήσεις έως υποκλινικά εξασθενημένα θετικά συμπτώματα (42). Επανελημμένως, έχει αναφερθεί πως οι εμπειρίες του φάσματος της ψύχωσης είναι συνήθεις και στο γενικό πληθυσμό και συχνά δεν συσχετίζονται με αυξημένο στρες (48-50). Μια πρόσφατη έρευνα σε περισσότερους από 31.000 συμμετέχοντες υποστηρίζει πως η εμφάνιση των εμπειριών αυτών αγγίζει το 7,2% (50). Η έκθεση σε οξύ ή χρόνια στρες μεταβάλλει τη φυσιολογική λειτουργία του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) και ενεργοποιεί μια αλληλουχία βιολογικών αντιδράσεων που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΨΕ (51). Σε ευαίσθητοποίηση λόγω στρες φαίνεται να οδηγούν τα επαναλαμβανόμενα στρεσογόνα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τα οποία ασκούν συσσωρευτική επιβλαβή δράση στους μηχανισμούς απόκρισης στο στρες και επαναφοράς στην ομοιόσταση (52, 53). Τα πρόδρομα στάδια του ΠΨΕ χαρακτηρίζονται από επιδείνωση της λειτουργικότητας και αύξηση των συμπτωμάτων που προηγούνται της έναρξης της ψύχωσης (54). Η διάρκεια της πρόδρομης φάσης μπορεί να ποικίλλει από μήνες μέχρι χρόνια, με τα χαρακτηριστικά σημάδια να περιλαμβάνουν εξασθενημένα θετικά συμπτώματα (ασυνήθιστες αισθητηριακές εμπειρίες και ιδέες, καχυποψία και αποδιοργανωμένη σκέψη), αρνητικά συμπτώματα (κοινωνική απόσυρση, ανηδονία και μειωμένη συναισθηματική δόνηση και έκφραση), καθώς και μια σειρά ειδικά συμπτώματα όπως άγχος, κατάθλιψη και μειωμένη προσοχή (55-58).

## **Επιγενετικά φαινόμενα και η πιθανή επίδρασή τους στο φαινότυπο**

Έχει παρατηρηθεί πως άνθρωποι με σχιζοφρένεια και ΠΨΕ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, ενώ τα επίπεδα κορτιζόλης αναφορικά με την έκθεση σε στρεσογόνο ερέθισμα παραμένουν χαμηλά (59-61). Το μοντέλο διάθεσης-στρες αρχικά διατυπώθηκε από τους Bleuler και Rosenthal και περιέγραφε τη σχιζοφρένεια ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μιας πληθώρας γονιδίων και ακραίων



περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, κανένα εκ των οποίων δε μπορεί να προκαλέσει το φαινόμενο από μόνο του (62-64). Οι χαρακτηρισμένοι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης σχιζοφρένειας περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων μη γενετικούς, προ- και περι-γεννητικούς παράγοντες που πιθανά ασκούν σημαντική επίδραση στον εγκέφαλο. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν λοιμώξεις, μαιευτικές επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη ή τη γέννηση, προγεννητική έκθεση σε τοξίνες ή ακτινοβολία, μητρικό στρες και κακή διατροφή κατά την εγκυμοσύνη, κυοφορία κατά τους χειμερινούς μήνες και αυξημένη πατρική ηλικία (65, 66). Επιπλέον, οι στρεσογόνες εμπειρίες κατά την παιδική ηλικία καθώς και η μετέπειτα έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΨΕ, μέσω δια-ευαισθητοποίησης των συστημάτων του κεντρικού νευρικού συστήματος (67). Οι επιδράσεις αυτών των περιβαλλοντικών παραγόντων επιδρούν διαφορετικά στο φαινόμενο, αναλόγως του υποκείμενου γονοτύπου, καθώς και του επιγονιδιώματος που ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση (68, 69). Σύμφωνα με το πρότυπο της «Αναπτυξιακής Προέλευσης Υγείας και Νόσου» (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) η έκθεση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα κατά τα κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια μπορεί να συνεισφέρει σε μακροπρόθεσμες τροποποιήσεις, προγραμματίζοντας έτσι την απόκριση του οργανισμού σε βιολογικό επίπεδο (70). Τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα εντυπώνονται στο γονιδίωμα και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της επιγενετικής ρύθμισης. Η επιγενετική ρύθμιση μπορεί να περιγραφεί μέσω διαδικασιών όπως η μεθυλίωση του DNA, οι επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ιστονικός κώδικας) και η δράση των μη-κωδικών μορίων RNA (71). Ο αρχικός ορισμός της επιγενετικής δόθηκε από τον Conrad Waddington και αφορούσε τη μελέτη των μηχανισμών μέσω των οποίων ο γονότυπος παράγει το φαινόμενο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Έπειτα, οι Nanney, Riggs και Holliday καθώς και ο Bird, διεύρυναν τον ορισμό, ώστε να περιγράψουν την κληρονομικότητα των εναλλακτικών καταστάσεων της χρωματίνης, χωρίς μεταβολές στο γονιδίωμα. Ο πιο σύγχρονος ορισμός της επιγενετικής αφορά στη μελέτη του συνόλου των μορίων και μηχανισμών που συντηρούν την εναλλακτική δράση των γονιδίων χωρίς να μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA (71). Η μεθυλίωση του DNA είναι η διαδικασία προσθήκης μεθυλομάδων (-CH<sub>3</sub>) στο πέμπτο μόριο άνθρακα (C5) των καταλοίπων βάσεων κυτοσίνης (5mC). Κατά κύριο λόγο αυτό συμβαίνει στα δινουκλεοτίδια με αλληλουχία CpG, πληθώρα των οποίων εντοπίζονται στις νησίδες CpG (CpG islands) κοντά στις περιοχές υποκινητών γονιδίων (72). Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyl transferases, DNMTs) και συγκεκριμένα τις Dnmt1, Dnmt3A, Dnmt3B. Οι Dnmt3A και Dnmt3B καταλύουν την εκ νέου (de novo) μεθυλίωση, ενώ οι Dnmt1 συντηρούν το πρότυπο μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή και επιδιόρθωση των χρωμοσωμάτων (73-75).



### **Εικόνα 1: Μεθυλίωση, υδροξυμεθυλίωση και απομεθυλίωση.**

(A) Η προσθήκη της μεθυλομάδας καταλύεται από τα ένζυμα *Dnmt*, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες. (B) Το ενδιάμεσο προϊόν, 5-μέθυλο-κυτοσίνη (5mC) μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-μέθυλο-κυτοσίνη (5hmC) και (C) πιθανά απομεθυλιώνεται. Είναι ασαφές εάν η 5-υδροξυ-μέθυλο-κυτοσίνη αποτελεί τελικό προϊόν της αντίδρασης απομεθυλίωσης ή ενδιάμεσο (75).

### **Η νευροενδοκρινική απόκριση στο στρες μέσω του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) και των μοριακών του τελεστών**

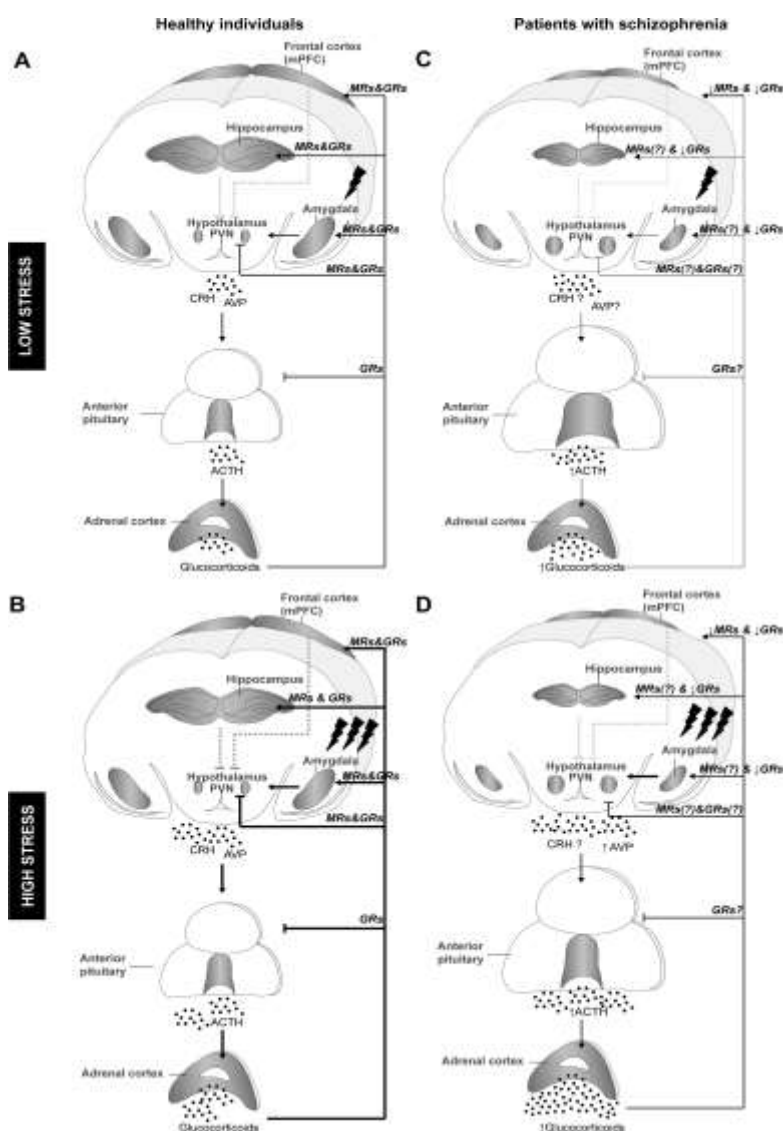
Η φυσιολογική απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα

Η απόκριση στο στρες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση συστημάτων όπως το ενδοκρινικό, το νευρικό και το ανοσοποιητικό (76-80). Τα όργανα που συμμετέχουν στην ομοιοστατική ρύθμιση του οργανισμού κατά την έκθεση σε στρεσογόνα περιβαλλοντικά σήματα εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στους περιφερικούς ιστούς. Οι δομές του εγκεφάλου που έχουν βασικό ρόλο, είναι ο παρακοιλιακός πυρήνας (paraventricular nucleus, PVN) του υποθαλάμου (hypothalamus), ο πρόσθιος λοβός (anterior hypophysis) της υπόφυσης (pituitary) και τα επινεφρίδια (adrenal glands). Τα όργανα αυτά αποτελούν τον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) που ρυθμίζει επίσης τους καρδιακούς ρυθμούς. Η υπόφυση συνδέεται με τον υποθάλαμο μέσω ενός μίσχου, του χοανοειδούς δακτυλίου, ο οποίος περιέχει νευρικές ίνες και αιμοφόρα αγγεία. Στους ανθρώπους, η υπόφυση αποτελείται από δύο λοβούς, την πρόσθια υπόφυση ή αδενοϋπόφυση και την οπίσθια υπόφυση ή νευροϋπόφυση (81). Οι ορμόνες του υποθαλάμου, που ονομάζονται εκλυτικές ορμόνες του υποθαλάμου μεταφέρονται στην αδενοϋπόφυση. Έτσι μια εκλυτική ορμόνη του υποθαλάμου ελέγχει την έκκριση μιας ορμόνης της πρόσθιας υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει την έκκριση μιας άλλης ορμόνης από κάποιον ενδοκρινή αδένα στην περιφέρεια. Η ακολουθία αυτή έχει μεγάλη προσαρμοστική αξία, αφού επιτρέπει πολλαπλές ορμονικές ανατροφοδοτήσεις. Συγκεκριμένα, ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου συνθέτει και εκκρίνει κορτικοεκλυτίνη (Corticotropin-releasing hormone, CRH) και αργινίνη-βασοπρεσσίνη (Arginine Vasopressin, AVP), οι οποίες, σε απόκριση στο στρες, απελευθερώνονται και καταλήγουν στην αδενοϋπόφυση. Εκεί προσδέονται σε ειδικούς υποδοχείς και επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (Pro-Opiomelanocortin, POMC), το οποίο διασπάται ενζυμικά σε κορτικοτροπίνη (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH) και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα στόχοι της ACTH βρίσκονται στα επινεφρίδια, στα οποία κατόπιν πρόσδεσής της, επάγεται η σύνθεση και η έκφραση των γλυκοκορτικοειδών (82). Τα γλυκοκορτικοειδή, η κορτιζόλη στον άνθρωπο και η κορτικοστερόνη στα τρωκτικά, αποτελούν μια υποκατηγορία στεροειδών ορμονών που ρυθμίζουν μεταβολικές, ανοσολογικές, συμπεριφορικές και καρδιαγγειακές διαδικασίες. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή φτάσουν με την κυκλοφορία του αίματος στα όργανα στόχους και προσδεθούν στους υποδοχείς τους, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR) και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptor, MR), τους ενεργοποιούν ώστε να οι ίδιοι να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μέσω των γενωμικών μηχανισμών τους περιλαμβάνουν τις άμεσες, δηλαδή την πρόσδεσή τους στις περιοχές απάντησης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements, GREs) και τις έμμεσες, που διαδραματίζονται μέσω πρόσδεσης των υποδοχέων GR/MR σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (83).

Συγκεκριμένα, σε καταστάσεις στρες, οι αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών στο αίμα, δρουν στα επίπεδα του υποθαλάμου και της πρόσθιας υπόφυσης. Τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται στους υποδοχείς τους, εισέρχονται στους πυρήνες των κυττάρων-στόχων και επάγουν την έκφραση γονιδίων. Ακολουθεί μείωση της απελευθέρωσης της CRH από τον υποθάλαμο και της ACTH από την πρόσθια υπόφυση και μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης τερματίζεται η απόκριση στο στρες και το σύστημα επανέρχεται σε ισορροπία (84).

Η απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα στη σχιζοφρένεια

Ορισμένοι από τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που συσχετίζονται με την εμφάνιση της σχιζοφρένειας συμβάλλουν στην απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ (85). Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο το εάν αυτός ο απορρυθμισμένος νευροενδοκρινικός φαινότυπος είναι χαρακτηριστικό της νόσου ή εάν συσχετίζεται με την κατάθλιψη, η οποία εμφανίζει μεγάλη συννοσηρότητα με τη σχιζοφρένεια (7-75% των ασθενών) (86-88). Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και ACTH παρατηρούνται σε διαφορετικές φάσεις της σχιζοφρένειας και ιδιαίτερα στην οξεία φάση της νόσου πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση (89). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη μεταβεβλημένη αντίληψη του στρες που έχει το άτομο και να συνοδεύεται από ψυχωτικά συμπτώματα (90). Επιπλέον, η φαρμακευτική παρέμβαση φαίνεται να επηρεάζει τα βασικά επίπεδα λειτουργίας του άξονα ΥΥΕ. Τα άτομα με σχιζοφρένεια αντιμετωπίζουν με πληθώρα αρνητικών συναισθημάτων τα καθημερινά στρεσογόνα ερεθίσματα (85). Αυτό συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και AVP (91). Οι κύριες περιοχές του εγκεφάλου που διαμεσολαβούν την απόκριση στο στρες είναι η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος φλοιός. Σε απεικονιστικές μελέτες σε άτομα με σχιζοφρένεια, εμφανίζεται μεταβολή στον όγκο των περιοχών αυτών. Το μέγεθος του ιπποκάμπου συσχετίστηκε αρνητικά με τα βασικά επίπεδα κορτιζόλης ή την καθημερινή ευαισθητοποίηση κατόπιν στρεσογόνου ερεθίσματος (92-94). Το μέγεθος της αμυγδαλής μπορεί να εμφανίζει μεταβολές αναλόγως της φάσης της ασθένειας. Γενικά, το στρες κατά τη νεαρή ηλικία ή μετέπειτα μπορεί να μεταβάλλει εξίσου το μέγεθος του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής (95-97). Μείωση στο μέγεθος του προμετωπιαίου φλοιού και αύξηση στον ιππόκαμπο και την υπόφυση, έχουν επίσης παρατηρηθεί (98, 99). Σε μοριακό επίπεδο, έχει παρατηρηθεί μειορρύθμιση στην έκφραση των υποδοχέων GR και MR, σε περιοχές του μεταχιακού συστήματος που ρυθμίζουν τον άξονα ΥΥΕ (προμετωπιαίος φλοιός, αμυγδαλή και ιππόκαμπος) (100-102). Αυτό φαίνεται να λειτουργεί ως αντισταθμιστικός μηχανισμός που προστατεύει από τη χρόνια υπερκορτιζολαιμία. Τα επίπεδα έκφρασης των συμπαραγόντων του GR φαίνεται να υποστηρίζουν τη μειορρύθμιση στη σηματοδότησή του (103). Αυτή η μείωση στη λειτουργικότητα του υποδοχέα, που προκαλείται από μειωμένη ρύθμιση ή ευαισθησία του (αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή), υποδεικνύει την ανεσταλαμμένη αρνητική ανατροφοδότηση των γλυκοκορτικοειδών που παρατηρείται στη σχιζοφρένεια και οδηγεί σε παρατεταμένη απόκριση στο στρες μέσω απευαισθητοποίησης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (104).



**Εικόνα 2: Ο άξονας ΥΥΕ σε υγιείς ανθρώπους και στη σχιζοφρένεια.** Μετά την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ και σε απόκριση στο στρεσογόνο ερέθισμα, η ανατροφοδότηση από τα γλυκοκορτικοειδή συμβαίνει σε διάφορα επίπεδα του νευροενδοκρινικού συστήματος. Άμεση αρνητική ανατροφοδότηση συμβαίνει στο επίπεδο του υποθαλάμου και της υπόφυσης, ενώ έμμεση συμβαίνει διαμέσου της ενεργοποίησης του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού. Παρόλα αυτά, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τη δράση τους και στο επίπεδο της αμυγδαλής, αυξάνοντας τα επίπεδα της CRH, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία των νευρώνων του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου. Σε καταστάσεις χαμηλού στρες (Α) η δράση του άξονα ΥΥΕ και η ενεργοποίηση των μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης είναι ασθενέστερη από ότι στις περιπτώσεις ισχυρού στρες (Β). Η απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ στη σχιζοφρένεια περιλαμβάνει περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος που είναι μικρότερες σε μέγεθος και εμφανίζουν μεταβολές στη λειτουργία τους. Ταυτόχρονα, ο υποθάλαμος και η υπόφυση είναι μεγαλύτερες σε μέγεθος πιθανά λόγω της ανεπαρκούς αρνητικής ανατροφοδότησης (αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή). Σε περιπτώσεις ασθενούς στρες (Γ) η αμυγδαλή, που διαμεσολαβεί την προσδοκία του ψυχοκοινωνικού στρεσογόνου ερεθίσματος, ενεργοποιείται σε χαμηλότερο βαθμό από ότι στα υγιή άτομα, αλλά ταυτόχρονα η αρνητική ανατροφοδότηση από τα γλυκοκορτικοειδή (λόγω μειωμένης έκφρασης των υποδοχέων MR/GR) είναι λιγότερο αποδοτική, γεγονός που καταλήγει σε ανιχνεύσιμη

μεταβολή στα επίπεδα των ορμονών μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών. Παρόλα αυτά, όταν το στρεσογόνο ερεθίσμα ξεπεράσει κάποια όρια (Δ, συνθήκες υψηλού στρες), η αμυγδαλή ενεργοποιείται και η διαφορά στη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ είναι ακόμη ισχυρότερη (30, 105).

Η έκθεση σε πολλαπλά στρεσογόνα ερεθίσματα και η απορρύθμιση των μη-γραμμικών αλληλεπιδράσεων του νευροενδοκρινικού συστήματος, όπως η αδυναμία του τερματισμού του άξονα ΥΥΕ, οδηγούν σε φθορά του οργανισμού και του εγκεφάλου, η οποία ονομάζεται αλλοστατικό φορτίο (106, 107). Αλλόσταση ονομάζεται η ενεργός διαδικασία προσαρμογής σε στρεσογόνα ερεθίσματα μέσω τελεστών όπως η κορτιζόλη, το αυτόνομο, το μεταβολικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, τα οποία λειτουργούν παράλληλα για τη διατήρηση της ομοιόστασης (106). Αλλοστατικό φορτίο ονομάζεται η συσσώρευση παθολογικών χαρακτηριστικών τα οποία πιθανά προκύπτουν από την έκθεση σε υπέρμετρο στρες (108). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως οι άνθρωποι με ΠΥΕ, ιδιαίτερα όσοι δε λαμβάνουν θεραπεία, έχουν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης. Επιπλέον φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ACTH σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, καθώς και αυξημένα επίπεδα ομοβανιλλικού οξέος (μεταβολίτης της ντοπαμίνης) (109-112). Ταυτόχρονα, μεταθανάτιες μελέτες σε υποφύσεις ασθενών, έδειξαν αύξηση των επιπέδων προοπιομελανοκορτίνης στη σχιζοφρένεια (113). Τα αντιψυχωτικά φαίνεται να μειώνουν τα επίπεδα της έκκρισης της κορτιζόλης και της ACTH, σε συνδυασμό με την εξομάλυνση των θετικών συμπτωμάτων, ενώ η ολική δράση του άξονα ΥΥΕ φαίνεται απορυθμισμένη, καθώς δεν επιτυγχάνεται εξισορρόπηση των επιπέδων κορτιζόλης κατόπιν της διαδικασίας καταστολής μέσω δεξαμεθαζόνης (114, 115). Τα επίπεδα κορτιζόλης φαίνεται επίσης να συσχετίζονται θετικά με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, ενώ το εύρος της σοβαρότητάς τους φαίνεται να μειώνεται ταυτόχρονα με τα επίπεδα κορτιζόλης, κατόπιν θεραπείας με αντιψυχωτικά (109, 116, 117).

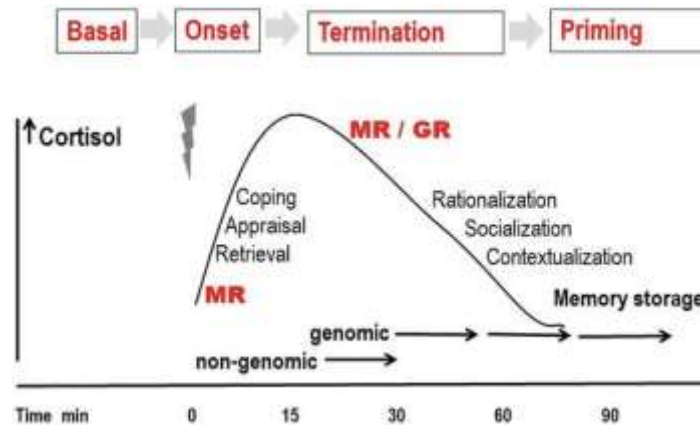
Τα γονίδια *NR3C1* και *NR3C2*, κωδικοποιούν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών

Η έκθεση σε περιβαλλοντικό στρες οδηγεί στην απελευθέρωση (νορ)αδρεναλίνης από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα καθώς και στην απελευθέρωση κορτικοστεροειδών από το σύστημα ΥΥΕ. Αμφότερα τα συστήματα λειτουργούν συντονισμένα, επιτρέποντας στο άτομο την επιτυχή προσαρμογή σε εναλλασσόμενα περιβάλλοντα (118). Οι κορτικοστεροειδείς ορμόνες εξασφαλίζουν την επάρκεια ενέργειας και μειώνουν την ανοσολογική απόκριση. Ταυτόχρονα, η κορτιζόλη ασκεί αρνητική ανατροφοδότηση στον άξονα ΥΥΕ, αποτρέποντας έτσι τη βλαβερή για τον οργανισμό υπερενεργοποίησή του. Μια προσαρμοστική ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ απαιτεί την άμεση απόκρισή του κατά την έκθεση στο στρες, καθώς και τον τερματισμό της ορμονικής αυτής πορείας μετά το πέρας της έκθεσης (119). Η παρατεταμένη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ μετά από χρόνιο στρες μπορεί να ξεπεράσει το αλλοστατικό φορτίο ενός οργανισμού, οδηγώντας στην ανάπτυξη ψυχιατρικών φαινοτύπων και σωματικών διαταραχών (120). Η έκθεση σε τραυματικές εμπειρίες και χρόνιο στρες μπορεί να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για πολλές ψυχιατρικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας, της διπολικής διαταραχής, της κατάθλιψης και των αγχωδών διαταραχών (121).

Τα κορτικοστεροειδή προσδένονται σε δύο υποδοχείς στον εγκέφαλο και το περιφερικό νευρικό σύστημα: στον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, MR (mineralocorticoid receptor) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *NR3C2* και εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q31.1 και στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, GR (glucocorticoid receptor) που κωδικοποιείται από το

γονίδιο *NR3C1* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q31-32. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν συμπληρωματική δράση και στοχεύουν στη ρύθμιση της δράσης του άξονα ΥΥΕ (122, 123). Η ενεργοποίηση των GR και MR πυροδοτεί μια σηματοδοτική πορεία που περιλαμβάνει έναν καταρράκτη κυτταρικών, ανοσολογικών και φυσιολογικών αλλαγών μέσω της γονιδιακής μεταγραφικής ρύθμισης (124). Ενώ ο υποδοχέας GR εκφράζεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου, ο υποδοχέας MR εκφράζεται κυρίως σε περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος όπως ο υπόκαμπος και η αμυγδαλή (125-127). Στον υπόκαμπο οι GR συνεντοπίζονται με τους MR υποδοχείς (125). Η πρωτεϊνική δομή των υποδοχέων GR και MR αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο (-NH<sub>2</sub>) μπορεί να ποικίλλει σε αλληλουχία και μήκος, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) στο οποίο προσδένονται τα γλυκοκορτικοειδή, παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Μεταξύ τους παρεμβάλλεται μια πολύ συντηρημένη αλληλουχία, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (128). Το γονίδιο *NR3C1* περιλαμβάνει εννέα εξώνια (1-9), μεταξύ των οποίων τα 9α και 9β, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταγραφή των δύο ισομορφών του υποδοχέα GR, συγκεκριμένα των GRα και GRβ (129, 130). Στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5' Untranslated Region, UTR) υπάρχουν τουλάχιστον έντεκα εναλλακτικά πρώτα εξώνια (129, 131). Στην περιοχή του υποκινητή του εξωνίου 1<sub>F</sub>, βρίσκεται μία νησίδα CpG, η επιγενετική τροποποίηση της οποίας έχει συσχετιστεί με στρες και νευροψυχιατρικές διαταραχές (31). Τα εναλλακτικά πρώτα μετάγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου, καθιστούν την έκφρασή του ιστοειδική, κατόπιν εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) (131, 132). Το *NR3C1* έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό σε επίπεδο πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου, ορισμένοι εκ των οποίων έχουν συσχετιστεί με την αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης καθώς και με την εμφάνιση ψυχωτικών συμπτωμάτων στην κατάθλιψη. Συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός rs6198 που εδράζεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του εξωνίου 9β, είναι πιθανό να επηρεάζει τη σταθερότητα του mRNA του γονιδίου και πιθανά σχετίζεται με την εμφάνιση ψύχωσης (133). Συγκριτικά με τους υποδοχείς GR, οι υποδοχείς MR έχουν δεκαπλάσια συγγένεια πρόσδεσης για τα κορτικοστεροειδή (134, 135). Το χαρακτηριστικό τους αυτό καθιστά τους υποδοχείς MR σε κατάσταση μόνιμης πρόσδεσης της κορτιζόλης υπό φυσιολογικές συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση χαμηλών επιπέδων των κορτικοστεροειδών υπό συνθήκες ηρεμίας (126, 136). Αντιθέτως, οι υποδοχείς GR παρατηρούνται πλήρως προσδεμένοι με κορτιζόλη όταν τα επίπεδα της ορμόνης είναι υψηλά, για παράδειγμα κατά την αφύπνιση ή ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα (137). Σε αντίθεση με τον υποδοχέα MR, ο γενωμικός υποδοχέας GR διαμεσολαβεί την προσαρμογή και τη λειτουργία του εγκεφάλου μερικές ώρες μετά την έκθεση στο στρες, όταν τα επίπεδα των κορτικοστεροειδών έχουν επανέλθει στο φυσιολογικό, λόγω της αρνητικής ανατροφοδότησης (138). Η υψηλή συγγένεια του υποδοχέα MR για την κορτιζόλη αποτέλεσε το λόγο για τον οποίο θεωρείται πως ο υποδοχέας MR κατά κύριο λόγο διαμεσολαβεί τη δράση του υποδοχέα GR μέσω της πρόσδεσης κορτιζόλης, παρόλο που ο ίδιος έχει ανεξάρτητο ρόλο στην απόκριση στο στρες. Μελέτες υποδεικνύουν πως ο υποδοχέας MR ασκεί ταχείες δράσεις στη συναπτική νευροδιαβίβαση και στη συναπτική πλαστικότητα του υποκάμπου και της αμυγδαλής κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα (139). Αυτές οι ταχείες και μη-γενωμικές δράσεις της κορτιζόλης φαίνεται να διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς MR που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και όχι από τους αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς. Η ανακάλυψη αυτών των μεμβρανικών υποδοχέων στον εγκέφαλο έχει συντελέσει στο χαρακτηρισμό των MR υποδοχέων ως σημαντικών διαμεσολαβητών του στρες. Ο κύριος ρόλος του υποδοχέα MR έγκειται στη δράση του ως γενωμικός κυτταροπλασματικός μεταγραφικός παράγοντας (140, 141). Κατά την πρόσδεση της κορτιζόλης, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα, επηρεάζοντας τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων,

μορίων κυτταρικής πρόσδεσης και νευροπεπτιδίων (142-144). Χάρη στην υψηλή συγγένειά τους για την κορτιζόλη, οι περισσότεροι γενωμικοί υποδοχείς MRs παραμένουν προσδεμένοι με την ορμόνη υπό φυσιολογικές συνθήκες και κατά τους κirkάδιους ρυθμούς, συγκριτικά με το 10% του συνολικού αριθμού των υποδοχέων GR (136). Ως αποτέλεσμα, οι υποδοχείς MR θέτουν το κατώφλι για την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ (139). Η κορτιζόλη έχει μειωμένη συγγένεια για τη διαμεμβρανική μορφή του υποδοχέα MR συγκριτικά με τη γενωμική του μορφή, συνεπώς απαιτείται 10-20% υψηλότερη συγκέντρωση ορμόνης για την αύξηση της νευροδιαβίβασης του ιπποκάμπου μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα. Έτσι, ο διαμεμβρανικός υποδοχέας MR μπορεί να επεξεργάζεται τα εξαρτώμενα από στρες υψηλά επίπεδα κορτικοστεροειδών και να επηρεάζει την απόκριση κατά την οξεία φάση έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα (141). Αντιθέτως, ο γενωμικός υποδοχέας MR θεωρείται πως ασκεί μια περισσότερο ρυθμιστική δράση και καθορίζει την ευαισθησία του άξονα ΥΥΕ, καθώς και τον ουδό της αντίδρασης. Η ανακάλυψη του διαμεμβρανικού σε συνδυασμό με τον γενωμικό υποδοχέα MR, του έχει προσδώσει τον επιπλέον ρόλο στον καθορισμό της ευαισθησίας στο στρες (139). Ο υποδοχέας MR εκφράζεται σε διαφορετικούς περιφερικούς ιστούς και κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων του νεφρού, του λιπώδους ιστού, του ενδοθηλίου, των επιθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων (145). Στον νεφρό, η αλδοστερόνη αποτελεί τον κύριο προσδέτη του υποδοχέα, ενώ έχει μεγάλη συγγένεια γι' αυτόν λόγω της δράσης του ενζύμου 11-β υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης τύπου 2 (11β-HSD2), η οποία καταβολίζει την κορτιζόλη στον ανενεργό μεταβολίτη κορτιζόνη. Αντιθέτως, στον εγκέφαλο τα επίπεδα αλδοστερόνης είναι πολύ χαμηλά, λόγω της απώλειας του ενζύμου συνθάσης της αλδοστερόνης από την κορτιζόλη (146, 147). Για το λόγο αυτό, η κορτιζόλη αποτελεί τον κύριο προσδέτη του υποδοχέα MR στον εγκέφαλο, ειδικά στις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος (148). Η απώλεια των υποδοχέων MR σε διαγονιδιακούς μύες οδήγησε σε μειωμένη πυκνότητα των κοκκιοειδών κυττάρων στον ιππόκαμπο καθώς και στη μείωση της νευρογένεσής τους (149). Συνεπώς, ο υποδοχέας MR είναι ζωτικής σημασίας για τη νευρωνική ακεραιότητα και για την προαγωγή της νευρογένεσης. Η μειορρύθμιση του υποδοχέα MR στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή θα μπορούσε να επηρεάσει τη νευρωνική ακεραιότητα, διαρρηγνύοντας τα σήματα από το μεταιχμιακό σύστημα προς τον υποθάλαμο και αυξάνοντας τον κίνδυνο για νευροψυχιατρικές διαταραχές που συσχετίζονται με το στρες (139). Ένας σημαντικός παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα MR είναι η ηλικία. Η αυξημένη ηλικία έχει συσχετιστεί με τη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα MR, με αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας αναστολής του άξονα ΥΥΕ και συνεπώς την αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης (150, 151). Τα αυξημένα επίπεδα της ορμόνης πιθανά ευθύνονται για τη μειωμένη γνωσιακή ικανότητα των ατόμων μεγάλης ηλικίας (152). Παρόλα αυτά παραμένει άγνωστο το εάν οι εξαρτώμενες από την ηλικία αλλαγές της έκφρασης του υποδοχέα MR μπορούν να επηρεάσουν τον κίνδυνο για τις εξαρτώμενες από στρες ψυχιατρικές διαταραχές. Επιπλέον, η έκφραση του υποδοχέα GR και συνεπώς η αναλογία των υποδοχέων MR/GR μπορεί επίσης να έχουν κάποιο ρόλο στις σχετιζόμενες με την ηλικία μεταβολές του άξονα ΥΥΕ.



### Εικόνα 3: Οι τέσσερις φάσεις της σηματοδότησης μέσω των MR/GR υποδοχέων κατά την απόκριση σε στρεσογόνο ερέθισμα.

Φάση 1: Τα βασικά επίπεδα των υποδοχέων κατά τους κερκάρδιους κύκλους καθορίζουν την ευαισθησία κατά την έκθεση στο στρες. Φάση 2: Η εκκίνηση της απόκρισης στο στρες διαμεσολαβείται από τις δράσεις των μη-γενωμικών MRs, οι οποίοι προωθούν τις διαδικασίες αξιολόγησης και την ανάκτηση αποθηκευμένων πληροφοριών, την επιλογή του τρόπου αντίδρασης και την κωδικοποίηση της εμπειρίας με σκοπό την προστασία του «εαυτού». Φάση 3: Ο τερματισμός της απόκρισης στο στρες γίνεται μέσω του υποδοχέα GR, με σκοπό την κανονικοποίηση των επιπέδων της κορτιζόλης. Μέσω του GR η εμπειρία κωδικοποιείται στον ιππόκαμπο και εκλογικεύεται από τον προμετωπιαίο φλοιό. Φάση 4: Γίνεται αποθήκευση της πληροφορίας με δημιουργία μνήμης, με σκοπό τη μελλοντική αξιοποίησή της (153).

Πράγματι, έχουν εντοπιστεί στον εγκέφαλο σχετιζόμενες με την ηλικία μειώσεις στα επίπεδα mRNA του υποδοχέα MR (154). Επιπλέον, οι εξαρτώμενες από την ηλικία μειώσεις στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα MR έχουν συσχετιστεί θετικά με τα ελλείμματα στη χωρική μνήμη (155). Τέτοιου είδους δεδομένα συνηγορούν στην υπόθεση πως η έκφραση του υποδοχέα MR είναι ζωτικής σημασίας για την νευρωνική επιβίωση και τη λειτουργικότητα του άξονα ΥΥΕ. Συνεπώς η μειωμένη έκφραση του υποδοχέα MR μπορεί να επηρεάσει την ατομική ανθεκτικότητα και να αυξήσει την πιθανότητα για επιβλαβείς συνέπειες κατόπιν έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα (139). Έρευνες σε διαγονιδιακούς μύες έδειξαν πως τα τρωκτικά με απώλεια του υποδοχέα MR στον προμετωπιαίο φλοιό εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, συνεπώς ο υποδοχέας αυτός αναστέλλει υπό φυσιολογικές συνθήκες τη δράση του άξονα ΥΥΕ (156). Αντιθέτως, υπερέκφραση του υποδοχέα MR οδήγησε σε παρόμοια επίπεδα κορτικοστερόνης κατά το στρες σε αρσενικούς μύες, αλλά σε θηλυκούς μύες κατόπιν στρες περιορισμού το αποτέλεσμα ήταν σχετική καταστολή των επιπέδων κορτικοστερόνης (157). Ο συνδυασμός υψηλών επιπέδων MR με μειωμένη έκφραση του υποδοχέα GR επανέφερε τη δραστηριότητα του άξονα ΥΥΕ υπό συνθήκες στρες. Το φαινόμενο αυτό συνηγορεί στο γεγονός πως στην περίπτωση της μειωμένης δραστηριότητας του υποδοχέα GR, μια αύξηση στη δράση του υποδοχέα MR μπορεί να κανονικοποιεί τη δράση του άξονα ΥΥΕ, λόγω της συμπληρωματικής λειτουργίας των δύο υποδοχέων για την επαναφορά στην ομοιόσταση (123). Παρόλα αυτά οι έρευνες είναι αντικρουόμενες, καθώς αρσενικοί και θηλυκοί μύες που υπολείπονται σε υποδοχέα MR σε ολόκληρο το μεταϊχμιακό σύστημα, εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα κορτικοστερόνης κατά τους κερκάρδιους κύκλους, αλλά αυξημένα επίπεδα της ορμόνης 40 λεπτά μετά την έκθεση σε στρες περιορισμού (149). Μελέτες σε τρωκτικά ενισχύουν την άποψη πως η σχέση μεταξύ της έκφρασης του MR και της απόκρισης στο στρες είναι αμφίδρομη, δηλαδή πως η έκθεση σε περιβαλλοντικό στρες

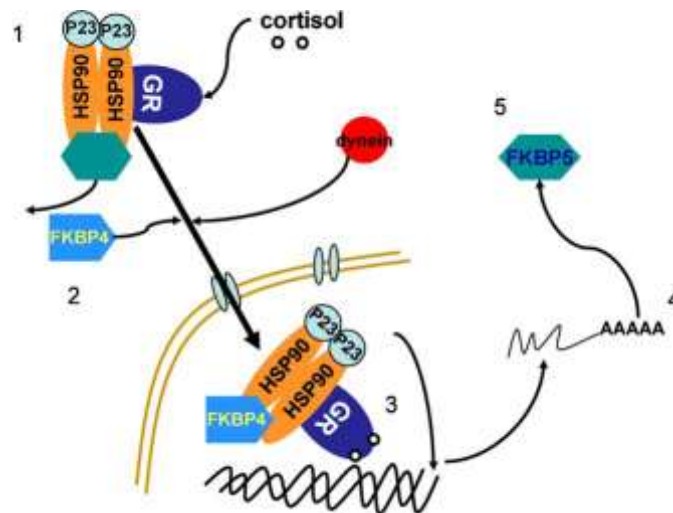


μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του υποδοχέα. Τα φαινόμενα αυτά φαίνεται να εξαρτώνται από τη χρονική διάρκεια του στρεσογόνου ερεθίσματος. Η έκθεση σε οξύ στρες αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα MR στον ιππόκαμπο μετά από 24 ώρες, ενώ μετά από 48 ώρες η έκφρασή του μειώνεται (158). Η αύξηση αυτή φαίνεται να έχει λειτουργικό ρόλο και να στοχεύει στη μείωση της δραστηριότητας του άξονα ΥΥΕ, ενώ μετά από την εκγύμναση τα επίπεδα του υποδοχέα MR μειώθηκαν εντός 30 λεπτών (159). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η έκφραση του υποδοχέα MR είναι δυναμική και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον νευροενδοκρινικό έλεγχο. Αντιθέτως, το χρόνιο απρόβλεπτο στρες οδήγησε σε 20% μείωση στα επίπεδα mRNA του υποδοχέα MR, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ η χρόνια χορήγηση κορτικοστερόνης μείωσε τον υποδοχέα MR στον ιππόκαμπο, χωρίς να μεταβάλλει την έκφραση του υποδοχέα GR (160, 161). Παρόλο που αυτές οι μελέτες δεν συμφωνούν απόλυτα, η πλειοψηφία των ερευνών σε τρωκτικά δείχνουν πως οι δράσεις του υποδοχέα MR συμβαίνουν κατόπιν έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Σε απόκριση στο στρες, η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα MR φαίνεται να συσχετίζεται με αμβλυμμένη ενδοκρινική απόκριση. Εφόσον οι γενωμικοί υποδοχείς MRs είναι κατελιμμένοι από κορτιζόλη υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι μη-γενωμικοί υποδοχείς MRs μπορεί να συμβάλλουν στη ρύθμιση της απόκρισης στο στρες διαμέσου της κορτιζόλης (139). Μελέτες σε ανθρώπους μετά θάνατον, αποκαλύπτουν δεδομένα αναφορικά με τη μείωση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα MR, στους ιπποκάμπους, την κάτω μετωπιαία έλικα και την κυκλική έλικα σε εγκεφάλους ασθενών με κατάθλιψη (162, 163). Το ίδιο αποτέλεσμα εντοπίστηκε και σε ιπποκάμπους εγκεφάλων αυτοχειρών (164). Παρομοίως, άνθρωποι με σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή εμφανίζουν μια μείωση στα επίπεδα mRNA του υποδοχέα MR στον ραχιοπλευρικό προμετωπιαίο φλοιό (100, 165). Ταυτόχρονα, τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα MR συσχετίστηκαν αρνητικά με τη διάρκεια της ψυχιατρικής ασθένειας, γεγονός που υποστηρίζει πως η μεγάλη διάρκεια της νόσου συσχετίστηκε με χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα. Στον αντίποδα, σε μια έρευνα εντοπίζονται αυξημένα τα επίπεδα του υποδοχέα MR στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου στη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, χαρακτηριστικό που μπορεί να εξισορροπεί τα μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα στον ιππόκαμπο και τον φλοιό (166). Συνολικά, οι ψυχιατρικές διαταραχές φαίνεται να διακρίνονται από μείωση στην έκφραση του υποδοχέα MR σε περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος, ανεξαρτήτως διάγνωσης. Αυτή η μείωση θα μπορούσε να καταλήγει σε μειωμένη αναστολή του άξονα ΥΥΕ, με μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα την αύξηση της κορτιζόλης, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για εμφάνιση σχετιζόμενων με το στρες διαταραχών (139).

Το γονίδιο *FKBP5*, οι πολυμορφισμοί του και η δράση του στο στρες

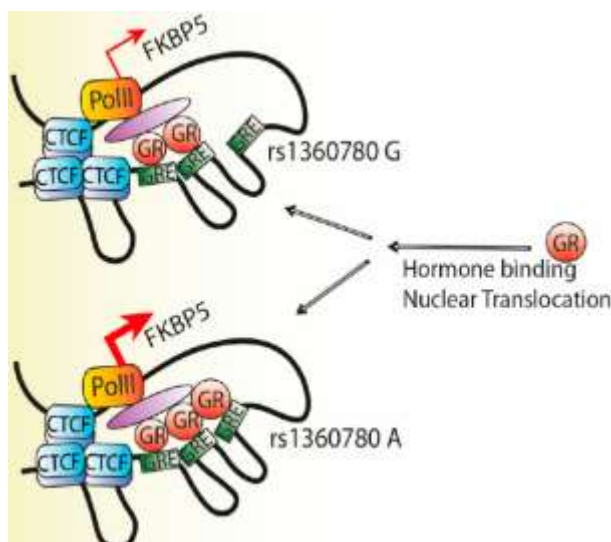
Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *FKBP5* (FK506 binding protein 5), (εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.31, μια περιοχή που έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διπολικής διαταραχής και ΠΨΕ (167)) είναι μια ανοσοφιλλίνη μεγέθους 51 kDa, η οποία αρχικά ταυτοποιήθηκε λόγω της ικανότητάς της να προσδένει το ανοσοκατασταλτικό FK506/tacrolimus, μέσω της περιοχής FK1 που προσδίδει στο μόριο ενεργότητα προλυλ-ισομεράσης (prolyl-isomerase, PPIase activity) (168, 169). Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται μια περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις (tetratricopeptide repeat, TPR) με ικανότητα πρόσδεσης της συνοδού πρωτεΐνης heat shock protein 90 (Hsp90) (170). Κατά την έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, η είσοδος της κορτιζόλης στο κυτταρόπλασμα ακολουθείται από πρόσδεσή της στο σύμπλεγμα του υποδοχέα GR, το οποίο μεταξύ άλλων αποτελείται από τις πρωτεΐνες Hsp90, FKBP5, Hsp70 και p23. Οι συμπαράγοντες αυτοί

ρυθμίζουν την ενεργότητα του υποδοχέα GR και συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης μετά την έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (171). Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών φαίνεται να μετατοπίζονται μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα (172). Αμφότερες οι ανοσοφιλίνες FKBP5 και FKBP4, ανταγωνίζονται η μία την άλλη για την πρόσδεση στο σύμπλεγμα του GR, ενώ φαίνεται πως η FKBP5 είναι ικανή να ρυθμίζει την έκφραση της FKBP4 στους μύες και δυνητικά στον ανθρώπινο εγκέφαλο και στο περιφερικό αίμα (173, 174). Η FKBP5 αλληλεπιδρά σε μικρό βαθμό με τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού, οπότε για τη μετατόπιση του προσδεμένου με κορτιζόλη υποδοχέα GR, η FKBP4 αντικαθιστά την FKBP5 στο σύμπλοκο και λόγω της μεγαλύτερης συγγένειάς της για τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού, οδηγεί το σύμπλοκο στον πυρήνα.



**Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα GR με την FKBP5.** (1) Όταν η FKBP5 είναι προσδεμένη μέσω της Hsp90 στον υποδοχέα GR, το σύμπλοκο έχει χαμηλότερη συγγένεια για την κορτιζόλη. (2) Μόλις προσδεθεί η κορτιζόλη, η FKBP5 αντικαθίσταται από την FKBP4, η οποία προσδένει τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού. (3) Το φαινόμενο αυτό επιτρέπει τη μεταφορά του συμπλόκου στον πυρήνα και την πρόσδεσή του στο DNA. (4) Έτσι, το σύμπλοκο μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου FKBP5 μέσω ειδικών ιντρονικών αλληλουχιών. (5) Η αυξημένη έκφραση της FKBP5 προσδίδει αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή μέσω ενός βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης που ρυθμίζει την ευαισθησία του υποδοχέα GR (175).

Η έκφραση του FKBP5 επάγεται από πρόσδεση του GR στις ρυθμιστικές αλληλουχίες GREs, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασής του μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (176). Στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου FKBP5 και σε μικρή απόσταση από μια ρυθμιστική αλληλουχία GRE, εδράζεται ο πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου rs1360780, με πιθανά λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (177). Παρουσία του αλληλομόρφου T, η δομή της χρωματίνης μεταβάλλεται με αποτέλεσμα υπερέκφραση του γονιδίου, φαινόμενο που δεν παρατηρείται παρουσία του αλληλομόρφου C (176, 177).



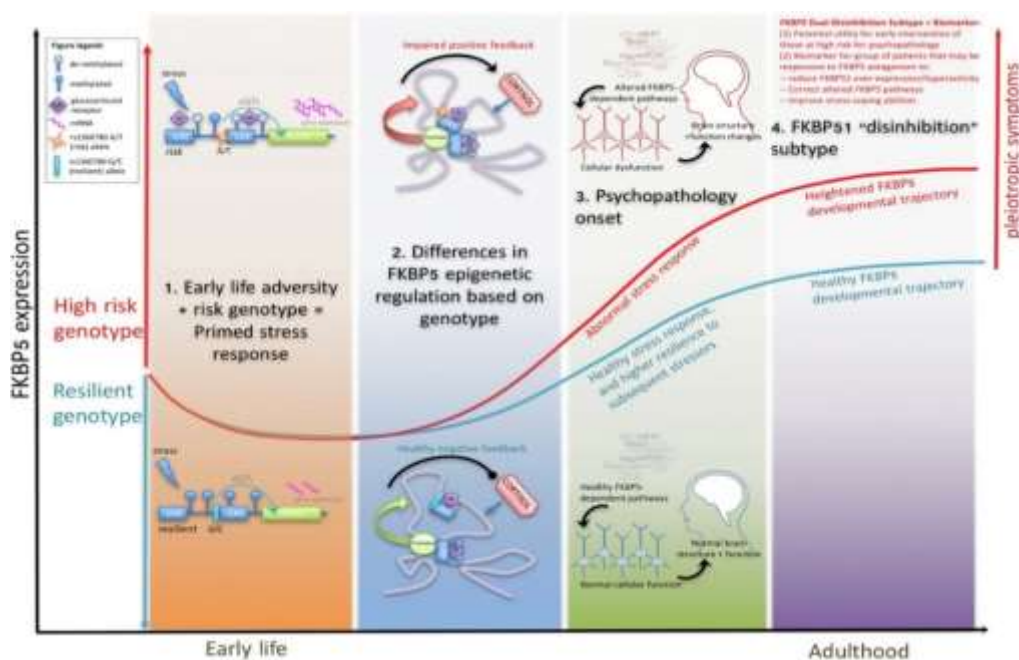
**Εικόνα 5: Η ρύθμιση του γονιδίου *FKBP5*.**

Σε μεταγραφικό επίπεδο, το γονίδιο του *FKBP5* πιθανά ρυθμίζεται από διάφορους λειτουργικούς πολυμορφισμούς του ενός νουκλεοτιδίου, περιλαμβανομένου του *rs1360780*, στο ιντρόνιο 2 (176-178).

Ένα από τα γονίδια που πιθανά προσδίδει ευαισθησία στην εμφάνιση φαινοτύπων ψυχικής υγείας είναι το *FKBP5*. Η διερεύνηση μηχανισμών «γονιδίου-περιβάλλοντος» (gene x environment, GxE) οδήγησε στην ταυτοποίηση παραγόντων που σε συνδυασμό με τις μεταβολές στην έκφραση του *FKBP5* αυξάνει τον κίνδυνο για την εμφάνιση ΠΨΕ. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι οι αντιξοότητες κατά την παιδική ηλικία ή η χρήση ουσιών κατά την εφηβεία σε συνδυασμό με ένα ήδη επιβαρυσμένο επιγονιδίωμα λόγω έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα (179). Ο παραπάνω πολυμορφισμός φαίνεται να συσχετίζεται με μια πληθώρα νευροψυχιατρικών διαταραχών περιλαμβανομένης της κατάθλιψης, του άγχους, της ψύχωσης και της διαταραχής μετατραυματικού στρες (180-183). Η έκθεση σε τραυματικές εμπειρίες κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής, η πιθανότητα κακοποίησης, αντίξοου οικογενειακού περιβάλλοντος και η οικονομική αστάθεια σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο, φαίνεται να αποτελούν συμπαράγοντες για την ανάπτυξη των νευροψυχιατρικών διαταραχών (184, 185). Τέτοιου είδους παράμετροι είναι πιθανό να οδηγήσουν στην απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ και σε συνδυασμό με συγκεκριμένους γονότυπους του *FKBP5* να προδιαθέτουν για την υποκλινική εμφάνιση ψυχωτικών συμπτωμάτων στο γενικό πληθυσμό (51). Επίσης, η παρουσία του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού *rs1360780* συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης στο γενικό πληθυσμό, καθώς και με μειωμένη ικανότητα επαναφοράς στην ομοιόσταση κατόπιν στρες (186, 187). Η μελέτη των Green et al., συσχέτισε πολυμορφισμούς του *FKBP5*, συμπεριλαμβανομένου του *rs1360780* με τις αντιξοότητες κατά την πρώιμη ανάπτυξη και τη γνωσιακή ικανότητα κατά την ενήλικη ζωή. Συγκεκριμένα, άτομα με σχιζοφρένεια και ομόζυγα για το T αλληλόμορφο εμφάνισαν χαμηλότερα σκορ αναφορικά με τη γνωσιακή τους λειτουργία, συγκριτικά με το δείγμα μαρτύρων, χαρακτηριστικό που αποδόθηκε στην πιθανή απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ, μέσω του *FKBP5* ανεξάρτητα από την έκθεση σε τραυματικές εμπειρίες κατά την νεαρή ηλικία (188). Επιπλέον, στην έρευνα των Buchmann et al., εντοπίστηκαν μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης στους ομόζυγους για το C αλληλόμορφο του ίδιου πολυμορφισμού, τα οποία συσχετίστηκαν με αντιξοότητες κατά την νεαρή ηλικία (189). Ένας ακόμη πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου που έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση γνωσιακών ενδοφαινοτύπων

σχιζοφρένειας και διπολικής διαταραχής είναι ο rs3800373. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί και με την αδυναμία κανονικοποίησης των επιπέδων κορτιζόλης κατόπιν έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα, σε άτομα χωρίς νευροψυχιατρικές διαταραχές (190). Η μελέτη των Binder et al., ταυτοποίησε και χαρακτήρισε μεταξύ άλλων τους πολυμορφισμούς rs1360780 και rs3800373 ως ισχυρά συνδεδεμένους και σε υψηλή ανισορροπία γενετικής σύνδεσης, ενώ ταυτόχρονα ενοχοποίησε την παιδική κακοποίηση ως κύριο προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση διαταραχής μετατραυματικού στρες κατά την ενηλικίωση. Ταυτόχρονα, ο χαρακτηρισμός των πολυμορφισμών αυτών που επηρεάζουν την έκφραση του *FKBP5* οδήγησε στο συμπέρασμα πως η απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ πιθανά οφείλεται σε αντίσταση των υποδοχέων GR στην κορτιζόλη (191). Παρόλα αυτά τα ευρήματα των μελετών παραμένουν αντικρουόμενα, καθώς οι Collip et al., δεν εντόπισαν την προαναφερθείσα ανισορροπία γενετικής σύνδεσης μεταξύ των rs1360780 και rs3800373 αλλά συσχέτισαν τους πολυμορφισμούς rs9296158 και rs4713916 του *FKBP5* με την εμφάνιση ΠΨΕ κατόπιν έκθεσης σε τραυματικά ερεθίσματα (186). Επιπλέον, οι Lekman et al., προτείνουν τον πολυμορφισμό rs4713916 που εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή ως το ρυθμιστικό στοιχείο για την έκφραση του *FKBP5* και όχι τους rs1360780 και rs3800373 που εντοπίζονται στο ιντρόνιο 2 και στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου αντίστοιχα (192). Ο χαρακτηρισμός του απλοτύπου CAT των πολυμορφισμών rs3800373, rs9296158, rs1360780 συσχετίστηκε περαιτέρω με την εμφάνιση των θετικών συμπτωμάτων του ΠΨΕ σε συνδυασμό με παράνοια σε ένα μη κλινικό δείγμα νεαρών ενηλίκων που υπέστησαν εκφοβισμό κατά τη νεαρή ηλικία. Συνεπώς η ποικιλομορφία του *FKBP5* και η έκθεση σε αντιζοότητες φαίνεται να ρυθμίζει την πιθανότητα εμφάνισης ψυχωτικών εμπειριών στο γενικό πληθυσμό, χωρίς να είναι απαραίτητη η μετέπειτα διάγνωση ψυχιατρικού φαινοτύπου (193). Στον αντίποδα, η παρουσία των προστατευτικών αλληλομόρφων των παραπάνω πολυμορφισμών, φαίνεται να μειώνει τα θετικά συμπτώματα του ΠΨΕ, όπως περαιτέρω χαρακτηρίστηκε από τους Cristobal-Narvaez et al., (194). Τα ευρήματα παραμένουν αντικρουόμενα, καθώς άλλες μελέτες όπως των Gawlik et al., δεν εντοπίζουν καμία συσχέτιση των πολυμορφισμών rs4713916, rs1360780 και rs3800373 με την εμφάνιση ΠΨΕ, ενώ οι Castro-Catala et al., συνδέουν την παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου με την εμφάνιση κατάθλιψης και όχι ΠΨΕ (195, 196). Οι Richter et al., συσχέτισαν την παρουσία του αλληλομόρφου κινδύνου του rs3800373 κατοίκων μεγάλων πόλεων με αυξημένη απόκριση στο στρες σε υποπεριοχές του πρόσθιου φλοιού του προσαγωγίου, συγκριτικά με τους κατοίκους μικρών πόλεων, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα εμφάνισης ψυχιατρικών φαινοτύπων (197). Ο υψηλός βαθμός (αν)ισορροπίας γενετικής σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών του *FKBP5* που παρατηρείται σε διαφορετικούς πληθυσμούς, φαίνεται να είναι ο λόγος για τα αντικρουόμενα ευρήματα αναφορικά με τους μηχανισμούς προδιάθεσης σε ψυχιατρικούς φαινοτύπους του γονιδίου αυτού (186). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* στον προμετωπιαίο φλοιό ατόμων με σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή, παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου κινδύνου του πολυμορφισμού rs4713916 (103). Οι Lee et al., παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* σε περιφερικό αίμα ασθενών με σχιζοφρένεια συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα του γονιδίου *NR3C1*. Προτάθηκε συνεπώς, πως στη σχιζοφρένεια, η *FKBP5* διατηρεί τον προσδεσμένο με κορτιζόλη υποδοχέα GR στο κυτταρόπλασμα, αναστέλλοντας την κάτωθι λειτουργία του ως μεταγραφικού παράγοντα (198). Έχει παρατηρηθεί πως η ανάπτυξη του εμβρυικού εγκεφάλου και η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κατάθλιψης επηρεάζονται και καθορίζονται κατά τον ενδομήτριο (in utero) σχηματισμό περιοχών του εγκεφάλου όπως η αμυγδαλή και ο ιπόκαμπος, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μητρικής κατάθλιψης κατά την κύηση

ή συμπτώματα άγχους (199, 200). Η γενετική ποικιλομορφία του *FKBP5* μεταξύ νεογνών σε συνδυασμό με τη κατάθλιψη πριν τον τοκετό θα μπορούσε να προδιαθέσει σε καταθλιπτικά συμπτώματα στη μετέπειτα ζωή του νεογνού, λόγω μόνιμων αλλαγών των εγκεφαλικών δομών (201). Διάφοροι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου έχουν συσχετιστεί με την απόκριση ασθενών στο άτυπο αντιψυχωτικό κλοζαπίνη. Συγκεκριμένα, σε άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο κινδύνου T του rs1360780, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα αδυναμίας απόκρισης στην κλοζαπίνη, σε σύγκριση με άτομα ετερόζυγα ή ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο C (202). Φυσικά, υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα τα οποία θα μπορούσαν να διαλευκανθούν με αντίστοιχες μελέτες σε μεγαλύτερους ή καλύτερα χαρακτηρισμένους πληθυσμούς ασθενών (175). Σε κυτταρικές σειρές απομονωμένες από άτομα με κατάθλιψη, η *FKBP5* φαίνεται να προσδέεται στην *CDK5*, μειώνοντας τη δράση της *DNMT1*, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής μεθυλίωσης του DNA (203). Αυτό το μονοπάτι δράσης της *FKBP5*, φαίνεται να συμβάλλει στην έκφραση γονιδίων όπως ο νευροτροφικός παράγοντας *BDNF*, βελτιώνοντας τη δράση αντικαταθλιπτικών όπως η παροξετίνη (203). Επιπλέον, η πρόσδεση της *FKBP5* μέσω της αλληλουχίας *FK1* στην κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (glycogen synthase kinase 3β, *GSK3β*), η οποία αποτελεί φαρμακευτικό στόχο των ψυχοτρόπων ουσιών, φαίνεται να συμβάλλει στην αντικαταθλιπτική και αντιψυχωτική τους δράση (204).



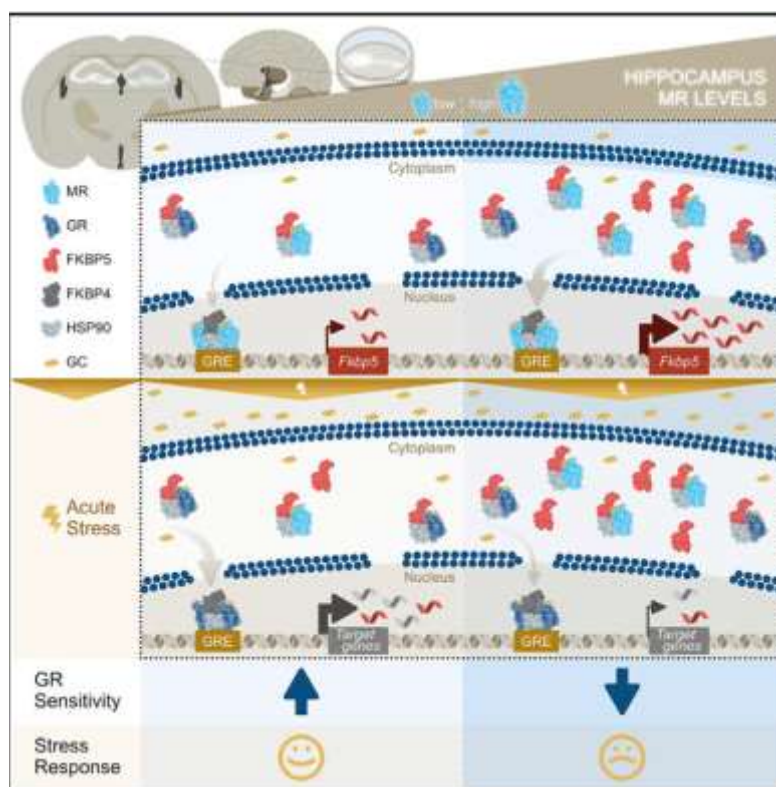
**Εικόνα 6: Μοντέλο της αλληλεπίδρασης της έκφρασης του *FKBP5* με τις πρώιμες αντίξοες συνθήκες διαβίωσης και της αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης νευροψυχιατρικών διαταραχών στη μετέπειτα ζωή.**

Πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες, πιθανά ακόμη κατά την εμβρυική ανάπτυξη, έχουν συσχετιστεί με μειωμένη μεθυλίωση του DNA στις αλληλουχίες πρόσδεσης γλυκοκορτικοειδών (*GREs*), φαινόμενο που οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του *FKBP5*. Οι μεταβολές αυτές της δραστηριότητας του *FKBP5*, σε περιπτώσεις του αλληλομόρφου κινδύνου A/T στο rs1360780, οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση και κυκλοφορία κορτιζόλης κατά την έκθεση στο στρες. Μακροπρόθεσμα και σε συνδυασμό με την απομεθυλίωση των *GREs* του *FKBP5*, οι μεταβολές αυτές πιθανά να έχουν επιπτώσεις σε μοριακό, κυτταρικό και ενδοκρινικό επίπεδο. Έτσι, επάγοντας αλλαγές στη δομή και λειτουργία διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών, είναι πιθανό να

συμβάλλουν στην πιθανότητα εμφάνισης νευροψυχιατρικών διαταραχών, συνήθως σε συνδυασμό με αντίζοα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η γενετική και επιγενετική επαγωγή της έκφρασης και δράσης του *FKBP5* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη θεραπευτική παρέμβαση και θεραπεία ασθενών (205).

Αρσενικοί μύες με απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης *FKBP5* στα κύτταρα POMC της πρόσθιας υπόφυσης εμφανίζουν αυξημένη αναστολή του άξονα HPA μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης του υποδοχέα GR, ενώ προστατεύονται από την ηλικιακά εξαρτώμενη απορρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού της κορτικοστερόνης (206). Η ομάδα των Hausl et al., απέδειξε πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου οδηγεί στη χρόνια υπερενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ, ενώ η ιστοειδική επαναφορά της αποκαθιστά τη λειτουργία του. Από την παραπάνω μελέτη προκύπτει πως η έκφραση της *FKBP5* ρυθμίζεται ειδικά στους  $Crh^+$  νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου μετά την έκθεση στο στρες (207). Η μελέτη των Atwood et al., έδειξε πως ενώ η ολική διαγραφή (knock-out) του γονιδίου *FKBP5* δεν επηρέασε την απόκριση στο στρες, η μείωση των επιπέδων έκφρασής του στην αμυγδαλή μείωσε το επαγόμενο από στρες, άγχος (208). Παρομοίως, η φαρμακολογική μεταβολή της σηματοδότησής της στην αμυγδαλή οδήγησε σε μετρίασμό του άγχους, ενώ η υπερέκφραση της *FKBP5* αύξησε την αγχώδη συμπεριφορά. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στον ιππόκαμπο δε μετέβαλλε την απόκριση στο στρες, σύμφωνα με τη μελέτη των Hartmann et al., (209). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν πως η δράση της *FKBP5* είναι ιστοειδική και συγκεκριμένα διαμεσολαβεί την αγχώδη συμπεριφορά διαμέσου της αμυγδαλής (210). Όπως και η αμυγδαλή έτσι και ο κλινοειδής πυρήνας της τελικής ταινίας (bed nucleus of the stria terminalis, BNST) φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στο άγχος. Ο BNST δέχεται σήματα από περιοχές του μαιχιμακού συστήματος (αμυγδαλή, ιππόκαμπος, μέσος προμετωπιαίος φλοιός) και προβάλλει σε συστήματα του αυτόνομου και του νευροενδοκρινικού συστήματος, που εντοπίζονται στον υποθάλαμο και το στέλεχος και ρυθμίζουν τον άξονα ΥΥΕ (211). Από απεικονιστικές μελέτες φαίνεται πως η δράση του BNST συσχετίζεται θετικά με το αυξημένο άγχος, ενώ λόγω των αντικρουόμενων ευρημάτων σε τρωκτικά παραμένει άγνωστο το εάν η περιοχή αυτή αυξάνει ή μειώνει το άγχος μετά την έκθεση στο στρες (212, 213). Οι Engelhardt et al., έδειξαν πως η υπερέκφραση του *FKBP5* στον BNST οδηγεί σε μία τάση προς μείωση του στρες στη συμπεριφορά και ενδοκρινική απόκριση των μυών, ενώ η ολική διαγραφή του γονιδίου δημιουργεί έναν φαινότυπο αμιγώς αγχολυτικό. Από τα παραπάνω προκύπτει πως η έκφραση του *FKBP5* στον BNST είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική απόκριση στο στρες, ενώ η κατόπιν έκθεσης στο στρες επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του *FKBP5* έχει πιθανά προστατευτικό ρόλο, με σκοπό τη μείωση του άγχους και τον τερματισμό του άξονα ΥΥΕ (210).

Η ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ συμβαίνει σε πολλά σημεία του κεντρικού νευρικού συστήματος και περιλαμβάνει γρήγορα σήματα προς τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ο οποίος εκφράζει ισχυρά τον υποδοχέα GR, αλλά ελάχιστα MR (207, 214). Ένα πρόσφατο μοντέλο της λειτουργίας της *FKBP5* προτείνει πως η κύρια δράση της είναι η ρύθμιση της ισορροπίας των MR/GR στον ιππόκαμπο, όχι μόνο μέσω της αρνητικής ρύθμισης που ασκεί στον GR, αλλά πιθανά μέσω αλληλεπίδρασής της με τον υποδοχέα MR. Οι Hartmann et al., υποστηρίζουν πως η *FKBP5* και ο MR εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης στον ιππόκαμπο, τα οποία είναι διακριτά από αυτά του GR.



**Εικόνα 7: Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων MR με τους υποδοχείς GR και την πρωτεΐνη FKBP5.**

Τα υψηλά επίπεδα MR υπερεκφράζουν τη συνοδό πρωτεΐνη FKBP5 και ο υποδοχέας GR διατηρείται στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, υπό συνθήκες στρες παρατηρείται μειωμένη έκφραση των γονιδίων στόχων του, τα οποία θα εκφράζονταν φυσιολογικά σε μεγάλο βαθμό. Τα αυξημένα επίπεδα MR οδηγούν σε μειωμένη ευαισθησία του υποδοχέα GR και μειωμένη απόκριση στο στρες (215).

Επιπλέον, η δράση του υποδοχέα MR και όχι του GR φαίνεται να είναι αυτή που ρυθμίζει την έκφραση του FKBP5 στους νευρώνες του ιπποκάμπου, ενώ η ενεργοποίηση του GR αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του FKBP5 in vivo. Φαίνεται επιπλέον πως η διαγραφή του GR δε μεταβάλλει τα επίπεδα του FKBP5, ενώ η φαρμακευτική αναστολή του MR μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ιππόκαμπο. Η διαγραφή του MR οδηγεί σε υπερευαισθησία του GR κατά την έκθεση σε οξύ στρες, ενώ το μοντέλο της εικόνας 6 απεικονίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα MR και της πρωτεΐνης FKBP5 (215).

Το γονίδιο *GILZ* και η ανοσιακή απόκριση στην ψυχική υγεία

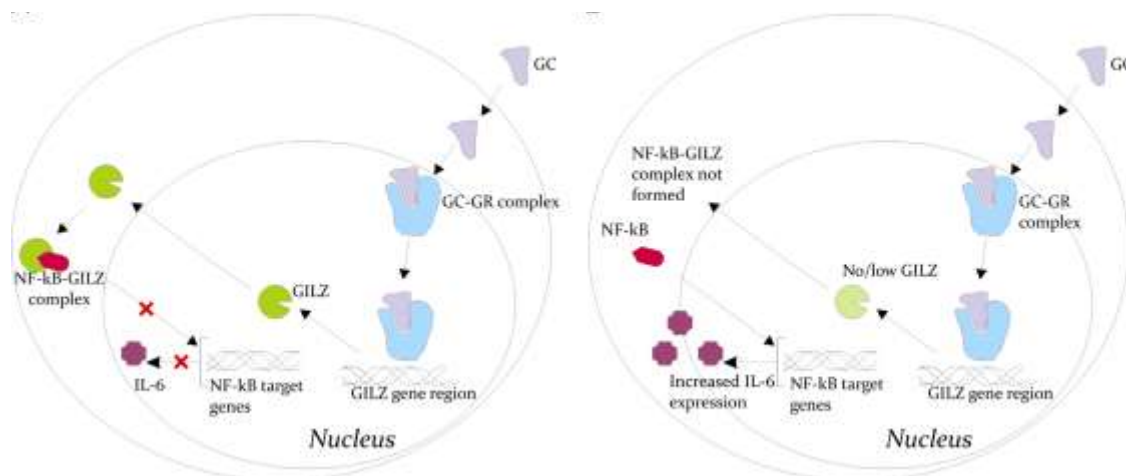
Οι νευροψυχιατρικές διαταραχές συνοδεύονται κατά κανόνα από μεταβολές στην ανοσολογική απόκριση. Άτομα με διαταραχές του συναισθήματος και σχιζοφρένεια εμφανίζουν όλο το φάσμα μιας μεταβεβλημένης ανοσολογικής απόκρισης. Μια τυπική ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει (i) επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης όπως τα μοριακά πρότυπα παθογόνων, (ii) αισθητήρες των επαγωγέων αυτών, (iii) διαμεσολαβητές της φλεγμονής που επάγονται από τα (i) και (ii), και (iv) ιστούς-στόχους που επηρεάζονται από τους διαμεσολαβητές αυτούς (216). Άτομα με διαταραχές του συναισθήματος και σχιζοφρένεια εμφανίζουν διάφορα χαρακτηριστικά της ανοσολογικής απορρύθμισης, καθώς και πρόωμη γήρανση σε διαφορετικά επίπεδα (μοριακό, κυτταρικό κτλ). Το ψυχοκοινωνικό

στρες έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα επαγωγέων της ανοσολογικής απόκρισης, όπως η εξωκυτταρική ATP, το ουρικό οξύ στην κυκλοφορία του αίματος, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), καθώς και διάφορα οξειδωμένα μόρια. Άνθρωποι με ψυχιατρικές διαταραχές έχουν αυξημένα επίπεδα διαμεσολαβητών της φλεγμονής (217). Συγκεκριμένα, άτομα με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, διπολική διαταραχή ή σχιζοφρένεια έχουν αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών του πλάσματος, αυξημένα επίπεδα CRP και χημειοκινών στο περιφερικό αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (218-222). Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα των κυττάρων της φυσικής ανοσίας όπως τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα καθώς και η ενισχυμένη σηματοδότησή τους, συσχετίστηκαν με την κυτταρική ενεργοποίηση και διαφοροποίηση (223, 224). Η αυξημένη ανοσιακή απόκριση έχει συσχετιστεί με την πρόοδο της κλινικής εικόνας των διαταραχών του συναισθήματος. Συγκεκριμένα, η αύξηση της C-δρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) και της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα του κλινικού φαινοτύπου, τη διάρκεια και την αντιψυχωτική θεραπεία σε άτομα με σχιζοφρένεια (225, 226). Η σχιζοφρένεια μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως νευροαναπτυξιακή διαταραχή είτε ως χρόνια, σχετιζόμενη με το στρες διαταραχή. Η έκθεση σε περιβαλλοντικό και ψυχοκοινωνικό στρες έχει συσχετιστεί με την ισχυρή ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ, καθώς και μεταβολές σε δομές του εγκεφάλου και την περιφερική νευροενδοκρινική απόκριση, με σκοπό την επαναφορά στην ομοιόσταση. Η νευροενδοκρινική απόκριση χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα νορεπινεφρίνης, επινεφρίνης του πλάσματος και γλυκοκορτικοειδών (227, 228). Κατά την ενεργοποίησή τους, οι υποδοχείς GRs μετατίθενται στον πυρήνα, αυξορρυθμίζουν την έκφραση αντιφλεγμονωδών γονιδίων (IL-10) και καταστέλλουν τη σχετιζόμενη με τη φλεγμονή σηματοδότηση, περιλαμβανομένου και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB(228).

Το γονίδιο *GILZ* αποτελεί μεταγραφικό στόχο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, GR. Το σύμπλοκο κορτικοστερόνης-GR, μετά την είσοδό του στον πυρήνα, επάγει την έκφραση του γονιδίου *GILZ*. Ο υποκινητής του *GILZ* περιλαμβάνει 6 GREs, σημεία δηλαδή στα οποία μπορεί να προσδεθεί ο GR και να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Εκτός αυτών, έχουν βρεθεί δύο GREs, υψηλής συγγένειας για τον GR, που εδράζονται 2kb ανοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής του υποκινητή του *GILZ* στον αρουραίο (229). Το *GILZ* ή *TSC22D3* εδράζεται στο χρωμόσωμα X και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δομή «φερμουάρ» λευκίνης (leucine zipper, LZ). Η πρωτεΐνη αυτή στον μυ έχει μέγεθος 137 αμινοξέων ενώ στον άνθρωπο έχει μέγεθος 135 αμινοξέων (230, 231). Το προϊόν του *GILZ* στον μυ αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή (-NH<sub>2</sub>), μια καρβοξυτελική περιοχή (-COOH) πλούσια σε προλίνη και γλουταμικό οξύ και την κεντρική περιοχή με δομή LZ (232). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπου και του μύος και αυξορρυθμίζεται από τα γλυκοκορτικοειδή στα κύτταρα περιοχών του εγκεφάλου που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες, στα θυμοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα του μύος, στα επιθηλιακά κύτταρα που αναπνευστικού σωλήνα του ανθρώπου και σε βλαστικές σειρές μεσεγγυματικών κυττάρων (233-235). Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται και ρυθμίζει διάφορες ορμόνες στην εμβρυική υπόφυση (236). Το *GILZ* αποτελεί το καλύτερο μέτρο εκτίμησης της έκφρασης του GR, καθώς η μεταγραφή του εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών (229). Αυξημένη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών, αυξάνει τη μεταγραφή του *GILZ*, το οποίο ενισχύει τη λειτουργία του άξονα HPA ρυθμίζοντας τη δράση διάφορων κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, T-λεμφοκύτταρα) (237). Σε καταστάσεις απόκρισης στο στρες, παράγεται μεγάλη συγκέντρωση πρωτεΐνης *GILZ* εντός του κυττάρου. Τα μόρια αυτά προσδένουν τον παράγοντα NF-κB, αποτρέποντάς τον από την επαγωγή της έκφρασης IL-6. Αντίστροφα, μείωση της έκφρασης



*GILZ*, οδηγεί σε αύξηση των συγκεντρώσεων IL-6. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί πως και αντίστροφα, η IL-6 μπορεί να επάγει τη δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών (238, 239).



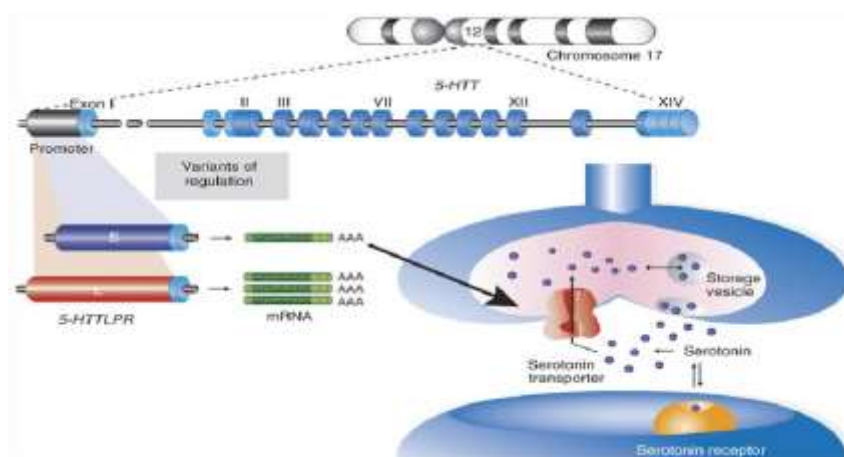
**Εικόνα 8: Η αλληλεπίδραση του γονιδίου *GILZ* με τον παράγοντα NF-κB.** Υπό φυσιολογικές συνθήκες (αριστερά), το *GILZ* προσδένει NF-κB, με αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση της έκφρασης της ιντερλευκίνης 6. Σε περίπτωση μείωσης της έκφρασης του *GILZ* ο NF-κB είναι ικανός να επάγει την έκφραση της ιντερλευκίνης 6 (238).

Άτομα με σχιζοφρένεια φαίνεται να εμφανίζουν μεταβολές στην ανοσολογική απόκρισή τους. Συγκεκριμένα, αυξήσεις ή ανισορροπίες στην ποσότητα κυτταροκινών πριν τη γέννηση ή κατά την πρώιμη ζωή φαίνεται να επηρεάζουν τη νευρωνική ανάπτυξη και να προδιαθέτουν σε ευαισθησία για τη νόσο (240). Η υπόθεση της νευρωνικής φλεγμονής στη σχιζοφρένεια, υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός πως ορισμένα αντιψυχωτικά μειώνουν την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών και ελεύθερων ριζών από ενεργοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας (241). Επιπροσθέτως των προφλεγμονωδών πορειών, η φυσική και η επίκτητη ανοσιακή ενεργότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση σχιζοφρένειας, συνεισφέροντας στην εξάλειψη των ανεπιθύμητων συνάψεων (pruning) κατά τη νευρωνική ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με έρευνες που προτείνουν πως η αυξημένη εξάλειψη των ανεπιθύμητων συνάψεων κατά την εφηβεία στον προμετωπιαίο φλοιό, είναι πιθανό να προδιαθέτει και να συνεισφέρει στην εμφάνιση σχιζοφρένειας (242). Υπάρχουν ενδείξεις πως η δυσλειτουργία στην ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης τύπου-1 μπορεί να συσχετίζεται με ανωμαλίες στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης στη σχιζοφρένεια (243). Επιπλέον, θα μπορούσε να υφίσταται μια σύνδεση μεταξύ των δομικών αλλαγών του εγκεφάλου και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, σε συνδυασμό με τους νευροτοξικούς μεταβολίτες που παράγονται από την πορεία μεταβολισμού της τρυπτοφάνης (244). Μεταβολές της έκφρασης του γονιδίου *GILZ* έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπους με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή. Συγκεκριμένα, οι Frodl et al., διερευνώντας τη δομική νευροαπεικόνιση του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής σε συνδυασμό με μετρήσεις της IL-6, της CRP, των επιπέδων έκφρασης των GR και *GILZ*, παρατήρησαν μειωμένο μέγεθος στον ιπποκάμπο, αύξηση στις IL-6 και CRP σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου και μειωμένη έκφραση του γονιδίου *GILZ* που συσχετίστηκε με το μειωμένο μέγεθος του ιπποκάμπου (245, 246). Οι Van Zuiden et al., μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *FKBP5* και *GILZ* ως προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση διαταραχής μετατραυματικού στρες (PTSD). Στο περιφερικό αίμα 448 στρατιωτών παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* και χαρακτηρίστηκαν ως

προδιάθεση για την εμφάνιση PTSD. Επιπλέον, μελετήθηκε το *GILZ* ως διαμεσολαβητής των αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών φαινομένων που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή και παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδά του, τα οποία συσχετίστηκαν επίσης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης PTSD. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός πως η αυξημένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή των T κυττάρων αποτελεί προγνωστικό χαρακτηριστικό για την εμφάνιση συμπτωμάτων PTSD, χωρίς να συσχετίζεται με συμπτώματα κατάθλιψης (247).

Το γονίδιο *SLC6A4* και η πολυμορφική περιοχή 5-HTTLPR

Η σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη συμπεριφορική απόκριση, την απόκριση στο στρες και ρύθμιση του συναισθήματος, της διάθεσης, της επεξεργασίας των αισθητικών πληροφοριών στο φλοιό, της προσοχής και της εγρήγορσης (248). Η σεροτονίνη αποτελεί νευροδιαβιβαστή που συντίθεται σε πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Οι σεροτονινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται στους πυρήνες ραφής (raphe) του εγκεφαλικού στελέχους. Το γονίδιο *SLC6A4* (Solute Carrier Family 6 Member 4), (17q11.1–q12) κωδικοποιεί το μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HTT, SERT), ο οποίος εντοπίζεται στο προσυναπτικό άκρο του νευρώνα και είναι υπεύθυνος για την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης από τον εξωκυττάριο χώρο της σύναψης.



**Εικόνα 9: Η πολυμορφική περιοχή 5-HTTLPR και τα αλληλόμορφα της.** Παρουσία του μικρού αλληλομόρφου (*short allele*) στην πολυμορφική περιοχή 5-HTTLPR, η έκφραση του γονιδίου *SLC6A4* παρατηρείται μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση παρουσία του μεγάλου αλληλομόρφου (*long allele*) (249).

Ο μεταφορέας σεροτονίνης έχει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του εύρους και της διάρκειας της δράσης της σεροτονίνης στον προσυναπτικό και το μετασυναπτικό υποδοχέα της, καθώς ενώ οι υπόλοιποι μεταφορείς μονοαμινών επαναπροσλαμβάνουν σεροτονίνη υπό ορισμένες συνθήκες, το προϊόν του γονιδίου *SLC6A4* αποτελεί το βασικό μεταφορέα υποστρώματος από τον συναπτικό χώρο, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει τον όγκο μεταφοράς της σεροτονίνης (250). Ο μεταφορέας έχει επίσης σημαντικό ρόλο αναφορικά με τη δράση των αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης και των αγχολυτικών. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου διαμεσολαβούνται αυτές οι δράσεις (251). Η αναστολή του μεταφορέα δεν είναι από μόνη της επαρκής για την μείωση των επιπέδων του στρες, αλλά πιθανότατα αποτελεί το πρώτο βήμα σε μια σηματοδοτική πορεία που καταλήγει στην εξομάλυνση των επιπέδων του στρες (252-254). Έχει παρατηρηθεί πως στην κατάθλιψη συμβαίνει μειωμένη πρόσδεση του μεταφορέα στον προμετωπιαίο φλοιό και στην

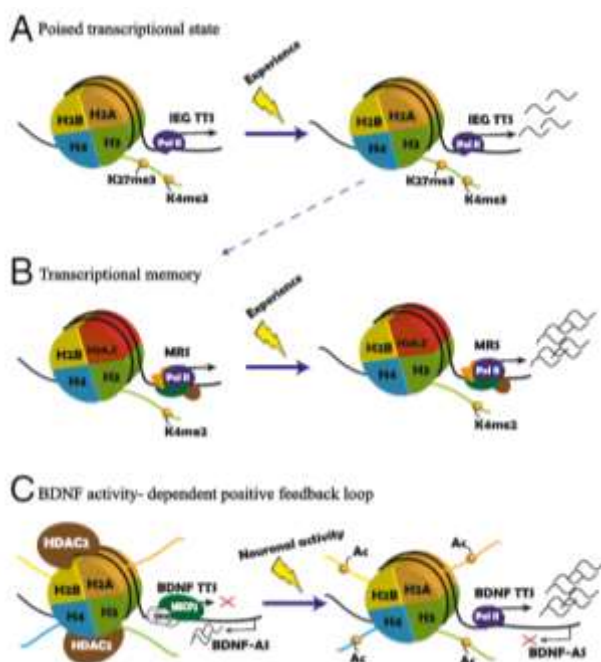
αμυγδαλή (255, 256). Ο μηχανισμός δράσης του μεταφορέα κατόπιν έκθεσης σε στρες δεν είναι γνωστός, παρά τις έρευνες που υποδεικνύουν μείωση των επιπέδων του υποδοχέα στο χρόνιο κοινωνικό στρες σε αρουραίους (257, 258). Παρόλα αυτά, οι μεταβολές στη λειτουργία επαναπρόσληψης θα αποτελούσαν σημαντικό μηχανισμό αυτορρύθμισης του μεταφορέα καθώς και της ποσότητας σεροτονίνης που απελευθερώνεται κατά το στρες. Για παράδειγμα, η αυξορρύθμιση του μεταφορέα θα μπορούσε να εξηγήσει το λόγο για τον οποίο η αύξηση στα επίπεδα εξωκυτταρικής σεροτονίνης μειώνεται απότομα κατά την έκθεση σε επαναλαμβανόμενο στρες (259). Η διαγονιδιακή υπερέκφραση του γονιδίου του μεταφορέα δημιουργεί φαινότυπο μειωμένου άγχους (260). Σε απάντηση στην έκθεση σε διαφορετικά στρεσογόνα ερεθίσματα, οι μύες που δεν εκφράζουν μεταφορέα σεροτονίνης εμφανίζουν διαταραγμένη απόκριση των γλυκοκορτικοειδών σε κατεχολαμίνες, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζουν φαινότυπο που προσομοιάζει στο άγχος (261-264). Συμπεριφορικά, οι μύες αυτοί εμφανίζουν χαρακτηριστικά κατάθλιψης σε δοκιμασίες όπως η δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, ενώ ταυτόχρονα δεν αποκρίνονται σε αντικαταθλιπτικά που στοχεύουν τον μεταφορέα σεροτονίνης (265-267). Επιπλέον, η αύξηση στον φαινότυπο της κατάθλιψης που εμφανίζεται στους μύες που υπολείπονται σε *SLC6A4* φαίνεται να ενισχύεται κατά την επανειλημμένη έκθεση στο στρες (268, 269). Οι πιθανές συνέπειες της απώλειας του γονιδίου του μεταφορέα της σεροτονίνης στον μυ φαίνεται να καθορίζονται από τη χρονική ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος και από επιστατικά φαινόμενά του με άλλους γενετικούς παράγοντες που πιθανά προσδίδουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στο στρες (270). Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου, εδράζεται μια πολυμορφική περιοχή η 5-HTTLPR (5-HTT-linked polymorphic region), στην οποία παρατηρείται προσθήκη/έλλειμμα (insertion/deletion) 44 ζευγών βάσεων. Προκύπτουν έτσι δύο πιθανά μετάγραφα του γονιδίου, το μικρό (short, S) και το μεγάλο (long, L) (271). Παρουσία του μικρού αλληλομόρφου, το γονίδιο εκφράζεται σε χαμηλότερο βαθμό από ότι παρουσία του μεγάλου αλληλομόρφου. Σύμφωνα με μία έρευνα, η πολυμορφική περιοχή 5-HTTLPR διαμορφώνει την επίδραση των στρεσογόνων ερεθισμάτων στην πιθανότητα εμφάνισης κατάθλιψης (272). Ευρήματα δείχνουν πως ομοζυγώτες για το μικρό αλληλόμορφο S, οι οποίοι εκτέθηκαν σε στρεσογόνα ερεθίσματα ή τραυματικές εμπειρίες κατά τη νεαρή ηλικία εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης συμπτωμάτων κατάθλιψης σε σύγκριση με ομοζυγώτες για το μεγάλο αλληλόμορφο L ή με ετερόζυγα άτομα SL (273, 274). Έχει επιπλέον προταθεί πως η επαναπρόσληψη της σεροτονίνης επηρεάζεται αναλόγως του γενετικού υποβάθρου (της πολυμορφικής περιοχής) του μεταφορέα της. Έτσι, κατά την έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, μεταβάλλεται η ισορροπία στη λειτουργία των νευρωνικών κυκλωμάτων μεταξύ της αμυγδαλής και του μεσοκοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού, και γενικότερα η συμπεριφορική απόκριση στο στρες (275). Οι μεταβολές στην επιγενετική ρύθμιση του υποκινητή του μεταφορέα της σεροτονίνης μπορούν να διαταράξουν την έκφραση του γονιδίου του, με αποτέλεσμα μεταβολές στη φυσιολογική επαναπρόσληψη σεροτονίνης (276). Η μελέτη των Hariri et al., έδειξε πως σε απόκριση σε απειλητικά πρόσωπα, ερέθισμα το οποίο ενεργοποιεί την απόκριση της αμυγδαλής στον άνθρωπο, η ύπαρξη του S αλληλομόρφου οδήγησε σε αυξημένη απόκριση της αμυγδαλής, όπως φάνηκε με λειτουργική απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (fMRI) (277). Τέτοιου είδους δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μοντέλου κατά το οποίο η απώλεια της λειτουργικότητας του μεταφορέα της σεροτονίνης οδηγεί σε πιθανή δυσλειτουργία των συστημάτων του φλοιού να αναστείλουν τη δράση της αμυγδαλής κατά το στρες, καταλύοντας την εμφάνιση φαινοτύπων όπως η κατάθλιψη (277, 278). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα της απώλειας της λειτουργίας του μεταφορέα στο φαινότυπο διαφέρουν από αυτά των αναστολέων επαναπρόσληψης

σεροτονίνης μετά από χρόνια χρήση τους (279-281). Ο λόγος για αυτό το παράδοξο μεταξύ γενετικής και φαρμακολογικής αναστολής του μεταφορέα, είναι πιθανά το μακροχρόνιο αποτέλεσμα της δράσης του στο φαινότυπο, κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω του ότι η σεροτονίνη λειτουργεί ως σημαντικό αναπτυξιακό μόριο (265, 282). Επιπλέον, μεταβολές της μεθυλίωσης του γονιδίου έχουν συσχετιστεί με την πιθανότητα εμφάνισης διαταραχής μετατραυματικού στρες (PTSD) (283). Εκτός αυτού, η υπομεθυλίωση του γονιδίου του μεταφορέα της σεροτονίνης είναι πιθανό να μειώνει την απόκριση των ασθενών στα αντικαταθλιπτικά (284). Η έκφραση του γονιδίου *SLC6A4* φαίνεται να είναι μειωμένη σε ασθενείς με ΠΥΕ, οι οποίοι δεν έχουν λάβει αγωγή με αντιψυχωτικά (drug-naïve), ενώ δεν φαίνεται να παρουσιάζεται αλλαγή στα επίπεδα mRNA του γονιδίου αυτού, μετά από αγωγή 8 εβδομάδων με ρισπεριδόνη (285).

### *BDNF*

Ο BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), (11p14.1) αποτελεί τη συνηθέστερη νευροτροφίνη του ανθρώπινου εγκεφάλου και συμμετέχει στη δημιουργία, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρώνων στο κεντρικό αλλά και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, διαμεσολαβεί τη νευρωνική πλαστικότητα, τη συναπτογένεση, τη δημιουργία μνήμης και τη γνωσιακή ικανότητα (286). Παίζει σημαντικό ρόλο στη μνήμη και τη μάθηση, καθώς εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό αυξάνοντας τη νευρωνική πλαστικότητα (287-289). Ο BDNF εκφράζεται επίσης στο περιφερικό νευρικό σύστημα, καθώς μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ φαίνεται πως η συγκέντρωσή του στο αίμα αντικατοπτρίζει τα επίπεδά του στον εγκέφαλο (290-293). Τα επίπεδα έκφρασης του *BDNF* φαίνεται να μεταβάλλονται σε άτομα με ψυχωτικές διαταραχές. Ο BDNF φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των δενδριτών στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή (294). Μύες που υπερεκφράζουν το γονίδιο του BDNF εμφανίζουν αυξήσεις στο μήκος των δενδριτών στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου και στην αμυγδαλή, χαρακτηριστικό που εξομαλύνει τη δράση του χρόνιου στρες στη μείωση των δενδριτικών κλάδων στον ιππόκαμπο και στην αύξησή τους στην αμυγδαλή. Αντιθέτως, οι φυσιολογικοί μύες που υφίστανται χρόνια στρες εμφανίζουν μειορρύθμιση του BDNF στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου και αύξησή του στην αμυγδαλή. Παρόλο που το χαρακτηριστικό αυτό εμμένει με την πάροδο 21 ημερών στρες στην αμυγδαλή, στον ιππόκαμπο φαίνεται να εξομαλύνεται (295). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως κατόπιν οξείας έκθεσης σε στρες η έκφραση του BDNF στην αμυγδαλή αυξάνεται και εμμένει για 10 ημέρες, ενώ στον ιππόκαμπο παρουσιάζει μόνο μια παροδική αύξηση (295). Αυτή η αύξηση στην αμυγδαλή συσχετίζεται με παρατεταμένα επίπεδα του άγχους και μειωμένη πυκνότητα των νευρωνικών ακάνθων στους νευρώνες της αμυγδαλής (296). Ο μηχανισμός της δράσης του BDNF παραμένει άγνωστος, αλλά φαίνεται να μη διαμεσολαβείται μονάχα από τη δράση των γλυκοκορτικοειδών, καθώς τα επίπεδα της κορτιζόλης αυξάνουν εξίσου κατόπιν οξέος και χρόνιου στρες. Συνεπώς, η διαμεσολαβούμενη από τον BDNF σηματοδότηση περιλαμβάνεται στις δομικές συνέπειες του στρες, αλλά η κατεύθυνση και η φύση της σηματοδότησης είναι ιστοειδική και μεταβάλλεται αναλόγως του είδους του ερεθίσματος, ενώ φαίνεται να επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (295, 297, 298). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση του BDNF επηρεάζονται από τη μητρική αποστέρηση κατά την πρώιμη ανάπτυξη, η οποία έπειτα οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση του BDNF και στην επιγενετική ρύθμιση μέσω ακετυλίωσης των ιστονών και μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της ζωής που μπορεί να καθορίζουν τη σχετιζόμενη με το άγχος συμπεριφορά (299). Μεταθανάτιες (post mortem)

μελέτες ασθενών με σχιζοφρένεια αποκαλύπτουν μειωμένα επίπεδα της νευροτροφίνης σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο φλοιός και ο ιππόκαμπος (300, 301). Τα επίπεδα του BDNF στην περιφέρεια έχουν επίσης μελετηθεί σε ασθενείς με ψύχωση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα BDNF στους περιφερικούς ιστούς ασθενών με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, οι οποίοι δεν έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή, φαίνεται να συσχετίζονται θετικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (302). Πρόσφατες μετα-αναλύσεις της βιβλιογραφίας τονίζουν πως οι ασθενείς με ΠΨΕ έχουν μειωμένα επίπεδα BDNF στους περιφερικούς ιστούς, ενώ στη χρόνια φάση της ασθένειας τα επίπεδα μειώνονται ακόμη περισσότερο. Τα επίπεδα του BDNF φαίνεται να συσχετίζονται και με ορισμένα γνωσιακά ελλείμματα ασθενών με ψύχωση (303-309). Παρόλα αυτά, τα ευρήματα σε ασθενείς με ψύχωση αναφορικά με τα επίπεδα του BDNF παραμένουν αντικρουόμενα. Σε πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκαν διαφορετικά επίπεδα BDNF μεταξύ ομάδων ατόμων at-risk mental state/for mental illness (ARMS), ΠΨΕ και στο στάδιο της χρόνιας νόσου. Η κατάσταση at-risk ορίζεται ως αυτή κατά την οποία τα άτομα εμφανίζουν υψηλότερες πιθανότητες εμφάνισης ψύχωσης. Μεταξύ των ατόμων αυτών υπάρχουν άτομα με οικογενειακό ιστορικό ασθένειας, σχιζοειδή διαταραχή και υποκλινικά ψυχωτικά συμπτώματα, με ένα ποσοστό 41% να εμφανίζει ψυχωτικά συμπτώματα εντός 12 μηνών από την αρχική διάγνωση (310). Συγκεκριμένα, οι χρόνιοι ασθενείς εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα BDNF σε αντίθεση με τα άτομα σε κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου (ARMS) στους οποίους παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα της νευροτροφίνης (311). Ασθενείς με σχιζοφρένεια ή διπολική διαταραχή φαίνεται να εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα BDNF στο πλάσμα, φαινόμενο που συσχετίστηκε με αύξηση στην εμφάνιση καταθλιπτικών επεισοδίων, ενώ φαίνεται πως μετά τη θεραπεία με κλοζαπίνη τα επίπεδα BDNF του ορού αυξάνονται, συγκριτικά με αυτά των ατόμων που λαμβάνουν ρισπεριδόνη ή τυπικά αντιψυχωτικά (312-314). Σε πειράματα σε νεαρούς αρουραίους, η έκθεση σε στρες κατά τη νεαρή ηλικία οδήγησε σε αυξημένη μεθυλίωση του γονιδίου *BDNF* (315). Ο πολυμορφισμός Val66Met (rs6265) του *BDNF* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη γνωσιακή ικανότητα των ατόμων με ΠΨΕ αλλά και του δείγματος ελέγχου. Άτομα με σχιζοφρένεια και ομόζυγα για τον πολυμορφισμό Val/Val εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα BDNF του ορού μετά τη θεραπεία γνωστικής αποκατάστασης, ενώ ο πολυμορφισμός αυτός έχει προταθεί ως βιοδείκτης για την πορεία πρόγνωσης της νόσου (316). Ο πολυμορφισμός rs10835210 έχει συσχετιστεί με τα θετικά συμπτώματα του ΠΨΕ, ενώ αμφότεροι οι παραπάνω πολυμορφισμοί φαίνεται να συσχετίζονται με μεταβολές στους εγκεφάλους ατόμων με σχιζοφρένεια όπως η μείωση της λευκής ουσίας στον προμετωπιαίο φλοιό και της φαιάς ουσίας στον κροταφικό λοβό (317).



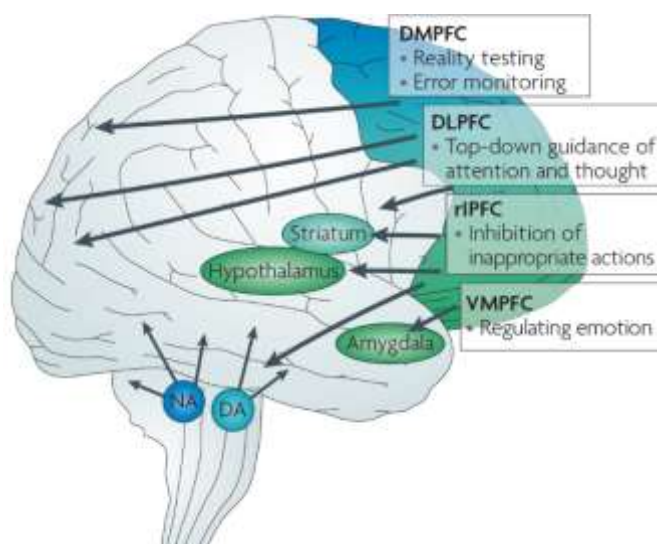
### Εικόνα 10: Επιγενετικοί μηχανισμοί που επιδρούν στη μεταγραφική κατάσταση της χρωματίνης.

Ο *BDNF* συμμετέχει στη διατήρηση ή εξάλειψη των νευρωνικών συνάψεων, η οποία είναι πιθανό να επάγεται κατόπιν λήψης αποφάσεων μέσω μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (318). (A) Χρωματίνη «έτοιμη» (*poised*) για μεταγραφή γονιδίων, κατόπιν εξωτερικού ερεθίσματος ή εμπειρίας. (B) Η επιγενετική μνήμη επιτρέπει τη συντομότερη και ισχυρότερη επαγωγή της επανέκφρασης γονιδίων. (Γ) Θετική ανατροφοδότηση έκφρασης γονιδίων, επαγόμενη από τη δράση του *BDNF*. Η αυξημένη νευρωνική δραστηριότητα επάγει την απελευθέρωση της κατασταλτικής *MECP2* από τον υποκινητή του *BDNF*, οδηγώντας σε μια εξαρτώμενη από τον *BDNF*, αύξηση της έκφρασής του. Ο *BDNF* επάγει την απελευθέρωση της *HDAC2* από τη χρωματίνη, με αποτέλεσμα αύξηση της ακετυλίωσης και επακόλουθη γονιδιακή έκφραση των νευροτροφινών, συμπεριλαμβανομένου του ίδιου (319).

### Οι εγκεφαλικές δομές που επηρεάζονται στη σχιζοφρένεια-Ο προμετωπιαίος φλοιός

Οι εγκεφαλικές δομές που ρυθμίζουν το συναίσθημα και τη μνήμη είναι η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος φλοιός, ενώ φαίνεται πως αυτές οι περιοχές απορρυθμίζονται στη σχιζοφρένεια. Ο προμετωπιαίος φλοιός (ΠΜΦ) αποτελεί μια δομή ικανή να ενσωματώνει εξωτερικές αισθητηριακές πληροφορίες και μέσω της επεξεργασίας πληροφοριών που έχουν αποκτηθεί από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, να αυξάνει τη συμπεριφορική αποτελεσματικότητα προσθέτοντας περαιτέρω επίπεδα πολυπλοκότητας στα ήδη υπάρχοντα. Σε αυτό το πλαίσιο, ο ΠΜΦ διαμεσολαβεί την ολοκλήρωση του συνόλου των πληροφοριών, ενώ μπορεί να συνδυάσει πραγματικές πληροφορίες του εξωτερικού περιβάλλοντος με παρελθοντικές εμπειρίες σε ένα κοινό πλαίσιο, με σκοπό τη διευκόλυνση της λήψης αποφάσεων (320). Ο ΠΜΦ αποτελεί μια από τις τελευταίες περιοχές του φλοιού που αναπτύχθηκαν φυλογενετικά και οντογενετικά, ενώ στο ανθρώπινο είδος αγγίζει τη μέγιστη ανάπτυξή του, αποτελώντας σχεδόν το 30% του συνόλου του μανδύα του εγκεφάλου (321). Στον άνθρωπο, ο μετωπιαίος λοβός βρίσκεται μπροστά από την κεντρική αύλακα και

μπορεί να χωριστεί σε δύο κύρια μέρη, ένα ουραίο που περιέχει τον κινητικό φλοιό και ένα πρόσθιο που περιλαμβάνει τον ΠΜΦ. Ο ΠΜΦ εντοπίζεται στο πρόσθιο άκρο των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και εκτείνεται μέχρι τον μετωπιαίο πόλο (322). Ο ΠΜΦ συνδέεται με το βρεγματικό, τον κροταφικό και τον ινιακό λοβό. Από αυτή την άποψη αρκετές ανατομικές και συμπεριφορικές μελέτες έχουν δείξει οδούς συσχέτισης με τον οπίσθιο βρεγματικό φλοιό, που είναι υπεύθυνος για την κατάλληλη εκτέλεση οπτικά καθοδηγούμενων κινήσεων. Επομένως, ο ραχιοπλευρικός ΠΜΦ έχει προταθεί πως διαμεσολαβεί την επεξεργασία πληροφοριών σχετικά με τη στερεοτακτική τοποθεσία αντικειμένων (323). Επίσης είναι γνωστό πως ο κατώτερος βρεγματικός και ο πλαγιοκοιλιακός κροταφικός φλοιός προβάλλουν προς τον πλαγιοκοιλιακό ΠΜΦ. Τέτοια κυκλώματα παρέχουν δεδομένα σχετικά με την αναγνώριση της μορφής αντικειμένων. Ως εκ τούτου, η κοιλιακή οδός φαίνεται να αποτελεί ένα ρεύμα επεξεργασίας πληροφοριών αναφορικά με το πώς αντιμετωπίζονται αντικείμενα του εξωτερικού περιβάλλοντος (324). Αυτό το ευρύ σύνολο των διασυνδέσεων μεταξύ του ΠΜΦ και των διαφορετικών περιοχών κατά μήκος του νευράξονα, δημιουργεί ένα σύμπλεγμα γνωστικών λειτουργιών ανώτερης τάξης. Αυτά περιλαμβάνουν τη μνήμη εργασίας, τον σχεδιασμό των κινήσεων, την ανάπτυξη και εφαρμογή μακροπρόθεσμων στρατηγικών, τη λήψη αποφάσεων και μεταξύ άλλων την επίλυση προβλημάτων, διαδραματίζοντας έτσι έναν ουσιαστικό ρόλο στη συμπεριφορική οργάνωση και ρύθμιση (325, 326). Η μνήμη εργασίας αποτελεί το τμήμα εκείνο της μνήμης όπου γίνεται η επεξεργασία και η κωδικοποίηση της πληροφορίας που λαμβάνει το άτομο, ενώ συμμετέχει στην αποθήκευση νέων γνώσεων και στην ανάκληση παλαιότερων (327). Ο ΠΜΦ είναι υπεύθυνος για τον ακριβή προγραμματισμό της μελλοντικής συμπεριφοράς και της πρόβλεψης πιθανών συνεπειών, εκτελώντας έτσι λειτουργίες με στόχο την οργανωμένη απόκριση του οργανισμού. Με άλλα λόγια, ο ΠΜΦ εμπλέκεται στη χρονική οργάνωση της συμπεριφοράς, την υποστήριξη των γνωστικών λειτουργιών που είναι απαραίτητες για τη διευθέτηση της συμπεριφοράς σε ένα χωροχρονικό πλαίσιο, επιτρέποντας στον οργανισμό να δημιουργήσει στρατηγικές συμπεριφοράς για την ενίσχυση της περιβαλλοντικής προσαρμογής (328).



**Εικόνα 11:** Οι υποπεριοχές του προμετωπιαίου φλοιού και οι λειτουργίες τους. Ο ραχιοπλευρικός (DLPFC) ΠΜΦ εμφανίζει εκτεταμένες συνδέσεις με αισθητηριακούς και κινητικούς φλοιούς και αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα ρύθμισης της προσοχής, της σκέψης και εκτέλεσης δράσεων. Ο δεξιός κάτωθι (rIPFC) ΠΜΦ εξειδικεύεται στην αναστολή

των ακατάλληλων κινητικών αποκρίσεων. Αντίθετα, ο κοιλιακός (VMPFC) ΠΜΦ έχει εκτεταμένες συνδέσεις με υποφλοιώδεις δομές (αμυγδαλή, επικλινή πυρήνας, υποθάλαμος), που προάγουν συναισθηματικές αντιδράσεις και συνήθειες και έτσι είναι σε θέση να ρυθμίζει τη συναισθηματική απάντηση. Τέλος ο ραχιαίος (DMPFC) ΠΜΦ έχει συσχετιστεί με την παρακολούθηση γνωσιακών σφαλμάτων και σχέσης με την πραγματικότητα. Αυτές οι περιοχές του ΠΜΦ διασυνδέονται εκτενώς για να ρυθμίσουν τη λήψη σημαντικών αποφάσεων και την οργάνωση και το σχεδιασμό μελλοντικών στόχων (329).

Αυτός ο ρόλος εκτείνεται σε όλους τους τομείς εκούσιας δράσης, συμπεριλαμβανομένης της σκελετικής κίνησης, της οφθαλμικής κινητικότητας, της ομιλίας, ακόμη και του λογικού συλλογισμού (330). Η δράση του ΠΜΦ είναι απαραίτητη όταν πρόκειται να συγκεντρωθούν από το άτομο προσωρινά εκτεταμένες αλληλουχίες σκόπιμης δράσης, ιδιαίτερα όταν η ενέργεια που πρέπει να πραγματοποιηθεί είναι νέα και περιβάλλεται από υψηλά επίπεδα αβεβαιότητας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας χρονικά αναδρομικής λειτουργίας της βραχυπρόθεσμης μνήμης σε συνδυασμό με την προοπτική λειτουργία του προπαρασκευαστικού συνόλου για δράση. Αυτές οι δύο λειτουργίες επιτρέπουν τη συνεχή αλληλεπίδραση παρελθοντικών και μελλοντικών γεγονότων κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της συμπεριφοράς, διατηρώντας τη δράση σε λογική σειρά (331). Επιπλέον, ο ΠΜΦ είναι υπεύθυνος για την καταστολή εξωγενών ή ενδογενών αισθητηριακών παραγόντων. Όταν αυτή η λειτουργία του αποτυγχάνει, η προδιαγεγραμμένη συμπεριφορά αποκλίνει του αρχικού στόχου και οι λειτουργίες δεν ολοκληρώνονται. Επιπλέον, αυτή η διάσπαση της προσοχής συνήθως συνοδεύεται από κινητική υπερδραστηριότητα, προκαλώντας έτσι ένα σύνδρομο που μοιάζει με αυτό που παρουσιάζεται στη διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας σε παιδιά (332). Είναι γνωστό πως η βλάβη στον ΠΜΦ μπορεί να οδηγήσει σε ελλείμματα στις διαρκείς και επιλεκτικές διαδικασίες της προσοχής. Άτομα με βλάβες στον ΠΜΦ εμφανίζουν δυσκολίες στη διοχέτευση της προσοχής σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, απορρίπτοντας τους εξωγενείς παράγοντες, χαρακτηριστικό που συνοδεύεται από μείωση του φάσματος της προσοχής και προβλήματα συγκέντρωσης. Αυτή η απώλεια της συγκέντρωσης της προσοχής προκαλεί ελλείμματα στη βραχυπρόθεσμη μνήμη, αποδυναμώνοντας την ικανότητα πρόσληψης νέας πληροφορίας για μελλοντική χρήση χωρίς υπάρχοντα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (μνήμη εργασίας) (333). Πολλές εργασίες έχουν τονίσει τη συνεχή εμπλοκή του ΠΜΦ στην αιτιοπαθολογία διαφόρων νευροψυχιατρικών διαταραχών, που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής του ατόμου. Ένα από τα συμπτώματα που διακρίνουν τη σχιζοφρένεια είναι η αποτυχία της σωστής χρονικής ολοκλήρωσης της σκέψης. Τέτοια ελλείμματα προκαλούνται συνήθως από τη συνεχή αναστολή και τη χαλαρότητα των συνειρμών. Έτσι προσεγγίσεις λειτουργικής νευροαπεικόνισης έχουν δείξει ασυνήθιστα χαμηλά επίπεδα μεταβολισμού στον προμετωπιαίο φλοιό σε ασθενείς, ιδιαίτερα όταν πρόκειται να αντιμετωπίσουν νευροψυχολογικές δοκιμασίες που απαιτούν την ενεργοποίηση του ΠΜΦ (334). Επιπλέον έχειδειχθεί πως οι μειώσεις της εγκεφαλικής φαιάς ουσίας σε συγκεκριμένες περιοχές, ιδιαίτερα στον κοιλιακό ΠΜΦ, μπορεί να λειτουργήσουν ως κρίσιμος παθολογικός δείκτης για την πρόγνωση της διαταραχής μετατραυματικού στρες (335). Επίσης, φαίνεται πως ο ΠΜΦ έχει σημαντικό ρόλο σε διαταραχές του συναισθήματος, όπως η κατάθλιψη (336).

Ο ΠΜΦ ασκεί σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αποκρίσεων του στρες αναφορικά με το συντονισμό των αυτόνομων, των νευροενδοκρινικών και των συμπεριφορικών αποκρίσεων που στοχεύουν στην προσαρμογή και την επιβίωση (337). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως το στρες επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία του ΠΜΦ, ενώ λόγω μεθοδολογικών



περιορισμών δεν έχει γίνει γνωστό το πώς ο χειρισμός της δράσης των νευρώνων του μέσου ΠΜΦ, ιδιαίτερα των διανευρώνων, επηρεάζουν τη συμπεριφορά σε καταστάσεις στρες (338). Ο μέσος ΠΜΦ έχει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση των στρεσογόνων ερεθισμάτων και ασκεί άμεσο ανασταλτικό έλεγχο στον άξονα ΥΥΕ. Φαίνεται πως μια συνέπεια της δυσλειτουργίας του ΠΜΦ μπορεί να είναι η ανεσταλμένη ρύθμιση της απόκρισης στο στρες. Οι Weinberg et al., υποστηρίζουν πως η λειτουργία του μέσου ΠΜΦ δεν είναι απαραίτητη για την προσαρμογή κατόπιν έκθεσης σε ψυχολογικό στρες, αλλά ο ΠΜΦ έχει σημαντικό ρόλο στην επιλογή του τρόπου με τον οποίο ο οργανισμός καταφέρνει να προσαρμοστεί (339). Ο μέσος ΠΜΦ λαμβάνει ανασταλτικά σήματα από πολλές περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της αμυγδαλής και του ιπποκάμπου, ενώ ενεργοποιείται όσο απενεργοποιούνται οι περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος. Αυτό επιτρέπει ισχυρότερα ανασταλτικά σήματα από τον μέσο ΠΜΦ προς την αμυγδαλή (340).

Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν τις δράσεις τους στον ΠΜΦ επηρεάζοντας τη μνήμη εργασίας και την μνήμη αναγνώρισης. Το οξύ στρες προκαλεί μακροχρόνια ενδυνάμωση των διαμεσολαβούμενων από NMDAR (υποδοχέας N-μέθυλο-D-ασπαρτικού) και AMPAR (υποδοχέας α-άμινο-3-υδροξύ-5-μεθυλο-4-ισοξαζολεπροπιονικού οξέος) συναπτικών δυναμικών μέσω υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στους πυραμιδικούς νευρώνες του ΠΜΦ, και συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση των NMDAR και AMPAR επιφανείας. Το οξύ στρες επίσης ενισχύει τη μνήμη εργασίας μέσω ενός εξαρτώμενου από τα γλυκοκορτικοειδή μηχανισμού. Όπως στον ιππόκαμπο, έτσι και στον ΠΜΦ το χρόνιο στρες προκαλεί αντιστρεπτό δομικό ανασχηματισμό των νευρώνων. Ο ανασχηματισμός αυτός αντιστρέφεται όταν τερματιστεί το στρεσογόνο ερέθισμα σε νεαρά ζώα, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο σε ενήλικα ή γερασμένα ζώα (338, 341-343). Έχει παρατηρηθεί πως οι δένδριτες που συρρικνώνονται, κατόπιν στρες, βρίσκονται μακριά από το σώμα του νευρώνα, ενώ όσοι επανέρχονται μετά τον τερματισμό του ερεθίσματος βρίσκονται εγγύς του σώματος (344). Φαίνεται πως η χορήγηση κορτικοστεροειδών προκαλεί την αναδιαμόρφωση των δένδριτών στον μέσο ΠΜΦ, όπως συμβαίνει και στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου (345, 346). Το οξύ στρες περιορισμού φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα mRNA της CRF στο μέσο ΠΜΦ (347). Οι Chen et al., έδειξαν πως η αναστολή των νευρώνων του μέσου ραχιαίου ΠΜΦ που εκκρίνουν CHR, αυξάνουν τη συμπεριφορική ακινησία, ενώ ταυτόχρονα επάγουν την κοινωνική αποφυγή. Οι νευρώνες αυτοί αποτελούν GABAεργικούς διανευρώνες, οι οποίοι στέλνουν προσαγωγά σήματα στους πυραμιδικούς νευρώνες του μέσου ΠΜΦ. Επιπλέον, η αναστολή των νευρώνων αυτών, μειώνει το χρόνο που περνούν τα πειραματόζωα στα ανοικτά μέρη της δοκιμασίας υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Συνεπώς, κατά την έκθεση σε ψυχοκοινωνικό στρες, οι μύες εμφάνισαν ευαισθησία στα στρεσογόνα ερεθίσματα, λόγω της απώλειας λειτουργίας των CRF νευρώνων του ΠΜΦ (348). Ο ανθρώπινος ΠΜΦ επηρεάζεται από στρεσογόνα ερεθίσματα και από το ψυχοκοινωνικό περιβάλλον. Τα σοβαρά, οξέα στρεσογόνα ερεθίσματα αναστέλλουν τη γνωσιακή ικανότητα μέσω αδρενεργικών μηχανισμών (329).

### **Η μελέτη σύνθετων φαινοτύπων του στρες σε τρωκτικά**

Η μελέτη του στρες βασίζεται πλέον σε ποικίλα καθιερωμένα πρωτόκολλα εφαρμογής του σε τρωκτικά, τα οποία φαίνεται να μοντελοποιούν με τις βέλτιστες συνθήκες τα επιθυμητά φαινόμενα για τη μελέτη ασθενειών και πολύπλοκων φαινοτύπων. Η βιβλιογραφία γύρω από

το στρες περιλαμβάνει βασικά ερευνητικά πρωτόκολλα πειραμάτων, καθώς και τις εφαρμογές τους στην ψυχολογία, την ιατρική και άλλους τομείς των επιστημών υγείας. Το στρες φαίνεται επανειλημμένα να επηρεάζει μια πληθώρα συμπεριφορών, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογίας, της ανοσολογίας, της ενδοκρινολογίας και των αναπτυξιακών μηχανισμών, ενώ μπορεί να επάγει την εμφάνιση πολλών διαταραχών και της σοβαρότητάς τους, όπως ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση και η κατάθλιψη (349-355). Ο αντίκτυπος του στρες στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις αποτελεί πεδίο μεγάλου ενδιαφέροντος, ενώ τα πειραματικά μοντέλα της επαγωγής εξίσου οξειδωτικού και ψυχολογικού στρες που περιλαμβάνουν φυσικές και ψυχολογικές προσεγγίσεις έχουν εγκαθιδρυθεί πλήρως στον ερευνητικό κλάδο. Το ψυχολογικό στρες περιλαμβάνει μια συναισθηματική απόκριση σε ένα ερέθισμα. Τέτοιου είδους έρευνα είναι μεγάλης σημασίας, καθώς το στρες κυριαρχεί στο φυσικό περιβάλλον και εντοπίζεται στην κοινωνική κυριαρχία ιδιαίτερα μεταξύ των τρωκτικών (356). Τα ψυχολογικά στρεσογόνα ερεθίσματα μπορεί να περιλαμβάνουν συγκρούσεις κοινωνικής τάξης και συναγωνισμό για την πρόσβαση σε πόρους καθώς και περιορισμό ή ακινητοποίηση συνοδευόμενη από άγχος και φόβο (357). Τα φυσικά και ψυχολογικά στρεσογόνα ερεθίσματα προκαλούν συντονισμένα φαινόμενα διατάραξης της ομοιόστασης του οργανισμού καθώς και αλλαγές σε επίπεδο συμπεριφοράς και φυσιολογίας (358).

### **Μοντέλα του στρες σε τρωκτικά: το επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού**

Τα ζωικά μοντέλα του στρες αποτελούν τη βέλτιστη προσέγγιση για μελέτη της συμπεριφοράς κατά αναλογία με τον άνθρωπο, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μοντελοποίησης νευροψυχιατρικών διαταραχών. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο μελέτης του στρες, είναι το στρες περιορισμού ή ακινητοποίησης σε τρωκτικά. Κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου οι μύες εισάγονται σε ειδικά σωληνάκια falcon, όπου ακινητοποιούνται για χρονικό διάστημα ορισμένων λεπτών. Η διαδικασία αυτή επάγει ισχυρό στρες περιορισμού σε τρωκτικά, το οποίο έπειτα ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια συμπεριφορικών διαδικασιών και διερεύνησης μοριακών δεικτών. Τα αποτελέσματα τέτοιου είδους ερευνών συνήθως ερμηνεύονται στο πλαίσιο της «μάχης ή φυγής» της απόκρισης στο στρες, του μεταβιβλημένου μεταβολισμού και της αλληλεπίδρασής του με την ανοσολογική απόκριση (359). Η μοντελοποίηση του πόνου σε συνδυασμό με την ακινητοποίηση φαίνεται να προξενεί σημαντικότερες μεταβολές στη συμπεριφορά και τη φυσιολογία του πειραματοζώου. Συγκριτικά με το στρες που επάγεται μετά τη χορήγηση ουσιών, τις χειρουργικές παρεμβάσεις και τις εναλλαγές στη θερμοκρασία των τρωκτικών, το στρες περιορισμού επιτρέπει την αρτιότερη μελέτη και παρατήρηση αλλαγών στα επίπεδα των κορτικοειδών ορμονών, της απευαισθητοποίησης του άξονα ΥΥΕ και της έκφρασης των κυτταροκινών (360). Το στρες περιορισμού αποτελεί ένα από τα πιο συνήθη πρωτόκολλα λόγω του ότι γίνεται άμεσα και δεν προκαλεί επιπλέον πόνο στα πειραματόζωα. Η ακινητοποίηση, που αποτελεί παραλλαγή του περιορισμού, συντελεί επίσης στη μείωση του εύρους κίνησης και αποτελεί εξίσου σημαντικό μοντέλο παραλληλισμού με νευροψυχιατρικό στρες. Η ευρεία εφαρμογή αυτών των πρωτοκόλλων οφείλεται στη χαμηλή τους οικονομική αξία και στο γεγονός πως δεν προκαλούν κανέναν περαιτέρω τραυματισμό στα τρωκτικά. Συνεπώς, οι όποιες παρατηρούμενες αλλαγές στο φαινότυπο οφείλονται στο ίδιο το στρες περιορισμού και όχι σε σωματικές βλάβες που προκαλούνται από διαφορετικά πρωτόκολλα του στρες. Οι ψυχολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που συσχετίζονται με τον περιορισμό

φαίνεται να προκύπτουν από την ταλαιπωρία και την αποστροφή του πειραματοζώου για τη διαδικασία και όχι από την οποιαδήποτε ταυτόχρονη ενεργοποίηση μηχανισμών πόνου ή δυσφορίας (359). Σε ορισμένες περιπτώσεις, το στρες περιορισμού και η ακινητοποίηση δεν επάγουν απόκριση του άξονα ΥΥΕ. Επιπλέον οι αποκρίσεις στο στρες δεν φαίνεται να αυξάνουν με την πάροδο των στρεσογόνων ερεθισμάτων. Αντ' αυτού φαίνεται πως η απόκριση στο στρες αγγίζει ένα πλατώ και πως το πειραματόζωο προσαρμόζεται στο στρες περιορισμού, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόκρισης στο στρες. Αυτό πιθανά οφείλεται στην ανεπαρκή ένταση ή διάρκεια του περιορισμού της κίνησης. Συγκεκριμένα, το οξύ στρες περιορισμού αποτελεί στρεσογόνο ερέθισμα που συμβαίνει σε μία χρονική στιγμή, δεν έχει μεγάλη διάρκεια και πιθανά δεν επάγει μεγάλες μοριακές και συμπεριφορικές μεταβολές στα τρωκτικά. Οι πιο κοινές φυσιολογικές μεταβολές μετά την έκθεση σε στρες περιορισμού στα τρωκτικά περιλαμβάνουν αυξήσεις τα επίπεδα ACTH και κορτικοστερόνης (357). Επιπλέον παρατηρούνται μεταβολές στην ικανότητα δημιουργίας μνημών και κινητοποίησης. Τα μειωμένα επίπεδα κινητοποίησης προκύπτουν από την υποταγή των τρωκτικών στις επιθέσεις άλλων ζώων ή όταν ένα τρωκτικό στην κορυφή της κοινωνικής ιεραρχίας δεν είναι σε θέση πλέον να δράσει επιθετικά και κυρίαρχα.

Αντιθέτως, το χρόνιο στρες περιορισμού έχει διάρκεια ημερών, σε αντίθεση με το οξύ στρες περιορισμού και επάγει σημαντικές συμπεριφορικές και μοριακές μεταβολές στα τρωκτικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η αύξηση στη διάρκεια του στρες περιορισμού δεν αυξάνει απαραίτητα πάντοτε την απόκριση στο στρες (360). Μία από τις περιοχές του εγκεφάλου που υφίστανται δομικές και λειτουργικές μεταβολές μετά την έκθεση σε χρόνιο στρες σε τρωκτικά είναι ο μέσος ΠΜΦ (361-363). Το χρόνιο στρες μειώνει τη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση, τη νευρωνική δραστηριότητα και προκαλεί ατροφία των δενδριτών και απώλεια δενδριτικών ακάνθων στον μέσο ΠΜΦ, χαρακτηριστικά που οδηγούν σε εμμένουσα καταθλιπτική συμπεριφορά (364, 365). Επιπλέον, η μειωμένη νευρωνική δραστηριότητα του μέσου ΠΜΦ οδηγεί σε δυσλειτουργία του άξονα ΥΥΕ (366). Συνεπώς, οι εξαρτώμενες από τα γλυκοκορτικοειδή μεταβολές στον μέσο ΠΜΦ είναι σημαντικές για την επαγόμενη από στρες καταθλιπτική συμπεριφορά. Το χρόνιο στρες επάγει προσαρμοστικές μεταβολές μέσω της συσσωρευτικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Το χρόνιο στρες περιορισμού σε μύες προκαλεί φαινότυπο παρόμοιο αυτού της κατάθλιψης, ο οποίος εμμένει περισσότερο από τρεις μήνες, ενώ τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές του φαινοτύπου αυτού. Οι Lee et al., παρατήρησαν αύξηση στα επίπεδα του *FKBP5* και μείωση στα επίπεδα του *GR* κατόπιν χρόνιου στρες περιορισμού, σε περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος όπως η αμυγδαλή (BLA), ο επικλινής πυρήνας (NAcc) και ο κλινειδής πυρήνας της τελικής ταινίας (BNST) του εγκεφάλου μύων (367). Έχει δειχθεί πως τρωκτικά τα οποία εκτίθενται σε στρες περιορισμού για δύο ώρες και τρεις συνεχόμενες ημέρες χάνουν βάρος, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της απώλειας ενέργειας και τη μείωση της πρόσληψης τροφής, κατά τη διάρκεια του περιορισμού (368, 369). Στα ίδια ζώα παρόλο που τα επίπεδα κορτικοστερόνης παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του περιορισμού, δώδεκα ημέρες μετά τη λήξη του και σε απόκριση σε άλλα στρεσογόνα ερεθίσματα η κορτικοστερόνη αυξάνεται δραματικά (370).

Η αυξημένη ευαισθησία σε στρεσογόνα ερεθίσματα την περίοδο μετά την απόκριση στο στρες, φαίνεται να συσχετίζεται με την ανεσταλμένη ικανότητα των γλυκοκορτικοειδών να καταστείλουν τον άξονα ΥΥΕ και με τον μειωμένο ουδό για την εκκίνηση της νευροενδοκρινικής απόκρισης στο στρες (370). Η έκθεση στο στρες συνοδεύεται από ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ, αύξηση στην κατανάλωση ενέργειας και μείωση της όρεξης

για τροφή (371). Ταυτόχρονα, οι συμπεριφορικές μεταβολές λόγω στρες περιλαμβάνουν την αύξηση του φαινοτύπου του στρες σε δοκιμασίες όπως η δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου (372). Τέτοιες συμπεριφορικές δοκιμασίες βασίζονται στη φυσική αποστροφή των τρωκτικών για φωτεινές, ανοικτές περιοχές και στην τάση τους να εξερευνούν νέα μέρη. Οι Chotiawat et al., παρατήρησαν πως είκοσι ημέρες μετά το στρες περιορισμού, οι μύες εμφάνισαν αύξηση στα επίπεδα του στρες, ενώ εμφάνισαν ταυτόχρονα αύξηση της κορτικοστερόνης. Αυτή η υπερευαισθησία στο στρες φαίνεται να συσχετίζεται και με την απώλεια βάρους που εμφάνισαν οι μύες αυτοί (373). Οι Algamal et al., υπέβαλαν νεαρούς μύες σε χρόνιο απρόβλεπτο στρες περιορισμού και παρατήρησαν μειωμένη ενεργότητα του άξονα ΥΥΕ, έναν μήνα κατόπιν στρες. Επιπλέον παρατήρησαν μείωση στο χρόνο κίνησης των τρωκτικών στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου καθώς και αυξημένα επίπεδα φόβου (374). Οι Sadler et al., εφάρμοσαν ένα πρωτόκολλο επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού και παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης και μειωμένο βάρος σε μύες, έπειτα από δεκατέσσερις ημέρες. Επιπλέον, σε έφηβους μύες παρατηρήθηκε αύξηση στην εξερευνητική συμπεριφορά στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου, μείωση στο χρόνο ακινησίας κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης και μείωση στην επιθυμία για σουκρόζη. Σε ενήλικους μύες παρατηρήθηκαν λιγότερες συμπεριφορικές μεταβολές. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός πως δύο διαφορετικά στελέχη μυών, τα BALB/c και τα C57BL/6 παρουσίασαν παρόμοιο φαινότυπο τρεις ημέρες μετά την έκθεση σε επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού. Οι συμπεριφορικές αυτές μεταβολές πιθανά είναι προϊόν της επιτυχημένης απόκρισης στο στρες ή και της ανθεκτικότητας των μυών σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Εκτός αυτού, παρατηρήθηκαν εντονότερες ορμονικές και συμπεριφορικές μεταβολές σε έφηβους μύες παρά σε ενήλικους, γεγονός που αντικατοπτρίζει την αυξημένη ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν έντονα στρεσογόνα ερεθίσματα (375).

## **Η θεραπεία της σχιζοφρένειας-Ιστορική αναδρομή**

Οι νευροψυχιατρικές διαταραχές όπως περιγράφονται από τη σύγχρονη επιστημονική κοινότητα, ήταν δύσκολο να γίνουν αντιληπτές ή να περιγραφούν επακριβώς από ιατρούς και φιλοσόφους σε παλαιότερες εποχές. Στην αρχαία Ελλάδα ως ψυχικές νόσοι περιγράφηκαν η μανία, η μελαγχολία, η φρενίτιδα και άλλες, οι οποίες θεωρούνταν αποτέλεσμα της αλλοίωσης της ισορροπίας των βασικών στοιχείων του σώματος ή του πνεύματος. Συγκεκριμένα, τα μέλη της Δογματικής Σχολής, τα οποία υποστήριζαν τις ιπποκρατικές αρχές, πίστευαν πως οι σωματικές διαταραχές ήταν αποτέλεσμα των δυσλειτουργιών και ανισορροπιών των χυμών του σώματος, ενώ τα μέλη της Πνευματικής Σχολής υποστήριζαν πως οι διαταραχές αυτές προέκυπταν από αλλοίωση της ποιότητας των χυμών και τη διέλευση αέρα (του πνεύματος) από το σώμα (376). Συμπεριφορές που θα μπορούσαν να ανήκουν στο σύνολο των συμπτωμάτων της ψύχωσης έγιναν αντιληπτές και καταγράφηκαν κατά την αρχαιότητα από διάφορους Έλληνες ιατρούς του 2<sup>ου</sup> αιώνα, μεταξύ των οποίων ο Αρεταίος ο Καππαδόκης και ο Σώρανος ο Εφέσιος (377). Οι περιγραφές ασθενών με σχιζοφρένεια αυξάνονται ραγδαία κατά τα 1800, ενώ επικρατούν τρεις βασικές υποθέσεις γύρω από το μεγάλο αριθμό νοσούντων. Προσπαθώντας να αιτιολογήσει την ξαφνική αύξηση ασθενών αυτής της περιόδου, ο αμερικανός ψυχίατρος Edwin Fuller Torrey υποστήριξε πως η σχιζοφρένεια είναι μια νόσος-παράγωγο της βιομηχανοποίησης των κοινωνιών (Industrialization Hypothesis) (378-381). Κατά την περίοδο 1800 έως 1900 υποστηρίζεται πως η εκ νέου ενσωμάτωση του γενετικού υλικού ενός ιού ή βακτηρίου στο ανθρώπινο

γονιδίωμα ή μια ανοσολογική απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα υπήρξαν η γενεσιουργός αιτία της νόσου. Μια άλλη υπόθεση γύρω από την αύξηση των καταγεγραμμένων περιστατικών, υποστηρίζει πως η σχιζοφρένεια υπήρξε παρούσα σε όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας αλλά δεν περιγράφηκε επαρκώς λόγω του εκάστοτε κοινωνικού, πολιτισμικού και επιστημονικού υποβάθρου (The Permanence View) (382). Συγκεκριμένα, η έλλειψη καταγραφών περιστατικών της νόσου είναι πιθανό να οφείλεται στη δυσκολία διάγνωσης από τους ιατρούς της εποχής, στο μικρό αριθμό εξειδικευμένων επιστημόνων καθώς και στα ίδια τα γνωσιακά συμπτώματα που διακρίνουν τη νόσο, καθιστώντας δύσκολη την περιγραφή των συμπτωμάτων από τους ασθενείς (382). Η τρίτη υπόθεση (The Discontinuity Hypothesis) υποστηρίζει πως η διάγνωση της σχιζοφρένειας δεν μπορεί να υπάρξει χωρίς την ψυχιατρική ταξινόμηση, επομένως αποτελεί ένα επιστημονικό ανάπτυγμα (formulation) της ιστορικής περιόδου κατά την οποία αυτή περιγράφηκε ευρέως (383, 384). Βάσει αυτής της υπόθεσης, ο ορισμός της σχιζοφρένειας και του φάσματος των νευροψυχιατρικών διαταραχών, εξελίχθηκε παράλληλα με την εξέλιξη της γλώσσας, των αξιών και του πολιτισμού της εκάστοτε κοινωνίας και δεν αντικατοπτρίζει μια νόσο σταθερή, αλλά εξελισσόμενη ανά τους αιώνες. Υπό αυτό το πρίσμα, η διάγνωση αποτελεί κοινωνικό κατασκεύασμα, συνεπώς ο εκάστοτε ορισμός της νόσου σε διαφορετικές χρονικές περιόδους αντικατοπτρίζει κατηγορίες νοσούντων διακριτές μεταξύ τους, λόγω γλώσσας και πολιτισμικών αλλαγών (385). Το 1852, ο Benedict Morel, εισήγαγε τον όρο *dementia praecox* (πρώιμη άνοια) για να περιγράψει μια ομάδα ασθενών του, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων ήταν ο λήθαργος (*stupor*) τον οποίο συσχέτισε με την εμφάνιση μελαγχολίας. Το 1898, ο Emil Kraepelin, μέσα από το σύγγραμμά του *Compendium der Psychiatrie*, εξέλιξε και διαμόρφωσε την έννοια της *dementia praecox* μέσω των κλινικών του παρατηρήσεων, συμπεραίνοντας πως η νόσος χαρακτηρίζεται από προοδευτική αποδιοργάνωση της προσωπικής ζωής και της βούλησης του ατόμου με κυρίαρχες τις διαταραχές του συναισθήματος (386-388). Τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο πεδίο της έρευνας, εκτός από τις απόψεις του γύρω από το βιολογικό υπόβαθρο των νευροψυχιατρικών διαταραχών, αποτέλεσε η εμπειρική του παρατήρηση στην πορεία της νόσου, χάρη στην οποία κατηγοριοποίησε τους ασθενείς βάσει της πιθανής έκβασης της ασθένειας (388). Το 1911, ο Eugen Bleuler χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο σχιζοφρένεια ή ομάδα σχιζοφρενειών, για τις οποίες θεωρούσε πως πίσω από τα κοινά κλινικά χαρακτηριστικά υποκρύπτονταν περισσότερες από μία συγγενείς νοσολογικές οντότητες που δεν ήταν δυνατόν να διακριθούν με τα επιστημονικά δεδομένα της εποχής (385). Ο Sigmund Freud το 1915 εισήγαγε τον όρο «Narcissistic Neurosis», για να εξηγήσει την εμπειρία της ψύχωσης μέσω της έννοιας του Ασυνείδητου (The Unconscious) (389). Ο Kurt Schneider χαρακτήρισε ορισμένα από τα συμπτώματα της νόσου, διαχωρίζοντάς τα σε συμπτώματα α' και β' τάξης. Τα συμπτώματα α' τάξης περιελάμβαναν μεταξύ άλλων, τις ακουστικές ψευδαισθήσεις και την παραποίηση της πραγματικότητας. Τα επιστημονικά επιτεύγματα που διαμόρφωσαν και συνεχίζουν να εξελίσσουν τη σύγχρονη άποψη γύρω από τις νευροψυχιατρικές διαταραχές, περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη συσχέτιση του γενετικού υποβάθρου με τις ψυχιατρικές νόσους από τον Franz Kallmann, ο οποίος υπογράμμισε το ρόλο της κληρονομικότητας στη σχιζοφρένεια και τη διπολική διαταραχή, την ανάπτυξη των τεχνικών απεικόνισης του εγκεφάλου, καθώς και τη δημιουργία ζωικών μοντέλων, απαραίτητων για τη μελέτη των διαταραχών αυτών (388, 390). Κατά τη διάρκεια των 1960 και 1970 η θεραπεία της σχιζοφρένειας περιελάμβανε μεθόδους περισσότερο ή λιγότερο παρεμβατικές, και εφαρμοζόταν από ιατρούς της εποχής, με μικρή επίγνωση των επιπτώσεων που αυτές θα είχαν στους ασθενείς. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, οι περισσότερες θεραπείες των νευροψυχιατρικών διαταραχών διεξάγονταν σε κρατικά νοσοκομεία ή άσυλα, όπου νοσηλευόταν μεγάλος αριθμός ασθενών. Μια από αυτές

ήταν η υδροθεραπεία, η οποία εφαρμοζόταν κατά τη διάρκεια ενός ψυχωτικού επεισοδίου. Οι ασθενείς τοποθετούνταν σε λουτρό με ζεστό νερό, όπου και παρέμεναν μέχρι το πέρας του επεισοδίου. Μια ακόμη μέθοδος, που αρχικά εφαρμόστηκε από τον Manfred Sakel, καθηγητή ψυχιατρικής στο Πανεπιστήμιο της Βιέννης, ήταν η θεραπεία με υπογλυκαιμικό κώμα (Insulin Shock Therapy), την οποία εμπνεύστηκε από τις παρατηρήσεις του σε ασθενείς με ιστορικό κατάχρησης μορφίνης κατά τη διάρκεια του διαβητικού τους κώματος. Συγκεκριμένα παρατήρησε πως οι ασθενείς ξυπνούσαν από το κώμα χωρίς να έχουν επιθυμία για μορφίνη. Από τις παρατηρήσεις του αυτές συμπέρανε πως επάγοντας σε ασθενείς με σχιζοφρένεια ένα ινσουλινικό σοκ, θα τους προκαλούσε μια υπογλυκαιμική κατάσταση, με αποτέλεσμα μείωση των συμπτωμάτων τους. Η θεραπεία του αυτή, αποτέλεσε διαδικασία ρουτίνας σε περισσότερες από 100 ψυχιατρικές κλινικές στις ΗΠΑ, ιδιαίτερα στις αρχές του 1960. Η ψυχοχειρουργική (Psychosurgery) εισήλθε στο θεραπευτικό προσκήνιο από τον Πορτογάλο νευρολόγο Egas Moniz, ο οποίος περιέγραψε για πρώτη φορά το 1935 το περιστατικό ενός χιμπατζή από τον εγκέφαλο του οποίου είχαν αφαιρεθεί οι πρόσθιοι λοβοί, χαρακτηρίζοντάς τον ως πειθήνιο και πρόθυμο να εκτελέσει εργασίες στις οποίες εναντιωνόταν πριν την λοβοτομή. Ο Moniz, θεωρώντας πως οι ψυχικά ασθενείς εμφανίζουν δυσλειτουργίες στις νευρωνικές συνάψεις των πρόσθιων λοβών τους, διεξήγαγε το πρώτο του «επιτυχημένο» ψυχοχειρουργείο το 1935. Για την συνεισφορά του στην ψυχιατρική, έλαβε το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας/Ιατρικής, το 1949 (385, 391). Το 1950 ο Paul Charpentier ξεκίνησε την έρευνά του γύρω από μια φαινοθειαζίνη, την χλωροπρομαζίνη (θοραζίνη), δραστική ουσία την οποία ανέπτυξε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως αντισταμινικό, κατά των αλλεργιών. Η ουσία αυτή πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον γάλλο χειρουργό Henri Laborit ως ισχυρό αναισθητικό, για τη μείωση των αντιδράσεων του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Κατόπιν των κλινικών δοκιμών της χλωροπρομαζίνης, οι Γάλλοι ψυχίατροι Pierre Deniker και Jean Delay, χορήγησαν το φάρμακο αυτό ως αντιψυχωτικό. Έως το 1954, υπολογίζεται πως η χλωροπρομαζίνη χορηγήθηκε σε 2 εκατομμύρια άτομα στις ΗΠΑ (385, 388). Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, έγινε γνωστό πως ενώ η χλωροπρομαζίνη και παρόμοιες δραστικές ουσίες μπορούσαν να μειώσουν τα θετικά συμπτώματα της νόσου, ταυτόχρονα προκαλούσαν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες.

**Αντιψυχωτικά Φάρμακα: Πρώτης Γενιάς (Τυπικά) και Δεύτερης Γενιάς (Άτυπα)**

Τα πρώτης γενιάς αντιψυχωτικά περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων την αλοπεριδόλη, η οποία δρα κυρίως ως ανταγωνιστής των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 του εγκεφάλου (392, 393). Στη λειτουργία αυτή αποδίδεται η αντιψυχωτική της δράση. Υπολογίζεται πως περίπου το 80% των ασθενών που λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή με τυπικά αντιψυχωτικά επιτυγχάνεται ύφεση των θετικών συμπτωμάτων (394). Καθώς τα τυπικά αντιψυχωτικά φαίνεται να έχουν μεταξύ τους παρόμοια αποτελεσματικότητα, η επιλογή για τη χορήγησή τους γίνεται βάσει του σχετικού προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών τους. Σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν τα εξωπυραμδικά συμπτώματα τα οποία περιλαμβάνουν την οξεία δυστονία, την ακαθισία, τον παρκινσονισμό και την όψιμη δυσκινησία (395). Επιπλέον, είναι πιθανό να προκαλέσουν μεταξύ άλλων, απορρυθμισμό της θερμοκρασίας σώματος και υπερπρολακτιναιμία (392). Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες φαίνεται να εμφανίζονται σε ποσοστό 75-90% των ασθενών που λαμβάνουν τυπικά αντιψυχωτικά και αυξάνονται αναλόγως της δόσολογίας (393, 396). Η κλοζαπίνη, το πρώτο άτυπο αντιψυχωτικό, ανακαλύφθηκε το 1960 αλλά αποσύρθηκε λόγω της ακοκκιοκυτταραιμίας που προκαλεί, για να επανεισαχθεί στην κλινική πράξη κατά το 1990 (397). Κατόπιν της έναρξης της θεραπείας με κλοζαπίνη, κρίνεται απαραίτητος ο εβδομαδιαίος αιματολογικός έλεγχος τις πρώτες 18

εβδομάδες, αλλά και μετέπειτα έλεγχος ανά μήνα για την πρόληψη της ακοκκιοκυτταραιμίας (398). Η χρήση της κλοζαπίνης ενδείκνυται σε ασθενείς με ανθεκτικές μορφές σχιζοφρένειας όταν δύο άλλα αντιψυχωτικά που ελήφθησαν σε ικανή δόση και χρονικό διάστημα τουλάχιστον έξι εβδομάδων το καθένα απέτυχαν να μειώσουν σημαντικά τα θετικά συμπτώματα ή σε περιπτώσεις όπου τα τυπικά αντιψυχωτικά προκάλεσαν σοβαρές εξωπυραμιδικού τύπου ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο όρος «άτυπα αντιψυχωτικά» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία φαρμάκων, εξίσου αποτελεσματικών αλλά με μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων. Τα δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, την ολανζαπίνη, τη ρισπεριδόνη, την κουετιαπίνη, την αριπιπραζόλη και πλέον χρησιμοποιούνται ως πρώτη γραμμής θεραπεία κατά των ψυχωτικών συμπτωμάτων (399, 400). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικών περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων αύξηση σωματικού βάρους (ολανζαπίνη, κλοζαπίνη), πιθανότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη, υπερκορτιζολαιμία, υπόταση, υπερπρολακτιναιμία (ρισπεριδόνη) και ακοκκιοκυτταραιμία (κλοζαπίνη) (392). Οι φαρμακευτικές ουσίες με αντιψυχωτική δράση εμφανίζουν ικανότητα πρόσδεσης σε διάφορων ειδών υποδοχείς του εγκεφάλου, περιλαμβανομένων των ντοπαμινεργικών, μουςκαρινικών χολινεργικών, σεροτονινεργικών, αδρενεργικών και ισταμινικών. In vitro μελέτες των προφίλ πρόσδεσης των αντιψυχωτικών σε ειδικούς υποδοχείς υποδεικνύουν την ικανότητα δράσης των αντιψυχωτικών και σε άλλα συστήματα, εκτός από το ντοπαμινεργικό σύστημα του εγκεφάλου (393).

### **Βιοδείκτες-Προοπτικές**

Βασικό περιορισμό στην έρευνα των νευροψυχιατρικών διαταραχών και συγκεκριμένα της σχιζοφρένειας αποτελεί ο ιδιαίτερα ετερογενής κλινικός φαινότυπος μεταξύ των ασθενών, που αποτελεί εμπόδιο στην εύρεση ξεκάθαρης 1:1 σχέσης μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Η πληθώρα συμπτωμάτων (θετικών, αρνητικών και γνωσιακών) σε συνδυασμό με τη δυσκολία εντοπισμού ενός πιθανού γενετικού υποβάθρου που να διακρίνει τουλάχιστον ένα μέρος του πληθυσμού ασθενών, καθιστούν απαραίτητο τον εντοπισμό πιθανών διαγνωστικών αλλά και θεραπευτικών βιοδεικτών της νόσου (401). Οι διαγνωστικοί βιοδείκτες κατατάσσονται σε ευρύτερες κατηγορίες (trait, state). Στην κατηγορία των «σταθερών» βιοδεικτών (trait biomarkers) θα μπορούσαν να ανήκουν, μεταξύ άλλων, οι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) χαρακτηριστικό των οποίων είναι πως προϋπάρχουν της εκδήλωσης της νόσου, κατά τη διάρκεια των συμπτωμάτων αλλά και κατόπιν της ύφεσής τους. Μια άλλη κατηγορία βιοδεικτών, οι «κατά συνθήκη» βιοδείκτες (state biomarkers) έχουν το χαρακτηριστικό της παροδικότητας. Συγκεκριμένα, διαταράσσονται κατά την εκδήλωση της νόσου αλλά τα επίπεδά τους εξομαλύνονται με την ύφεση των συμπτωμάτων. Ένα παράδειγμα θα μπορούσαν να αποτελούν τα επίπεδα ορμονών, χαρακτηριστικά διαφόρων ασθενειών. Εκτός από τη σημασία των βιοδεικτών στη διάγνωση της σχιζοφρένειας και γενικότερα των νευροψυχιατρικών διαταραχών, επιτακτική είναι επίσης η ανάγκη προσδιορισμού θεραπευτικών βιοδεικτών (treatment biomarkers), οι οποίοι θα συμβάλλουν ιδιαίτερα στην πρόγνωση της φαρμακευτικής απόκρισης των ασθενών. Η ατομική γονιδιακή αρχιτεκτονική σε συνδυασμό με τη γονιδιακή ποικιλομορφία, είναι πολύ πιθανό να επηρεάζουν την απόκριση στα αντιψυχωτικά και να συμβάλλουν στην εμφάνιση παρενεργειών. Τα αντιφατικά ευρήματα φαρμακογονιδιωματικών ερευνών αναφορικά με την απόκριση σε αντιψυχωτικά και τη συσχέτισή τους με την ύπαρξη πολυμορφισμών, ανοίγουν

το δρόμο προς μια θεραπεία που θα στοχεύει στην ύφεση των συμπτωμάτων, την ελαχιστοποίηση όσο το δυνατόν, ανεπιθύμητων ενεργειών καθώς και στη βελτιστοποίηση του τρόπου και της ποιότητας διαβίωσης των ασθενών (397).

## Σκοπός

Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν η διερεύνηση των μοριακών τελεστών της απόκρισης στο στρες στο περιφερικό αίμα ατόμων με Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο (ΠΨΕ) πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την απόκριση στο στρες και τη σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση, καθώς και τα επίπεδα mRNA γονιδίων που διαμεσολαβούν την απόκριση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ). Τα γονίδια αυτά περιλάμβαναν το γονίδιο *NR3C1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), το γονίδιο *NR3C2* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (MR), το γονίδιο *FKBP5* που κωδικοποιεί τη συνοδό πρωτεΐνη του GR, καθώς και το γονίδιο *GILZ* που αποτελεί μεταγραφικό στόχο του GR. Επιπλέον μελετήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 στο περιφερικό αίμα ατόμων με ΠΨΕ και αναλύθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης της νησίδας CpG του υποκινητή του γονιδίου *FKBP5*. Επίσης, με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων mRNA των γονιδίων *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *GILZ*, *BDNF* στον προμετωπιαίο φλοιό μυών, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού σε μύες και η απόκριση στο στρες αξιολογήθηκε με τη βοήθεια συμπεριφορικών δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας Εξαναγκασμένης Κολύμβησης, της δοκιμασίας Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής και της δοκιμασίας Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Συλλογή δειγμάτων Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ) – Μοριακές τεχνικές

48 δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΠΨΕ συλλέχθηκαν σε συνεργασία με την Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και συγκρίθηκαν με 39 δείγματα μάρτυρες. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε συνολικό RNA, DNA και πρωτεΐνες.

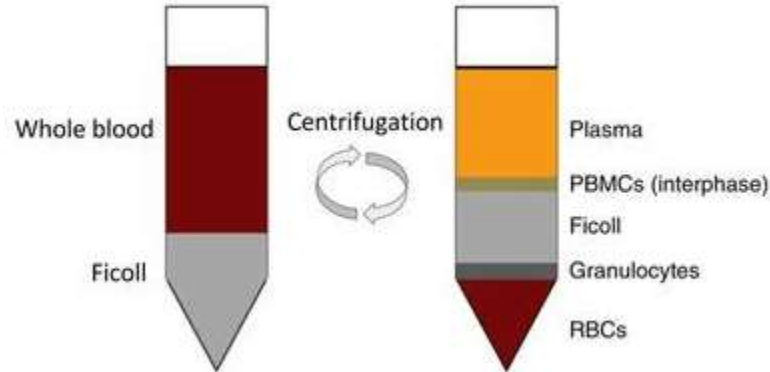
### Απομόνωση συνολικού RNA από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

Η απομόνωση RNA από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος διενεργείται εντός μερικών ορών από την αιμοληψία (φρέσκο αίμα) και σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

- 2 mL περιφερικού αίματος αραιώνονται σε ίσο όγκο (1:1) με PBS



- Το αραιωμένο αίμα (4 mL) επιστοιβάζεται σε 2 mL Ficoll (Lymphosep, Biosera LM-T1702) εντός falcon των 15 mL.
- Το falcon με το δείγμα φυγοκεντρείται για 25' στα 1800 rpm, σε φυγόκεντρο με κινούμενες κεφαλές, χωρίς φρένα, στους 4 °C (συνολικός χρόνος φυγοκέντρωσης: 45').
- Με το πέρας της φυγοκέντρωσης έχουν σχηματιστεί τα κλάσματα του αίματος.



**Εικόνα 12:** Κλάσματα περιφερικού αίματος, κατόπιν φυγοκέντρωσης

- Το πλάσμα απομονώνεται, εισάγεται σε καθαρό falcon και τοποθετείται στον πάγο.
- Από τη μεσόφαση μετακινούνται με πιπέτα του 1 mL τα περιφερικά μονοπύρρηνα και εισάγονται σε καθαρό falcon. Προστίθεται PBS μέχρι τον τελικό όγκο και το δείγμα επαναφυγοκεντρείται στα 1600 rpm για 10' με φρένα, στους 4 °C.
- Τα περιφερικά μονοπύρρηνα σχηματίζουν ίζημα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται. Προστίθεται επιπλέον PBS μέχρι τελικού όγκου και το δείγμα επαναφυγοκεντρείται στα 1400 rpm, για 10', στους 4 °C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το ίζημα επαναιωρείται σε 500  $\mu$ L Nucleozol, (Macherey-Nagel, #740404) και μεταφέρεται σε Eppendorf των 1,5 mL.
- Από το βήμα αυτό και μετά, ακολουθείται βήμα-βήμα η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA με το kit Nucleospin RNA set for Nucleozol (Macherey-Nagel, #740406).
- Προστίθενται 200  $\mu$ L RNase-free H<sub>2</sub>O στο nucleozol, γίνεται vortex για 30'' και το δείγμα επωάζεται για 15' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 20' στα 12000 x g στους 4 °C.
- Μεταφέρονται 600  $\mu$ L υπερκείμενο σε καθαρό Eppendorf.
- Προστίθενται 250  $\mu$ L MX buffer και το δείγμα ομογενοποιείται με vortex.
- Μεταφέρονται 700  $\mu$ L υπερκειμένου σε στήλη και φυγοκεντρώνται για 30'' στα 8000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και προστίθεται το υπόλοιπο υπερκείμενο. Γίνεται φυγοκέντρωση για 30'' στα 8000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε νέο συλλέκτη.
- Προστίθενται 700  $\mu$ L buffer RA3 και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1' στα 8000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και προστίθενται 350  $\mu$ L buffer RA3 και η στήλη φυγοκεντρείται για 2'30'' στα 8000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε καθαρό Eppendorf των 1,5 mL.
- Η στήλη αφήνεται ανοικτή να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.

- Προστίθενται 30  $\mu\text{L}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$  και το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- Η τελική έκλυση γίνεται στα 15000 x g για 1' και το έκλουσμα επαναποθετείται στη στήλη για επανέκλυση. Η αποθήκευση του RNA γίνεται στους  $-80^\circ\text{C}$ .

### **Απομόνωση ολικού DNA από περιφερικό αίμα**

Για την απομόνωση DNA από ολικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, #740951) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

- 200  $\mu\text{L}$  περιφερικό αίμα αναμιγνύονται με 25  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνάση K σε Eppendorf του 1,5 mL. Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  buffer B3 και το δείγμα αναδεύεται με vortex για περίπου 1'.
- Γίνεται επώαση στους  $70^\circ\text{C}$  σε υδατόλουτρο για 30' και πραγματοποιούνται ενδιάμεσα vortex ανά περίπου 5'.
- Προστίθενται 210  $\mu\text{L}$  απόλυτη αιθανόλη και το δείγμα αναδεύεται ξανά με vortex.
- Ο ολικός όγκος διαλύματος μεταφέρεται σε στήλη και φυγοκεντρείται για 1'30'' στα 15000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη εισάγεται σε νέο συλλέκτη.
- Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  buffer BW και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1'30'' στα 11000 x g.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη εισάγεται σε νέο συλλέκτη. Προστίθενται 600  $\mu\text{L}$  buffer B5 και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1'30'' στα 11000 x g.
- Γίνεται μια επιπλέον πλύση με 250  $\mu\text{L}$  buffer B5 και επαναλαμβάνεται η προηγούμενη φυγοκέντρηση.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και το δείγμα επαναφυγοκεντρείται για 1'30'' στα 15000 x g για να απομακρυνθεί εντελώς το buffer.
- Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη εισάγεται σε καθαρό Eppendorf του 1,5 mL.
- Η στήλη αφήνεται να στεγνώσει πλήρως για 5'.
- Στη στήλη προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  προθερμασμένου ( $70^\circ\text{C}$ ) elution buffer και αφήνεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1'30'' στα 15000 x g και το έκλουσμα επαναποθετείται στη στήλη για επανέκλυση.

Η αποθήκευση του DNA γίνεται στους  $-20^\circ\text{C}$  για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### **Μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής.**

Για τη διαδικασία μετατροπής του ολικού RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το kit PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser (Takara, #RR047A). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στον πάγο.

Βήμα 1<sup>ο</sup>: Για τη σύνθεση 500ng ολικού cDNA απαιτείται αρχικά η απομάκρυνση του γενωμικού DNA μέσω της διαδικασίας διαγραφής:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
5X gDNA Eraser Buffer	2
gDNA Eraser	1
total RNA	αναλόγως συγκέντρωσης
RNase Free H <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου
V <sub>tot</sub>	10

Τα δείγματα επωάζονται σε θερμικό κυκλοποιητή για 3' στους 42 °C.

Βήμα 2<sup>ο</sup>: Για τη σύνθεση του cDNA απαιτείται αρχικά η δημιουργία ενός τυφλού δείγματος ελέγχου που δεν περιέχει αντίστροφη μεταγραφάση (noRT) και έπειτα ένα mastermix που μοιράζεται ισόποσα στα δείγματα ενδιαφέροντος. Το mastermix μοιράζεται ισόποσα στην αντίδραση κάθε δείγματος από το Βήμα 1.

Αντιδραστήριο	noRT Όγκος (μL)	Mastermix δειγμάτων Όγκος (μL)
Αντίδραση από το Βήμα 1	10	10
5X PrimeScript Buffer 2	4	4
PrimeScript RT Enzyme Mix I	-	1
RT Primer Mix	1	1
RNase Free H <sub>2</sub> O	5	4
V <sub>tot</sub>	20	20

Τα δείγματα επωάζονται σε θερμικό κυκλοποιητή στο παρακάτω πρόγραμμα:

42 °C, 20'

85 °C, 2'

4 °C

Η συντήρηση των cDNA γίνεται στους -20 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) και του θερμοανθεκτικού ενζύμου Taq πολυμεράση, ενισχύεται η αλληλουχία ενός γονιδίου που βρίσκεται μεταξύ των αλληλουχιών πρόσδεσης των εκκινητών. Το αρχικό υλικό για τη διεξαγωγή της αντίδρασης είναι ένα δείγμα cDNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Για το λόγο αυτό, χρειάζεται θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία κοντά στο σημείο βρασμού, για να προκύψει μονόκλωνο

DNA. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές υβριδοποιούνται ειδικά στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στο 3' άκρο κάθε κλώνου-στόχου. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί τους εκκινητές αυτούς για να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων κλώνων με κατεύθυνση 5' → 3'. Οι εκκινητές επιλέγονται έτσι ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που επιθυμείται για ενίσχυση. Η διαδικασία ξεκινάει με θέρμανση του μίγματος στους 94–96 °C ή στους 98 °C στην περίπτωση χρήσης πολύ θερμοσταθερής πολυμεράσης και έχει διάρκεια 1-9', ώστε όλα τα δίκλιωνα μόρια να αποδιαταχθούν και να γίνουν μονόκλιωνα. Στο πρώτο βήμα του κύκλου (denaturation step), όπου η θερμοκρασία πλησιάζει το σημείο βρασμού (94-98 °C για 20-30''), προκαλείται θραύση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των κλώνων του DNA. Στο δεύτερο βήμα (annealing step), η θερμοκρασία χαμηλώνει (50-65 °C για 20-40'') και επιτρέπει την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών στις αλληλουχίες-στόχους (μία σε κάθε κλώνο) που περιβάλλουν την προς ενίσχυση περιοχή. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα εξαρτάται από το Tm των εκκινητών σύμφωνα με την σύνθεσή τους. Στο τρίτο βήμα του κύκλου (extension step) η θερμοκρασία εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση και θα πρέπει να είναι η κατάλληλη (συνήθως 72-75 °C) ώστε να γίνει η σύνθεση του θυγατρικού κλώνου. Οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι εκτείνονται πέραν της θέσης πρόσδεσης του εκκινητή στον άλλο κλώνο και τα μήκη τους διαφέρουν, αναλόγως του που θα σταματήσει η πολυμεράση τη σύνθεση. Σε κάθε επόμενο κύκλο, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, αλλά το μήκος των προϊόντων περιορίζεται, λόγω πρόσδεσης των εκκινητών, ενισχύοντας έτσι μόνο την επιθυμητή αλληλουχία. Ο αριθμός των κύκλων μεταβάλλεται αναλόγως του γονιδίου που μελετάται και του χρόνου έκφρασής του κατά τον κυτταρικό κύκλο. Ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων (n) ο αριθμός των δίκλωνων μορίων στο μίγμα μετά το πέρας της αντίδρασης μπορεί να φτάσει θεωρητικά τα 2<sup>n</sup> δίκλιωνα μόρια. Το επόμενο βήμα (final elongation) ακολουθεί τον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης, γίνεται σε θερμοκρασία 70-74 °C και κατά τη διάρκειά του (5-15') επιμηκύνονται τα εναπομείναντα μονόκλιωνα μόρια DNA. Στο τελευταίο βήμα η θερμοκρασία πέφτει (συνήθως 4 °C) και το προϊόν της αντίδρασης διατηρείται. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα εντός θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Για την επιτυχή διεξαγωγή της PCR απαιτείται ρύθμιση παραμέτρων όπως η επιλογή κατάλληλων εκκινητών, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο και η χρονική διάρκεια κάθε βήματος. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS (#KK 1039, #KK1015) και τα dNTPs ήταν της εταιρίας Invitrogen (#10297-018). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 1.6% σε τάση 50 Volts και η χρώση έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακών βαρών των 100 bp της εταιρίας Invitrogen (#15628-019). Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η αγαρόζη αποτελεί ένα πολυμερές, το οποίο τήκεται σε διάλυμα αλάτων με αύξηση της θερμοκρασίας και όταν πήζει σχηματίζει πήκτωμα. Οι πόροι του πλέγματος στο πήκτωμα έχουν μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης σε αγαρόζη. Το πήκτωμα, το οποίο φέρει στο επάνω μέρος του ειδικά πηγαδάκια για φόρτωση του DNA τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και εμβαπτίζεται σε διάλυμα αλάτων (TBE 1x). Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από την επίδραση ενός αρνητικού ηλεκτροδίου στο επάνω μέρος του πηκτώματος και ενός θετικού στο κάτω μέρος. Η κίνηση των μορίων DNA εντός του πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος, το φορτίο και το σχήμα τους. Όσο μικρότερο σε μέγεθος είναι ένα μόριο DNA, τόσο πιο γρήγορα θα μετακινηθεί προς τον θετικό πόλο.

Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού 5-HTTLPR του γονιδίου *SLC6A4* η επιθυμητή αλληλουχία ενισχύθηκε με συμβατική PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τις

αλληλουχίες Forward: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3' και Reverse: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια για την παρασκευή mastermix, το οποίο μετέπειτα μοιράστηκε στα δείγματα DNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Buffer C Kapa	10
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3
dNTPs 25 mM	0,4
Primers F', R' 20 μM	1
Kapa taq polymerase	0,2
H <sub>2</sub> O	33,9
V <sub>tot</sub>	50

Το πρόγραμμα ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

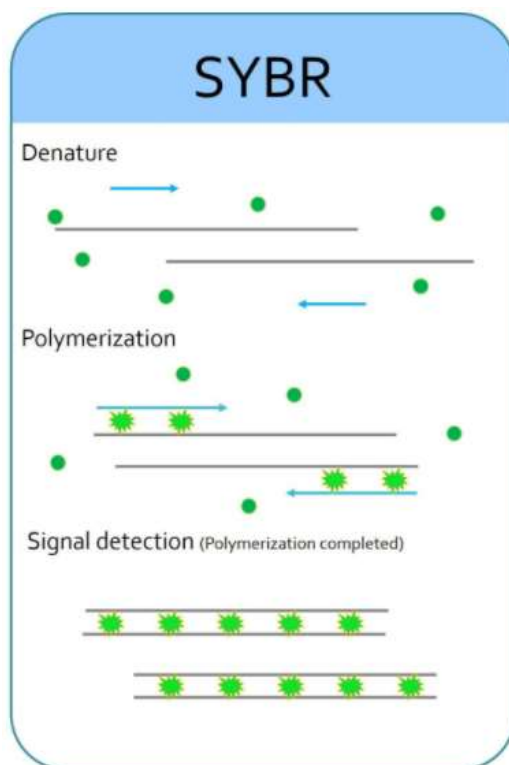


Η αντίδραση ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αραρόζης 3%, στα 50 volts. Από την ενίσχυση προκύπτουν δύο αλληλόμορφα μεγέθους 529bp και 486bp.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) με τις τεχνολογίες SYBRgreen και TaqMan assay

#### SYBRgreen

Η RT-qPCR για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων γονιδίων ενδιαφέροντος που βασίζεται στην τεχνολογία SYBR green, επίσης αξιοποιεί τη χρήση ειδικών αλληλουχιών εκκινητών που είναι συμπληρωματικοί των γονιδίων ενδιαφέροντος. Στην παρούσα τεχνική, η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ταυτοποιείται κατά τον πολλαπλασιασμό του σε πραγματικό χρόνο, μέσω του φθορισμού της ειδικής χρωστικής SYBRgreen, ο οποίος εκπέμπεται αποκλειστικά μετά την πρόσδεση της χρωστικής σε δίκλιωνα μόρια DNA, αλλά όχι σε μονόκλιωνα. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αντιστοιχεί στα νεοσυντιθέμενα μόρια που προκύπτουν από τους κύκλους αντίδρασης, ενώ η ποσοτικοποίηση γίνεται κατά τους κύκλους πολλαπλασιασμού του προϊόντος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη μέθοδο 2<sup>-ΔCt</sup>.



**Εικόνα 13:** Κατά την εκκίνηση της αντίδρασης η χρωστική εντοπίζεται ελεύθερη στο μίγμα αντιδραστηρίων. Με την έναρξη του πολυμερισμού, η χρωστική προσδένεται στους νεοσυντιθέμενους κλώνους του DNA και εκπέμπει φθορισμό. Το εκπεμπόμενο σήμα ανιχνεύεται με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού (*smobio.com*).

Για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος στους ασθενείς με ΠΨΕ και στους ιστούς εγκεφάλου των πειραματοζώων που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αλληλουχίες ειδικών ανιχνευτών:

Γονίδιο Ενδιαφέροντος	Αλληλουχία Forward (Eurofins)	Αλληλουχία Reverse (Eurofins)	Προϊόν (bp)
<i>18s rRNA</i> (h-m)	GCTGCTGGACCAGACTT	CGGCTACCACATCCAAGG	90
<i>GAPDH</i> (h)	GTGGTCTCCTCTGACTTC AACA	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC	134
<i>Actin</i> (h-m)	TTGCTGACAGGATGCAGA AG	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	141
<i>NR3C1</i> (h-m)	TGAAATGGGCAAAGGCG ATACC	GGTCATACATGCAGGGTAGA GT	201
<i>NR3C2</i> (h-m)	TGGCAGAGGTTCTACCAA CTGAC	GCAGCTGGTCGCTGATGATC TC	154

<i>FKBP5</i> (h)	GGAGAACCAAACGGAAA GGAG	CACAGTGAATGCCACATCTC TG	122
<i>FKBP5</i> (m)	GAAGCCGGGAAGCCTAA GTT	CGTGTACTTGCCTCCCTTGA	177
<i>GILZ/TSC22D3</i> (h-m)	CAAGATTGAGCAGGCCAT GGA	TGGCTCTTCAGGGCTCAGC	199
<i>BDNF</i> (h-m)	TGAGTCTCCAGGACAGCA AAGC	GTGGACGTTTACTTCTTTCAT GG	131

Κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε βάσει του εξής πρωτοκόλλου:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
MasterMix SYBRgreen (Kapa #KK4601)	5
Forward primer (20 μM)	0,2
Reverse primer (20 μM)	0,2
Template	1 (1:4)
H <sub>2</sub> O	3,6
V <sub>tot</sub>	10

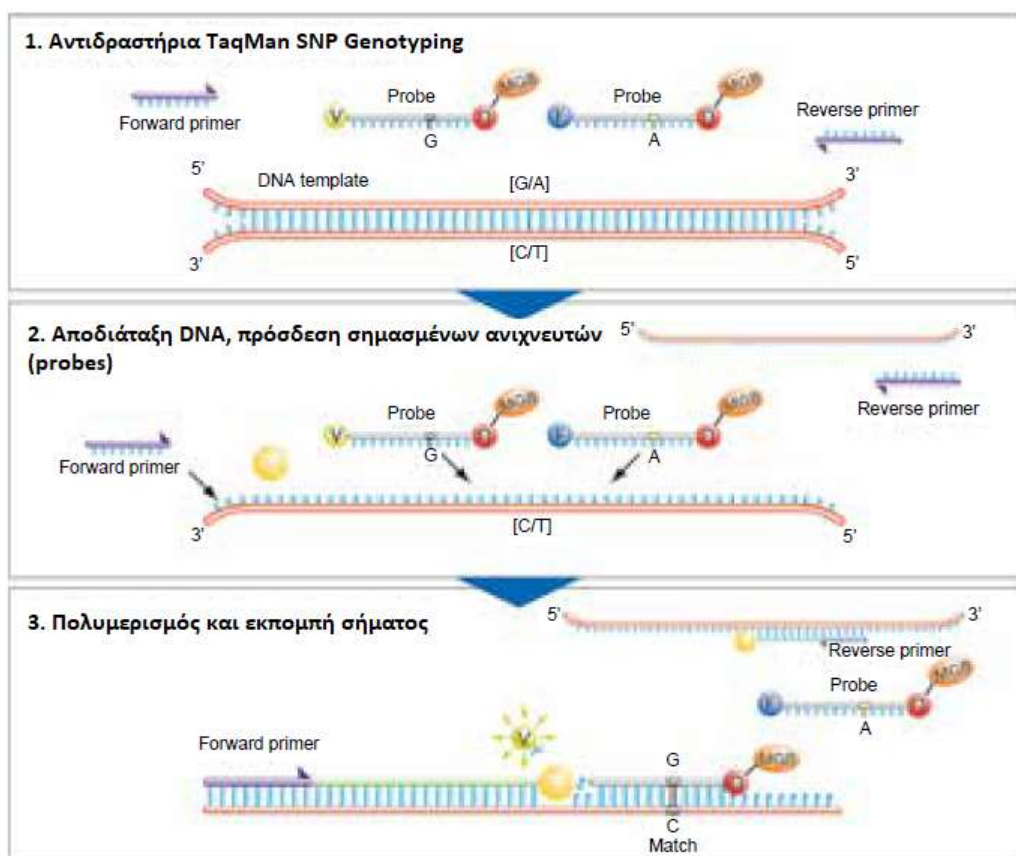
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- 1) 95 °C/3'
  - 2) 95 °C/10''
  - 3) 60 °C/1', +plate read
  - 4) Go to '2', 39 more times
  - 5) Melt Curve 55-95 °C/5'', +plate read
  - 6) 4 °C/10'
- END

#### TaqMan assay

Για τη διεξαγωγή αντιδράσεων του παραπάνω τύπου, χρησιμοποιούνται αλληλουχίες εκκινητών ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου, καθώς και ειδικά σημασμένοι ανιχνευτές (probes), συμπληρωματικοί κάθε αλληλομόρφου ενός πολυμορφισμού του ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP). Κάθε ανιχνευτής φέρει μια χρωστική στο 5' άκρο του. Συγκεκριμένα, τα δύο αλληλομόρφα ενός ετερόζυγου SNP αναγνωρίζονται από δύο ανιχνευτές, καθένας εκ των οποίων φέρει τη δική του φθορίζουσα χρωστική (V, F

fluorescent dyes). Οι σημασμένοι ανιχνευτές που είναι συμπληρωματικοί των SNPs που πιθανά εντοπίζονται σε κάθε αλυσίδα του μορίου DNA, φέρουν στο 3' άκρο τους ένα μόριο MBG (minor binding groove). Το μόριο αυτό βοηθά στη σταθεροποίηση του συμπλόκου ανιχνευτή-συμπληρωματικής αλυσίδας DNA, μέσω της πρόσδεσής του στη μικρή αύλακα της έλικας του DNA. Για την ταυτοποίηση κάθε αλληλομόρφου, αξιοποιείται η δράση της 5' → 3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης. Συγκεκριμένα, η επιτυχής σύζευξη σημασμένου ανιχνευτή-αλληλουχίας στόχου και ο πολλαπλασιασμός τους με τη βοήθεια των ειδικών εκκινήτων, οδηγεί στην πέψη του μορίου χρωστικής που αντιστοιχεί στον κάθε ανιχνευτή. Ο θερμικός κυκλοποιητής κατά τη διάρκεια της RT-PCR αντίδρασης ανιχνεύει τον εκπεμπόμενο φθορισμό από κάθε χρωστική που έχει υποστεί πέψη και ταυτοποιεί βάσει αυτής, τα αλληλόμορφα του πολυμορφισμού ενδιαφέροντος.



**Εικόνα 14:** Γονοτύπηση πολυμορφισμών με χρήση σημασμένων ανιχνευτών (*probes*) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (πηγή: Applied Biosystems, *TaqMan Assays product bulletin*).

Για τη γονοτύπηση των αλληλομόρφων rs1360780 και rs3800373 του γονιδίου *FKBP5* χρησιμοποιήθηκαν τα Taqman assays της Applied Biosystems (#4351379) με κωδικούς C\_8852038\_10 και C\_27489960\_10 αντίστοιχα καθώς και το κατάλληλο mastermix (#4371353).

Κάθε αντίδραση προετοιμάστηκε ως εξής:

**Αντιδραστήριο**

**Όγκος (μL)**

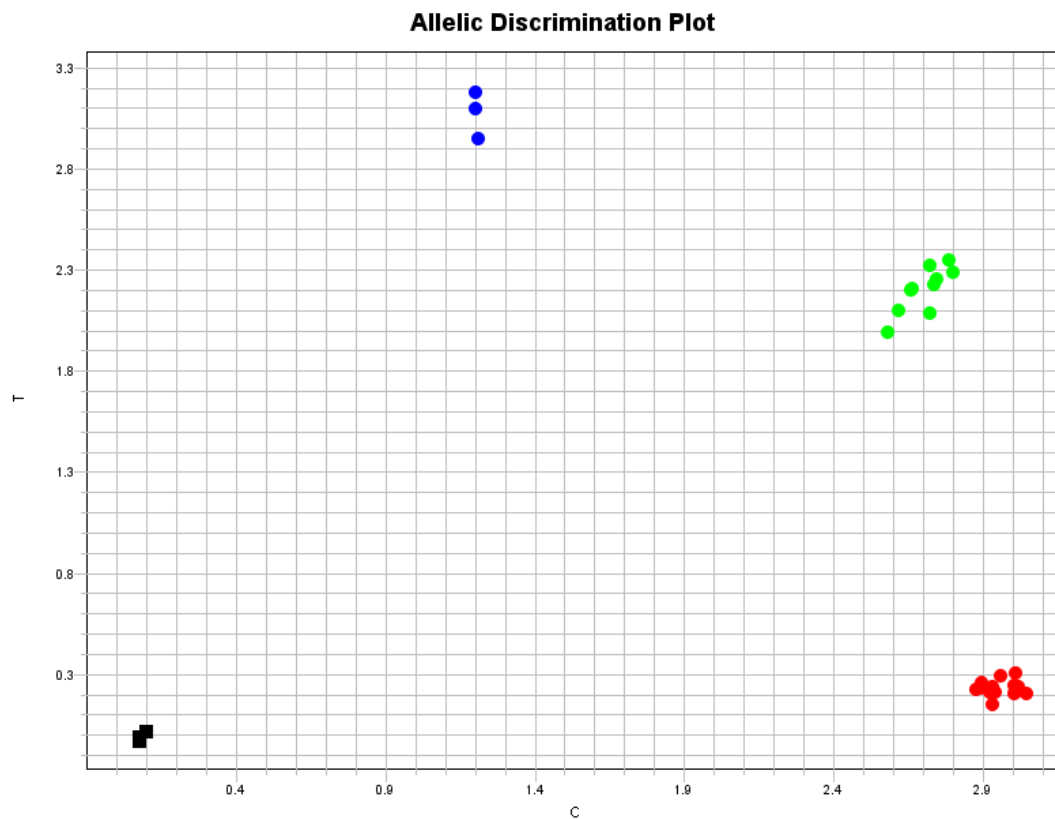


TaqMan mastermix	5
Assay 20x	0,5
Template (5 ng/ $\mu$ L)	2
H <sub>2</sub> O	2,5
V <sub>tot</sub>	10

60 °C/30", data collection ON  
 95 °C/10", data collection OFF  
 95 °C/15", data collection OFF  
 60 °C/1", data collection ON  
 60 °C/30", data collection ON

} x 40

Μετά το πέρας της αντίδρασης ο αλγόριθμος του λογισμικού StepOne Software v2.3 διαχωρίζει τα αλληλόμορφα κάθε δείγματος σε διάγραμμα x-y της παρακάτω μορφής:



**Εικόνα 15:** Παράδειγμα αποτελεσμάτων γονοτύπησης του πολυμορφισμού rs1360780. Στον άξονα x κατανέμονται τα δείγματα που φέρουν το αλληλόμορφο C (κόκκινο), ενώ στον άξονα y κατανέμονται τα δείγματα που φέρουν το αλληλόμορφο T (μπλε). Μεταξύ των δύο αξόνων (πράσινο) εντοπίζονται τα ετερόζυγα δείγματα.

## Ανοσοαποτύπωση κατά Western

### Bradford Assay

- Το πρώτο βήμα για το Bradford assay είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιείται εκχύλισμα αλβουμίνης από ορό βοοειδών. (BSA 1 mg/mL σε PBS).
- Το φωτόμετρο ρυθμίζεται στα 595nm και προετοιμάζονται αραιώσεις των 5, 10, 15, 20, 30μg BSA σε τελικό όγκο 50μL.
- Προστίθενται 950μL αντιδραστηρίου Bradford και τα δείγματα αναμιγνύονται με vortex.
- Κάθε δείγμα μετράται στα 595nm και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων.
- Από τα δείγματα ΠΨΕ χρησιμοποιούνται 3-5μL κάθε δείγματος. Προστίθενται 950μL αντιδραστηρίου Bradford και γίνεται η φωτομέτρηση.
- Η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε πρωτεΐνες προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται παραπάνω.

### Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 2-70 kDa χρησιμοποιείται πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% (separating gel).

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH <sub>2</sub> O	7.9 ml
1.5 Tris 8.8	5 ml
10% SDS	200 μl
30% Acrylamide	6.7 ml
10% APS	200 μl
TEMED	8 μl

Για το stacking gel χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH <sub>2</sub> O	4.1 ml
1M Tris 6.8	750 μl
10% SDS	60 μl
30% Acrylamide	1 ml

10% APS	60 μl
TEMED	6 μl

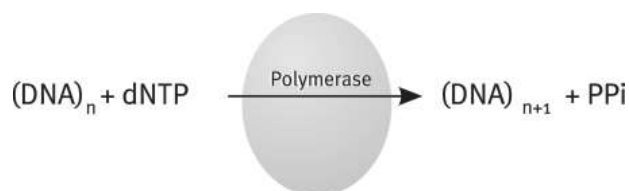
Αφού γίνει η φόρτωση των δειγμάτων πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 120 V, όσο οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο stacking gel και μετά στα 180 V για 45'. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γίνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την προετοιμασία του transfer buffer χρειάζονται:

Αντιδραστήρια	Όγκος
ddH <sub>2</sub> O	800 ml
Tris	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200 ml

Η μεταφορά γίνεται σε σταθερή τάση 30 V όλη τη νύχτα ή δύο ώρες σε ψυχρό περιβάλλον με σταθερό ρεύμα στα 400 mA. Μετά το τέλος της μεταφοράς πρωτεϊνών, η μεμβράνη χρωματίζεται με ronseau για τον έλεγχο της μεταφοράς. Για να απομακρυνθεί το ronseau χρησιμοποιείται TBST 0,1 %. Στη συνέχεια, προστίθεται στη μεμβράνη γάλα 5 % (5 mL) διαλυμένο σε TBST και η μεμβράνη επώάζεται για μια ώρα. Προστίθενται τα κατάλληλα αντισώματα και οι μεμβράνες επώάζονται όλη τη νύχτα. Την επόμενη ημέρα το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα συλλέγεται και πραγματοποιούνται τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με 10 mL TBST. Για την προσθήκη του 2<sup>ου</sup> αντισώματος, ετοιμάζουμε το αντίσωμα σε αραιώση 1:5000 και πραγματοποιούμε επώαση μιας ώρας. Για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης FKBP5 στα δείγματα με ΠΨΕ χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα D-4 sc-271547 της εταιρίας SantaCruz. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις δεκάλεπτες πλύσεις και η μεμβράνη είναι έτοιμη για εμφάνιση.

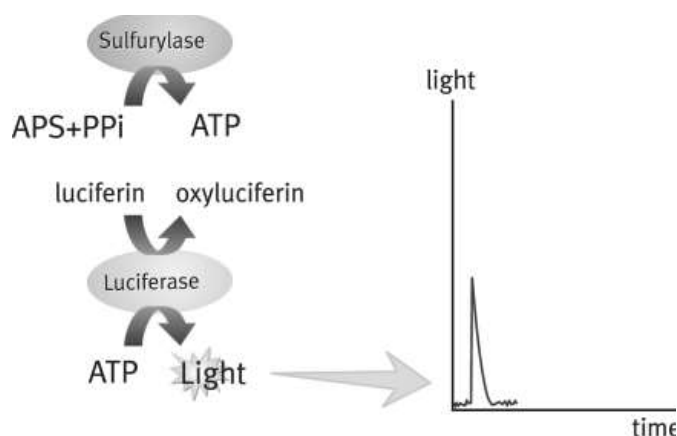
### Πυροαλληλούχιση-Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης

Η τεχνολογία της πυροαλληλούχισης χρησιμοποιεί αλληλούχιση μέσω σύνθεσης για την ακριβή και ποσοτική ανάλυση αλληλουχιών του DNA. Αρχικά, ένας εκκινητής αλληλούχισης υβριδίζεται σε μια μήτρα μονόκλωνου DNA ενισχυμένου με PCR. Η μήτρα επώάζεται με ένζυμα και υποστρώματα. Το πρώτο από τα τέσσερα νουκλεοτίδια προστίθεται στην αντίδραση. Εάν το νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό στη βάση στον κλώνο της μήτρας, αυτό θα ενσωματωθεί στον κλώνο DNA από την πολυμεράση. Κάθε συμβάν ενσωμάτωσης συνοδεύεται από την απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) σε ισομοριακή ποσότητα με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται.



**Εικόνα 16:** Αντίδραση πολυμερισμού και απελευθέρωση πυροφωσφορικού.

Η ATP σουλφυριλάση μετατρέπει ποσοτικά το PPi σε ATP υπό την παρουσία 5' φωσφοθεικής αδενοσίνης. Αυτό ενεργοποιεί τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη από τη λουσιφεράση, παράγοντας ορατό φως σε ποσότητες ανάλογες προς την ποσότητα της ATP. Το φως ανιχνεύεται με τη χρήση συζευγμένων με το φορτίο στοιχείων και εμφανίζεται ως μια κορυφή στο πυρόγραμμα. Κάθε φωτεινό σήμα είναι ανάλογο προς τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται.



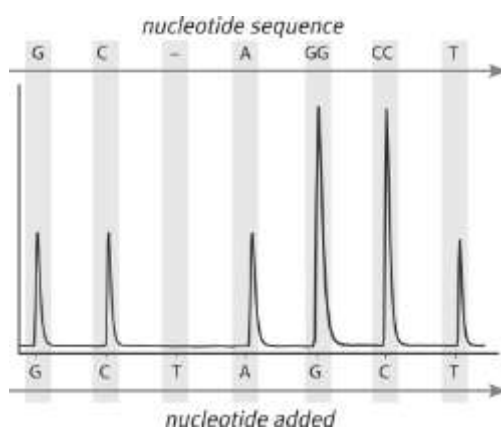
**Εικόνα 17:** Ανίχνευση φωτός και δημιουργία κορυφής στο πυρόγραμμα.

Η απυράση, ένα ένζυμο αποικοδόμησης των νουκλεοτιδίων, αποικοδομεί συνεχώς τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και την ATP. Όταν ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση, προστίθεται άλλο ένα νουκλεοτίδιο.



**Εικόνα 18:** Διαδικασία αποικοδόμησης μέσω της απυράσης.

Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα κάθε φορά. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, δημιουργείται η συμπληρωματική αλληλουχία και η αλληλουχία νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται από την κορυφή στο πυρόγραμμα.

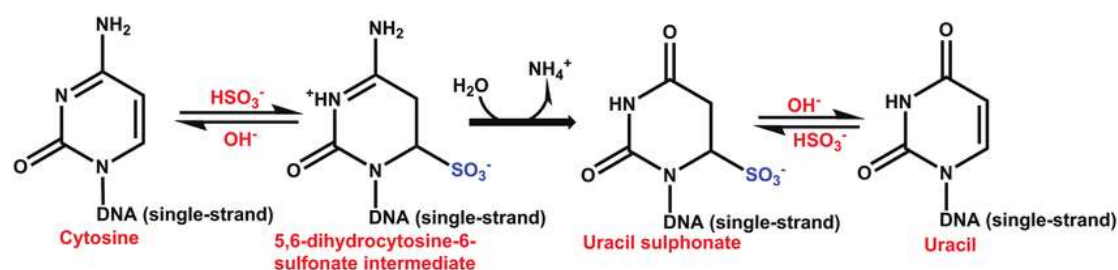


**Εικόνα 19:** Η αναγνώριση των νουκλεοτιδίων στο πυρόγραμμα.

Δισουλφιδική μετατροπή των δειγμάτων ΠΨΕ

Χρησιμοποιείται το EpiTect Bisulfite Conversion Kit (#59104). Για τη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες μέσω αποσουλφονιλώσης, τοποθετούνται 85  $\mu\text{L}$  bisulfite mix και 35  $\mu\text{L}$  DNA protect buffer σε κάθε δείγμα. Το DNA protect buffer γίνεται μπλε κατά το πιπετάρισμα. Ακολουθεί επώαση 5 ωρών σε θερμικό κυκλοποιητή βάσει του παρακάτω πρωτοκόλλου:

Βήμα	Χρόνος (λεπτά)	Θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{C}$ )
Αποδιάταξη	5	95
Επώαση	25	60
Αποδιάταξη	5	95
Επώαση	85	60
Αποδιάταξη	5	95
Επώαση	175	60
Τέλος	-	20



**Εικόνα 20:** Μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες.

Μετά το πέρας της επώασης το διάλυμα μεταφέρεται σε Eppendorf του 1,5 mL, κατόπιν καλής ανάδευσης.

- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 560  $\mu\text{L}$  BL buffer & carrier και τα δείγματα μεταφέρονται σε στήλες.
- Γίνεται φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1' και το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  BW buffer και τα δείγματα επαναφυγοκεντρώνται σε μέγιστη ταχύτητα για 1'. Το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προστίθεται το BD buffer για την αποσουλφονυλίωση και τα δείγματα επωάζονται για 15' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στη μέγιστη ταχύτητα για 1' και το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  BW buffer, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στη μέγιστη ταχύτητα για 1' και το έκλουσμα απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμη.
- Γίνεται μια επιπλέον φυγοκέντρηση για στέγνωμα της στήλης.
- Ακολουθεί στέγνωμα σε heat block, 5' στους 56 °C.
- Η τελική έκλουση γίνεται σε όγκο 50  $\mu\text{L}$  EB.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *FKBP5* στα δείγματα που έχουν υποστεί δισουλφιδική μετατροπή (bisulfite conversion).

Χρησιμοποιείται το kit Qiagen Pyromark Kit (#9787703 & #978705)

Αντιδραστήριο	Όγκος ( $\mu\text{L}$ )
Pyromark PCR mastermix 2x	12,5
Coral load	2,5
Q solution	4
Primers	1,2
RNase (-) H <sub>2</sub> O	2,4

#### Πρωτόκολλο Touchdown PCR

95 °C/15'	94 °C/30''	49 °C/30''
94 °C/30''	52 °C/30''	72 °C/40''
56 °C/30''	72 °C/40''	Go to step 18, 6x
72 °C/40''	Go to step 10, 6x	94 °C/30''
Go to step 2, 6x	94 °C/30''	48 °C/30''
94 °C/30''	50 °C/30''	72 °C/40''
54 °C/30''	72 °C/40''	Go to step 22, 15x
72 °C/40''	Go to step 14, 6x	72 °C/10'

Go to step 6, 6x	94 °C/30''	12 °C/for ever
------------------	------------	----------------

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, στα 90 V.

Πρωτόκολλο πυροαλληλούχισης:

<b>Αντιδραστήρια</b>	Ένζυμα	119 $\mu$ L
	Υπόστρωμα	119 $\mu$ L
<b>Νουκλεοτίδια</b>	A: 94 $\mu$ L	G: 147 $\mu$ L
	C: 108 $\mu$ L	T: 170 $\mu$ L

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος (<math>\mu</math>L)</b>
PCR product	20
Binding buffer	40
Sepharose Beads	2
H <sub>2</sub> O	18
V <sub>tot</sub>	80

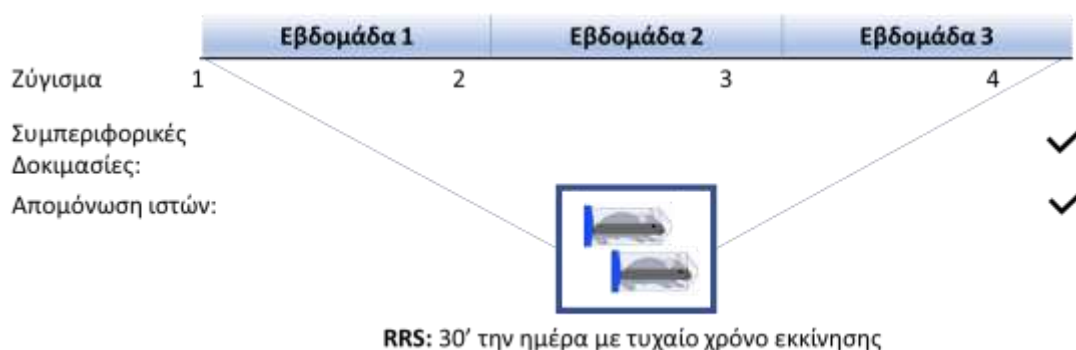
Κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 25  $\mu$ L και ακολουθεί η πυροαλληλούχιση.

### **Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες**

Πειραματικό πρωτόκολλο

16 αρσενικοί μύες του στελέχους C57BL/6, 4 μηνών χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του απρόβλεπτου επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού (Repeated Restraint Stress, RRS). Συγκεκριμένα 9 μύες αποτέλεσαν το δείγμα ενδιαφέροντος που υπέστη στρες (RRS) και 7 μύες αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου (Control, C) και διέμειναν σε φυσιολογικές συνθήκες. Ο περιορισμός διήρκησε 22 ημέρες και περιλάμβανε την εισαγωγή των μυών σε falcon των 50 mL και την ακινητοποίησή τους εκεί επί μισή ώρα κάθε ημέρα. Μετά το πέρας της δοκιμασίας, οι μύες επιστρέφονται στα κλουβιά τους όπου παραμένουν μέχρι την επόμενη. Στο τέλος κάθε εβδομάδας οι μύες ζυγίζονταν, ενώ μια μέρα μετά τον τερματισμό του RRS τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στις συμπεριφορικές δοκιμασίες. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε μια διαδικασία συμπεριφορικών τεστ που περιλάμβαναν τη δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης (Forced Swim Test, FST), τη δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης και Αποφυγής (Social Preference/Avoidance Test, SPAT) και τη δοκιμασία Σκοτεινού-Φωτεινού Πεδίου (Dark/Light Box, DaLi). Μετά το πέρας των διαδικασιών αυτών, τα πειραματόζωα υπέστησαν ευθανασία και απομονώθηκαν περιοχές του εγκεφάλου,

για περαιτέρω επεξεργασία, συμπεριλαμβανομένου του προμετωπιαίου φλοιού. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  Nucleozol και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που αναγράφεται παραπάνω.



**Εικόνα 21:** Χρονοδιάγραμμα της διαδικασίας RRS. Το ζύγισμα των πειραματοζώων έλαβε χώρα σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές, ενώ οι συμπεριφορικές δοκιμασίες και η απομόνωση εγκεφαλικών ιστών έγιναν μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου.

Οι χρόνοι περιορισμού για κάθε ημέρα προσδιορίστηκαν μέσω της χρήσης μιας γεννήτριας τυχαίων αριθμών (<https://www.random.org/clock-times/>) και ήταν οι παρακάτω:

Ημέρα 1: 11:05	Ημέρα 7: 11:10	Ημέρα 13: 15:30	Ημέρα 19: 11:50
Ημέρα 2: 12:45	Ημέρα 8: 11:30	Ημέρα 14: 14:20	Ημέρα 20: 09:30
Ημέρα 3: 16:08	Ημέρα 9: 16:50	Ημέρα 15: 12:00	Ημέρα 21: 14:20
Ημέρα 4: 10:00	Ημέρα 10: 17:00	Ημέρα 16: 14:45	Ημέρα 22: 11:05
Ημέρα 5: 15:50	Ημέρα 11: 15:15	Ημέρα 17: 10:10	
Ημέρα 6: 15:40	Ημέρα 12: 13:10	Ημέρα 18: 12:15	

Την 23<sup>η</sup> ημέρα διενεργήθηκαν τα συμπεριφορικά τεστ και την 24<sup>η</sup> ημέρα έγινε η απομόνωση εγκεφαλικών ιστών των πειραματοζώων.

#### Συμπεριφορικές δοκιμασίες

- Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης

Για τη διεξαγωγή της διαδικασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης, κάθε μυς τοποθετείται σε γυάλινο κύλινδρο ύψους 23,5 cm και διαμέτρου 11 cm. Το δοχείο περιέχει νερό σε ύψος περίπου 15 cm, έτσι ώστε το πειραματόζωο να μην μπορεί να αγγίξει τον πάτο του κυλίνδρου με τα πόδια ή την ουρά του. Η συμπεριφορά κάθε πειραματοζώου παρακολουθείται για 6' και καταγράφεται ο χρόνος που ο μυς κινείται (time struggling), ο χρόνος που ο μυς κολυμπάει ενεργά (time swimming), ο χρόνος που ο μυς επιπλέει (time floating) και ο χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι το πρώτο συμβάν ακινησίας (latency floating). Συνολικά, ο χρόνος που το πειραματόζωο παραμένει ακίνητο και απλά επιπλέει χωρίς να κολυμπάει χαρακτηρίζει το ποσοστό της σχετικής με την κατάθλιψη συμπεριφοράς που παρουσιάζει ο μυς (402).



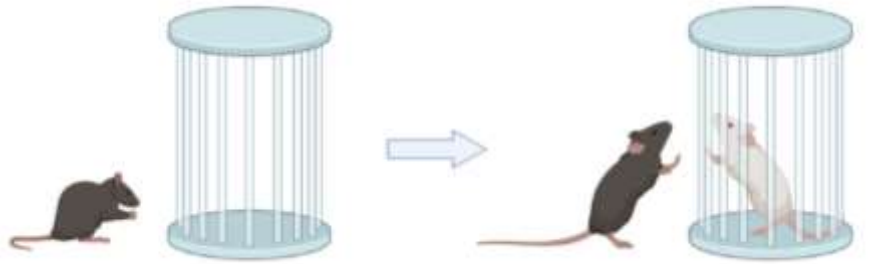


Created in BioRender.com

**Εικόνα 22:** Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης.

- Δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής

Η δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής αρχικά σχεδιάστηκε με σκοπό τη μελέτη της συμπεριφοράς σε μύες κι έπειτα σε αρουραίους. Ο υπό μελέτη μυς τοποθετείται σε ένα νέο περιβάλλον με χαμηλό φωτισμό (5 lux) που περιέχει έναν άδειο κύλινδρο για 150''. Έπειτα, στον κύλινδρο εισάγεται ένας ακόμη μυς που αποτελεί το κοινωνικό ερέθισμα για μελέτη της συμπεριφοράς και οι δυο μύες αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για ακόμη 150''. Η αυξημένη διερεύνηση του έγκλειστου μυ, σε σχέση με το χρόνο διερεύνησης του άδειου κυλίνδρου, αποτελεί δείκτη κοινωνικής προτίμησης και αναμένεται ως ο φυσιολογικός φαινότυπος για τα υπό μελέτη πειραματόζωα. Αντιθέτως, ο μειωμένος χρόνος αλληλεπίδρασης αντικατοπτρίζει την κοινωνική αποφυγή και πιθανά τον αυξημένο κοινωνικό φόβο (403, 404). Τα χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς του πειραματόζωου που μελετώνται περιλαμβάνουν το ποσοστό του αριθμού των κοινωνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μυών (% # time interactions social), το ποσοστό του χρόνου της κοινωνικής αλληλεπίδρασης (% time interactions social), το χρόνο που ο υπό μελέτη μυς διερευνά τον άδειο κύλινδρο (time interactions non-social), το χρόνο που ο υπό μελέτη μυς αλληλεπιδρά με τον έγκλειστο μυ (time interactions social), καθώς και το συνολικό χρόνο αλληλεπίδρασης μεταξύ του μυ και του κυλίνδρου (total time interactions). Το ποσοστό του χρόνου της κοινωνικής αλληλεπίδρασης αποτελεί τη μέτρηση της προτίμησης/αποφυγής του κοινωνικού ερεθίσματος και υπολογίζει το χρόνο που το πειραματόζωο αλληλεπιδρά με τον έγκλειστο μυ σε σχέση με το χρόνο που περνά για την εξερεύνηση του κενού κυλίνδρου. Ο συνολικός χρόνος αλληλεπίδρασης αποτελεί το χρόνο που το πειραματόζωο εξερευνά τον κύλινδρο με ή χωρίς τον έγκλειστο μυ.

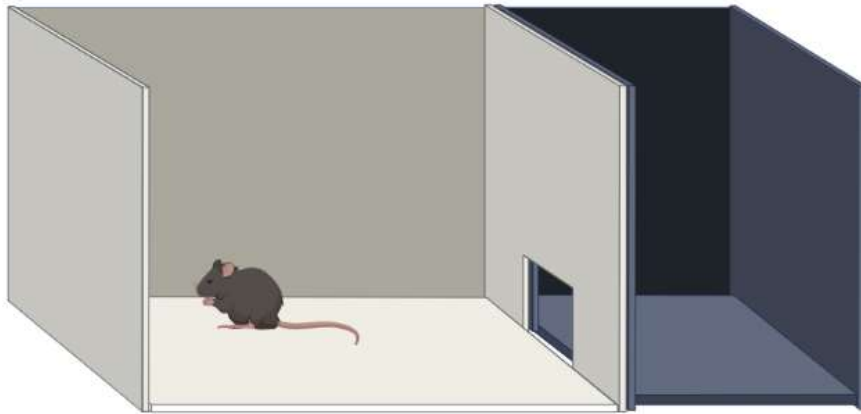


Created in BioRender.com bit

**Εικόνα 23:** Δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής.

- Δοκιμασία Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην έμφυτη αποστροφή των τρωκτικών για τους φωτεινούς χώρους, καθώς και στη χαρακτηριστική συμπεριφορά εξερεύνησης που αυτά εμφανίζουν (405). Η δοκιμασία σκοτεινού πεδίου διενεργείται σε νέο για τον μυ περιβάλλον, με μέγεθος 15x20x26 cm, φωτεινότητα 0-5 lux και καπάκι για το σκοτεινό, και 29x20x26 cm και φωτεινότητα 400 lux για το φωτεινό πεδίο, τα οποία συνδέονται μέσω ενός διαχωριστικού περάσματος. Κατά την έναρξη της διαδικασίας, κάθε μυς εισήχθη στο σκοτεινό πεδίο με κατεύθυνση προς το τοίχωμα του πεδίου. Η διαδικασία διήρκεσε 5' για κάθε πειραματόζωο και μετρήθηκαν ο αριθμός εισόδων κάθε μυ στο φωτεινό πεδίο (entries light compartment), ο χρόνος διαμονής κάθε μυ στο φωτεινό πεδίο (time light compartment) και ο χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι την είσοδο στο φωτεινό πεδίο (latency light compartment) με τη βοήθεια του λογισμικού Eventlog 1.0 (EMCO Software, Reykjavik, Iceland) (406). Ο υπό μελέτη μυς θεωρείται πως εισέρχεται στο φωτεινό πεδίο όταν αμφότερα τα μπροστινά πόδια του έχουν περάσει το διαχωριστικό μεταξύ των δύο πεδίων. Ο χρόνος διαμονής στο φωτεινό περιβάλλον είναι αντιπροσωπευτικός της χαμηλής σχετικής με το άγχος συμπεριφοράς, ενώ φαίνεται πως ο χρόνος αυτός μπορεί να επηρεάζεται από την κινητικότητα κάθε μυός (402). Έχει αποδειχθεί πως η χορήγηση κλοζαπίνης σε πειραματόζωα στα επίπεδα των 0,015 mg/kg μειώνει το χρόνο παραμονής των πειραματόζωων στο σκοτεινό πεδίο (407).



Created in BioRender.com bit

**Εικόνα 24:** Δοκιμασία Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου

### Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 8, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Για τον υπολογισμό των πολυμορφισμών και των αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκαν τα  $\chi^2$  τεστ,  $\chi^2$  test for trend και Fisher's exact test, ενώ η ανισορροπία γενετικής σύνδεσης εξακριβώθηκε με το λογισμικό Harloview (408). Για την ανάλυση των επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών των γονιδίων ενδιαφέροντος, αρχικά ελέγχθηκαν με τεστ κανονικότητας όλες οι μεταβλητές κι έπειτα έγιναν τα παραμετρικά ή τα μη παραμετρικά τεστ σε κάθε περίπτωση, αφού είχαν απορριφθεί οι ακραίες τιμές κάθε παραμέτρου. Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών ενδιαφέροντος έγιναν με το μη παραμετρικό Spearman's correlation coefficient. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το p value < 0,05.

### Αποτελέσματα

#### Περιγραφική Στατιστική – Δείγματα Πρώτου Ψυχωτικού Επεισοδίου (ΠΨΕ)

Τα δείγματα με ΠΨΕ χαρακτηρίστηκαν ως προς το δείκτη μάζας σώματος (BMI), την ηλικία, τη χρονικό διάστημα σε εβδομάδες που πέρασε από την έναρξη των συμπτωμάτων μέχρι την έναρξη της θεραπείας (Duration of Untreated Psychosis, DUP) και τη συμπτωματολογία τους βάσει της κλίμακας PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale). Στον πίνακα 1 αναγράφονται οι τιμές για κάθε παράμετρο και τα σκορ σε κάθε υποκατηγορία της κλίμακας PANSS πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Φαίνεται πως μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση ο μέσος όρος του δείκτη μάζας σώματος αυξάνεται, ενώ τα σκορ για την κλίμακα PANSS μειώνονται στατιστικά σημαντικά.

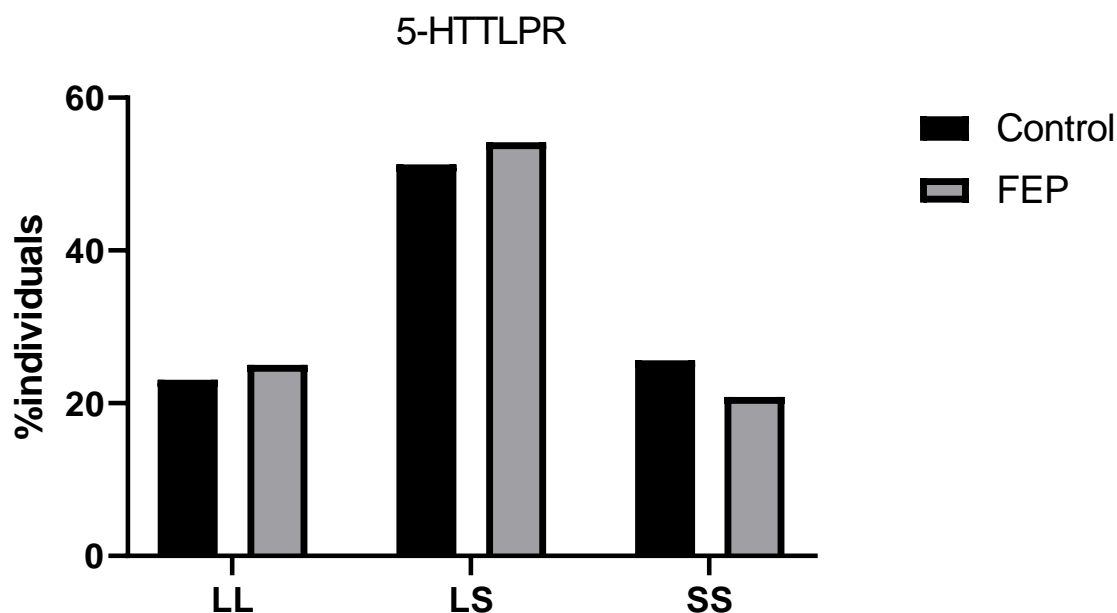
	FEP (N=48)		Treated (N=48)		Statistics	
	Mean	SD	Mean	SD	Test	p - value
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22,61	1,03	23,36	1,41	paired t-test	<0.0001
PANSS-P	31,44	1,99	7,90	1,34	wilcoxon	<0.0001
PANSS-N	21,27	3,29	18,60	2,97	wilcoxon	<0.0001
PANSS-G	25,04	2,75	19,15	2,35	wilcoxon	<0.0001
PANSS-T	77,73	5,46	45,50	5,34	wilcoxon	<0.0001
DUP (weeks)	14,75	8,00				
Ηλικία (years)	31,60	8,57				

**Πίνακας 1:** Αναγράφονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση για κάθε παράμετρο πριν και μετά τη θεραπεία. PANSS positive (PANSS-P), PANSS negative (PANSS-N), PANSS general (PANSS-G), PANSS total (PANSS-T).

### Πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) – Δείγματα ΠΨΕ

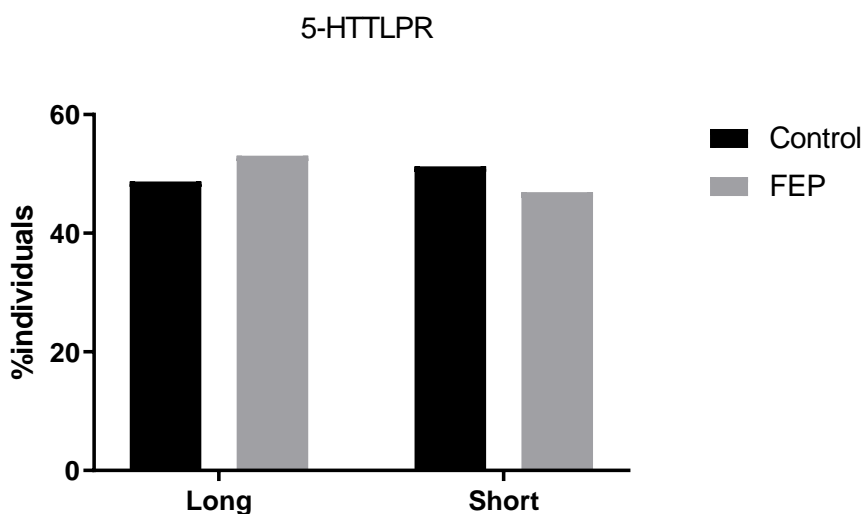
Ο πολυμορφισμός 5-HTTLPR και τα αλληλόμορφα του

Ο πολυμορφισμός 5-HTTLPR του γονιδίου *SLC6A4* γονοτυπήθηκε στα δείγματα ατόμων με ΠΨΕ (N=48) καθώς και στα δείγματα μάρτυρες (N=39). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ενδιαφέροντος και των δειγμάτων μαρτύρων αναφορικά με τα ποσοστά των παρατηρούμενων πολυμορφισμών.



**Εικόνα 25:** Οι πολυμορφισμοί παρουσιάζονται ως ποσοστά στα δείγματα με ΠΨΕ και στα δείγματα μάρτυρες. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το  $\chi^2$  τεστ με  $p$  - value = 0,8680.

Επιπλέον συγκρίθηκαν τα ποσοστά εμφάνισης των αλληλομόρφων Long (L) και Short (S) στα δείγματα ΠΨΕ και στα δείγματα μάρτυρες. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αναφορικά με τα παρατηρούμενα ποσοστά αλληλομόρφων.



**Εικόνα 26:** Τα αλληλόμορφα παρουσιάζονται ως ποσοστά στα δείγματα με ΠΨΕ και στα δείγματα μάρτυρες. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το  $\chi^2$  τεστ με  $p$  - value = 0,5669.

Οι πολυμορφισμοί rs1360780 και rs3800373 του γονιδίου *FKBP5*

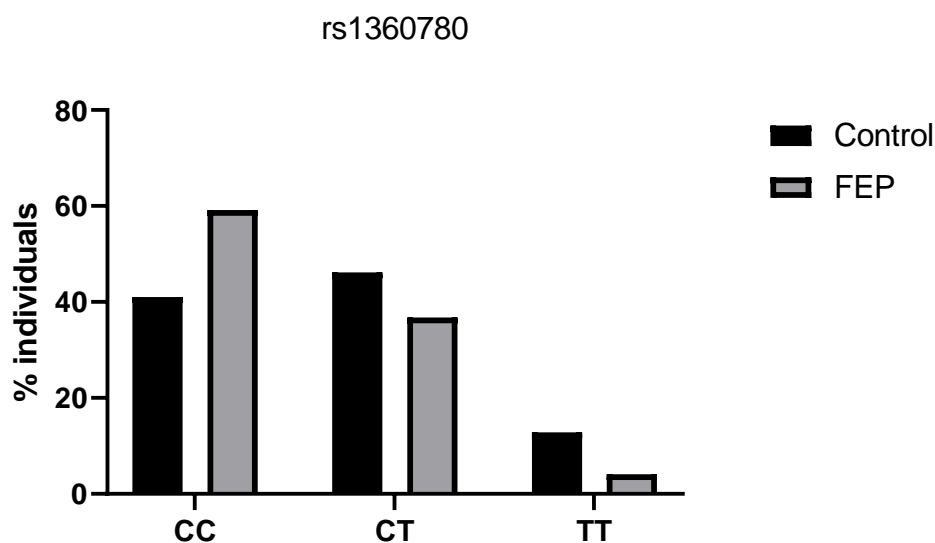
Οι πολυμορφισμοί αυτοί εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα ο rs1360780 (SNP 1) στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου *FKBP5* ενώ ο rs3800373 (SNP 2) στην 3' αμετάφραστη περιοχή του. Οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ανισορροπίας γενετικής σύνδεσης (linkage disequilibrium, LD) με το λογισμικό Haploview. Συγκεκριμένα, οι δυο πολυμορφισμοί βρέθηκαν σε ισορροπία Hardy-Weinberg στον πληθυσμό, ενώ τα SNPs 1 και 2 βρέθηκαν σε υψηλή ανισορροπία γενετικής σύνδεσης με  $r^2=0,83$  και  $D'=1$ . Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του  $D'$  τόσο χαμηλότερη η πιθανότητα να έχει συμβεί γενετικός ανασυνδυασμός μεταξύ των πολυμορφισμών αυτών, συνεπώς τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα συγκληρονόμησής τους. Επιπλέον, η υψηλή τιμή του  $r^2$  υποδεικνύει πως τα δεδομένα του ενός πολυμορφισμού μπορούν να υποκαταστήσουν τα δεδομένα του άλλου, σε επίπεδο πληθυσμού.



SNP	SNP1	SNP2
rs	rs1360780	rs3800373
Location	6: 35639794	6: 35574699
Position	Intron 2	3' UTR
MAF	0.287	0.253
Genotype frequencies	CC: 45 (51.14%) CT: 36 (40.91%) TT: 7 (7.96%)	AA: 51 (57.96%) AC: 31 (35.23%) CC: 6 (6.82%)
HW equilibrium	$p = 1$	$p = 0.9662$

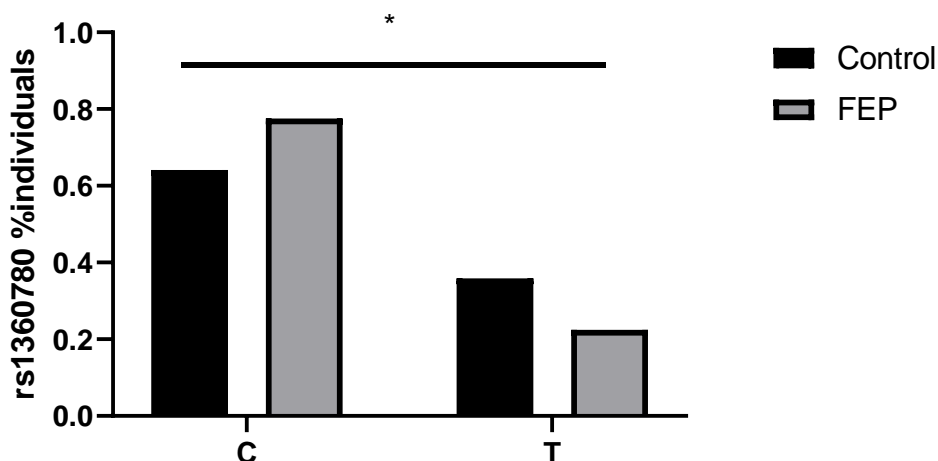
**Εικόνα 27:** Στον πίνακα αναγράφονται οι συχνότητες των γονοτύπων των SNP 1 και SNP 2. Επιπλέον φαίνονται οι ελάχιστες συχνότητες των αλληλομόρφων για κάθε SNP (minor allele frequency, MAF) και οι τιμές ( $p$  - values) για την ισορροπία Hardy Weinberg (HW equilibrium).

Ακολουθεί η κατανομή των ποσοστών των πολυμορφισμών CC, CT, TT του rs1360780 για το δείγμα ατόμων με ΠΨΕ και στα δείγματα μάρτυρες. Φαίνεται πως στα δείγματα με ΠΨΕ η παρουσία του πολυμορφισμού CC είναι υψηλότερη από ότι στο δείγμα ελέγχου γενικού πληθυσμού και η παρουσία του αλληλομόρφου TT είναι χαμηλότερη από ότι στο γενικό πληθυσμό.



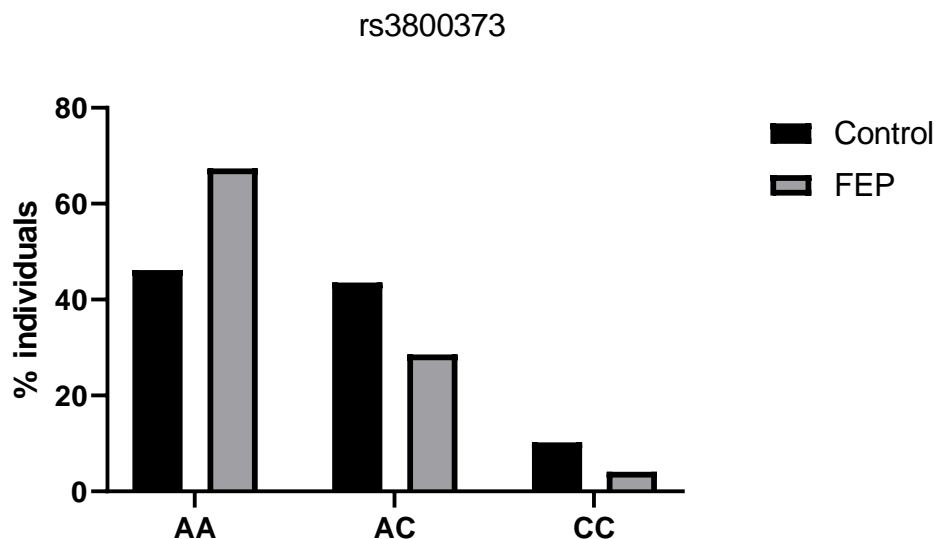
**Εικόνα 28:** Για τον πολυμορφισμό *rs1360780* απεικονίζονται σε μορφή ποσοστών τα ποσοστά εμφάνισης των *CC*, *CT* και *TT* γονοτύπων ( $\chi^2$  τεστ,  $p$ -value=0,1383).

Επιπλέον παρουσιάζονται τα ποσοστά των αλληλομόρφων *C* και *T* του ίδιου πολυμορφισμού για τα δείγματα ΠΨΕ και για το γενικό πληθυσμό. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των ποσοστών εμφάνισης του αλληλομόρφου *C* στο δείγμα με ΠΨΕ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και μειωμένο ποσοστό εμφάνισης του *T* αλληλομόρφου.

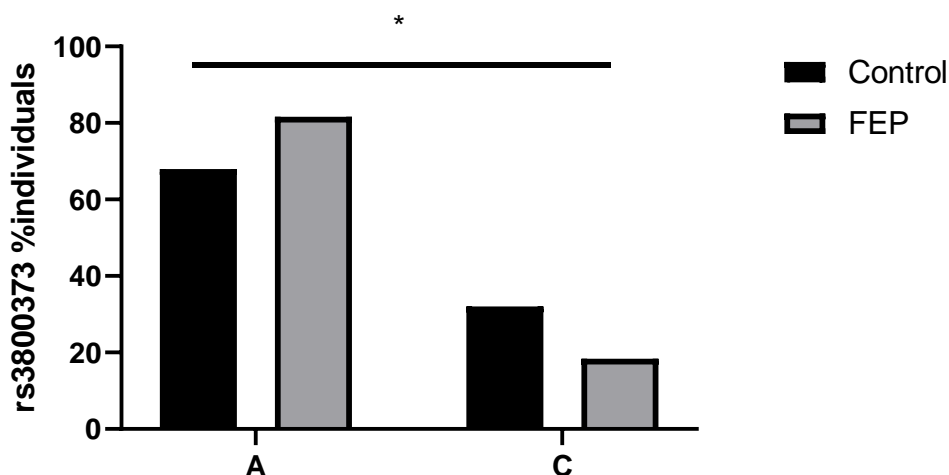


**Εικόνα 29:** Απεικονίζονται τα αλληλόμορφα του πολυμορφισμού *rs1360780* για το δείγμα ΠΨΕ και το δείγμα γενικού πληθυσμού ( $\chi^2$  τεστ,  $*p$ -value=0,0494).

Για τον πολυμορφισμό *rs3800373* παρουσιάζονται παρακάτω σε μορφή ποσοστών οι γονότυποι *AA*, *AC* και *CC* για το δείγμα ατόμων με ΠΨΕ και για το δείγμα μαρτύρων.



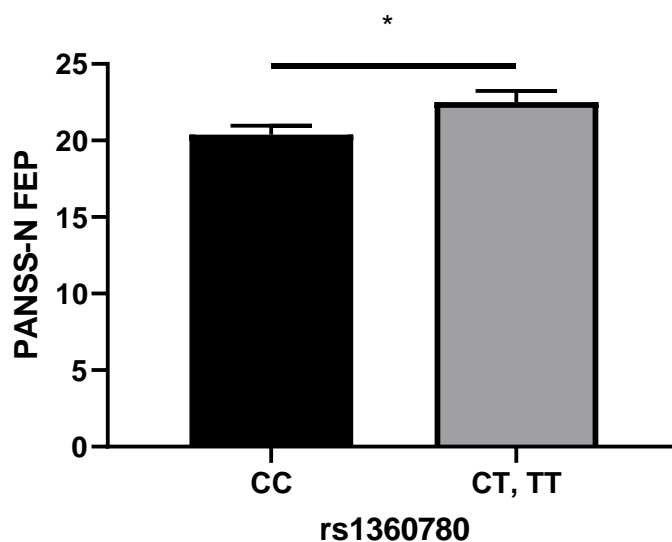
**Εικόνα 30:** Απεικονίζονται οι γονότυποι *AA*, *AC* και *CC* για τον πολυμορφισμό *rs3800373*. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων ( $\chi^2$  τεστ,  $p$ -value=0,1172).



**Εικόνα 31:** Απεικονίζονται τα ποσοστά των αλληλομόρφων A και C στο δείγμα ατόμων με ΠΨΕ και στο δείγμα ελέγχου. Το ποσοστό εμφάνισης του αλληλομόρφου A είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο στο δείγμα με ΠΨΕ από ότι στο γενικό πληθυσμό, ενώ το αλληλόμορφο C εμφανίζεται μειωμένο στο δείγμα με ΠΨΕ ( $\chi^2$  τεστ, \* $p$ -value=0,0358).

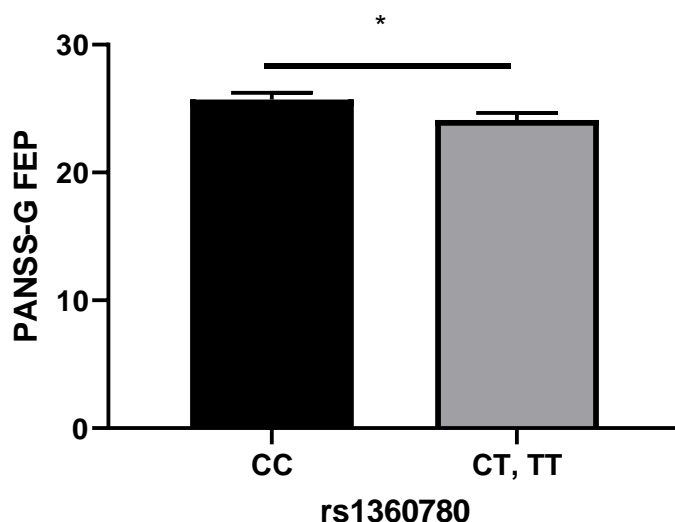
Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *FKBP5* και η διαγνωστική κλίμακα PANSS

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs1360780 και το δείγμα ατόμων με ΠΨΕ φαίνεται πως τα άτομα με τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου T εμφανίζουν αυξημένα σκορ στην κλίμακα PANSS-N, η οποία αφορά στα αρνητικά συμπτώματα της νόσου, πριν τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά σε σχέση με άτομα ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο C.

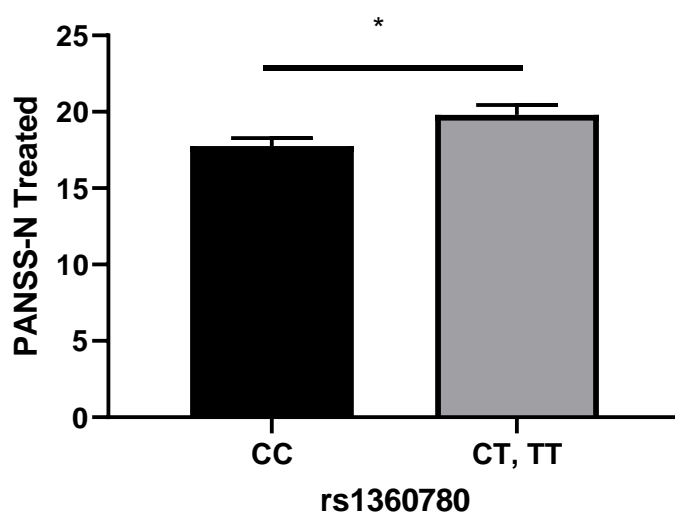


**Εικόνα 32:** Η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου κινδύνου T, του πολυμορφισμού rs1360780 ευθύνεται για υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N πριν τη θεραπεία (Mann-Whitney τεστ, \* $p$ -value=0,0253).



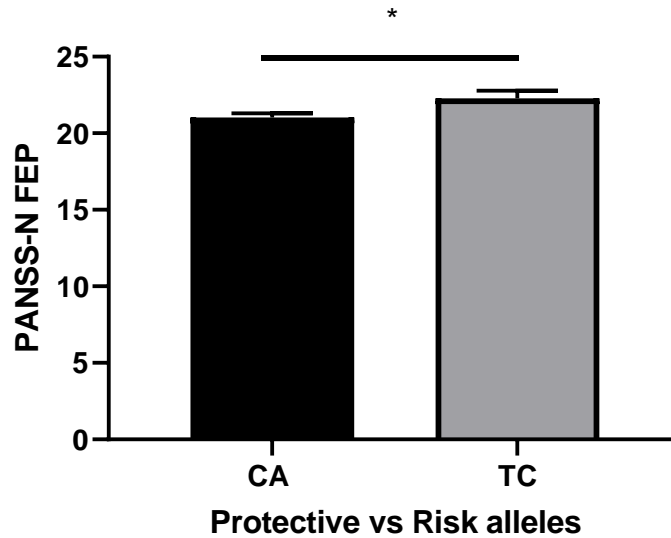


**Εικόνα 33:** Η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου T του ίδιου πολυμορφισμού ευθύνεται για χαμηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-G πριν τη θεραπεία (Mann-Whitney τεστ, \* $p$  - value=0,0496).

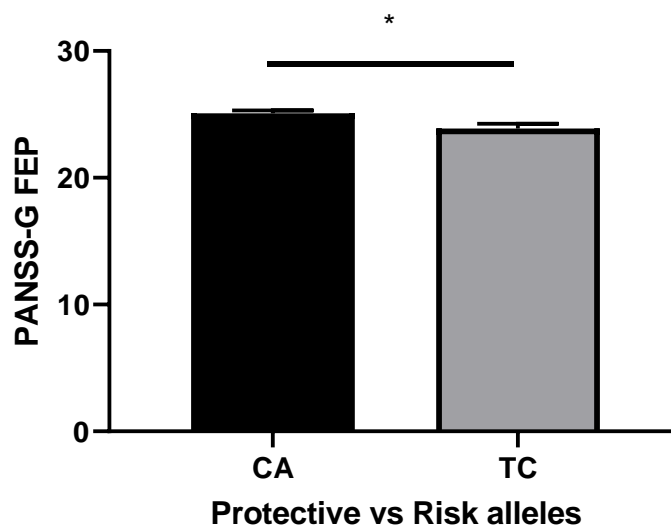


**Εικόνα 34:** Η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου T φαίνεται να ευθύνεται για υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N των ατόμων με ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας, σε σχέση με τα ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs1360780 (Mann-Whitney τεστ, \* $p$  - value=0,0448).

Περαιτέρω ελέγχθηκε η συμβολή και των δυο αλληλομόρφων του γονιδίου *FKBP5*, συγκεκριμένα των rs1360780 και rs3800373 στο φαινότυπο και παρατηρήθηκε πως η παρουσία των δυο αλληλομόρφων κινδύνου των πολυμορφισμών αυτών επηρέασε το σκορ στην κλίμακα PANSS σε άτομα με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία.



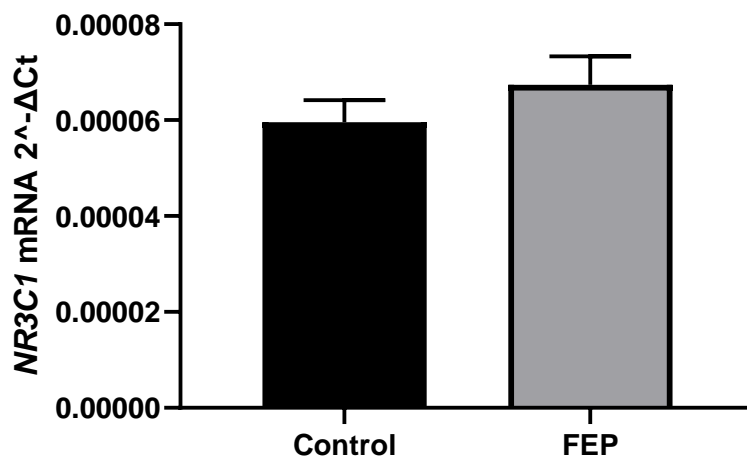
**Εικόνα 35:** Η παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου TC των δυο πολυμορφισμών φαίνεται να συνέβαλλε στην αύξηση του σκορ της κλίμακας PANSS-N σε άτομα με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία (Mann-Whitney τεστ, \* $p$  - value=0,0310).



**Εικόνα 36:** Επιπλέον, σε άτομα με ΠΨΕ τα οποία φέρουν και τα δυο αλληλόμορφα κινδύνου TC των παραπάνω πολυμορφισμών εντοπίζεται υψηλότερο σκορ στην κλίμακα PANSS-G πριν τη θεραπεία, σε σχέση με άτομα με ΠΨΕ που φέρουν τα προστατευτικά αλληλόμορφα (Mann-Whitney τεστ, \* $p$  - value=0,0102).

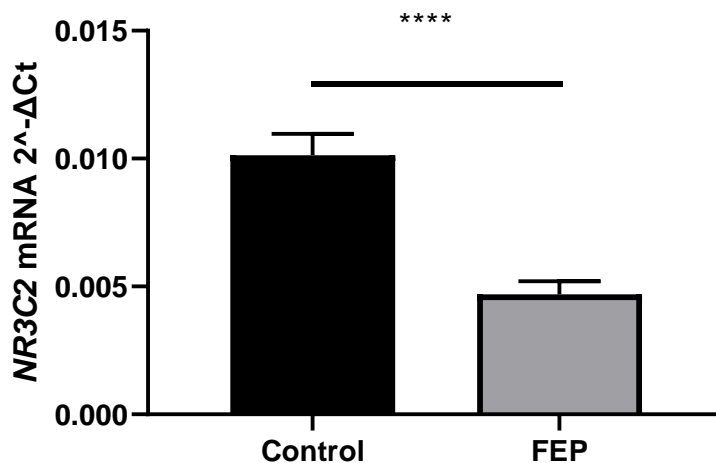
**Επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος – Δείγματα ΠΨΕ πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση**

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και συγκρίθηκαν μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων.



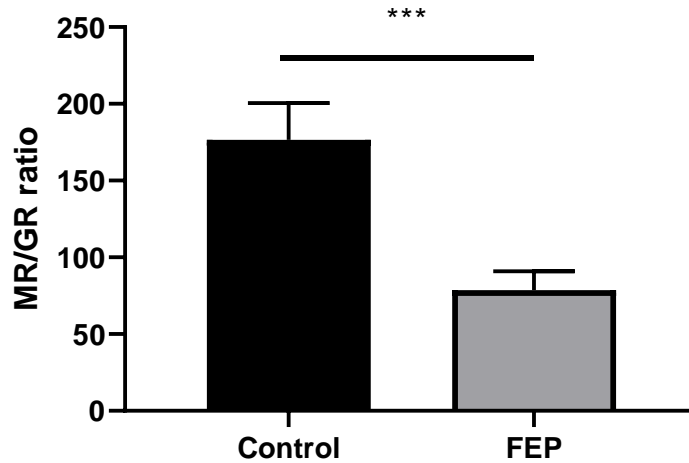
**Εικόνα 37:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* δε διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων, (Mann-Whitney τεστ,  $p$  – value=0,5029).

Αντιθέτως, το γονίδιο *NR3C2* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, ελέγχθηκε σε δείγματα ΠΨΕ και στο γενικό πληθυσμό και φαίνεται να εμφανίζει μείωση στο πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο.



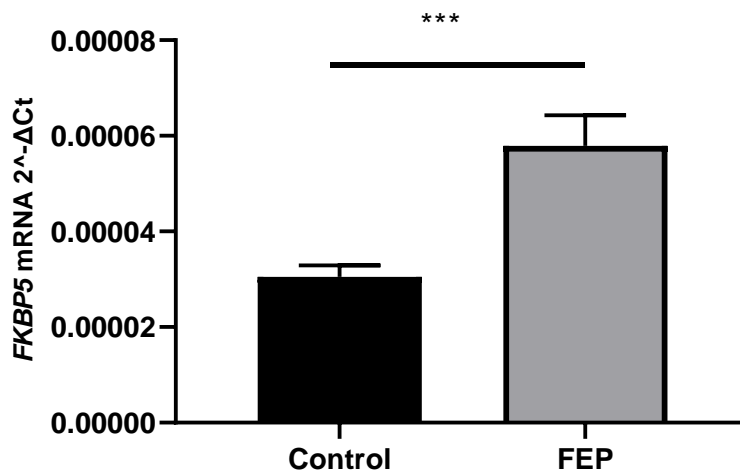
**Εικόνα 38:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά μειωμένα στα δείγματα με ΠΨΕ (Mann-Whitney τεστ, \*\*\*\* $p$  – value<0,0001).

Ο λόγος (ratio) των γονιδίων *NR3C2/NR3C1* ή MR/GR εμφανίζεται επίσης σημαντικά μειωμένος στο ΠΨΕ, γεγονός που αντικατοπτρίζει την απορρύθμιση του άξονα HPA, που πιθανά οφείλεται σε απώλεια λειτουργίας του υποδοχέα MR.



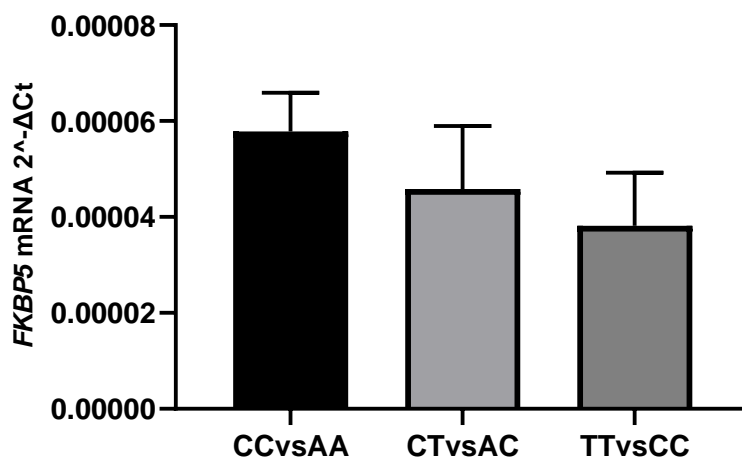
**Εικόνα 39:** Απεικονίζεται η στατιστικά σημαντική μείωση του λόγου *MR/GR* στα δείγματα με ΠΨΕ (Mann-Whitney τεστ, \*\*\* $p$  – value=0,0002).

Έπειτα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* το οποίο κωδικοποιεί τη συνοδό πρωτεΐνη του GR. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του γονιδίου αυτού στα δείγματα με ΠΨΕ.



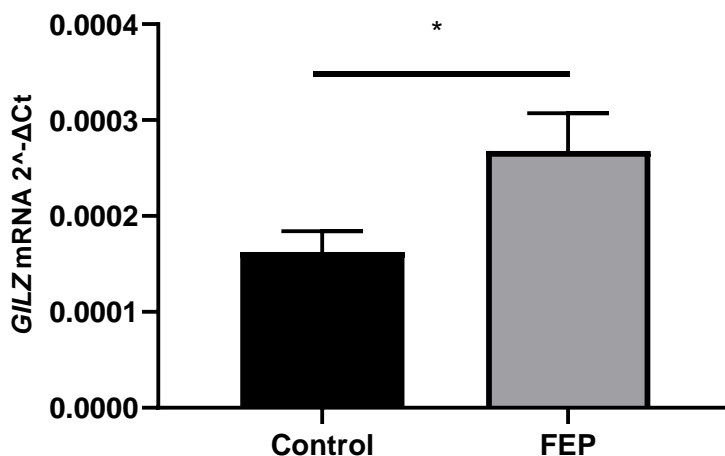
**Εικόνα 40:** Απεικονίζεται η αύξηση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου ενδιαφέροντος, στα δείγματα με ΠΨΕ (Mann-Whitney τεστ, \*\*\* $p$  – value=0,0004).

Συνδυαστικά με τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του *FKBP5* με rs1360780 και rs3800373 δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα mRNA του γονιδίου στα δείγματα με ΠΨΕ.



**Εικόνα 41:** Ανεξαρτήτως γονοτύπου των δύο πολυμορφισμών, τα δείγματα με ΠΨΕ εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5. Συγκεκριμένα άτομα με ΠΨΕ και ομόζυγα για τα προστατευτικά αλληλόμορφα των δυο πολυμορφισμών εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα mRNA του γονιδίου σε σύγκριση με άτομα ετερόζυγα ή άτομα ομόζυγα για τα αλληλόμορφα κινδύνου (Mann-Whitney τεστ,  $p_1$  – value=0,9588,  $p_2$  – value=0,6,  $p_3$  – value=0,8 και Kruskal-Wallis τεστ,  $p$  – value=0,8324).

Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου GILZ επίσης εμφανίζονται αυξημένα στα δείγματα με ΠΨΕ σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες.

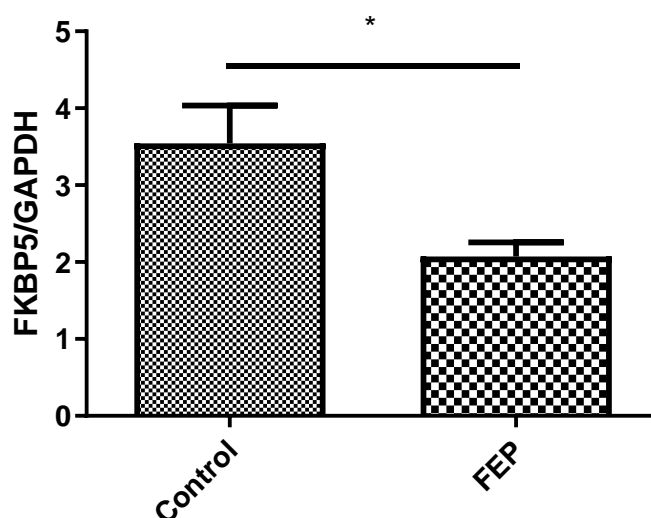


**Εικόνα 42:** Απεικονίζονται τα αυξημένα επίπεδα mRNA GILZ στο ΠΨΕ σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες (Mann-Whitney, \* $p$  – value=0,0398).

#### Επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 – Δείγματα ΠΨΕ πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 μελετήθηκαν σε ένα ανεξάρτητο δείγμα ατόμων με ΠΨΕ πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση. Σε αντίθεση με τα επίπεδα mRNA, η πρωτεΐνη παρουσίασε σημαντικά μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Αυτό πιθανά

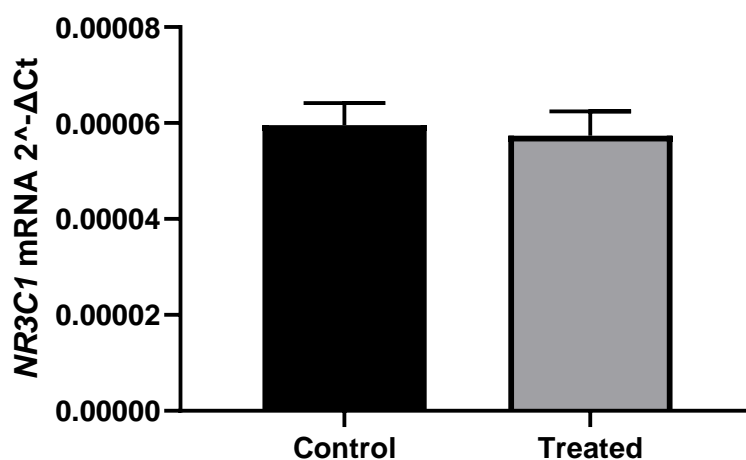
οφείλεται στο ότι το ανεξάρτητο δείγμα αποτέλεσε διαφορετικό πληθυσμό στον οποίο διενεργήθηκε η μελέτη των πρωτεϊνών, σε σχέση με τον πληθυσμό στον οποίο αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί και τα επίπεδα mRNA.



**Εικόνα 43:** Απεικονίζονται τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 σε ανεξάρτητο δείγμα πληθυσμού με ΠΨΕ (Mann-Whitney τεστ \* $p$  – value=0,0159).

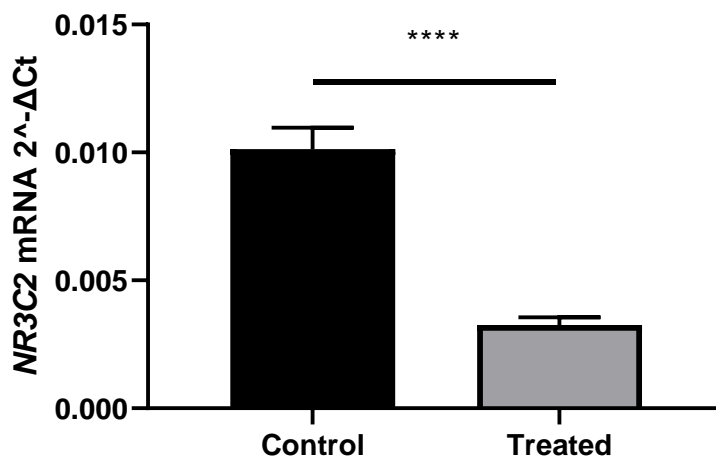
#### Επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος – Δείγματα ΠΨΕ κατόπιν φαρμακευτικής παρέμβασης

Στο δείγμα ΠΨΕ ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος κατόπιν της φαρμακευτικής παρέμβασης με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Όπως και πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση παρατηρείται πως τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* που κωδικοποιεί το GR, παραμένουν σταθερά μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων.



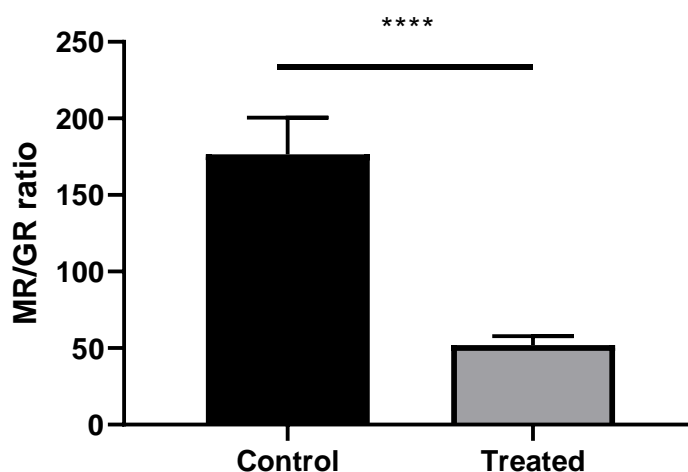
**Εικόνα 44:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* παραμένουν αμετάβλητα στα δείγματα με ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες (Mann-Whitney τεστ,  $p$ -value=0,3347).

Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* παρέμειναν μειωμένα μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση στα άτομα με ΠΨΕ συγκριτικά με τα δείγματα μαρτύρων.



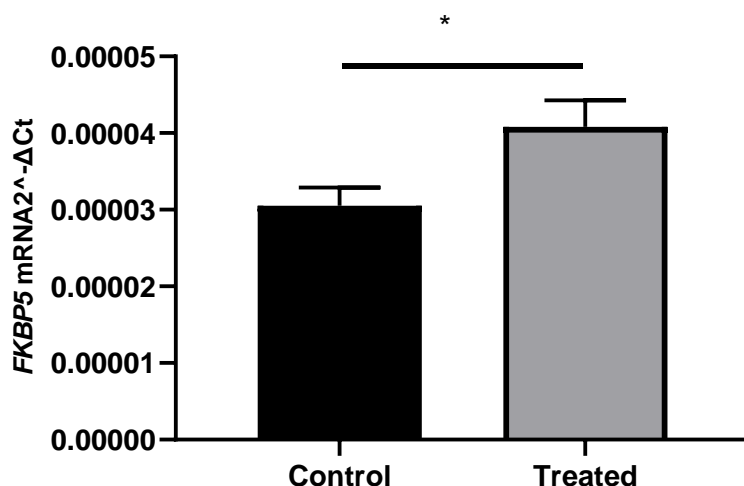
**Εικόνα 45:** Παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* στα δείγματα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Mann-Whitney τεστ, \*\*\*\* $p$ -value<0,0001).

Ο λόγος (ratio) των επιπέδων mRNA των γονιδίων *NR3C2/NR3C1* ή MR/GR εμφανίζεται επίσης σημαντικά μειωμένος στα δείγματα ΠΨΕ κατόπιν φαρμακευτικής παρέμβασης, γεγονός που υποστηρίζει την εμμένουσα απορρύθμιση του άξονα HPA κατά τη διάρκεια της νόσου.



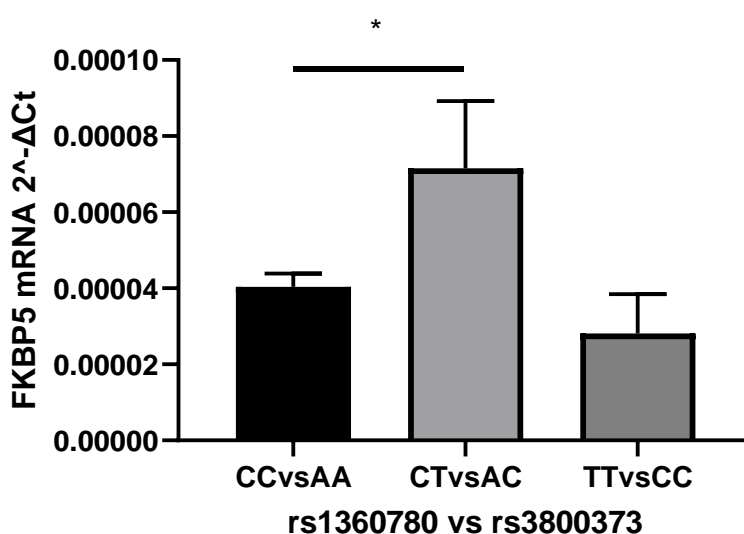
**Εικόνα 46:** Μείωση του λόγου MR/GR στα δείγματα με ΠΨΕ μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση (Mann-Whitney τεστ, \*\*\*\* $p$ -value<0,0001).

Ελέγχθηκαν επιπλέον τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* και βρέθηκαν επίσης αυξημένα στα δείγματα ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας.



**Εικόνα 47:** Αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *FKBP5* στα δείγματα με ΠΨΕ σε σχέση με τα δείγματα γενικού πληθυσμού (Mann-Whitney τεστ, \* $p$  – value=0,0283).

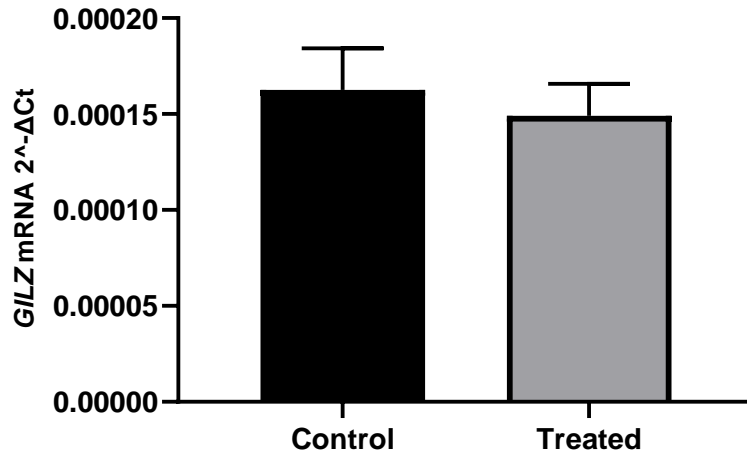
Επίσης αναφορικά με τους πολυμορφισμούς rs1360780 και rs3800373 του γονιδίου *FKBP5* εξακριβώθηκαν τα επίπεδα mRNA στα δείγματα με ΠΨΕ. Συγκεκριμένα βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα mRNA του γονιδίου σε άτομα με ΠΨΕ και ετερόζυγα ως προς τους δύο πολυμορφισμούς σε σχέση με άτομα ομόζυγα για τα προστατευτικά ή τα αλληλόμορφα κινδύνου των δύο πολυμορφισμών, μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση.



**Εικόνα 48:** Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *FKBP5* σε άτομα ετερόζυγα ως προς τους δύο πολυμορφισμούς (Mann-Whitney τεστ, \* $p_1$  – value=0,0248,  $p_2$  – value=0,3333,  $p_3$  – value=0,1333 και Kruskal-Wallis τεστ, \* $p$  – value=0,0196).

Τέλος, διερευνήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *GILZ* στα δείγματα με ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Φαίνεται πως μετά τη θεραπεία, τα επίπεδα του γονιδίου επανέρχονται στα δείγματα με ΠΨΕ, καθιστώντας το γονίδιο αυτό πιθανό κατά συνθήκη βιοδείκτη (state biomarker) για την οξεία φάση της νόσου.

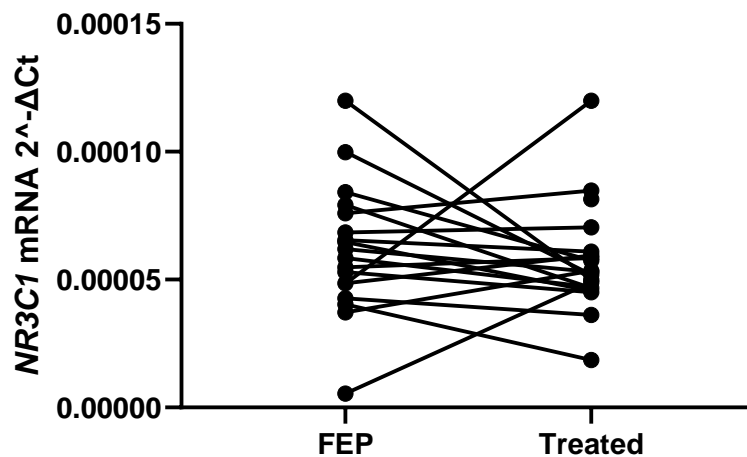




**Εικόνα 49:** Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του γονιδίου GILZ μετά τη θεραπεία στα δείγματα με ΠΨΕ σε σχέση με τα δείγματα γενικού πληθυσμού (Mann-Whitney τεστ,  $p$  – value=0,7701).

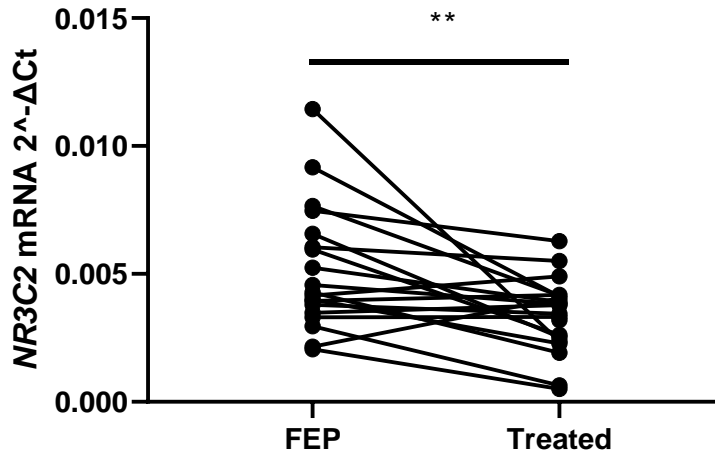
#### Διερεύνηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος σε κοινά δείγματα με ΠΨΕ πριν και κατόπιν της φαρμακευτικής παρέμβασης

21 άτομα με ΠΨΕ χαρακτηρίστηκαν ως προς τα γονίδια ενδιαφέροντος πριν και μετά τη φαρμακευτική αγωγή με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C1 που κωδικοποιεί τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών παρέμειναν σταθερά και στις δυο φάσεις της νόσου.



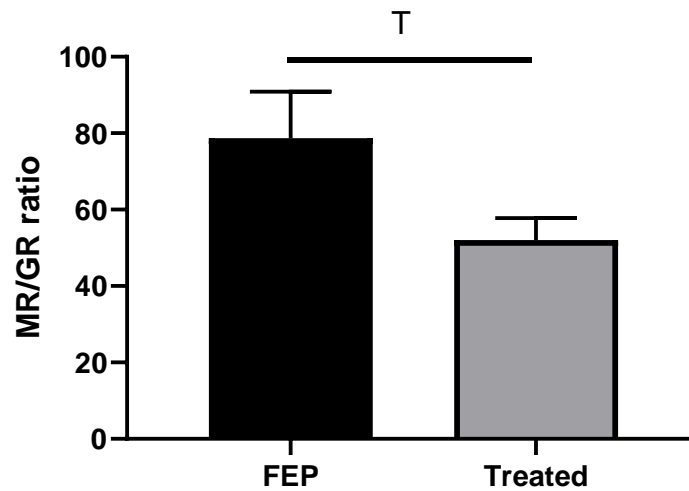
**Εικόνα 50:** Τα επίπεδα mRNA NR3C1 παραμένουν αμετάβλητα πριν και μετά τη θεραπεία στα άτομα με ΠΨΕ (Wilcoxon τεστ,  $p$  – value=0,3038).

Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C2 που κωδικοποιούν τον υποδοχέα MR μεταβάλλονται και συγκεκριμένα μειώνονται στα άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία.



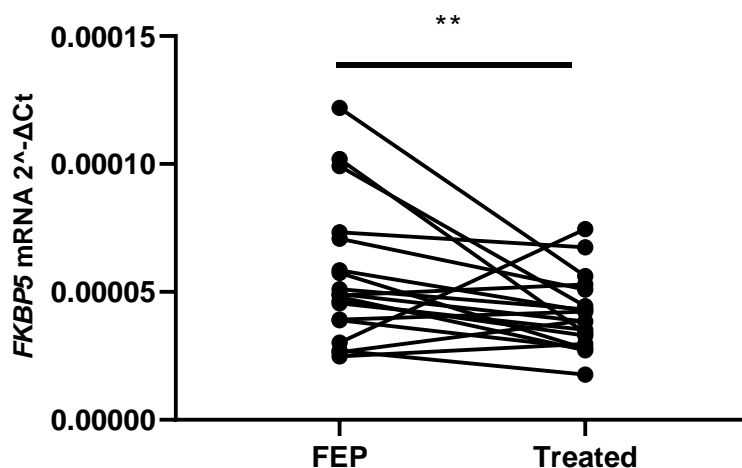
**Εικόνα 51:** Παρατηρείται μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *NR3C2* στα δείγματα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Paired *t*-test,  $**p - value=0,0059$ ).

Ο λόγος (ratio) των επιπέδων mRNA των γονιδίων *NR3C2/NR3C1* ή MR/GR εμφανίζει μια τάση (trend) προς μείωση, στα δείγματα με ΠΨΕ κατόπιν της θεραπείας.



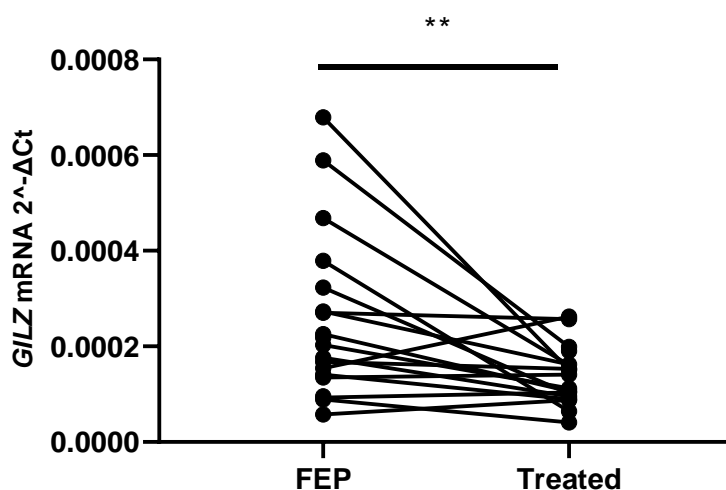
**Εικόνα 52:** Τάση προς μείωση του λόγου MR/GR στα δείγματα με ΠΨΕ (Wilcoxon test,  $p - value=0,0673$ ).

Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* στα δείγματα με ΠΨΕ φαίνεται να μειώνονται σημαντικά κατόπιν θεραπείας.



**Εικόνα 53:** Μείωση των επιπέδων FKBP5 στο πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο κατόπιν θεραπείας με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Wilcoxon τεστ,  $**p - value=0,0095$ ).

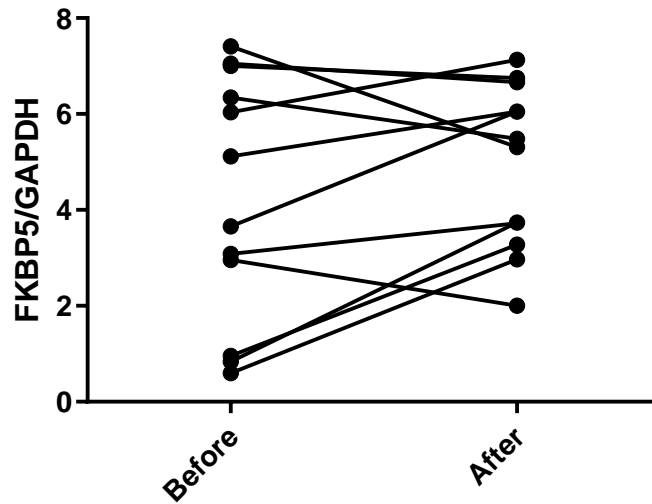
Τέλος διερευνήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *GILZ* σε κοινά δείγματα ΠΨΕ πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Το γονίδιο αυτό βρέθηκε επίσης στατιστικά σημαντικά μειωμένο.



**Εικόνα 54:** Μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *GILZ* μετά τη θεραπεία, σε άτομα με ΠΨΕ (Wilcoxon τεστ,  $**p - value=0,0038$ ).

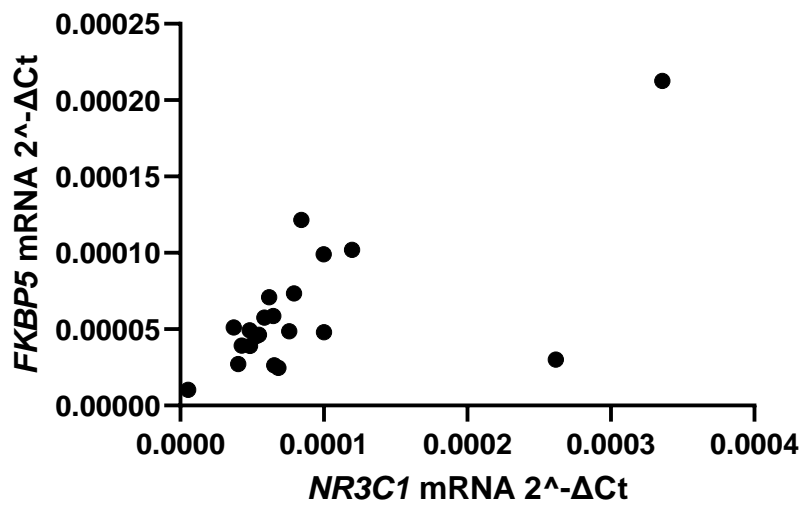
#### Επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 – Κοινά δείγματα ΠΨΕ πριν και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 ελέγχθηκαν σε μια υποομάδα 12 ατόμων με ΠΨΕ πριν και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση. Πιθανά λόγω του μικρού δείγματος ατόμων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης.

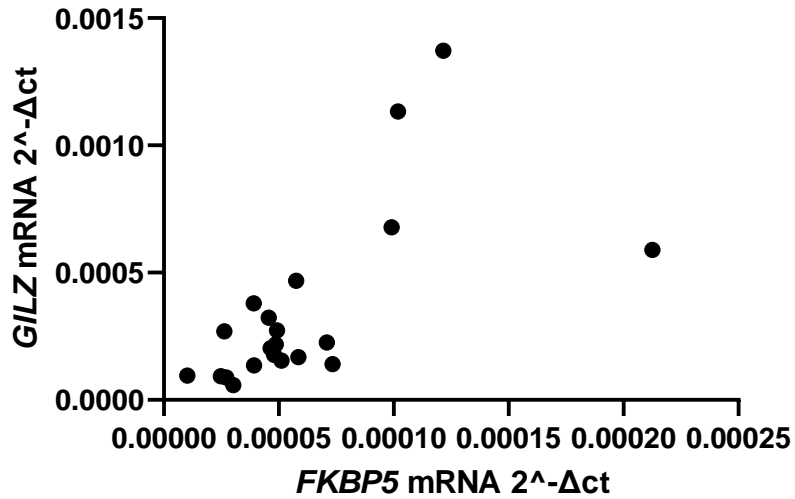


**Εικόνα 55:** Τα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Wilcoxon τεστ,  $p$  – value=0,1763).

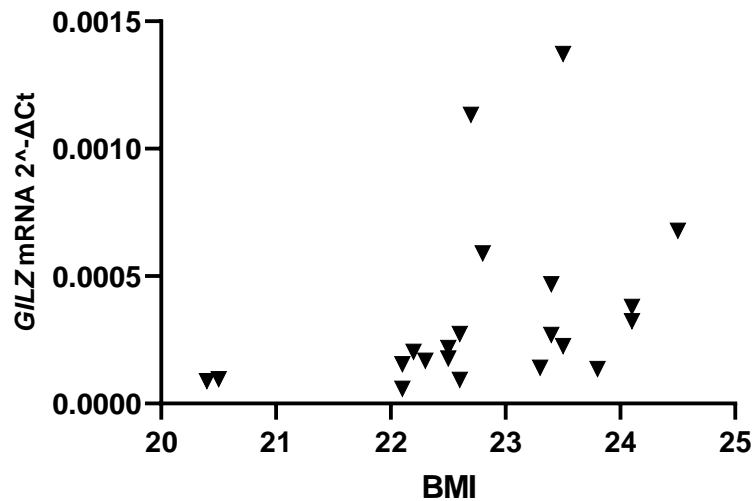
#### Συσχετίσεις των γονιδίων ενδιαφέροντος με περιγραφικούς δείκτες – Δείγματα ΠΨΕ



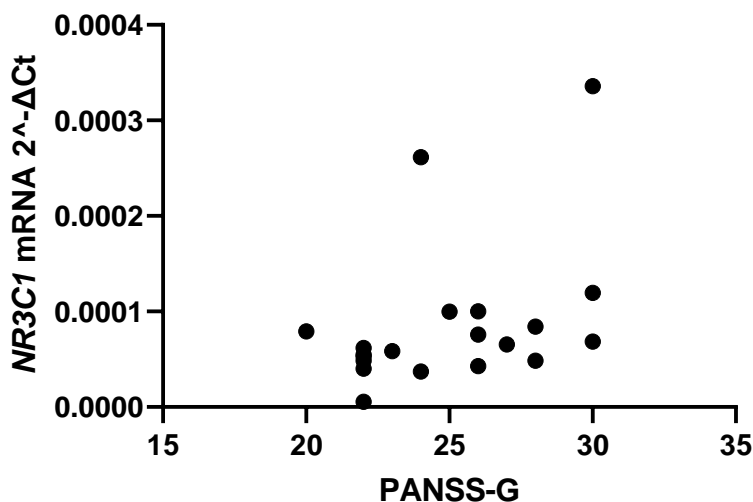
**Εικόνα 56:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5 συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C1 στα άτομα με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=0,4935$ , \* $p$  – value=0,0230).



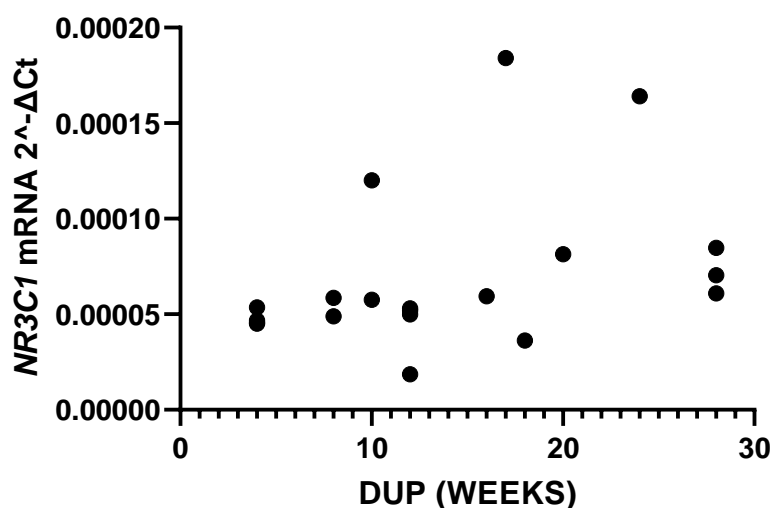
**Εικόνα 57:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *GILZ* συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* στα άτομα με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία (Spearman's correlation,  $r=0,6545$ ,  $**p - value=0,0013$ ).



**Εικόνα 58:** Τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* των ατόμων με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία συσχετίστηκαν θετικά με τις τιμές του δείκτη μάζας σώματος (Spearman's correlation,  $r=0,6422$ ,  $**p - value=0,0017$ ).



**Εικόνα 59:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C1 συσχετίστηκαν θετικά με τα σκορ της κλίμακας PANSS-G πριν τη θεραπεία των ατόμων με ΠΨΕ (Spearman's correlation,  $r=0,4806$ ,  $*p - value=0,0274$ ).

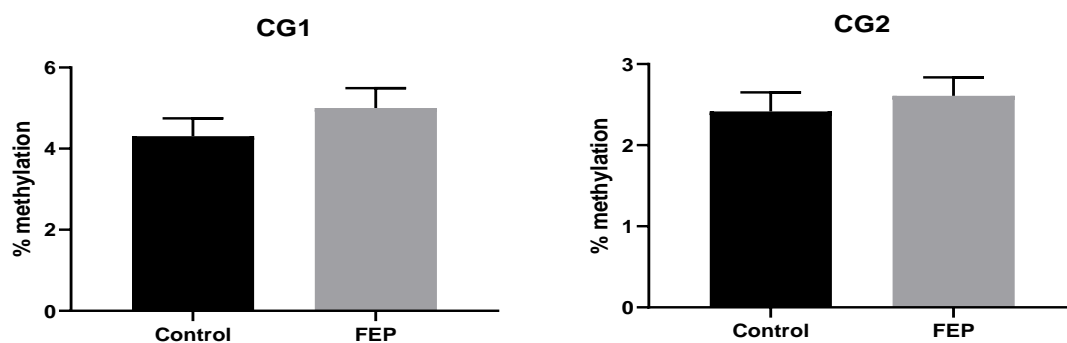


**Εικόνα 60:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C1 μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά, συσχετίστηκαν θετικά με τη διάρκεια νόσησης χωρίς θεραπεία, συγκεκριμένα όσο περισσότερος χρόνος πέρασε χωρίς θεραπεία, τόσο αυξημένα βρέθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου μετά τη φαρμακευτική αγωγή (Spearman's correlation,  $r=0,5697$ ,  $**p - value=0,007$ ).

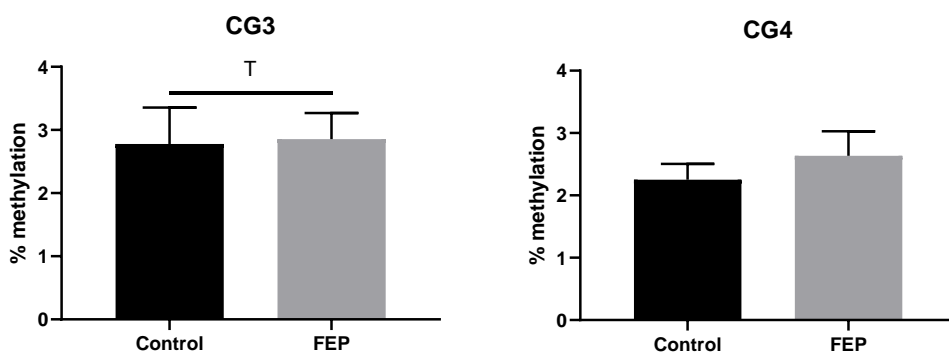
#### Πυροαλληλούχιση - Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης - Δείγματα ΠΨΕ

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης (% methylation) σε 18 θέσεις CG της νησίδας CpG του υποκινητή του γονιδίου FKBP5 στα δείγματα περιφερικού αίματος ατόμων με ΠΨΕ και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα του δείγματος γενικού πληθυσμού. Δεν παρατηρήθηκαν

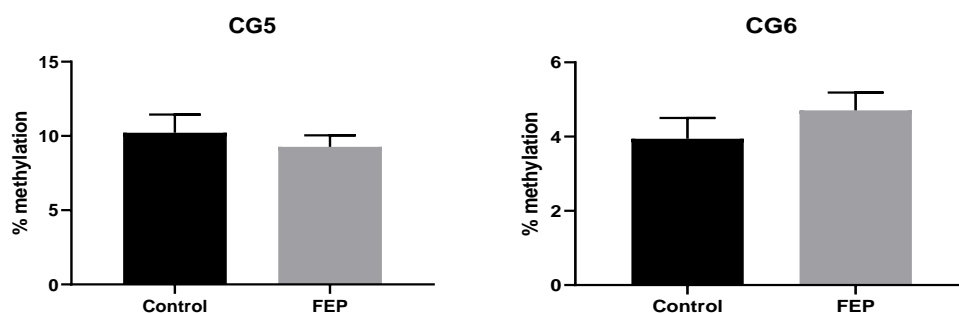
διαφορές σε καμία θέση CG μεταξύ των δειγμάτων ενδιαφέροντος και των δειγμάτων μαρτύρων.



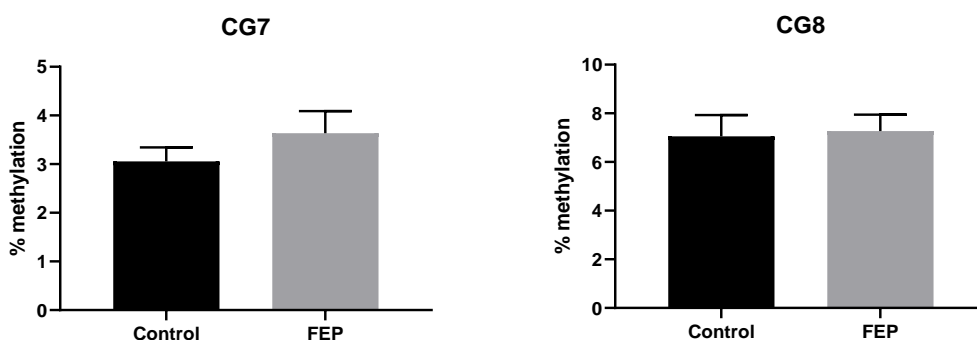
**Εικόνα 61:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG1 και CG2 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p$  – value=0,3757 για CG1 και  $p$  – value=0,6904 για CG2, αντίστοιχα).



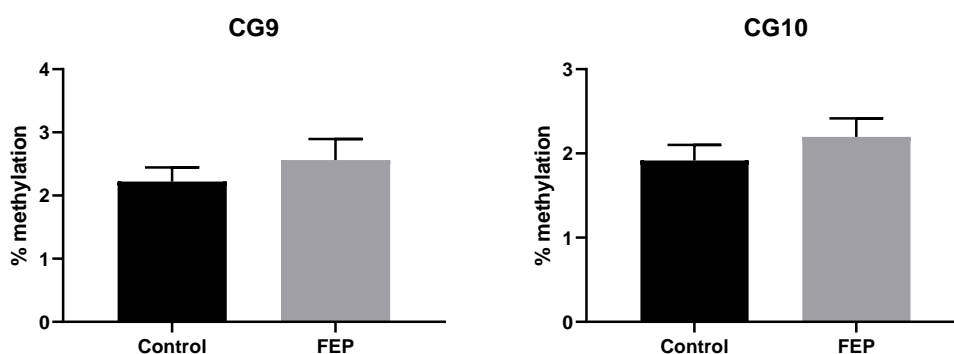
**Εικόνα 62:** Τάση προς αύξηση στη μεθυλίωση στη θέση CG3 και καμία μεταβολή στη μεθυλίωση στη θέση CG4 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p$  – value=0,0898 για CG3 και  $p$  – value=0,8101 για CG4, αντίστοιχα).



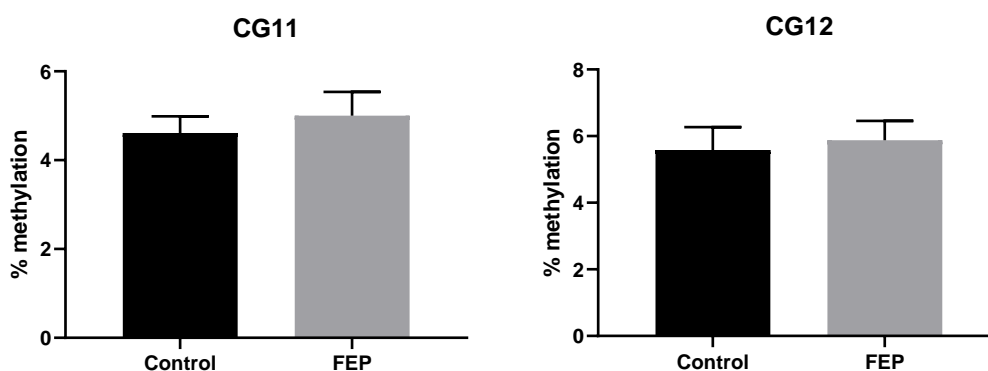
**Εικόνα 63:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG5 και CG6 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p$  – value=0,1167 για CG5 και  $p$  – value=0,2718 για CG6, αντίστοιχα).



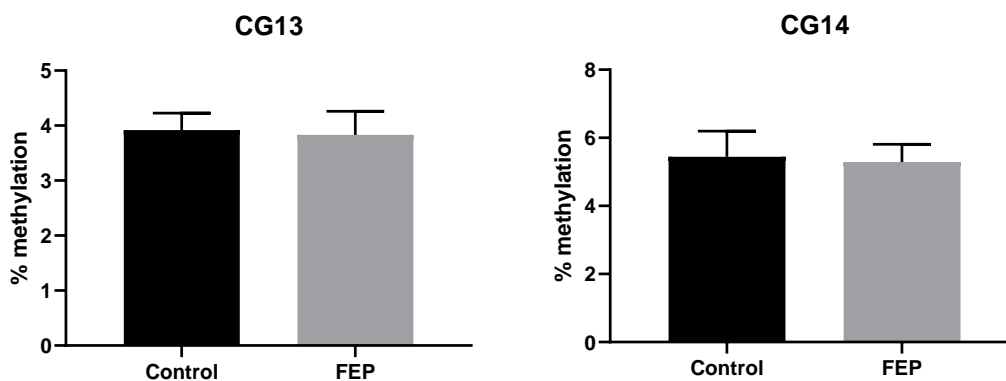
**Εικόνα 64:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG7 και CG8 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,7972$  για CG7 και  $p - value=0,3345$  για CG8, αντίστοιχα).



**Εικόνα 65:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG9 και CG10 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,7999$  για CG9 και  $p - value=0,9141$  για CG10, αντίστοιχα).

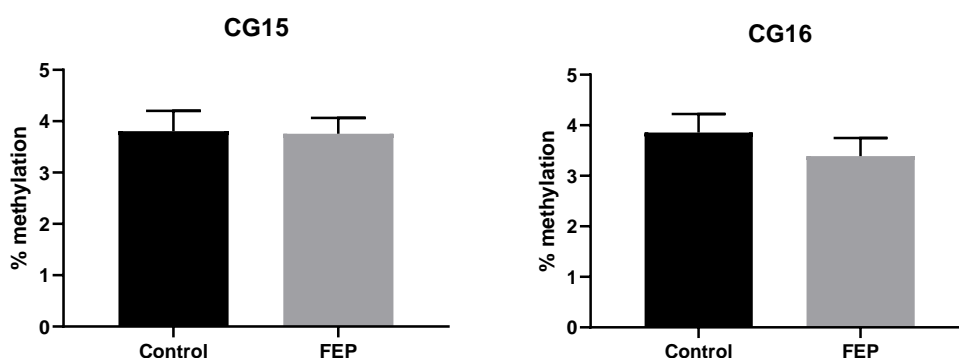


**Εικόνα 66:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG11 και CG12 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,9106$  για CG11 και  $p - value=0,3418$  για CG12, αντίστοιχα).

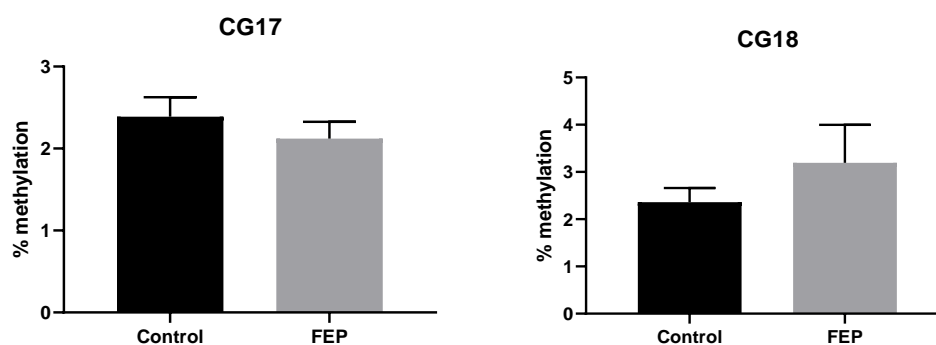




**Εικόνα 67:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG13 και CG14 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,3457$  για CG13 και  $p - value=0,4125$  και CG14 αντίστοιχα).



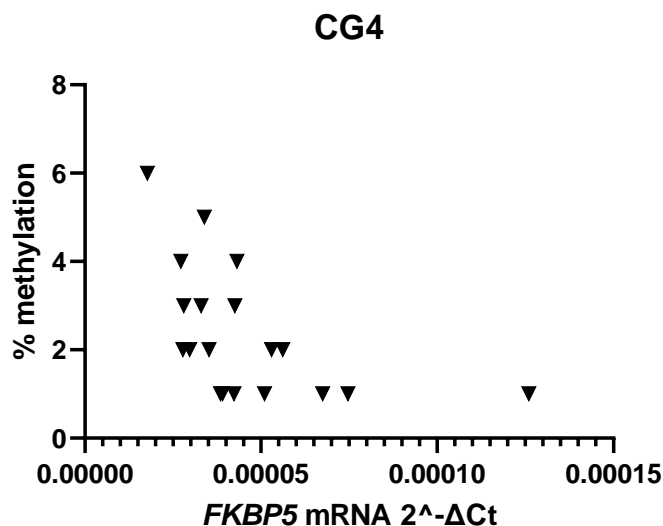
**Εικόνα 68:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG15 και CG16 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,6785$  για CG15 και  $p - value=0,1556$  για CG16, αντίστοιχα).



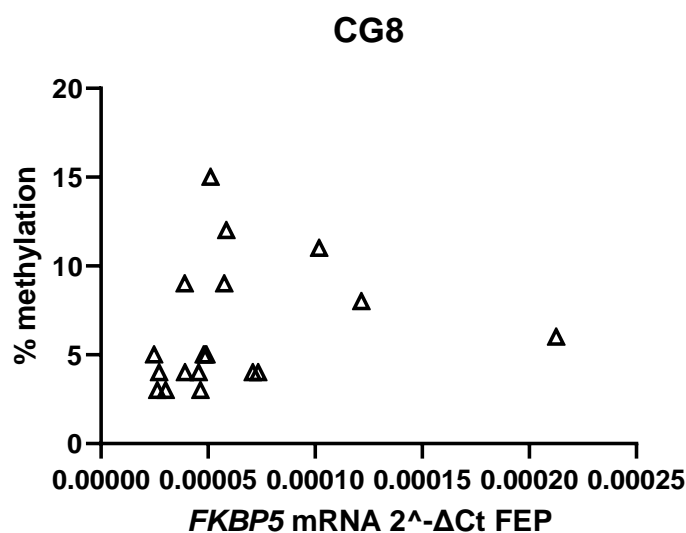
**Εικόνα 69:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μεθυλίωση στις θέσεις CG17 και CG18 μεταξύ των δειγμάτων με ΠΨΕ και των δειγμάτων μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,3184$  για CG17 και  $p - value=0,8547$  για CG18 αντίστοιχα).

### Συσχετίσεις επιπέδων μεθυλίωσης με μοριακούς και περιγραφικούς δείκτες – Δείγματα ΠΨΕ

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των θέσεων CG4, CG8 και CG18 του υποκινητή του γονιδίου συσχετίστηκαν με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5*.

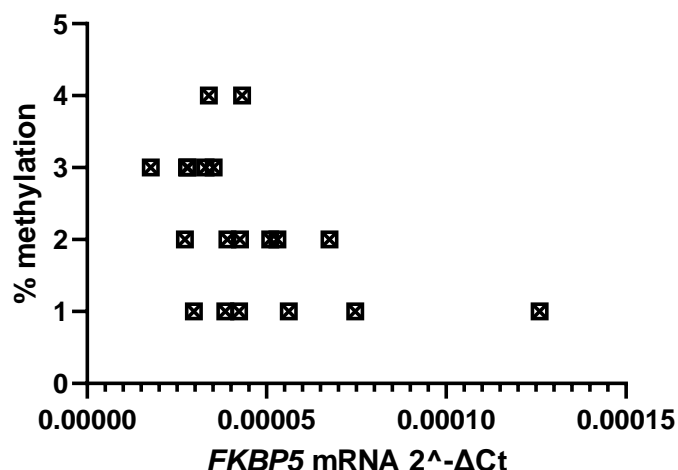


**Εικόνα 70:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης της θέσης CG4 της νησίδας CpG του υποκινητή συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5 μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=-0,6143$ ,  $**p - value=0,005134$ ).

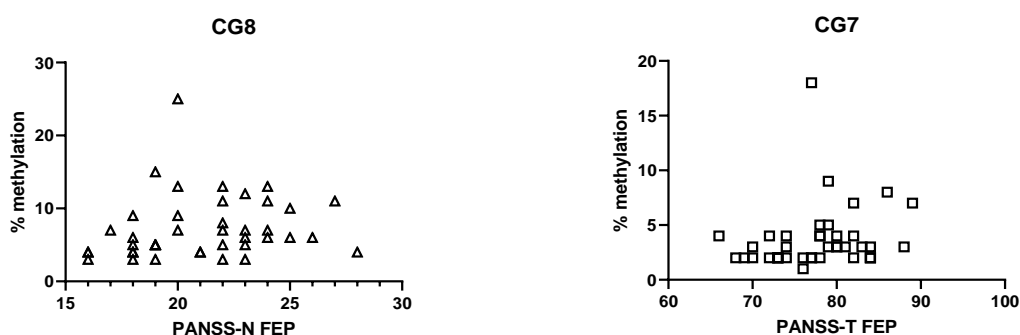


**Εικόνα 71:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης της θέσης CG8 της νησίδας CpG του υποκινητή συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5 μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=0,5034$ ,  $*p - value=0,028$ ).

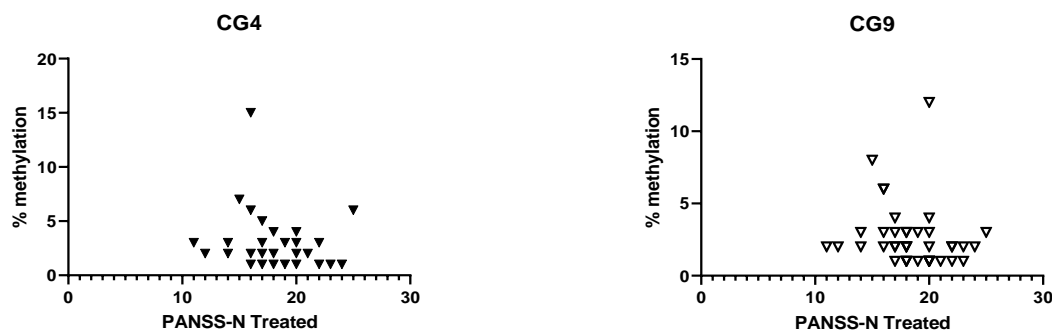
## CpG18



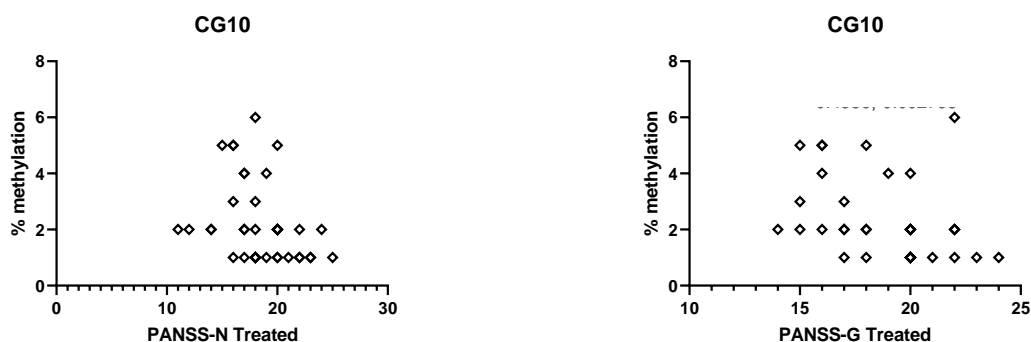
**Εικόνα 72:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης της θέσης CG18 της νησίδας CpG του υποκινητή συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5 μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=-0,4792$ ,  $*p - value=0,03791$ ).



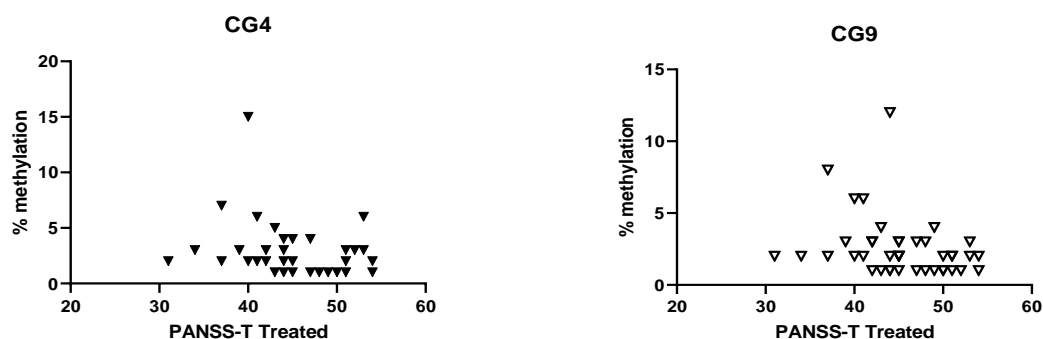
**Εικόνα 73:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης των θέσεων CG8 και CG9 συσχετίστηκαν θετικά με τα σκορ των κλιμάκων PANSS-N και PANSS-T στα δείγματα ατόμων με ΠΨΕ (Spearman's correlation,  $r=0,3317$  και  $*p - value=0,03411$  και  $r=0,3147$  και  $*p - value=0,04509$ ).



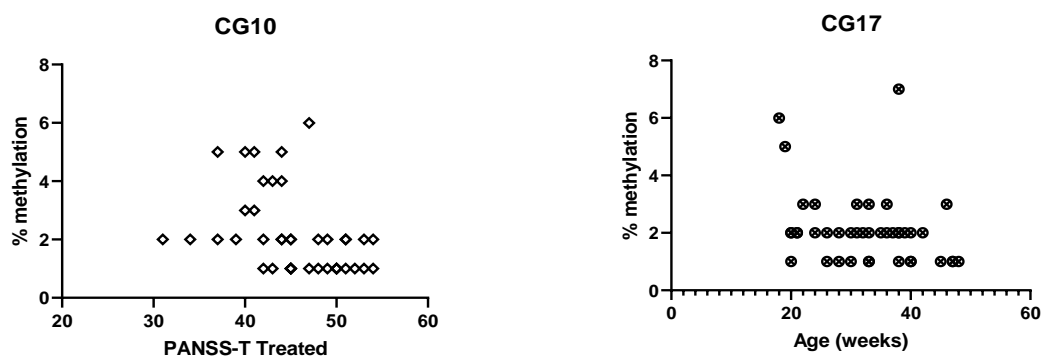
**Εικόνα 74:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης των θέσεων CG4 και CG9 συσχετίστηκαν αρνητικά μετα σκορ της κλίμακας PANSS-N σε άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=-0,3259$  και  $*p - value=0,03760$  και  $r=-0,3256$  και  $*p - value=0,03778$ ).



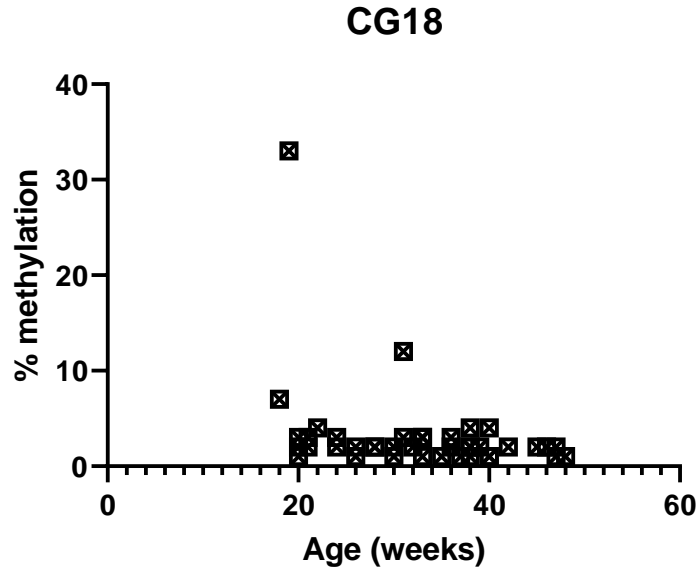
**Εικόνα 75:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης της θέσης CG10 συσχετίστηκαν αρνητικά με τα σκορ στις κλίμακες PANSS-N και PANSS-G σε άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=-0,3955$  και  $*p - value=0,01049$  και  $r=-0,4556$  και  $**p - value=0,002758$ ).



**Εικόνα 76:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης των θέσεων CG4 και CG9 συσχετίστηκαν αρνητικά με τα σκορ της κλίμακας PANSS-T σε άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά (Spearman's correlation,  $r=-0,3333$  και  $*p - value=0,0332$  και  $r=-0,3372$  και  $*p - value=0,03107$ ).



**Εικόνα 77:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης των θέσεων CG10 και CG17 συσχετίστηκαν αρνητικά με τα σκορ της κλίμακας PANSS-T σε άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά καθώς και με την ηλικία κάθε ατόμου (Spearman's correlation,  $r=-0,5031$  και  $**p - value=0,0008006$  και  $r=-0,3131$  και  $*p - value=0,04620$ ).



**Εικόνα 78:** Τα επίπεδα μεθυλίωσης της θέσης CG18 συσχετίστηκαν αρνητικά με την ηλικία κάθε ατόμου με ΠΨΕ (Spearman's correlation,  $r=-0,3448$  και  $*p-value=0,02725$ ).

#### Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Συμπεριφορικά ευρήματα

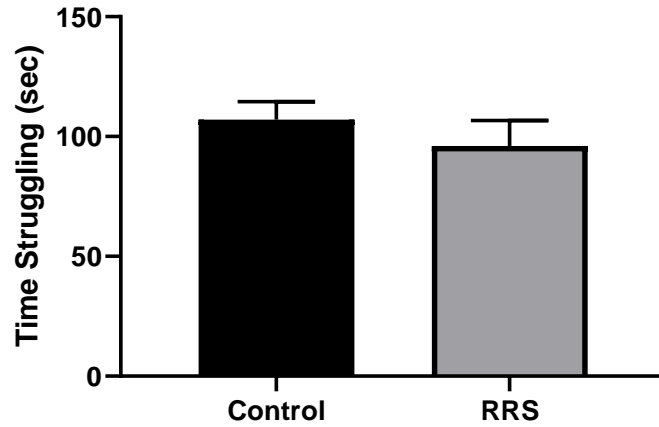
Μετρήσεις σωματικού βάρους μυών που υπέστησαν στρες περιορισμού και μυών ελέγχου

	Βάρος RRS (g)	Βάρος Control (g)	p-value
<b>Ημέρα 1</b>	27,67	30,57	0,0212
<b>Ημέρα 8</b>	26,11	30,00	0,0011
<b>Ημέρα 15</b>	26,56	29,86	0,0108
<b>Ημέρα 22</b>	26,78	30,71	0,0029

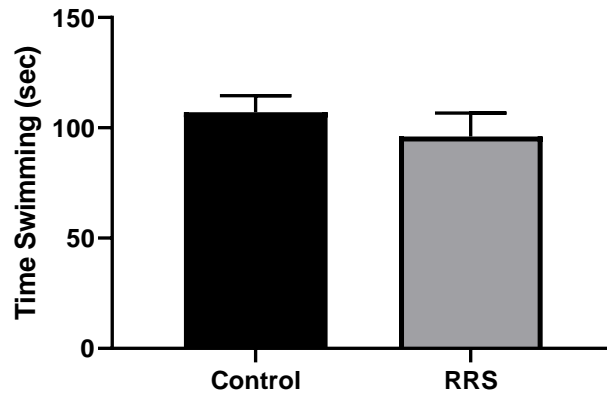
**Πίνακας 2:** Οι μύες ζυγίστηκαν τέσσερις φορές κατά τη διαδικασία του απρόβλεπτου επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μέσοι όροι του βάρους για την ομάδα του στρες και την ομάδα ελέγχου. Σε κάθε περίπτωση τα βάρη των μυών που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερα από τα βάρη των πειραματοζώων που αποτέλεσαν το δείγμα μαρτύρων. Χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney test για τη στατιστική ανάλυση.

#### Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης

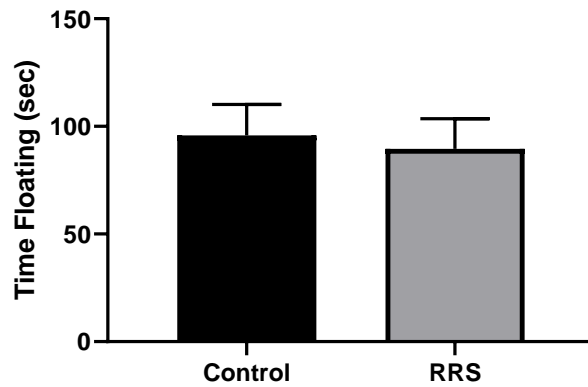
Κατά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης οι παράμετροι που καταμετρήθηκαν ήταν ο χρόνος κίνησης του μυός (time struggling), ο χρόνος που ο μυς κολυμπάει ενεργά (time swimming), ο χρόνος που ο μυς επιπλέει (time floating) και ο χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι το πρώτο συμβάν ακινησίας (latency floating). Οι μύες που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού συγκρίθηκαν με τους μύες που αποτέλεσαν δείγματα μάρτυρες.



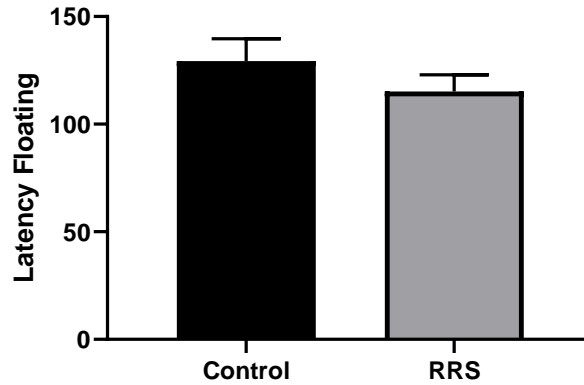
**Εικόνα 79:** Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο χρόνο κίνησης των πειραματοζώων που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού και στα πειραματόζωα που αποτέλεσαν δείγμα ελέγχου (Unpaired t-test,  $p$  – value=0,4369).



**Εικόνα 80:** Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο χρόνο κολύμβησης των στρεσαρισμένων μυνών συγκριτικά με το χρόνο κολύμβησης των μυνών του δείγματος μαρτύρων (Unpaired t-test,  $p$  – value=0,4369).



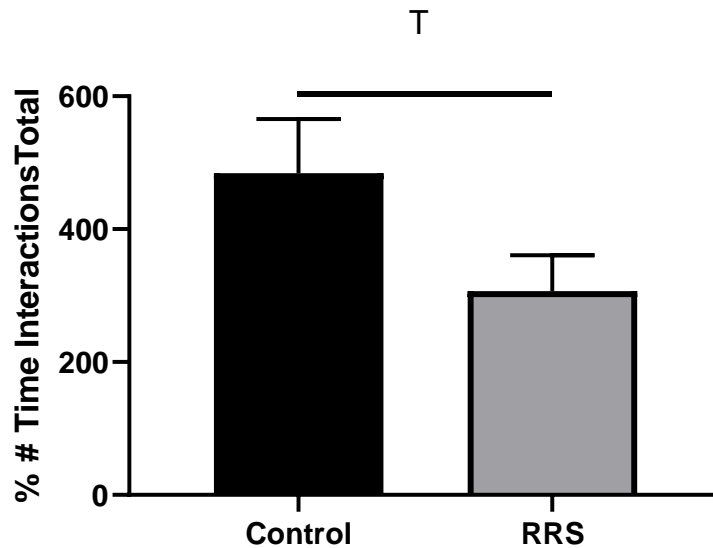
**Εικόνα 81:** Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ του χρόνου που επέπλεαν οι στρεσαρισμένοι μύες και του αντίστοιχου χρόνου των μυνών του δείγματος μαρτύρων (Unpaired t-test,  $p$  – value=0,7635).



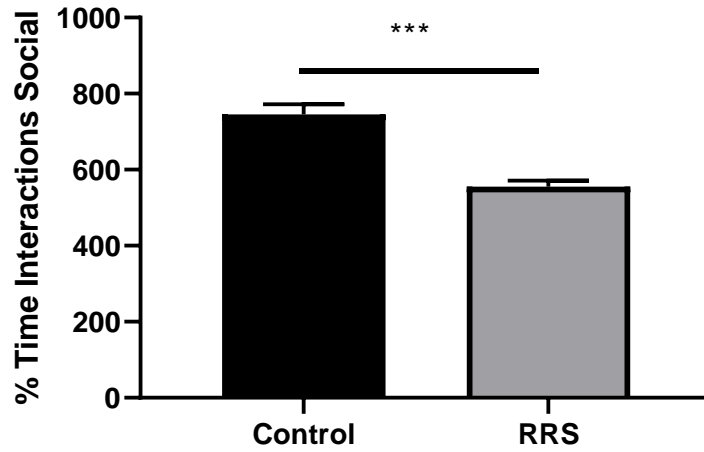
**Εικόνα 82:** Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο χρόνο από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι το πρώτο συμβάν ακινησίας μεταξύ των δύο ομάδων μυών (Mann-Whitney,  $p$  – value=0,4821).

#### Δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής

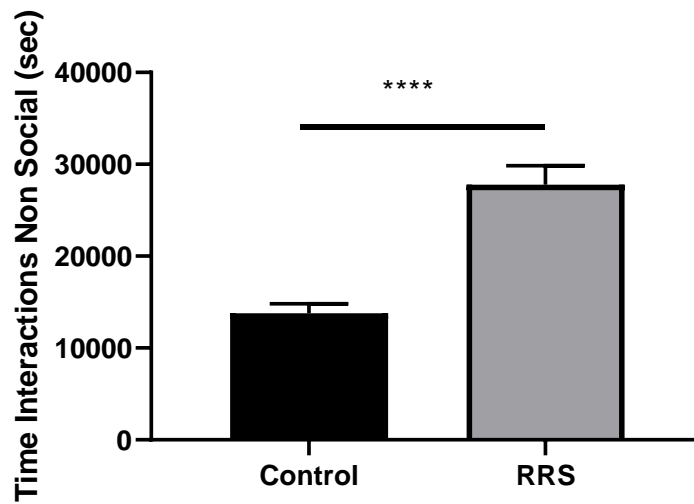
Οι παράμετροι που μελετήθηκαν κατά τη δοκιμασία αυτή ήταν το ποσοστό του αριθμού των κοινωνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μυών (% # time interactions social), το ποσοστό του χρόνου της κοινωνικής αλληλεπίδρασης (% time interactions social), ο χρόνος που ο υπό μελέτη μυς διερευνά τον άδειο κύλινδρο (time interactions non-social), ο χρόνος που ο υπό μελέτη μυς αλληλεπιδρά με τον έγκλειστο μυ (time interactions social), καθώς και ο συνολικός χρόνος αλληλεπίδρασης μεταξύ του μυ και του κυλίνδρου (total time interactions).



**Εικόνα 83:** Τάση προς μείωση στο ποσοστό του αριθμού των κοινωνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στρεσαρισμένων μυών και των μυών του δείγματος μαρτύρων (Unpaired  $t$ -test,  $p$  – value=0,0799).

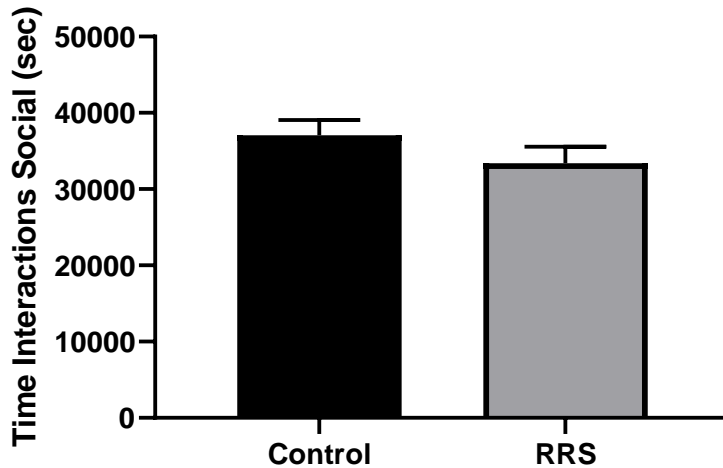


**Εικόνα 84:** Οι στρεσαρισμένοι μύες εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό χρόνου κοινωνικής αλληλεπίδρασης σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ, \*\*\* $p$  – value=0,0003).

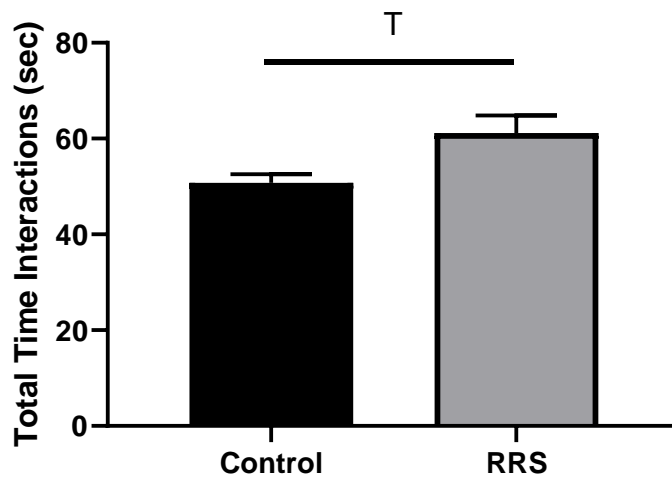


**Εικόνα 85:** Οι στρεσαρισμένοι μύες εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο χρόνο μη κοινωνικής αλληλεπίδρασης σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων (Unpaired  $t$ -test, \*\*\*\* $p$  – value<0,0001).





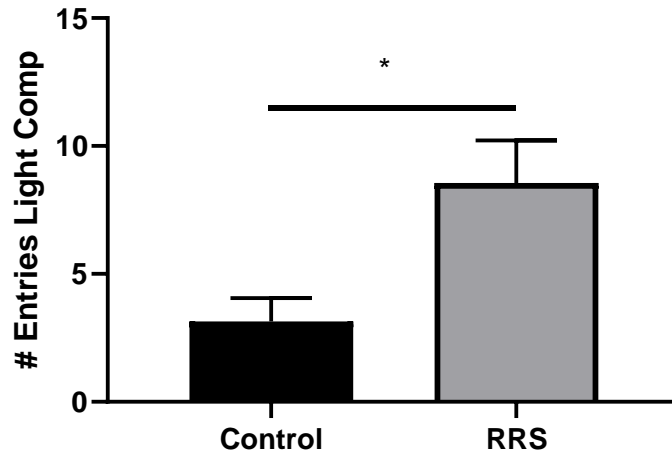
**Εικόνα 86:** Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο χρόνο κοινωνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των στρεσαρισμένων μωών και των μωών που αποτέλεσαν το δείγμα μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,3884$ ).



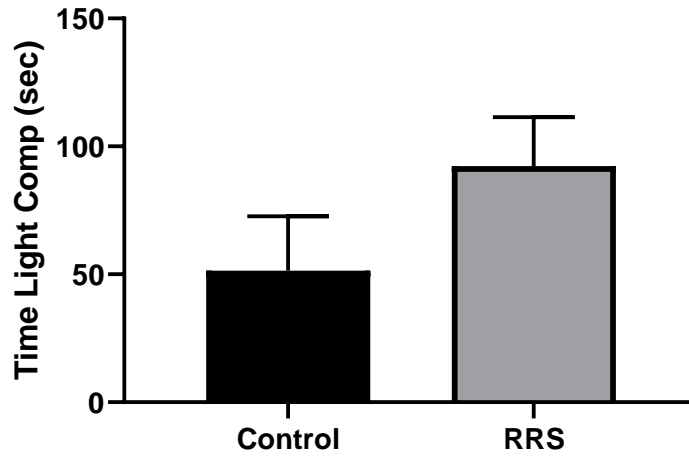
**Εικόνα 87:** Τάση προς αύξηση στο συνολικό χρόνο αλληλεπίδρασης μεταξύ των στρεσαρισμένων μωών και των μωών του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney τεστ,  $p - value=0,0879$ ).

#### Δοκιμασία Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου

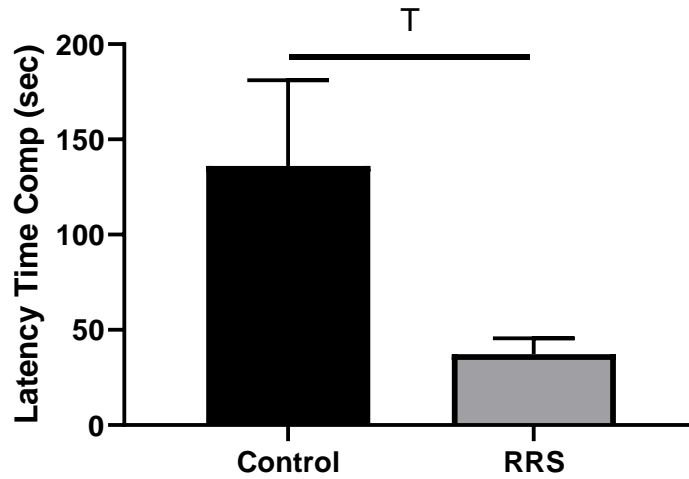
Κατά τη διαδικασία αυτή καταγράφηκαν ο αριθμός εισόδων κάθε μυ στο φωτεινό πεδίο (entries light compartment), ο χρόνος διαμονής κάθε μυ στο φωτεινό πεδίο (time light compartment) και ο χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι την είσοδο στο φωτεινό πεδίο (latency light compartment).



**Εικόνα 88:** Οι στρεσαρισμένοι μύες εμφάνισαν υψηλότερο αριθμό εισόδων στο φωτεινό πεδίο, σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων (Unpaired t-test, \* $p$  – value=0,0201).

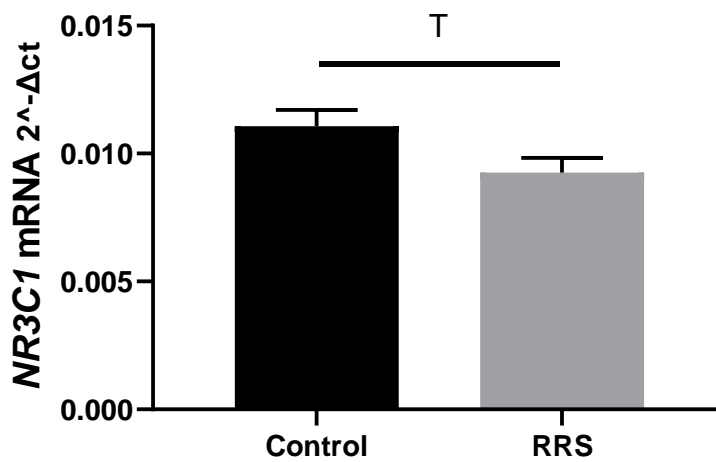


**Εικόνα 89:** Ο χρόνος διαμονής στο φωτεινό πεδίο δε φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των στρεσαρισμένων μυών και των μυών που αποτέλεσαν το δείγμα μαρτύρων (Unpaired t-test,  $p$  – value=0,1766).

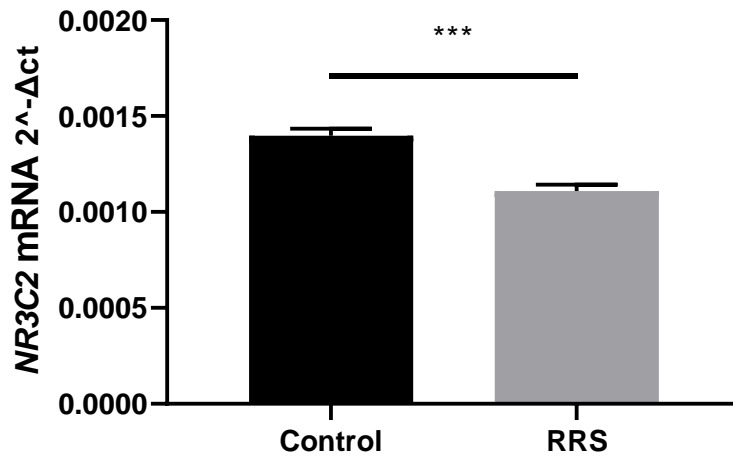


**Εικόνα 90:** Οι στρεσαρισμένοι μύες φαίνεται να εμφανίζουν μια τάση για μειωμένο ο χρόνο από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι την είσοδο στο φωτεινό πεδίο (Mann-Whitney τεστ,  $p - value = 0,0693$ )

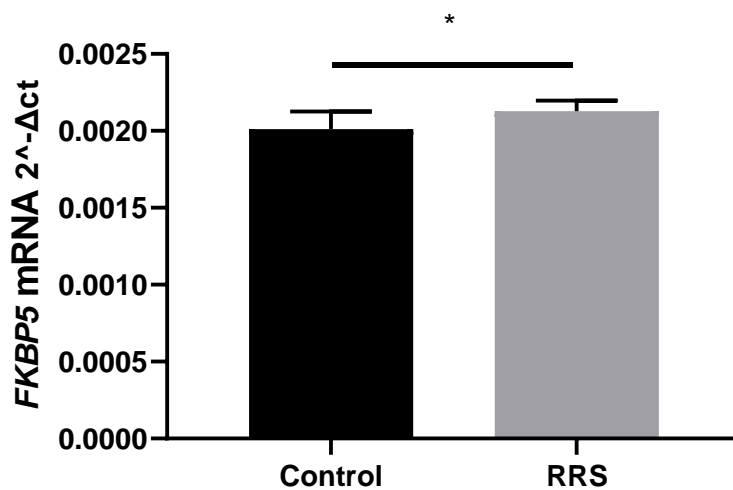
#### Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Μοριακά ευρήματα



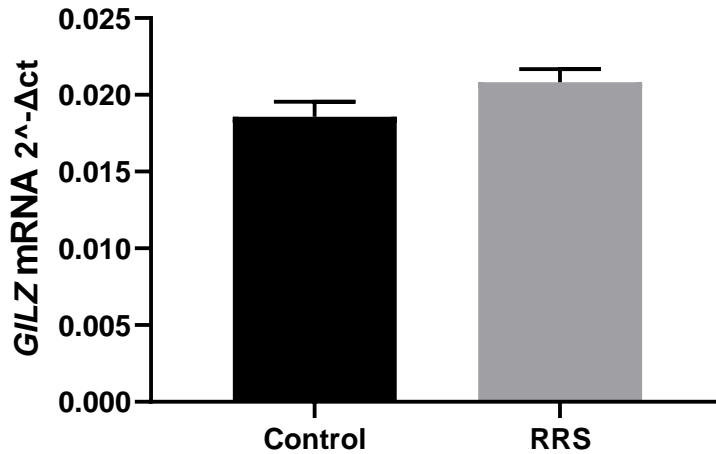
**Εικόνα 91:** Τάση προς μείωση μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου NR3C1 των στρεσαρισμένων μυών συγκριτικά με αυτά των μυών του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney,  $p - value = 0,0712$ ).



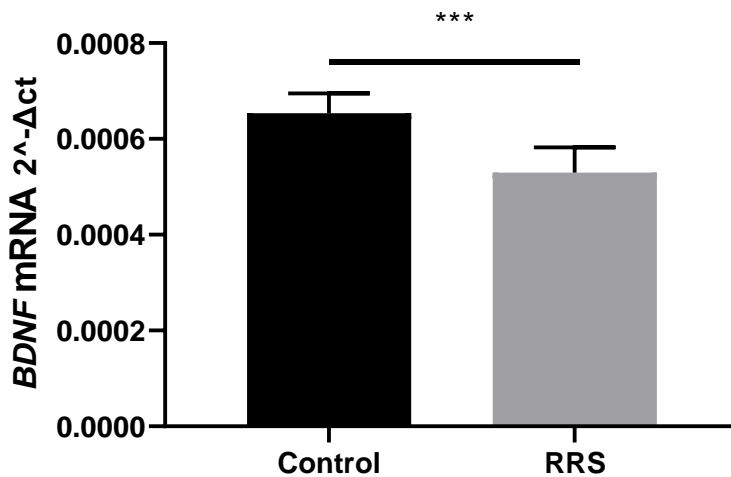
**Εικόνα 92:** Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου NR3C2 των στρεσαρισμένων μών συγκριτικά με αυτά των μών του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney test, \*\*\* $p$  – value=0,0003).



**Εικόνα 93:** Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου FKBP5 των στρεσαρισμένων μών συγκριτικά με τους μύες του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney, \* $p$  – value=0,0274).

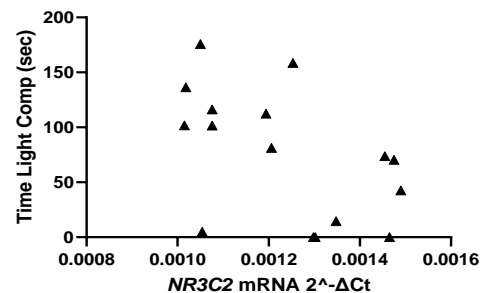
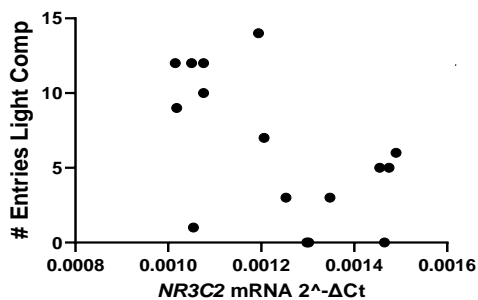


**Εικόνα 94:** Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου GILZ μεταξύ των στρεσαρισμένων μυών και των μυών του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney,  $p$ -value=0,1738).

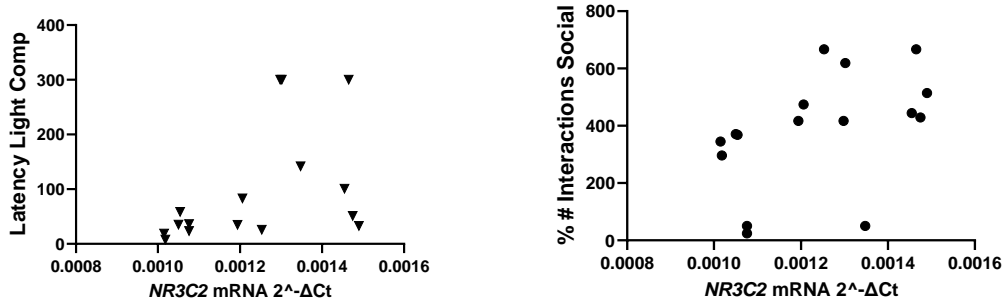


**Εικόνα 95:** Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου BDNF των στρεσαρισμένων μυών σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων (Mann-Whitney, \*\*\* $p$ -value=0.0006).

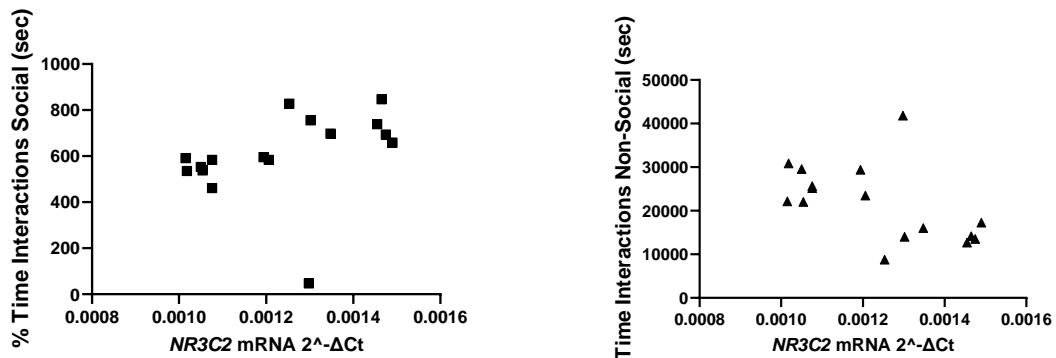
**Επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού σε μύες – Συσχετίσεις συμπεριφορικών και μοριακών ευρημάτων**



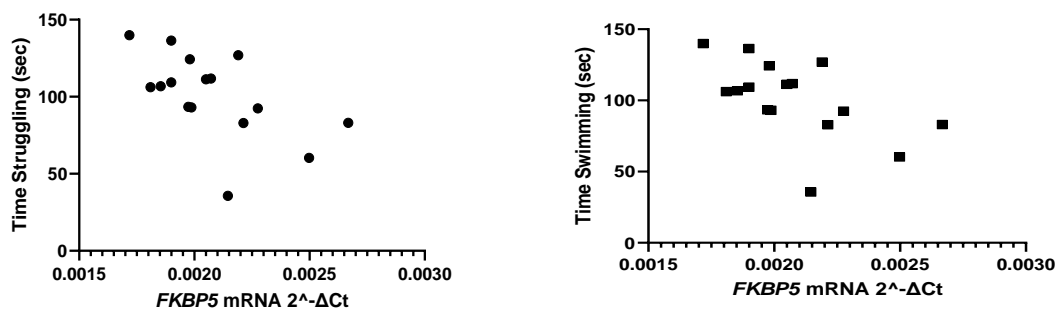
**Εικόνα 96:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C2 συσχετίστηκαν αρνητικά με τις παραμέτρους «αριθμός εισόδων στο φωτεινό πεδίο» και «χρόνος στο φωτεινό πεδίο» της δοκιμασίας Σκοτεινού/Φωτεινού πεδίου (Spearman's correlation,  $r=-0,5556$  και  $*p - value=0,02734$  και  $r=-0,5919$  και  $*p - value=0,01761$ , αντίστοιχα).



**Εικόνα 97:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C2 συσχετίστηκαν θετικά με τη λανθάνουσα κατάσταση παραμονής στο φωτεινό πεδίο της δοκιμασίας Σκοτεινού/Φωτεινού πεδίου και με το ποσοστό του αριθμού κοινωνικών αλληλεπιδράσεων της δοκιμασίας Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής (Spearman's correlation,  $r=0,5335$  και  $*p - value=0,0282$  και  $r=0,5996$  και  $*p - value=0,0158$ , αντίστοιχα).



**Εικόνα 98:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NR3C2 συσχετίστηκαν θετικά με το ποσοστό του χρόνου κοινωνικής αλληλεπίδρασης και αρνητικά με το χρόνο μη κοινωνικής αλληλεπίδρασης στη δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής (Spearman's correlation,  $r=0,6237$  και  $*p - value=0,01127$  και  $r=-0,6107$  και  $*p - value=0,01363$ , αντίστοιχα).



**Εικόνα 99:** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου FKBP5 συσχετίστηκαν αρνητικά με το χρόνο κίνησης και το χρόνο κολύμβησης των μύων στη δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης

(Spearman's correlation,  $r=-0,5960$  και  $*p - value=0,01661$  και  $r=-0,5960$  και  $*p - value=0,01661$ , αντίστοιχα).

	Δείγματα ΠΥΕ	Δείγματα Μυών
<b>NR3C1</b>	<->	↓
<b>NR3C2</b>	↓	↓
<b>FKBP5</b>	↑	↑
<b>GILZ</b>	↑	<->
<b>BDNF</b>	-	↓

**Πίνακας 3:** Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων επιπέδων mRNA στο δείγμα ατόμων με ΠΥΕ και στο δείγμα μυών που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού, σε σύγκριση με τα εκάστοτε δείγματα μαρτύρων. Παρατηρείται κοινή τάση προς μείωση στο γονίδιο NR3C2 και κοινή τάση προς αύξηση στο γονίδιο FKBP5 στα άτομα με ΠΥΕ και στο μοντέλο στρες σε μύες.

## Συζήτηση

Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών του στρες σε ένα δείγμα ατόμων με Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο (ΠΥΕ) καθώς και η μελέτη μοριακών και συμπεριφορικών παραμέτρων σε ένα μοντέλο επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού σε τρωκτικά.

Αρχικά διερευνήθηκαν οι κατανομές πολυμορφισμών ενδιαφέροντος στα δείγματα με ΠΥΕ και συγκρίθηκαν με το δείγμα μαρτύρων. Συγκεκριμένα γονοτυπήθηκαν οι πολυμορφισμοί 5-HTTLPR, rs1360780 και rs3800373 των γονιδίων *SLC6A4* και *FKBP5*, τα οποία αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της σεροτονινεργικής διαβίβασης και της απόκρισης στο στρες αντίστοιχα. Τα ποσοστά του πολυμορφισμού 5-HTTLPR δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με ΠΥΕ και των δειγμάτων μαρτύρων. Οι πολυμορφισμοί rs1360780 και rs3800373 του γονιδίου *FKBP5* βρέθηκαν σε υψηλή ανισορροπία γενετικής σύνδεσης ( $r^2=0,83$ ,  $D^2=1$ ) και ισορροπία Hardy-Weinberg. Αυτό καταδεικνύει πως η περιοχή του γονιδίου αυτού είναι ισχυρά συντηρημένη και δεν είναι πιθανό να παρουσιάζει γενετικό ανασυνδυασμό, ενώ τα δεδομένα της παρούσας εργασίας δεν αποκλίνουν από τα πληθυσμιακά δεδομένα των πολυμορφισμών αυτών. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με εκείνα που παρουσιάζονται στη μελέτη των Binder et al., και υποστηρίζουν το υψηλό ποσοστό γενετικής ανισορροπίας που διακρίνει το γονίδιο *FKBP5* (191). Παρατηρήθηκε επίσης, πως ενώ δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών εμφάνισης κάθε πολυμορφισμού στα δείγματα, η παρουσία των αλληλομόρφων T και C των πολυμορφισμών rs1360780 και rs3800373 ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε αμφότερα τα δείγματα ΠΥΕ και τα δείγματα μάρτυρες, σε σχέση με τα αλληλόμορφα C και A. Επιπλέον, η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου κινδύνου T του πολυμορφισμού rs1360780 συσχετίστηκε με υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N και χαμηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-G των δειγμάτων ΠΥΕ συγκριτικά με τα δείγματα που ήταν ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο C, αλλά και με υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N των δειγμάτων με ΠΥΕ κατόπιν της θεραπείας με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά, σε σύγκριση με τα δείγματα που έφεραν το προστατευτικό αλληλόμορφο C. Συνδυαστικά, η παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου T και C των πολυμορφισμών rs1360780 και rs3800373 αντίστοιχα στα άτομα με ΠΥΕ, συσχετίστηκε με στατιστικά

σημαντικά αυξημένα σκορ στην κλίμακα PANSS-N και μειωμένα σκορ στην κλίμακα PANSS-G, σε σύγκριση με άτομα με ΠΨΕ που έφεραν τα προστατευτικά αλληλόμορφα C και A των πολυμορφισμών αυτών.

Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5* και *GILZ* σε μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος των ατόμων με ΠΨΕ και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα επίπεδα των γονιδίων των ατόμων που αποτέλεσαν δείγμα ελέγχου. Συγκεκριμένα στα άτομα με ΠΨΕ στην οξεία φάση της νόσου, παρατηρήθηκαν σταθερά επίπεδα του γονιδίου *NR3C1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και μειωμένα επίπεδα του γονιδίου *NR3C2* (MR), που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρες, ενώ ο λόγος MR/GR βρέθηκε σημαντικά μειωμένος. Η παρατηρηθείσα απώλεια των υποδοχέων MR πιθανά είναι αποτέλεσμα της κατιούσας ρύθμισης του υποδοχέα, λόγω μιας ξαφνικής και απότομης αύξησης των επιπέδων κορτιζόλης που οδήγησε στη δραματική μείωση των επιπέδων των υποδοχέων MR. Το γονίδιο *FKBP5* βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένο πριν τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά, ανεξαρτήτως της κατανομής των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs1360780 και rs3800373 που πιθανά ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου και είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της μελέτης των Sinclair et al., (103). Τα ευρήματα σχετικά με τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *NR3C1* και *FKBP5* συμφωνούν με αυτά που αναγράφονται στη μελέτη των Lee et al., και αφορούν σε δείγμα πληθυσμού με σχιζοφρένεια (198). Σε ένα ανεξάρτητο δείγμα ατόμων με ΠΨΕ, τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα, γεγονός που υπογραμμίζει την αναγκαιότητα επιβεβαίωσης των ευρημάτων αυτών σε μεγαλύτερους πληθυσμούς. Τέλος, τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στα δείγματα με ΠΨΕ σε σχέση με το δείγμα μαρτύρων.

Τα επίπεδα των γονιδίων ενδιαφέροντος μελετήθηκαν και στα δείγματα ατόμων με ΠΨΕ πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* παρέμειναν σταθερά ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *NR3C2* βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα. Ο λόγος των MR/GR παρατηρήθηκε επίσης μειωμένος, γεγονός που αντικατοπτρίζει την εμμένουσα απορρύθμιση της λειτουργίας του άξονα ΥΨΕ. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* παρέμειναν σημαντικά αυξημένα, χαρακτηριστικό που πιθανά υποδηλώνει την παραμονή του ενεργού υποδοχέα GR στο κυτταρόπλασμα και την ανεσταλμένη αρνητική ανατροφοδότηση που συνεπάγεται αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Επίσης, άτομα με ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας και ετερόζυγα για τους δύο πολυμορφισμούς rs1360780 και rs3800373, συγκεκριμένα με γονότυπο CT και AC παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* σε σύγκριση με άτομα ομόζυγα για τα προστατευτικά ή τα αλληλόμορφα κινδύνου των δυο πολυμορφισμών. Τέλος, τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* μετά τη θεραπεία φαίνεται να επανέρχονται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των δειγμάτων μαρτύρων, καθιστώντας την αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου αυτού χαρακτηριστικό της οξείας φάσης της νόσου και πιθανό κατά συνθήκη (state) βιοδείκτη.

Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος μελετήθηκαν σε 21 δείγματα ατόμων με ΠΨΕ και συγκρίθηκαν πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα του γονιδίου *NR3C1* παραμένουν αμετάβλητα, ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *NR3C2* μειώνονται μετά τη θεραπεία. Ο λόγος MR/GR παρουσιάζει μια τάση προς μείωση. Τα επίπεδα του γονιδίου *FKBP5* υφίστανται στατιστικά σημαντική μείωση, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά, πιθανώς λόγω



μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Τέλος, τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* μειώνονται επίσης.

Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* συσχετίστηκαν θετικά με τα αντίστοιχα του γονιδίου *FKBP5*, γεγονός που αντικατοπτρίζει πως μια αύξηση στο ένα γονίδιο οδηγεί σε αύξηση στο άλλο. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο, καθώς το *FKBP5* αποτελεί μεταγραφικό στόχο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Επίσης, τα επίπεδα του *FKBP5* συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα του *GILZ* καθώς και τα δύο γονίδια αποτελούν μεταγραφικούς στόχους του υποδοχέα GR. Τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* συσχετίστηκαν θετικά με το δείκτη μάζας σώματος BMI των ατόμων με ΠΨΕ, ενώ τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* συσχετίστηκαν θετικά με τα σκορ της κλίμακας PANSS-G και το χρονικό διάστημα, σε εβδομάδες που πέρασε από την έναρξη των συμπτωμάτων μέχρι την έναρξη της θεραπείας (DUP).

Περαιτέρω μελετήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης της νησίδας CpG της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *FKBP5*. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα μεθυλίωσης σε 18 θέσεις CG της νησίδας αυτής συγκρίθηκαν μεταξύ των ατόμων με ΠΨΕ και των ατόμων που αποτέλεσαν δείγμα μαρτύρων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη μεθυλίωση μεταξύ των δυο ομάδων ενδιαφέροντος, γεγονός που πιθανά να οφείλεται στο ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται συστατικά ή η ρύθμισή του συμβαίνει σε κάποιο σημείο κάτωθι της περιοχής του υποκινητή. Το ποσοστό μεθυλίωσης της θέσης CG4 συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* σε άτομα με ΠΨΕ πριν τη θεραπεία, ενώ το ποσοστό μεθυλίωσης της θέσης CG8 συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα του γονιδίου πριν τη θεραπεία. Επίσης, το ποσοστό μεθυλίωσης της θέσης CG18 συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Το ποσοστό μεθυλίωσης των θέσεων CG8 και CG7 συσχετίστηκε θετικά με τα σκορ στις κλίμακες PANSS-N και PANSS-T αντίστοιχα στα άτομα με ΠΨΕ, ενώ τα ποσοστά μεθυλίωσης των θέσεων CG4 και CG9 συσχετίστηκαν αρνητικά με τα σκορ της κλίμακας PANSS-N στα άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Το ποσοστό μεθυλίωσης της θέσης CG10 συσχετίστηκε αρνητικά με τα σκορ στις κλίμακες PANSS-N και PANSS-G στα άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία, ενώ τα ποσοστά μεθυλίωσης των θέσεων CG4 και CG9 συσχετίστηκαν αρνητικά με το σκορ της κλίμακας PANSS-T σε άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία. Το ποσοστό μεθυλίωσης της θέσης CG10 συσχετίστηκε αρνητικά με το σκορ της κλίμακας PANSS-T στα άτομα με ΠΨΕ μετά τη θεραπεία, ενώ τα ποσοστά μεθυλίωσης των θέσεων CG17 και CG18 συσχετίστηκαν αρνητικά με την ηλικία των ατόμων με ΠΨΕ. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνει η ηλικία φαίνεται να μειώνονται τα ποσοστά μεθυλίωσης των θέσεων αυτών στο ΠΨΕ.

Στο μοντέλο επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού σε τρωκτικά, διενεργήθηκε μια σειρά συμπεριφορικών τεστ που περιλάμβανε τη δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης, τη δοκιμασία Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής και τη δοκιμασία Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας Εξαναγκασμένης Κολύμβησης μελετήθηκε ο χρόνος κίνησης του μυός στο νερό, ο χρόνος ενεργής κολύμβησης, ο χρόνος που ο μυς επιπλέει και ο χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι το πρώτο συμβάν ακινησίας. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των στρεσαρισμένων μυών και των μυών του δείγματος μαρτύρων. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό του αριθμού κοινωνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στρεσαρισμένων μυών και των μυών του δείγματος μαρτύρων. Αντιθέτως, το ποσοστό του χρόνου κοινωνικής

αλληλεπίδρασης παρατηρήθηκε μειωμένο για τους στρεσαρισμένους μύες σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων, ενώ ο χρόνος που ο υπό μελέτη μυς διερευνά τον άδειο κύλινδρο ήταν αυξημένος για τα στρεσαρισμένα πειραματόζωα. Τέλος, χρόνος που ο υπό μελέτη μυς αλληλεπιδρά με τον έγκλειστο μυ, όπως και ο συνολικός χρόνος αλληλεπίδρασης μεταξύ του μυ και του κυλίνδρου δεν διέφεραν μεταξύ των στρεσαρισμένων πειραματόζωων και των πειραματόζωων ελέγχου. Κατά τη δοκιμασία Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου, μελετήθηκε ο αριθμός εισόδων κάθε μυ στο φωτεινό πεδίο και βρέθηκε αυξημένος για τα στρεσαρισμένα πειραματόζωα γεγονός που συμφωνεί με τα ευρήματα των Engelhardt et al., αναφορικά με στρεσαρισμένα πειραματόζωα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *FKBP5* (210), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις παραμέτρους «χρόνος διαμονής στο φωτεινό πεδίο» και «χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι την είσοδο στο φωτεινό πεδίο» για τους στρεσαρισμένους μύες και τους μύες του δείγματος μαρτύρων.

Τα γονίδια ενδιαφέροντος μελετήθηκαν και στο δείγμα πειραματόζωων που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C1* εμφανίζουν μια τάση προς μείωση στους στρεσαρισμένους μύες σε σχέση με τους μύες του δείγματος μαρτύρων, ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *NR3C2* όπως και στα δείγματα με ΠΨΕ και του γονιδίου *BDNF* παρατηρήθηκαν μειωμένα στα στρεσαρισμένα πειραματόζωα, χαρακτηριστικό που πιθανά οφείλεται στην αύξηση των γλυκοκορτικοειδών λόγω στρες (117, 409). Τα επίπεδα του γονιδίου *FKBP5* παρατηρήθηκαν αυξημένα στους μύες που υπέστησαν περιορισμό χαρακτηριστικό που παρατηρείται ευρέως κατόπιν περιορισμού κίνησης (410), ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* παρέμειναν αμετάβλητα. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* συσχετίστηκαν αρνητικά με τις παραμέτρους «αριθμός εισόδων στο φωτεινό πεδίο» και «χρόνος παραμονής στο φωτεινό πεδίο», ενώ συσχετίστηκαν θετικά με την παράμετρο «χρόνος από την αρχή της μαγνητοσκόπησης του πειράματος μέχρι την είσοδο στο φωτεινό πεδίο» της δοκιμασίας Σκοτεινού/Φωτεινού Πεδίου. Τα επίπεδα του γονιδίου *NR3C2* συσχετίστηκαν θετικά με τις παραμέτρους «ποσοστό του αριθμού κοινωνικών αλληλεπιδράσεων» και «ποσοστό του χρόνου κοινωνικών αλληλεπιδράσεων» και αρνητικά με την παράμετρο «χρόνος μη κοινωνικών αλληλεπιδράσεων» της δοκιμασίας Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής. Τέλος, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *FKBP5* συσχετίστηκαν αρνητικά με τις παραμέτρους «χρόνος κίνησης του μυός στο νερό» και «χρόνος ενεργής κολύμβησης».

## Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η κατανομή των πολυμορφισμών του γονιδίου *FKBP5* που συσχετίζονται με την απόκριση στο στρες. Οι πολυμορφισμοί rs1360780 και rs3800373 βρέθηκαν σε υψηλή ανισορροπία γενετικής σύνδεσης και σε ισορροπία Hardy-Weinberg με τα δεδομένα γενικού πληθυσμού. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία των αλληλομόρφων T και C των παραπάνω πολυμορφισμών, σε σχέση με τα αλληλόμορφα C και A, ενώ η παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού rs1360780 συσχετίστηκε με υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N και χαμηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-G, αλλά και με υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N των δειγμάτων ΠΨΕ κατόπιν θεραπείας με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Επιπλέον η παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου T και C των ανωτέρω πολυμορφισμών

συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντικά αυξημένα σκορ στην κλίμακα PANSS-N και μειωμένα σκορ στην κλίμακα PANSS-G. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα στα άτομα ΠΨΕ πριν και μετά τη θεραπεία, ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *FKBP5* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα. Τα επίπεδα του γονιδίου *GILZ* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα, ενώ φαίνεται να επανέρχονται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά στο γενικό πληθυσμό, μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά. Τα επίπεδα μεθυλίωσης της νησίδας CpG του υποκινητή του γονιδίου *FKBP5* βρέθηκαν μη μεθυλιωμένα, υποδηλώνοντας πως το γονίδιο αυτό παραμένει πιθανότατα συστατικά ενεργό ή πως ρυθμίζεται σε περιοχές κάτωθι του υποκινητή. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα σε ανεξάρτητο δείγμα πληθυσμού με ΠΨΕ, γεγονός που υπογραμμίζει την αναγκαιότητα επιβεβαίωσης των ευρημάτων σε μεγαλύτερους πληθυσμούς. Από το μοντέλο απρόβλεπτου επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού σε μύες, προέκυψαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2*, ενώ τα επίπεδα του γονιδίου *FKBP5* παρατηρήθηκαν αυξημένα. Από τα ευρήματα αυτά προκύπτουν παρόμοια επίπεδα mRNA στους μοριακούς τελεστές της απόκρισης στο στρες στο ΠΨΕ και στο μοντέλο επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού στα τρωκτικά. Συμπερασματικά, παρατηρείται μια απορρύθμιση των τελεστών του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων σε ασθενείς με ΠΨΕ και στο ζωικό μοντέλο, που καθιστά την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων επιτακτική.

## Περίληψη

Η σχιζοφρένεια αποτελεί μια σημαντική νευροψυχιατρική νόσο και επηρεάζει το 1% του γενικού πληθυσμού. Η έναρξη της νόσου είναι οξεία και θεαματική ή βραδεία με προϊούσα πορεία. Τα συμπτώματά της περιλαμβάνουν ψευδαισθήσεις, παραληρητικές ιδέες και αποδιοργανωμένο λόγο, ενώ στην παθολογία της νόσου συμπεριλαμβάνονται ψυχωτικά επεισόδια. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν σε περιφερικό αίμα ατόμων με Πρώτο Ψυχωτικό Επεισόδιο (ΠΨΕ) και σε δείγμα ελέγχου γενικού πληθυσμού, παράγοντες που διαμεσολαβούν την απόκριση στο στρες. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα mRNA των μορίων-τελεστών που διαμεσολαβούν την απόκριση στο στρες μέσω του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) και είναι υπεύθυνα για την επαναφορά του οργανισμού στην ομοιόσταση κατόπιν έκθεσης σε στρεσογόνα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αρχικά γονοτυπήθηκαν πολυμορφισμοί των γονιδίων *SLC6A4* και *FKBP5* που φαίνεται να επηρεάζουν την απόκριση στο στρες και βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αλληλομόρφων στα δείγματα με ΠΨΕ και στο γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, η παρουσία των αλληλομόρφων κινδύνου συσχετίστηκε με υψηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-N και χαμηλότερα σκορ στην κλίμακα PANSS-G. Μελετήθηκαν έπειτα τα επίπεδα των γονιδίων *NR3C1* και *NR3C2* που κωδικοποιούν τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και αλατοκορτικοειδών (MR) αντίστοιχα και παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *NR3C2* στα δείγματα με ΠΨΕ πριν και μετά τη θεραπεία με δεύτερης γενιάς αντιψυχωτικά, ενώ η έρευνα των γονιδίων *FKBP5* και *GILZ*, που αποτελούν μεταγραφικούς στόχους του GR, αποκάλυψε αυξημένα τα επίπεδα των mRNA τους. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP5 που λειτουργεί ως συμπάραγοντας του GR σε ανεξάρτητο δείγμα ατόμων με ΠΨΕ και βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα, καθώς και τα επίπεδα μεθυλίωσης της νησίδας CpG του υποκινητή του γονιδίου *FKBP5*, τα οποία

υποδεικνύουν μια μη μεθυλιωμένη περιοχή. Επιπλέον, οι ίδιοι παράγοντες του στρες μελετήθηκαν σε επίπεδο mRNA σε ένα μοντέλο απρόβλεπτου επαναλαμβανόμενου στρες περιορισμού σε μύες. Η απόκριση στο στρες μελετήθηκε μέσω συμπεριφορικών δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας Εξαναγκασμένης Κολύμβησης, της δοκιμασίας Κοινωνικής Προτίμησης/Αποφυγής και της δοκιμασίας Σκοτεινού/Φωτεινού πεδίου στους μύες που υπέστησαν στρες και σε δείγμα ελέγχου. Τα μοριακά ευρήματα στο μοντέλο τρωκτικών συμφωνούν με τα ευρήματα των ατόμων με ΠΨΕ. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα των γονιδίων *NR3C2* και *BDNF* και αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *FKBP5* στον προμετωπιαίο φλοιό τρωκτικών που υπέστησαν επαναλαμβανόμενο στρες περιορισμού. Τα ευρήματα αυτά καθιστούν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των μοριακών τελεστών του στρες στο ΠΨΕ επιτακτική.

## Abstract

Schizophrenia is a debilitating disorder that affects 1% of the population worldwide. The onset of the disease is usually characterized by a First Episode in Psychosis (FEP) and includes delusions, hallucinations and disorganized speech. It is commonly observed in young adults and lasts lifelong. The purpose of this PhD thesis was to investigate the molecular, stress-associated underpinnings of the disease in peripheral blood of individuals with FEP, as well as in a control sample of the general population. First and foremost, polymorphisms associated with the response to stress were genotyped in order to investigate the contribution of risk alleles in the development of the disease. Specifically, the presence of the risk polymorphisms was associated with higher scores at the PANSS-N scale and lower scores at the PANSS-G scale for the FEP individuals. Furthermore, the mRNA levels of molecular stress mediators, namely *NR3C1* and *NR3C2* that encode for the glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors were analyzed and the mRNA levels of *NR3C2* were found diminished in FEP individuals before and after the treatment with second generation antipsychotics. Also, the mRNA levels of GR targets *FKBP5* and *GILZ* were examined and found higher. The aforementioned genes mediate the stress response via the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, as well as the maintenance of homeostasis. Furthermore, the levels of FKBP5 protein were assessed and found diminished in an independent cohort of FEP individuals, as well as the methylation status of the CpG island in the promoter region of *FKBP5* gene, which was observed to be unmethylated. The stress response was also studied in a model of unpredictable repeated restraint stress in C57BL/6 mice. The mRNA levels of *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *GILZ* and *BDNF* genes were assessed in prefrontal cortices of stressed and control mice. The mRNA levels of *NR3C2* and *BDNF* were found lower in stressed mice compared to controls. The behavioral response was assessed with the use of a battery of behavioral tests, including the Forced Swim test, the Social Preference/Avoidance test and the Dark/Light Box test.

## Βιβλιογραφία

1. Barbato A, Initiative WNFmH, Organization WH. Schizophrenia and public health. World Health Organization; 1997.
2. Organization WH. Mental health: a call for action by world health ministers. Mental health: a call for action by World Health Ministers 2001. p. 163-.
3. Zito JM, Safer DJ, dosReis S, Gardner JF, Boles M, Lynch F. Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers. *JAMA*. 2000;283(8):1025-30.
4. Costello EJ, Mustillo S, Erkanli A, Keeler G, Angold A. Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(8):837-44.
5. Organization WH. Global Health Estimates 2015: disease burden by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2015. Geneva, 2016. 2018.
6. Organization WH. The World Health Report 2001: Mental health: new understanding, new hope: World Health Organization; 2001.
7. Durisko Z, Mulsant BH, Andrews PW. An adaptationist perspective on the etiology of depression. *J Affect Disord*. 2015;172:315-23.
8. Durisko Z, Mulsant BH, McKenzie K, Andrews PW. Using Evolutionary Theory to Guide Mental Health Research. *Can J Psychiatry*. 2016;61(3):159-65.
9. Joness I, Blackshaw JK. An evolutionary approach to psychiatry. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2000;34(1):8-13.
10. Nesse RM. Is depression an adaptation? *Archives of general psychiatry*. 2000;57(1):14-20.
11. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ, Mack S. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.
12. van der Werf M, Hanssen M, Kohler S, et al. Systematic review and collaborative recalculation of 133,693 incident cases of schizophrenia. *Psychol Med*. 2014;44(1):9-16.
13. Remington G, Foussias G, Fervaha G, et al. Treating Negative Symptoms in Schizophrenia: an Update. *Curr Treat Options Psychiatry*. 2016;3:133-50.
14. Austin SF, Mors O, Secher RG, et al. Predictors of recovery in first episode psychosis: the OPUS cohort at 10 year follow-up. *Schizophr Res*. 2013;150(1):163-8.
15. Moffitt TE, Caspi A, Rutter M. Measured Gene-Environment Interactions in Psychopathology: Concepts, Research Strategies, and Implications for Research, Intervention, and Public Understanding of Genetics. *Perspect Psychol Sci*. 2006;1(1):5-27.
16. Carpenter WT, McGlashan TH, Strauss JS. The treatment of acute schizophrenia without drugs: an investigation of some current assumptions. *Am J Psychiatry*. 1977;134(1):14-20.
17. Rappaport M, Hopkins HK, Hall K, Belleza T, Silverman J. Are there schizophrenics for whom drugs may be unnecessary or contraindicated? *Int Pharmacopsychiatry*. 1978;13(2):100-11.
18. Bola JR, Mosher LR. Treatment of acute psychosis without neuroleptics: two-year outcomes from the Soteria project. *J Nerv Ment Dis*. 2003;191(4):219-29.
19. Balderston NL, Mathur A, Adu-Brimpong J, Hale EA, Ernst M, Grillon C. Effect of anxiety on behavioural pattern separation in humans. *Cogn Emot*. 2017;31(2):238-48.
20. Stansfeld S, Candy B. Psychosocial work environment and mental health--a meta-analytic review. *Scand J Work Environ Health*. 2006;32(6):443-62.
21. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1161-92.
22. Schanberg SM, Evoniuk G, Kuhn CM. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1984;175(2):135-46.

23. Renzi C, Provencal N, Bassil KC, et al. From Epigenetic Associations to Biological and Psychosocial Explanations in Mental Health. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;158:299-323.
24. Boks MP, de Jong NM, Kas MJ, et al. Current status and future prospects for epigenetic psychopharmacology. *Epigenetics.* 2012;7(1):20-8.
25. Evers K. Can we be epigenetically proactive?: Open MIND. Frankfurt am Main: MIND Group; 2014.
26. Mulle JG. Genomic structural variation and schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2008;10(2):171-7.
27. Belsky J, Jonassaint C, Pluess M, Stanton M, Brummett B, Williams R. Vulnerability genes or plasticity genes? *Mol Psychiatry.* 2009;14(8):746-54.
28. Ellis BJ, Boyce WT, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ, van Ijzendoorn MH. Differential susceptibility to the environment: an evolutionary--neurodevelopmental theory. *Dev Psychopathol.* 2011;23(1):7-28.
29. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(6):434-45.
30. Daskalakis NP, Binder EB. Schizophrenia in the spectrum of gene-stress interactions: the FKBP5 example. *Schizophr Bull.* 2015;41(2):323-9.
31. Daskalakis NP, Yehuda R. Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: systematic review of contributing factors. *Front Neurosci.* 2014;8:369.
32. Yehuda R, Daskalakis NP, Desarnaud F, et al. Epigenetic Biomarkers as Predictors and Correlates of Symptom Improvement Following Psychotherapy in Combat Veterans with PTSD. *Front Psychiatry.* 2013;4:118.
33. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics.* 2008;3(2):97-106.
34. Campos EI, Stafford JM, Reinberg D. Epigenetic inheritance: histone bookmarks across generations. *Trends Cell Biol.* 2014;24(11):664-74.
35. Misiak B, Stramecki F, Gaweda L, et al. Interactions Between Variation in Candidate Genes and Environmental Factors in the Etiology of Schizophrenia and Bipolar Disorder: a Systematic Review. *Mol Neurobiol.* 2018;55(6):5075-100.
36. Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res.* 1982;17(4):319-34.
37. Keshavan MS, Anderson S, Pettegrew JW. Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited. *J Psychiatr Res.* 1994;28(3):239-65.
38. Adams J, Barone S, Jr., LaMantia A, et al. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: neurobehavioral work group summary. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 3:535-44.
39. Matheson SL, Shepherd AM, Pinchbeck RM, Laurens KR, Carr VJ. Childhood adversity in schizophrenia: a systematic meta-analysis. *Psychol Med.* 2013;43(2):225-38.
40. Dauvermann MR, Donohoe G. The role of childhood trauma in cognitive performance in schizophrenia and bipolar disorder - A systematic review. *Schizophr Res Cogn.* 2019;16:1-11.
41. Gaweda L, Pionke R, Krezolek M, et al. Self-disturbances, cognitive biases and insecure attachment as mechanisms of the relationship between traumatic life events and psychotic-like experiences in non-clinical adults - A path analysis. *Psychiatry Res.* 2018;259:571-8.
42. Gaweda L, Pionke R, Arciszewska A, et al. A combination of self-disturbances and psychotic-like experiences. A cluster analysis study on a non-clinical sample in Poland. *Psychiatry Res.* 2019;273:394-401.
43. Turley D, Drake R, Killackey E, Yung AR. Perceived stress and psychosis: The effect of perceived stress on psychotic-like experiences in a community sample of adolescents. *Early Interv Psychiatry.* 2019;13(6):1465-9.

44. Varese F, Smeets F, Drukker M, et al. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective-and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia bulletin*. 2012;38(4):661-71.
45. Sideli L, Murray RM, Schimmenti A, et al. Childhood adversity and psychosis: a systematic review of bio-psycho-social mediators and moderators. *Psychol Med*. 2020;50(11):1761-82.
46. Beards S, Gayer-Anderson C, Borges S, Dewey ME, Fisher HL, Morgan C. Life events and psychosis: a review and meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2013;39(4):740-7.
47. van Os J, Linscott RJ, Myin-Germeys I, Delespaul P, Krabbendam L. A systematic review and meta-analysis of the psychosis continuum: evidence for a psychosis proneness-persistence-impairment model of psychotic disorder. *Psychol Med*. 2009;39(2):179-95.
48. Kelleher I, Cannon M. Psychotic-like experiences in the general population: characterizing a high-risk group for psychosis. *Psychol Med*. 2011;41(1):1-6.
49. Yung AR, Nelson B, Baker K, Buckby JA, Baksheev G, Cosgrave EM. Psychotic-like experiences in a community sample of adolescents: implications for the continuum model of psychosis and prediction of schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*. 2009;43(2):118-28.
50. Van Os J, Reininghaus U. Psychosis as a transdiagnostic and extended phenotype in the general population. *World Psychiatry*. 2016;15(2):118-24.
51. Stramecki F, Frydecka D, Gaweda L, et al. The Impact of the FKBP5 Gene Polymorphisms on the Relationship between Traumatic Life Events and Psychotic-Like Experiences in Non-Clinical Adults. *Brain Sci*. 2021;11(5).
52. Grace AA. Dopamine system dysregulation by the ventral subiculum as the common pathophysiological basis for schizophrenia psychosis, psychostimulant abuse, and stress. *Neurotox Res*. 2010;18(3-4):367-76.
53. Valenti O, Lodge DJ, Grace AA. Aversive stimuli alter ventral tegmental area dopamine neuron activity via a common action in the ventral hippocampus. *J Neurosci*. 2011;31(11):4280-9.
54. Yung AR, McGorry PD. The initial prodrome in psychosis: descriptive and qualitative aspects. *Aust N Z J Psychiatry*. 1996;30(5):587-99.
55. Walker EF, Grimes KE, Davis DM, Smith AJ. Childhood precursors of schizophrenia: facial expressions of emotion. *Am J Psychiatry*. 1993;150(11):1654-60.
56. Yung AR, Phillips LJ, Yuen HP, McGorry PD. Risk factors for psychosis in an ultra high-risk group: psychopathology and clinical features. *Schizophr Res*. 2004;67(2-3):131-42.
57. Fuller R, Nopoulos P, Arndt S, O'Leary D, Ho BC, Andreasen NC. Longitudinal assessment of premorbid cognitive functioning in patients with schizophrenia through examination of standardized scholastic test performance. *Am J Psychiatry*. 2002;159(7):1183-9.
58. Lencz T, Smith CW, Auther A, Correll CU, Cornblatt B. Nonspecific and attenuated negative symptoms in patients at clinical high-risk for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2004;68(1):37-48.
59. Girshkin L, Matheson SL, Shepherd AM, Green MJ. Morning cortisol levels in schizophrenia and bipolar disorder: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;49:187-206.
60. Hubbard DB, Miller BJ. Meta-analysis of blood cortisol levels in individuals with first-episode psychosis. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;104:269-75.
61. Ciufolini S, Dazzan P, Kempton MJ, Pariante C, Mondelli V. HPA axis response to social stress is attenuated in schizophrenia but normal in depression: evidence from a meta-analysis of existing studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:359-68.
62. Bleuler M. Conception of Schizophrenia Within the Last Fifty Years and Today [Abridged]. *Proc R Soc Med*. 1963;56(10):945-52.
63. Meehan MC. The Genain Quadruplets: A Case Study and Theoretical Analysis of Heredity and Environment in Schizophrenia. *JAMA*. 1964;187(11):873-.
64. Rosenthal DE. The Genain quadruplets: A case study and theoretical analysis of heredity and environment in schizophrenia. 1963.

65. Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2011;93(1):23-58.
66. Konings M, Stefanis N, Kuepper R, et al. Replication in two independent population-based samples that childhood maltreatment and cannabis use synergistically impact on psychosis risk. *Psychol Med.* 2012;42(1):149-59.
67. Selten JP, van der Ven E, Rutten BP, Cantor-Graae E. The social defeat hypothesis of schizophrenia: an update. *Schizophr Bull.* 2013;39(6):1180-6.
68. Petronis A. The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol Psychiatry.* 2004;55(10):965-70.
69. Rutten BP, Mill J. Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull.* 2009;35(6):1045-56.
70. Velazquez MA, Fleming TP, Watkins AJ. Periconceptional environment and the developmental origins of disease. *J Endocrinol.* 2019;242(1):T33-T49.
71. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature.* 2019;571(7766):489-99.
72. Bayraktar G, Kreutz MR. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *Neuroscientist.* 2018;24(2):171-85.
73. Guidotti A, Auta J, Chen Y, et al. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology.* 2011;60(7-8):1007-16.
74. Zhubi A, Veldic M, Puri NV, et al. An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. *Schizophr Res.* 2009;111(1-3):115-22.
75. Cheng X, Hashimoto H, Horton JR, Zhang X. Mechanisms of DNA methylation, methyl-CpG recognition, and demethylation in mammals. *Handbook of epigenetics: Elsevier;* 2011. p. 9-24.
76. Petrikis P, Voulgari PV, Tzallas AT, et al. Changes in the cytokine profile in first-episode, drug-naïve patients with psychosis after short-term antipsychotic treatment. *Psychiatry Res.* 2017;256:378-83.
77. Karanikas E, Ntoulos E, Oikonomou D, Floros G, Griveas I, Garyfallos G. Evidence for Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis and Immune Alterations at Prodrome of Psychosis in Males. *Psychiatry Investig.* 2017;14(5):703-7.
78. Mitra R. Neuronal Plasticity in the Amygdala Following Predator Stress Exposure. *Front Behav Neurosci.* 2019;13:25.
79. Chrousos GP, Detera-Wadleigh SD, Karl M. Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann Intern Med.* 1993;119(11):1113-24.
80. Pervanidou P, Chrousos GP. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism.* 2012;61(5):611-9.
81. Maclean PD. The limbic system ("visceral brain") and emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1955;73(2):130-4.
82. Schwartz JH, Kandel ER, Jessell TM. *Principles of neural science: Prentice-Hall International;* 1991.
83. Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1179:167-78.
84. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, et al. *Principles of neural science: McGraw-hill New York;* 2000.
85. van Winkel R, Stefanis NC, Myin-Germeys I. Psychosocial stress and psychosis. A review of the neurobiological mechanisms and the evidence for gene-stress interaction. *Schizophr Bull.* 2008;34(6):1095-105.
86. Walker E, Mittal V, Tessner K. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol.* 2008;4:189-216.
87. Zorrilla EP, Cannon TD, Kessler J, Gur RE. Leukocyte differentials predict short-term clinical outcome following antipsychotic treatment in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1998;43(12):887-96.



88. Dai J, Du X, Yin G, et al. Prevalence, demographic and clinical features of comorbid depressive symptoms in drug naive patients with schizophrenia presenting with first episode psychosis. *Schizophr Res.* 2018;193:182-7.
89. Bradley AJ, Dinan TG. A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J Psychopharmacol.* 2010;24(4 Suppl):91-118.
90. Borges S, Gayer-Anderson C, Mondelli V. A systematic review of the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in first episode psychosis. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(5):603-11.
91. Gispén-de Wied CC. Stress in schizophrenia: an integrative view. *European journal of pharmacology.* 2000;405(1-3):375-84.
92. Gur RE, Keshavan MS, Lawrie SM. Deconstructing psychosis with human brain imaging. *Schizophr Bull.* 2007;33(4):921-31.
93. Exner C, Boucsein K, Degner D, Irle E, Weniger G. Impaired emotional learning and reduced amygdala size in schizophrenia: a 3-month follow-up. *Schizophr Res.* 2004;71(2-3):493-503.
94. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2000;157(1):16-25.
95. Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci.* 1998;1(1):69-73.
96. Brown ES, Woolston DJ, Frol AB. Amygdala volume in patients receiving chronic corticosteroid therapy. *Biol Psychiatry.* 2008;63(7):705-9.
97. Bonne O, Brandes D, Gilboa A, et al. Longitudinal MRI study of hippocampal volume in trauma survivors with PTSD. *Am J Psychiatry.* 2001;158(8):1248-51.
98. Goldstein JM, Seidman LJ, Makris N, et al. Hypothalamic abnormalities in schizophrenia: sex effects and genetic vulnerability. *Biol Psychiatry.* 2007;61(8):935-45.
99. Pariante CM, Dazzan P, Danese A, et al. Increased pituitary volume in antipsychotic-free and antipsychotic-treated patients of the AESop first-onset psychosis study. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(10):1923-31.
100. Xing GQ, Russell S, Webster MJ, Post RM. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2004;7(2):143-53.
101. Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry.* 2002;7(9):985-94, 24.
102. Perlman WR, Webster MJ, Kleinman JE, Weickert CS. Reduced glucocorticoid and estrogen receptor alpha messenger ribonucleic acid levels in the amygdala of patients with major mental illness. *Biol Psychiatry.* 2004;56(11):844-52.
103. Sinclair D, Fillman SG, Webster MJ, Weickert CS. Dysregulation of glucocorticoid receptor co-factors FKBP5, BAG1 and PTGES3 in prefrontal cortex in psychotic illness. *Sci Rep.* 2013;3:3539.
104. Phillips LJ, McGorry PD, Garner B, et al. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry.* 2006;40(9):725-41.
105. Cherian K, Schatzberg AF, Keller J. HPA axis in psychotic major depression and schizophrenia spectrum disorders: Cortisol, clinical symptomatology, and cognition. *Schizophr Res.* 2019;213:72-9.
106. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med.* 1998;338(3):171-9.
107. McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.* 2003;43(1):2-15.
108. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1353-63.

109. Garner B, Phassouliotis C, Phillips LJ, et al. Cortisol and dehydroepiandrosterone-sulphate levels correlate with symptom severity in first-episode psychosis. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):249-55.
110. Kale A, Naphade N, Sapkale S, et al. Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Res.* 2010;175(1-2):47-53.
111. Brunelin J, d'Amato T, van Os J, Cochet A, Suaud-Chagny MF, Saoud M. Effects of acute metabolic stress on the dopaminergic and pituitary-adrenal axis activity in patients with schizophrenia, their unaffected siblings and controls. *Schizophr Res.* 2008;100(1-3):206-11.
112. Ryan MC, Sharifi N, Condren R, Thakore JH. Evidence of basal pituitary-adrenal overactivity in first episode, drug naive patients with schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29(8):1065-70.
113. Krishnamurthy D, Harris LW, Levin Y, et al. Metabolic, hormonal and stress-related molecular changes in post-mortem pituitary glands from schizophrenia subjects. *World J Biol Psychiatry.* 2013;14(7):478-89.
114. Venkatasubramanian G, Chittiprol S, Neelakantachar N, Shetty T, Gangadhar BN. Effect of antipsychotic treatment on Insulin-like Growth Factor-1 and cortisol in schizophrenia: a longitudinal study. *Schizophrenia research.* 2010;119(1-3):131-7.
115. Ceskova E, Kasperek T, Zourkova A, Prikryl R. Dexamethasone suppression test in first-episode schizophrenia. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006;27(4):433-7.
116. Mondelli V, Dazzan P, Hepgul N, et al. Abnormal cortisol levels during the day and cortisol awakening response in first-episode psychosis: the role of stress and of antipsychotic treatment. *Schizophr Res.* 2010;116(2-3):234-42.
117. Holtzman CW, Trotman HD, Goulding SM, et al. Stress and neurodevelopmental processes in the emergence of psychosis. *Neuroscience.* 2013;249:172-91.
118. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(6):463-75.
119. McEwen BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1032:1-7.
120. Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;35(1):2-16.
121. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(6):693-710.
122. de Kloet ER. Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur J Pharmacol.* 2013;719(1-3):53-62.
123. Harris AP, Holmes MC, de Kloet ER, Chapman KE, Seckl JR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(5):648-58.
124. Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(6):459-66.
125. Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res.* 2000;34(6):383-92.
126. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985;117(6):2505-11.
127. Seckl JR, Dickson KL, Yates C, Fink G. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus. *Brain Res.* 1991;561(2):332-7.
128. Funder JW. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science.* 1993;259(5098):1132-3.

129. Petta I, Dejager L, Ballegeer M, et al. The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(2):495-522.
130. Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(21):3435-48.
131. Turner JD, Muller CP. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol.* 2005;35(2):283-92.
132. Turner JD, Alt SR, Cao L, et al. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1860-8.
133. Schatzberg AF, Keller J, Tennakoon L, et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. *Mol Psychiatry.* 2014;19(2):220-7.
134. Grossmann C, Scholz T, Rochel M, et al. Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(3):397-406.
135. Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, et al. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol.* 1993;247(2):145-54.
136. De Kloet ER, Reul JM. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology.* 1987;12(2):83-105.
137. de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(2):168-79.
138. Joels M, Sarabdjitsingh RA, Karst H. Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(4):901-38.
139. ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;52:92-110.
140. Karst H, Berger S, Erdmann G, Schutz G, Joels M. Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14449-54.
141. Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19204-7.
142. Gekle M, Bretschneider M, Meinel S, Ruhs S, Grossmann C. Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids.* 2014;81:103-8.
143. Meinel S, Gekle M, Grossmann C. Mineralocorticoid receptor signaling: crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids.* 2014;91:3-10.
144. Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* 2005;19(9):2211-21.
145. Martinerie L, Munier M, Le Menuet D, Meduri G, Viengchareun S, Lombes M. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie.* 2013;95(2):148-57.
146. Padian K. Evolutionary physiology: A bone for all seasons. *Nature.* 2012;487(7407):310-11.
147. Ferrari P. The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1178-87.
148. Marzolla V, Armani A, Zennaro MC, et al. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;350(2):281-8.
149. Berger S, Wolfer DP, Selbach O, et al. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(1):195-200.

150. Giordano R, Bo M, Pellegrino M, et al. Hypothalamus-pituitary-adrenal hyperactivity in human aging is partially refractory to stimulation by mineralocorticoid receptor blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5656-62.
151. Heuser I, Deuschle M, Weber A, et al. The role of mineralocorticoid receptors in the circadian activity of the human hypothalamus-pituitary-adrenal system: effect of age. *Neurobiol Aging.* 2000;21(4):585-9.
152. Yau JL, Seckl JR. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front Aging Neurosci.* 2012;4:24.
153. De Kloet ER, Meijer OC. MR/GR Signaling in the Brain during the Stress Response. *Aldosterone-Miner Recept Cell Biol Transl Med.* 2019.
154. Perlman WR, Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Weickert CS. Age-related differences in glucocorticoid receptor mRNA levels in the human brain. *Neurobiol Aging.* 2007;28(3):447-58.
155. Yau JL, Hibberd C, Noble J, Seckl JR. The effect of chronic fluoxetine treatment on brain corticosteroid receptor mRNA expression and spatial memory in young and aged rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;106(1-2):117-23.
156. ter Horst JP, van der Mark MH, Arp M, Berger S, de Kloet ER, Oitzl MS. Stress or no stress: mineralocorticoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;98(1):33-40.
157. Rozeboom AM, Akil H, Seasholtz AF. Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4688-93.
158. Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci.* 2001;21(13):4822-9.
159. Chang YT, Chen YC, Wu CW, et al. Glucocorticoid signaling and exercise-induced downregulation of the mineralocorticoid receptor in the induction of adult mouse dentate neurogenesis by treadmill running. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(9):1173-82.
160. Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry.* 1998;43(8):547-73.
161. Wu TC, Chen HT, Chang HY, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(6):871-83.
162. Klok MD, Giltay EJ, Van der Does AJ, et al. A common and functional mineralocorticoid receptor haplotype enhances optimism and protects against depression in females. *Transl Psychiatry.* 2011;1:e62.
163. Medina A, Seasholtz AF, Sharma V, et al. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in the human hippocampus in major depressive disorder. *J Psychiatr Res.* 2013;47(3):307-14.
164. Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. The role of mineralocorticoid receptors in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3339-45.
165. Qi XR, Kamphuis W, Wang S, et al. Aberrant stress hormone receptor balance in the human prefrontal cortex and hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(6):863-70.
166. Wang SS, Kamphuis W, Huitinga I, Zhou JN, Swaab DF. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Mol Psychiatry.* 2008;13(8):786-99, 41.
167. Cheng R, Juo SH, Loth JE, et al. Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. *Mol Psychiatry.* 2006;11(3):252-60.

168. Pelleymounter LL, Moon I, Johnson JA, et al. A novel application of pattern recognition for accurate SNP and indel discovery from high-throughput data: targeted resequencing of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP5 in a Caucasian population. *Mol Genet Metab.* 2011;104(4):457-69.
169. Wiederrecht G, Hung S, Chan HK, et al. Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506-binding protein as well as a protein complex. *J Biol Chem.* 1992;267(30):21753-60.
170. Pirkl F, Buchner J. Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J Mol Biol.* 2001;308(4):795-806.
171. Sanchez ER. Chaperoning steroidal physiology: lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(3):722-9.
172. Galigniana MD, Echeverria PC, Erlejan AG, Piwien-Pilipuk G. Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus.* 2010;1(4):299-308.
173. Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, et al. The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J.* 2003;22(5):1158-67.
174. Herrmann L, Ebert T, Rosen H, et al. Analysis of the cerebellar molecular stress response led to first evidence of a role for FKBP51 in brain FKBP52 expression in mice and humans. *Neurobiol Stress.* 2021;15:100401.
175. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34 Suppl 1:S186-95.
176. Paakinaho V, Makkonen H, Jaaskelainen T, Palvimo JJ. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions. *Mol Endocrinol.* 2010;24(3):511-25.
177. Klengel T, Mehta D, Anacker C, et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci.* 2013;16(1):33-41.
178. Fries GR, Gassen NC, Rein T. The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
179. Ajnakina O, Borges S, Di Forti M, et al. Role of Environmental Confounding in the Association between FKBP5 and First-Episode Psychosis. *Front Psychiatry.* 2014;5:84.
180. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet.* 2004;36(12):1319-25.
181. Criado-Marrero M, Rein T, Binder EB, Porter JT, Koren III J, Blair LJ. Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2017;373(1738):20160532.
182. Voisey J, Young RM, Lawford BR, Morris CP. Progress towards understanding the genetics of posttraumatic stress disorder. *Journal of anxiety disorders.* 2014;28(8):873-83.
183. Bishop JR, Lee AM, Mills LJ, et al. Methylation of FKBP5 and SLC6A4 in Relation to Treatment Response to Mindfulness Based Stress Reduction for Posttraumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry.* 2018;9:418.
184. Rosenberg SD, Lu W, Mueser KT, Jankowski MK, Cournos F. Correlates of adverse childhood events among adults with schizophrenia spectrum disorders. *Psychiatr Serv.* 2007;58(2):245-53.
185. Halldorsdottir T, de Matos APS, Awaloff Y, Arnarson EO, Craighead WE, Binder EB. FKBP5 moderation of the relationship between childhood trauma and maladaptive emotion regulation strategies in adolescents. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;84:61-5.
186. Collip D, Myin-Germeys I, Wichers M, et al. FKBP5 as a possible moderator of the psychosis-inducing effects of childhood trauma. *Br J Psychiatry.* 2013;202(4):261-8.
187. Alemany S, Moya J, Ibanez MI, et al. Research Letter: Childhood trauma and the rs1360780 SNP of FKBP5 gene in psychosis: a replication in two general population samples. *Psychol Med.* 2016;46(1):221-3.

188. Green MJ, Raudino A, Cairns MJ, et al. Do common genotypes of FK506 binding protein 5 (FKBP5) moderate the effects of childhood maltreatment on cognition in schizophrenia and healthy controls? *J Psychiatr Res.* 2015;70:9-17.
189. Buchmann AF, Holz N, Boecker R, et al. Moderating role of FKBP5 genotype in the impact of childhood adversity on cortisol stress response during adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(6):837-45.
190. Memic A, Streit F, Hasandedic L, et al. Neurocognitive Endophenotypes of Schizophrenia and Bipolar Disorder and Possible Associations with FKBP Variant rs3800373. *Med Arch.* 2018;72(5):352-6.
191. Binder EB, Bradley RG, Liu W, et al. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA.* 2008;299(11):1291-305.
192. Lekman M, Laje G, Charney D, et al. The FKBP5-gene in depression and treatment response--an association study in the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\*D) Cohort. *Biol Psychiatry.* 2008;63(12):1103-10.
193. Cristobal-Narvaez P, Sheinbaum T, Rosa A, et al. The Interaction between Childhood Bullying and the FKBP5 Gene on Psychotic-Like Experiences and Stress Reactivity in Real Life. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158809.
194. Cristobal-Narvaez P, Sheinbaum T, Rosa A, et al. Interaction of both positive and negative daily-life experiences with FKBP5 haplotype on psychosis risk. *Eur Psychiatry.* 2020;63(1):e11.
195. Gawlik M, Moller-Ehrlich K, Mende M, et al. Is FKBP5 a genetic marker of affective psychosis? A case control study and analysis of disease related traits. *BMC Psychiatry.* 2006;6:52.
196. de Castro-Catala M, Pena E, Kwapil TR, et al. Interaction between FKBP5 gene and childhood trauma on psychosis, depression and anxiety symptoms in a non-clinical sample. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;85:200-9.
197. Richter A, Al-Bayati M, Paraskevopoulou F, et al. Interaction of FKBP5 variant rs3800373 and city living alters the neural stress response in the anterior cingulate cortex. *Stress.* 2021;24(4):421-9.
198. Lee CH, Sinclair D, O'Donnell M, et al. Transcriptional changes in the stress pathway are related to symptoms in schizophrenia and to mood in schizoaffective disorder. *Schizophr Res.* 2019;213:87-95.
199. Qiu A, Rifkin-Graboi A, Chen H, et al. Maternal anxiety and infants' hippocampal development: timing matters. *Translational psychiatry.* 2013;3:e306.
200. Qiu A, Anh TT, Li Y, et al. Prenatal maternal depression alters amygdala functional connectivity in 6-month-old infants. *Translational psychiatry.* 2015;5:e508.
201. Wang C, Shen M, Guillaume B, et al. FKBP5 Moderates the Association between Antenatal Maternal Depressive Symptoms and Neonatal Brain Morphology. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43(3):564-70.
202. Mitjans M, Catalan R, Vazquez M, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal system, neurotrophic factors and clozapine response: association with FKBP5 and NTRK2 genes. *Pharmacogenet Genomics.* 2015;25(5):274-7.
203. Gassen NC, Fries GR, Zannas AS, et al. Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. *Sci Signal.* 2015;8(404):ra119.
204. Gassen NC, Hartmann J, Zannas AS, et al. FKBP51 inhibits GSK3beta and augments the effects of distinct psychotropic medications. *Mol Psychiatry.* 2016;21(2):277-89.
205. Matosin N, Halldorsdottir T, Binder EB. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biol Psychiatry.* 2018;83(10):821-30.
206. Brix LM, Hausl AS, Toksoz I, et al. The co-chaperone FKBP51 modulates HPA axis activity and age-related maladaptation of the stress system in pituitary proopiomelanocortin cells. *Psychoneuroendocrinology.* 2022;138:105670.

207. Hausl AS, Brix LM, Hartmann J, et al. The co-chaperone Fkbp5 shapes the acute stress response in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male mice. *Mol Psychiatry*. 2021;26(7):3060-76.
208. Attwood BK, Bourgognon JM, Patel S, et al. Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature*. 2011;473(7347):372-5.
209. Hartmann J, Wagner KV, Liebl C, et al. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):332-9.
210. Engelhardt C, Tang F, Elkhateib R, et al. FKBP51 in the Oval Bed Nucleus of the Stria Terminalis Regulates Anxiety-Like Behavior. *eNeuro*. 2021;8(6).
211. Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol*. 2001;436(4):430-55.
212. Somerville LH, Whalen PJ, Kelley WM. Human bed nucleus of the stria terminalis indexes hypervigilant threat monitoring. *Biol Psychiatry*. 2010;68(5):416-24.
213. Yassa MA, Hazlett RL, Stark CE, Hoehn-Saric R. Functional MRI of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis during conditions of uncertainty in generalized anxiety disorder. *J Psychiatr Res*. 2012;46(8):1045-52.
214. Arnett MG, Muglia LM, Laryea G, Muglia LJ. Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):245-60.
215. Hartmann J, Bajaj T, Klengel C, et al. Mineralocorticoid receptors dampen glucocorticoid receptor sensitivity to stress via regulation of FKBP5. *Cell Rep*. 2021;35(9):109185.
216. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-6.
217. Fleshner M, Frank M, Maier SF. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):36-45.
218. Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):15-25.
219. Dargel AA, Godin O, Kapczinski F, Kupfer DJ, Leboyer M. C-reactive protein alterations in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. 2015;76(2):142-50.
220. Kohler CA, Freitas TH, Maes M, et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr Scand*. 2017;135(5):373-87.
221. Inoshita M, Numata S, Tajima A, et al. A significant causal association between C-reactive protein levels and schizophrenia. *Sci Rep*. 2016;6:26105.
222. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol Psychiatry*. 2016;21(12):1696-709.
223. do Prado CH, Rizzo LB, Wieck A, et al. Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(5):667-76.
224. Barbosa IG, Rocha NP, Assis F, et al. Monocyte and lymphocyte activation in bipolar disorder: a new piece in the puzzle of immune dysfunction in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;18(1).
225. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70(7):663-71.
226. Khandaker GM, Cousins L, Deakin J, Lennox BR, Yolken R, Jones PB. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *Lancet Psychiatry*. 2015;2(3):258-70.
227. Nicolaides NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):6-19.
228. Bauer ME, Teixeira AL. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1437(1):57-67.

229. van der Laan S, Sarabdjitsingh RA, Van Batenburg MF, et al. Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain. *J Neurochem.* 2008;106(6):2515-23.
230. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity.* 1997;7(6):803-12.
231. Cannarile L, Zollo O, D'Adamio F, et al. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ.* 2001;8(2):201-3.
232. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009;23(11):3649-58.
233. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, et al. Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2006;529(1-3):63-70.
234. Eddleston J, Herschbach J, Wagelie-Steffen AL, Christiansen SC, Zuraw BL. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):115-22.
235. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene.* 2002;21(53):8196-205.
236. Ellestad LE, Malkiewicz SA, Guthrie HD, Welch GR, Porter TE. Expression and regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper in the developing anterior pituitary gland. *J Mol Endocrinol.* 2009;42(2):171-83.
237. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:309-45.
238. Thiagarajah AS, Eades LE, Thomas PR, et al. GILZ: Glitzing up our understanding of the glucocorticoid receptor in psychopathology. *Brain Res.* 2014;1574:60-9.
239. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med.* 1997;185(7):1185-92.
240. Mansur RB, Zugman A, Asevedo EM, da Cunha GR, Bressan RA, Brietzke E. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2012;66(4):247-60.
241. Monji A. [The neuroinflammation hypothesis of psychiatric disorders]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi.* 2012;114(2):124-33.
242. Glantz LA, Lewis DA. Dendritic spine density in schizophrenia and depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58(2):203.
243. Muller N, Myint AM, Schwarz MJ. Inflammation in schizophrenia. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012;88:49-68.
244. Leonard BE, Schwarz M, Myint AM. The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? *J Psychopharmacol.* 2012;26(5 Suppl):33-41.
245. Frodl T, Carballedo A, Hughes MM, et al. Reduced expression of glucocorticoid-inducible genes GILZ and SGK-1: high IL-6 levels are associated with reduced hippocampal volumes in major depressive disorder. *Transl Psychiatry.* 2012;2:e88.
246. Frodl T, Amico F. Is there an association between peripheral immune markers and structural/functional neuroimaging findings? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;48:295-303.
247. van Zuiden M, Kavelaars A, Geuze E, Olf M, Heijnen CJ. Predicting PTSD: pre-existing vulnerabilities in glucocorticoid-signaling and implications for preventive interventions. *Brain Behav Immun.* 2013;30:12-21.
248. Maier SF, Watkins LR. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4-5):829-41.



249. De Neve JE, Christakis NA, Fowler JH, Frey BS. Genes, Economics, and Happiness. *J Neurosci Psychol Econ.* 2012;5(4).
250. Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Jr., et al. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature.* 1991;354(6348):66-70.
251. Torres GE, Amara SG. Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(3):304-12.
252. Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15(7):220-6.
253. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1997;54(7):597-606.
254. Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med.* 2001;7(5):541-7.
255. Oquendo MA, Hastings RS, Huang YY, et al. Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. *Arch Gen Psychiatry.* 2007;64(2):201-8.
256. Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, et al. Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am J Psychiatry.* 2006;163(1):52-8.
257. McKittrick CR, Magarinos AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse.* 2000;36(2):85-94.
258. Vazquez DM, Lopez JF, Van Hoers H, Watson SJ, Levine S. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. *Brain Res.* 2000;855(1):76-82.
259. Kirby LG, Lucki I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress.* 1998;2(4):251-63.
260. Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, et al. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci.* 2006;26(35):8955-64.
261. Adamec R, Burton P, Blundell J, Murphy DL, Holmes A. Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. *Behav Brain Res.* 2006;170(1):126-40.
262. Carola V, Frazzetto G, Pascucci T, et al. Identifying molecular substrates in a mouse model of the serotonin transporter x environment risk factor for anxiety and depression. *Biol Psychiatry.* 2008;63(9):840-6.
263. Li Q, Holmes A, Ma L, Van de Kar LD, Garcia F, Murphy DL. Medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A receptors regulate neuroendocrine responses to stress and exploratory locomotor activity: application of recombinant adenovirus containing 5-HT1A sequences. *J Neurosci.* 2004;24(48):10868-77.
264. Tjurmina OA, Armando I, Saavedra JM, Li Q, Murphy DL. Life-long serotonin reuptake deficiency results in complex alterations in adrenomedullary responses to stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:99-104.
265. Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1):8-17.
266. Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology.* 2002;27(6):914-23.
267. Lira A, Zhou M, Castanon N, et al. Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry.* 2003;54(10):960-71.
268. Wellman CL, Izquierdo A, Garrett JE, et al. Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci.* 2007;27(3):684-91.
269. Zhao ZQ, Scott M, Chiechio S, et al. *Lmx1b* is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. *J Neurosci.* 2006;26(49):12781-8.

270. Holmes A, Hariri AR. The serotonin transporter gene-linked polymorphism and negative emotionality: placing single gene effects in the context of genetic background and environment. *Genes Brain Behav.* 2003;2(6):332-5.
271. Heils A, Teufel A, Petri S, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem.* 1996;66(6):2621-4.
272. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003;301(5631):386-9.
273. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE. Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry.* 2010;167(5):509-27.
274. Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(5):444-54.
275. Jasinska AJ, Lowry CA, Burmeister M. Serotonin transporter gene, stress and raphe-raphe interactions: a molecular mechanism of depression. *Trends Neurosci.* 2012;35(7):395-402.
276. Duman EA, Canli T. Influence of life stress, 5-HTTLPR genotype, and SLC6A4 methylation on gene expression and stress response in healthy Caucasian males. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2015;5:2.
277. Hariri AR, Holmes A. Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci.* 2006;10(4):182-91.
278. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, et al. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):828-34.
279. Holmes A, Rodgers RJ. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol.* 2003;459(2-3):221-30.
280. Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 2003;70(2):83-244.
281. Salchner P, Singewald N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. *Neuropharmacology.* 2002;43(8):1238-48.
282. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry.* 2003;54(10):953-9.
283. Koenen KC, Uddin M, Chang SC, et al. SLC6A4 methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety.* 2011;28(8):639-47.
284. Domschke K, Tidow N, Schwarte K, et al. Serotonin transporter gene hypomethylation predicts impaired antidepressant treatment response. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(8):1167-76.
285. Li Z, He Y, Han H, et al. COMT, 5-HTR2A, and SLC6A4 mRNA Expressions in First-Episode Antipsychotic-Naive Schizophrenia and Association With Treatment Outcomes. *Front Psychiatry.* 2018;9:577.
286. Kuipers SD, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006;9(5):580-6.
287. Carlino D, De Vanna M, Tongiorgi E. Is altered BDNF biosynthesis a general feature in patients with cognitive dysfunctions? *Neuroscientist.* 2013;19(4):345-53.
288. Bekinschtein P, Cammarota M, Katze C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2711-6.
289. Nuernberg GL, Aguiar B, Bristot G, Fleck MP, Rocha NS. Brain-derived neurotrophic factor increase during treatment in severe mental illness inpatients. *Transl Psychiatry.* 2016;6(12):e985.
290. Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett.* 2002;328(3):261-4.

291. Klein AB, Williamson R, Santini MA, et al. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14(3):347-53.
292. Sartorius A, Hellweg R, Litzke J, et al. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry.* 2009;42(6):270-6.
293. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37(12):1553-61.
294. Govindarajan A, Rao BS, Nair D, et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13208-13.
295. Lakshminarasimhan H, Chattarji S. Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. *PLoS One.* 2012;7(1):e30481.
296. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9371-6.
297. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(5):355-67.
298. Gray JD, Milner TA, McEwen BS. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience.* 2013;239:214-27.
299. Suri D, Veenit V, Sarkar A, et al. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry.* 2013;73(7):658-66.
300. Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2003;8(6):592-610.
301. Durany N, Michel T, Zochling R, et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res.* 2001;52(1-2):79-86.
302. Pillai A, Kale A, Joshi S, et al. Decreased BDNF levels in CSF of drug-naive first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(4):535-9.
303. Carlino D, Leone E, Di Cola F, et al. Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):273-9.
304. Asevedo E, Gadelha A, Noto C, et al. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013;47(10):1376-82.
305. Hori H, Yoshimura R, Katsuki A, et al. Blood Biomarkers Predict the Cognitive Effects of Aripiprazole in Patients with Acute Schizophrenia. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3).
306. Hori H, Yoshimura R, Katsuki A, et al. Relationships between serum brain-derived neurotrophic factor, plasma catecholamine metabolites, cytokines, cognitive function and clinical symptoms in Japanese patients with chronic schizophrenia treated with atypical antipsychotic monotherapy. *World J Biol Psychiatry.* 2017;18(5):401-8.
307. Niitsu T, Shirayama Y, Matsuzawa D, et al. Associations of serum brain-derived neurotrophic factor with cognitive impairments and negative symptoms in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(8):1836-40.
308. Zhang XY, Chen DC, Xiu MH, et al. Cognitive and serum BDNF correlates of BDNF Val66Met gene polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. *Hum Genet.* 2012;131(7):1187-95.
309. Zhang XY, Liang J, Chen DC, et al. Low BDNF is associated with cognitive impairment in chronic patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;222(2):277-84.
310. Yung AR, Phillips LJ, Yuen HP, et al. Psychosis prediction: 12-month follow up of a high-risk ("prodromal") group. *Schizophr Res.* 2003;60(1):21-32.

311. Heitz U, Pappmeyer M, Studerus E, et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and their association with neurocognition in at-risk mental state, first episode psychosis and chronic schizophrenia patients. *World J Biol Psychiatry*. 2018;1-10.
312. Aas M, Dieset I, Mørch R, et al. Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with childhood trauma experiences and number of depressive episodes in severe mental disorders. *Schizophr Res*. 2019;205:45-50.
313. Grillo RW, Ottoni GL, Leke R, Souza DO, Portela LV, Lara DR. Reduced serum BDNF levels in schizophrenic patients on clozapine or typical antipsychotics. *J Psychiatr Res*. 2007;41(1-2):31-5.
314. Tan YL, Zhou DF, Cao LY, Zou YZ, Zhang XY. Decreased BDNF in serum of patients with chronic schizophrenia on long-term treatment with antipsychotics. *Neurosci Lett*. 2005;382(1-2):27-32.
315. Coley E JL, Demaestri C, Ganguly P, et al. Cross-Generational Transmission of Early Life Stress Effects on HPA Regulators and Bdnf Are Mediated by Sex, Lineage, and Upbringing. *Front Behav Neurosci*. 2019;13:101.
316. Penades R, Lopez-Vilchez I, Catalan R, et al. BDNF as a marker of response to cognitive remediation in patients with schizophrenia: A randomized and controlled trial. *Schizophr Res*. 2018;197:458-64.
317. Mohammadi A, Rashidi E, Amooeian VG. Brain, blood, cerebrospinal fluid, and serum biomarkers in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2018;265:25-38.
318. Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem*. 2007;14(4):268-76.
319. Clayton DF, Anreiter I, Aristizabal M, Frankland PW, Binder EB, Citri A. The role of the genome in experience-dependent plasticity: Extending the analogy of the genomic action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019.
320. Kolb B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109 Suppl 2:17186-93.
321. Riga D, Matos MR, Glas A, Smit AB, Spijker S, Van den Oever MC. Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:230.
322. Jeon HA. Hierarchical processing in the prefrontal cortex in a variety of cognitive domains. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:223.
323. Tse MT, Piantadosi PT, Floresco SB. Prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid transmission and cognitive function: drawing links to schizophrenia from preclinical research. *Biol Psychiatry*. 2015;77(11):929-39.
324. Ketz NA, Jensen O, O'Reilly RC. Thalamic pathways underlying prefrontal cortex-medial temporal lobe oscillatory interactions. *Trends Neurosci*. 2015;38(1):3-12.
325. Bourguignon NJ. A rostro-caudal axis for language in the frontal lobe: the role of executive control in speech production. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:431-44.
326. Pistillo F, Clementi F, Zoli M, Gotti C. Nicotinic, glutamatergic and dopaminergic synaptic transmission and plasticity in the mesocorticolimbic system: focus on nicotine effects. *Prog Neurobiol*. 2015;124:1-27.
327. Kent PL. Working memory: a selective review. *Applied Neuropsychology: Child*. 2016;5(3):163-72.
328. Puig MV, Antzoulatos EG, Miller EK. Prefrontal dopamine in associative learning and memory. *Neuroscience*. 2014;282:217-29.
329. Arnsten AF. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):410-22.
330. Sebastian A, Jung P, Krause-Utz A, Lieb K, Schmahl C, Tuscher O. Frontal dysfunctions of impulse control - a systematic review in borderline personality disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Front Hum Neurosci*. 2014;8:698.
331. Goldman-Rakic PS. Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1994;6(4):348-57.

332. Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Ohmura Y, Izumi T, Yoshioka M. Milnacipran remediates impulsive deficits in rats with lesions of the ventromedial prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(5).
333. Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 1989;61(2):331-49.
334. Opris I, Casanova MF. Prefrontal cortical minicolumn: from executive control to disrupted cognitive processing. *Brain.* 2014;137(Pt 7):1863-75.
335. Kuhn S, Gallinat J. Gray matter correlates of posttraumatic stress disorder: a quantitative meta-analysis. *Biol Psychiatry.* 2013;73(1):70-4.
336. Disner SG, Beevers CG, Haigh EA, Beck AT. Neural mechanisms of the cognitive model of depression. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(8):467-77.
337. McEwen BS, Morrison JH. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron.* 2013;79(1):16-29.
338. Liston C, Miller MM, Goldwater DS, et al. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci.* 2006;26(30):7870-4.
339. Weinberg MS, Johnson DC, Bhatt AP, Spencer RL. Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation. *Neuroscience.* 2010;168(3):744-56.
340. Miller MM, McEwen BS. Establishing an agenda for translational research on PTSD. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1071:294-312.
341. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 2004;60(2):236-48.
342. Radley JJ, Sisti HM, Hao J, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2004;125(1):1-6.
343. Bloss EB, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH. Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2010;30(19):6726-31.
344. Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience.* 2009;164(2):798-808.
345. Cerqueira JJ, Pego JM, Taipa R, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci.* 2005;25(34):7792-800.
346. Watanabe Y, Gould E, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS. Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus.* 1992;2(4):431-5.
347. Meng QY, Chen XN, Tong DL, Zhou JN. Stress and glucocorticoids regulated corticotropin releasing factor in rat prefrontal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;342(1-2):54-63.
348. Chen P, Lou S, Huang ZH, et al. Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Neurons Control Behavioral Style Selection under Challenging Situations. *Neuron.* 2020;106(2):301-15 e7.
349. Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev.* 2008;57(2):531-53.
350. Harvey S, Wadsworth M, Wessely S, Hotopf M. The relationship between prior psychiatric disorder and chronic fatigue: evidence from a national birth cohort study. *Psychological medicine.* 2008;38(7):933-40.
351. Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(6):1152-60.
352. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):141-94.
353. Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):11032-7.

354. Canu MH, Darnaudery M, Falempin M, Maccari S, Viltart O. Effect of hindlimb unloading on motor activity in adult rats: impact of prenatal stress. *Behav Neurosci*. 2007;121(1):177-85.
355. Harvey BH, Bothma T, Nel A, Wegener G, Stein DJ. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Hum Psychopharmacol*. 2005;20(5):367-73.
356. Sapolsky RM. The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. *Horm Behav*. 1982;16(3):279-92.
357. Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade Ada S, et al. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav*. 2006;87(4):643-9.
358. Gleib DA, Goldman N, Chuang YL, Weinstein M. Do chronic stressors lead to physiological dysregulation? Testing the theory of allostatic load. *Psychosom Med*. 2007;69(8):769-76.
359. Grandin T, Deesing M. Distress in animals: is it fear, pain or physical stress? : Colorado State University. Libraries; 2002.
360. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(7):1089-98.
361. Radley JJ, Rocher AB, Miller M, et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2006;16(3):313-20.
362. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 2009;29(22):7330-40.
363. Lee EH, Han PL. Reciprocal interactions across and within multiple levels of monoamine and cortico-limbic systems in stress-induced depression: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;101:13-31.
364. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2011;13(1):22-37.
365. Yuen EY, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Yan Z. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*. 2012;73(5):962-77.
366. Sullivan RM, Gratton A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology*. 2002;27(1-2):99-114.
367. Lee EH, Park JY, Kwon HJ, Han PL. Repeated exposure with short-term behavioral stress resolves pre-existing stress-induced depressive-like behavior in mice. *Nat Commun*. 2021;12(1):6682.
368. Harris RB, Zhou J, Shi M, Redmann S, Mynatt RL, Ryan DH. Overexpression of agouti protein and stress responsiveness in mice. *Physiol Behav*. 2001;73(4):599-608.
369. Harris RB, Palmondon J, Leshin S, Flatt WP, Richard D. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav*. 2006;49(5):615-25.
370. Harris RB, Gu H, Mitchell TD, Endale L, Russo M, Ryan DH. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol Behav*. 2004;81(4):557-68.
371. Harris RB, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH. Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. *Physiol Behav*. 2002;76(4-5):543-50.
372. Morilak DA, Cecchi M, Khoshbouei H. Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress. *Life Sci*. 2003;73(6):715-26.
373. Chotiawat C, Harris RB. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav*. 2006;50(3):489-95.
374. Algamal M, Pearson AJ, Hahn-Townsend C, et al. Repeated unpredictable stress and social isolation induce chronic HPA axis dysfunction and persistent abnormal fear memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;104:110035.

375. Sadler AM, Bailey SJ. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav.* 2016;167:313-23.
376. Laios K, Kontaxaki MI, Markatos K, Lagiou E, Karamanou M, Androustos G. [Psychosomatic disorders in ancient Greek medicine]. *Psychiatriki.* 2018;29(2):130-6.
377. Evans K, McGrath J, Milns R. Searching for schizophrenia in ancient Greek and Roman literature: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand.* 2003;107(5):323-30.
378. Hare E. Was insanity on the increase? The fifty-sixth Maudsley Lecture. *Br J Psychiatry.* 1983;142:439-55.
379. Hare E. Schizophrenia as a recent disease. *Br J Psychiatry.* 1988;153:521-31.
380. Torrey EF. *Schizophrenia and Civilization.* 1980.
381. Torrey EF, Miller J. *The invisible plague.* New Brunswick, NJ: Rutgers University Press; 2001.
382. Jeste DV, Del Carmen R, Lohr JB, Wyatt RJ. Did schizophrenia exist before the eighteenth century? *Comprehensive psychiatry.* 1985;26(6):493-503.
383. Noll R. *American madness: Harvard University Press;* 2011.
384. Scull A. Was insanity increasing? A response to Edward Hare. *The British Journal of Psychiatry.* 1984;144(4):432-6.
385. Kurtz MM. *Schizophrenia and its treatment: Where is the progress?: Oxford University Press;* 2015.
386. Πετρίκης Π. Η υποκειμενική εμπειρία των σχιζοφρενών: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα ...; 2007.
387. Μίχου Π. *Σχιζοφρένεια.* 2015.
388. Kandel ER. *The Disordered Mind: What Unusual Brains Tell Us about Ourselves: Hachette UK;* 2018.
389. de Oliveira Moreira J, Drawin CR. Possible relation between psychosis and the unconscious: a review of "The Unconscious," by Freud. *Front Psychol.* 2015;6:1001.
390. Harrington A. *Mind Fixers: Psychiatry's Troubled Search for the Biology of Mental Illness: WW Norton & Company;* 2019.
391. Tan SY, Yip A. Antonio Egas Moniz (1874-1955): Lobotomy pioneer and Nobel laureate. *Singapore Med J.* 2014;55(4):175-6.
392. Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med.* 2003;349(18):1738-49.
393. Casey DE. The relationship of pharmacology to side effects. *J Clin Psychiatry.* 1997;58 Suppl 10:55-62.
394. Hogarty GE, Goldberg SC, Schooler NR, Ulrich RF. Drug and sociotherapy in the aftercare of schizophrenic patients. II. Two-year relapse rates. *Arch Gen Psychiatry.* 1974;31(5):603-8.
395. D'Souza RS, Hooten WM. Extrapyrarnidal Symptoms (EPS). *StatPearls. Treasure Island (FL)2019.*
396. Andersson C, Chakos M, Mailman R, Lieberman J. Emerging roles for novel antipsychotic medications in the treatment of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 1998;21(1):151-79.
397. Tsermpini EE, Assimakopoulos K, Bartsakoulia M, et al. Individualizing clozapine and risperidone treatment for schizophrenia patients. *Pharmacogenomics.* 2014;15(1):95-110.
398. Schatzberg AF, Nemeroff CB. *The American psychiatric publishing textbook of psychopharmacology: American Psychiatric Pub;* 2009.
399. Abidi S, Bhaskara SM. From chlorpromazine to clozapine--antipsychotic adverse effects and the clinician's dilemma. *Can J Psychiatry.* 2003;48(11):749-55.
400. Johnsen E, Sinkeviciute I, Loberg EM, Kroken RA, Hugdahl K, Jorgensen HA. Hallucinations in acutely admitted patients with psychosis, and effectiveness of risperidone, olanzapine, quetiapine, and ziprasidone: a pragmatic, randomized study. *BMC Psychiatry.* 2013;13:241.
401. Allsopp K, Read J, Corcoran R, Kinderman P. Heterogeneity in psychiatric diagnostic classification. *Psychiatry Res.* 2019;279:15-22.
402. Kromer SA, Kessler MS, Milfay D, et al. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J Neurosci.* 2005;25(17):4375-84.

403. Toth I, Neumann ID. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res.* 2013;354(1):107-18.
404. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science.* 2006;311(5762):864-8.
405. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13(2):167-70.
406. Nussbaumer M, Asara JM, Teplytska L, et al. Selective Mitochondrial Targeting Exerts Anxiolytic Effects In Vivo. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(7):1751-8.
407. Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):55-65.
408. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263-5.
409. Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. *International journal of molecular sciences.* 2017;18(11).
410. Scharf SH, Liebl C, Binder EB, Schmidt MV, Muller MB. Expression and regulation of the *Fkbp5* gene in the adult mouse brain. *PLoS One.* 2011;6(2):e16883.