

Beata Godlewska

**Ocena związku pomiedzy polimorfizmami
genów receptorów H1, H2 i D3 a schizofrenia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: Prof. dr hab. n. med. Jerzy Landowski

Klinika Chorób Psychiczych i Zaburzen Nerwicowych
Akademii Medycznej w Gdansk

Gdansk 2007

SPIS TRESCI

Wykaz skrótów.....	IV
I. Wstep.....	1
I.1. Schizofrenia i schizotaksja.....	1
I.1.1. Schizofrenia jako pojecie kliniczne.....	1
I.1.2. Etiopatogeneza schizofrenii.....	2
I.1.2.1. Czynniki etiopatogenetyczne.....	2
I.1.2.2. Hipoteza predyspozycji – stresu.....	3
I.1.3. Dziedziczenie schizofrenii.....	4
I.1.3.1. Model dziedziczenia schizofrenii.....	4
I.1.3.2. Badania wskazujace na genetyczne podloze zaburzen psychicznych, w tym schizofrenii.....	5
I.1.4. Schizotaksja jako genetycznie uwarunkowana predyspozycja do schizofrenii.....	6
I.2. Metody genetyki molekularnej stosowane w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za zaburzenia psychiczne.....	9
I.2.1. Analiza sprzezen.....	10
I.2.2. Badania asocjacyjne.....	11
I.3. Wybrane geny kandydujace zwiazane z ukladem dopaminergicznym i histaminergiczny.....	14
I.3.1. Gen receptora dopaminowego D3 (<i>DRD3</i>).....	14
I.3.2. Gen receptora histaminowego H1 (<i>HRH1</i>).....	17
I.3.3. Gen receptora histaminowego H2 (<i>HRH2</i>).....	20
I.4. Hipotezy badawcze.....	22
II. Cel pracy.....	23
III. Materiały i metody.....	24
A. Osoby badane i metody oceny klinicznej.....	24
III.1. Osoby badane.....	24
III.1.1. Chorzy na schizofrenie.....	24
III.1.2. Grupa kontrolna.....	24
III.2. Zastosowane kwestionariusze i skale oceny.....	25
III.2.1. Wywiad ustrukturyzowany.....	25
III.2.2. SCID-I.....	26

III.2.3. Skala Phillipsa.....	26
B. Badania molekularne.....	27
III.3. Aparatura.....	27
III.4. Materiały.....	27
Materiały jednorazowe.....	27
Odczynniki wykorzystane do przygotowywania odczynników złożonych.....	28
Roztwory.....	28
Bufory.....	29
Enzymy.....	30
Markery wielkości.....	30
Startery do reakcji PCR.....	30
III.5. Metody.....	31
III.5.1. Izolacja DNA.....	31
III.5.2. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR).....	32
III.5.3. PCR-RFLP.....	33
III.5.4. PCR-SSCP.....	33
III.6. Analiza poszczególnych polimorfizmów.....	34
III.6.1. Gen receptora dopaminowego D3: wariant polimorficzny Ser9Gly.....	34
III.6.2. Gen receptora histaminowego H1.....	36
III.6.2.1. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny C-17T.....	36
III.6.2.2. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Lys19Asn....	39
III.6.2.3. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Asp349Glu...41	
III.6.2.4. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny A1068G.....	43
III.6.2.5. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Phe358?.....	45
III.6.2.6. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Leu449Ser... 47	
III.6.3. Gen receptora histaminowego H2: wariant polimorficzny A649G.....	49
III.7. Prawo Hardy'ego-Weinberga.....	51
III.8. Analiza statystyczna.....	51
IV. Wyniki.....	52
1. Częstość alleli badanych wariantów polimorficznych.....	52
2. Prawo Hardy'ego-Weinberga.....	54
IV.1. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu <i>DRD3</i> oraz C-17T, A1068G i Phe358? genu <i>HRH1</i> z zachorowaniem na schizofrenie.....	55

IV.1.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3.....	55
IV.1.2. Polimorfizmy genu receptora histaminowego H1.....	58
Podsumowanie.....	61
IV.2. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu	
<i>DRD3</i> oraz C-17T genu <i>HRH1</i> z rodzinnym obciążeniem schizofrenia.....	62
IV.2.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3.....	62
IV.2.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1.....	64
Podsumowanie.....	66
IV.3. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu	
<i>DRD3</i> oraz C-17T genu <i>HRH1</i> z wiekiem zachorowania na	
schizofrenie.....	67
IV.3.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3.....	68
IV.3.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1.....	72
Podsumowanie.....	74
IV.4. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu <i>DRD3</i> oraz	
C-17T genu <i>HRH1</i> z funkcjonowaniem społecznym w okresie	
przedchorobowym, ocenianym przy pomocy podskali I skali Phillipsa.....	75
IV.4.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3.....	76
IV.4.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1.....	81
Podsumowanie.....	84
V. Dyskusja.....	85
V.1. Wstęp do dyskusji.....	85
V.2. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3.....	85
V.3. Polimorfizmy genu receptora histaminowego H1.....	96
V.4. Polimorfizm A649G genu receptora histaminowego H2.....	100
VI. Wnioski.....	103
VII. Streszczenie.....	104
VIII. Pismiennictwo.....	106
IX. Załączniki.....	125

Wykaz skrótów

5HT _{2A}	- receptor serotoniny 2A
5HT _{2C}	- receptor serotoniny 2C
5HT _{1A}	- receptor serotoniny 1A
ADHD <i>Hyperactivity</i>	- zespół nadpobudliwości psychoruchowej (ang. <i>Attention Deficit Disorder</i>)
A	- adenina
Ala	- alanina
APS	- nadsiarczan amonu
Asn	- asparagina
Asp	- kwas asparaginowy
BDNF	- czynnik neurotrofowy pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BrEt	- bromek etydyny
BSA	- albumina surowicy bydlecej
C	- cytozyna
cAMP	- 3'-5'-cykliczny adenozymonofosforan
COMT	- katechol-O-metylotransferaza
ICD-10 <i>International</i>	- międzynarodowa klasyfikacja chorób i przyczyn zgonów (ang. <i>Classification of Diseases - Tenth Revision</i>)
DAO	- oksydaza D-aminokwasowa
DAOA	- aktywator oksydazy D-aminokwasowej
DAT	- transporter dopaminy
ddH ₂ O	- podwójnie destylowana woda
DISC1	- ang. <i>disrupted-in-schizophrenia-1</i>
DNA	- kwas dezoksyrybonukleinowy
dNTPs	- fosforany deoksynukleotydów
DRD2	- receptor dopaminowy D2
DRD3	- receptor dopaminowy D3
dsDNA	- dwuniciowe DNA
DSM-IV	- klasyfikacja zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego (ang. <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
DZ	- dwuzygowe (bliźnięta)
EDTA	- etylenodiaminotetraoctan
EtOH	- etanol
G	- guanina
GABA	- kwas γ-aminomasłowy
GAF	- skala całosciowej oceny funkcjonowania (ang. <i>Global Assessment of Functioning</i>)
Glu	- kwas glutaminowy
Gly	- glicyna
HRH1	- receptor histaminowy H1
HRH2	- receptor histaminowy H2
K	- kobiety
Leu	- leucyna
Lys	- lizyna

LOD	- logarytm szans (ang. <i>logarithm of the odds</i>)
M	- mężczyźni
MAO-A	- monoaminooksydaza A
MAO-B	- monoaminooksydaza A
MAPK	- ang. <i>mitogen-associated protein kinase</i>
MRI	- rezonans magnetyczny (ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
MZ	- monozygotyczne (bliźnięta)
n	- liczebność
NOSIE	- nazwa własna skali (ang. <i>Nurses' Observation Scale for Inpatient Evaluation</i>)
NRG1	- neuregulina 1
OUN	- osrodkowy układ nerwowy
PCR	- reakcja lancuchowej polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
RGS4	- ang. <i>regulator of G protein signaling 4</i>
p	- poziom istotności statystycznej
PET	- pozytronowa tomografia emisyjna (ang. <i>positron emission tomography</i>)
Phe	- fenyloalanina
PRODH	- dehydrogenaza proliny
pz	- para zasad
RBC	- bufor do lizowania erytrocytów
RLFP	- polimorfizmy długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
SCID-I	- nazwa własna kwestionariusza (ang. <i>Schedule for Clinical Interview for DSM-IV</i>)
SD	- odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SDS	- siarczan dodecylo sodowy
Ser	- seryna
SERT	- transporter serotoniny
SNAP-25	- ang. <i>synaptosome-associated protein of 25000 dalton</i>
SNP	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSCP	- nazwa metody molekularnej (ang. <i>single strand conformation polymorphism</i>)
ssDNA	- jednoniciowe DNA
T	- tymina
TAE	- ang. <i>tris-acetate buffer</i>
TBE	- ang. <i>tris-borate buffer</i>
TEMED	- N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
TFA	- formamid
TH	- hydroksylazy tyrozyny
Thr	- treonina
TRIS	- trihydroksymetyloaminometan
U	- jednostka
UTR	- region genu nieulegający translacji (ang. <i>untranslated region</i>)
UV	- światło ultrafioletowe
VMAT1	- ang. <i>vesicular monoamine transporter 11</i>

I. Wstep

I. 1. Schizofrenia i schizotaksja

I.1. 1. Schizofrenia jako pojecie kliniczne

Schizofrenia stanowi jedno z najciezszych zaburzen psychicznych, czesto o bujnych objawach i przewleklym przebiegu, która nawet obecnie, w epoce leków przeciwpsychotycznych, moze prowadzic do degradacji osobowosci i glebokiego uposledzenie funkcjonowania. Poczatek tego trwajacego cale zycie zaburzenia najczesciej ma miejsce we wczesnej mlodosci - okolo 70% przypadków rozpoczyna sie przed 30 rokiem zycia, ze szczytem zachorowan przypadajacym na 15-25 rok zycia u mezczyzn oraz 20-30 rok zycia u kobiet [Häfner, 2003]. Ryzyko zachorowania na schizofrenie w wiekszosci badan ocenia sie na 0,5-1,5% [Jablensky, 2000], niezaleznie od rasy. Jest ono wysokie, a ze wzgledu na mlody wiek zachorowania i niejednokrotnie ciezki przebieg wiaze sie nie tylko z wysokimi kosztami osobistymi, ale takze spolecznymi [Jablensky, 2000].

Schizofrenia manifestuje sie różnorodnymi objawami psychopatologicznymi. Wyodrebnia sie kilka jej postaci. Zgodnie ze stosowanymi obecnie klasyfikacjami – ICD-10 i DSM-IV – w oparciu o dominujace objawy wyróżnia sie schizofrenie paranoidalna, katatoniczna, hebefreniczna (zdezorganizowana wg DSM-IV), nieróznicowana, rezydualna i prosta (bez odpowiednika w DSM-IV). Na obraz kliniczny schizofrenii skladaja sie: zniekształcenie oceny rzeczywistosci, np. w formie objawów wytwórczych (urojen i omamów) czy dereizmu, objawy negatywne (np. alogia, abulia i apatia) oraz dezorganizacja czynnosci psychicznych (niedostosowanie funkcji poznawczych, uczuciowych i motywacyjnych) [Wciórka, 2002]. Za zasadnicza ceche schizofrenii uwaza sie dezintegracje procesów psychicznych. Bleuler podkreslil to wprowadzajac nazwe schizofrenia (greckie „*schizis*”, rozszczepienie, rozpad). Bilikiewicz okreslil to mianem rozpadu struktury osobowosci. Różnorodnosc klinicznych prezentacji schizofrenii podkreslil twórca tego pojecia, Bleuler, tytułujac swoja monografie „Dementia praecox albo grupa schizofrenii”.

Mimo powszechnego stosowania powyzzszych klasyfikacji powstaja coraz wieksze watpliwosci odnosnie ich klinicznej i badawczej wartosci ze wzgledu na czeste trudnosci w zakwalifikowaniu objawów do jednego tylko podtypu oraz z powodu zmiennosci obrazu

klinicznego w przebiegu zaburzenia. Z tego względu objawy coraz częściej przedstawia się w formie tzw. wymiarów psychopatologicznych. Określenie „wymiarów” odnosi się do zespołów objawów pogrupowanych zgodnie z koncepcjami klinicznymi lub patogenetycznymi. Pierwszego podziału na wymiary psychopatologiczne - pozytywne (wytwórcze) i negatywne (deficytowe) - dokonali Crow [Crow, 1980] i Andreasen [Andreasen i Olsen, 1982], nawiązując do wcześniejszych koncepcji Jacksona i Mazurkiewicza. Z czasem powstawały kolejne modele, uwzględniające większe liczby wymiarów, zgodnie z tworzącymi się koncepcjami klinicznymi i etiologicznymi – modele trójwymiarowe (np. objawy pozytywne, negatywne i dezorganizacja), czterowymiarowe (np. objawy pozytywne, negatywne, depresyjne i pobudzenie) i pięciowymiarowe (składnik pozytywny, negatywny, depresyjny/lekowy, poznawczy, pobudzenie) [Wciórka, 2002].

Dokonanie trafnego podziału „grupy schizofrenii” na poszczególne jednostki jest istotne nie tylko ze względu na precyzję diagnostyczną i dobór odpowiedniego leczenia, ale także w kontekście badań, zwłaszcza nad etiologią schizofrenii. Możliwe, że „wymiarów” czy „podtypów klinicznych” mają różne tło etiologiczne, a w takim razie bez ich rozróżnienia znalezienie odpowiedzi na pytanie o pochodzenie schizofrenii może być bardzo trudne.

I.1.2. Etiopatogeneza schizofrenii

I.1.2.1. Czynniki etiopatogenetyczne

Wyniki badań wskazują na wieloczynnikowy charakter schizofrenii. Wśród czynników wpływających na jej powstanie wymienia się:

- 1) czynniki genetyczne (ich udział dokładniej omówiono poniżej);
- 2) czynniki przed- i okołoporodowe [Maki i wsp., 2005], np. infekcje wirusowe w czasie ciąży (możliwość uszkodzenia DNA płodu, w tym genów wpływających na rozwój osłódkowego układu nerwowego (OUN) lub aktywacji mechanizmów immunologicznych zakłócających ten rozwój), urazy okołoporodowe (możliwość uszkodzenia ważnych struktur OUN np. w wyniku hipoksji);
- 3) zaburzenia neuroprzekaznictwa w OUN, głównie w zakresie układu dopaminergicznego i serotonergicznego (pierwotne teorie etiopatologiczne schizofrenii), ale też GABAergicznego, glutaminergicznego i noradrenergicznego [Carlsson i Lindqvist, 1963];

Seemann, 1987; Seeman i Van Tol, 1994];

4) czynniki rodzinne, związane z funkcjonowaniem systemu rodzinnego i komunikacji interpersonalnej w rodzinie [Fromm-Reichmann, 1948; Bateson i wsp., 1956];

5) czynniki środowiskowe, np. wpływ używek, zwłaszcza marihuany, miejsca zamieszkania (rola urbanizacji) [Henquet i wsp., 2005].

Interesująca próba integracji niektórych z powyższych podejść jest sformułowana przez Weinbergera [1987] koncepcja neurorozwojowa schizofrenii. Zakłada ona, że na wczesnym etapie rozwoju OUN dochodzi do zaburzeń w zakresie formowania się struktur mózgowych. Zaburzenia dotyczą np. migracji neuronów [Kovalenko i wsp., 2003] i ich różnicowania, procesów modelowania, procesu apoptozy [Feinberg, 1982-1983; Keshavan i wsp., 1994], czego efektem jest zmniejszenie gęstości neuronów i nadmierna eliminacja synaps, a także powstawanie dysfunkcyjnych sieci neuronalnych [Friston, 1999]. Nieprawidłowości w rozwoju sieci neuronalnej mózgu są także związane z zaburzeniami metabolizmu lipidów błony komórkowej [Puzynski i Rybakowski, 2002]. Ostatecznym efektem jest powstanie mózgowia charakteryzującego się nieprawidłową cytoarchitektoniką i objętością poszczególnych struktur.

Zgodnie z teorią neurorozwojową schizofrenia, a przynajmniej niektóre jej postaci cechujące się wczesnym początkiem, przewagą objawów negatywnych, słabymi wynikami leczenia przeciwpsychotycznego i złym rokowaniem [Rabe-Jablonska i Kotlicka-Antczak, 1998], są wynikiem zaburzeń formowania się struktur mózgowych na wczesnym etapie rozwoju OUN.

I.1.2.2. Hipoteza predyspozycji – stresu

Przedstawione powyżej czynniki i koncepcje najpełniej uwzględnia hipoteza predyspozycji – stresu, która wydaje się najbardziej zgodna z aktualnym stanem wiedzy.

Zakłada ona, że w efekcie działania genów i czynników biologicznych w okresie przed- i okołoporodowym dochodzi do opisanych w ramach teorii neurorozwojowej zaburzeń w kształtowaniu się OUN. Zaburzenia strukturalne są przyczyną nieprawidłowości w funkcjonowaniu OUN, zwłaszcza w zakresie przetwarzania informacji, stopniowania znaczenia bodźców i związanym z tym brakiem selektywności ich wyboru oraz osłabienia hamowania procesów psychicznych związanych z zadziałaniem stresorów. Efektem są zaburzenia w zakresie relacji interpersonalnych i niewłaściwy rozwój kompetencji społecznych. Przy działających dodatkowo

patologicznych czynnikach środowiskowych, związanych np. ze środowiskiem rodzinnym, dochodzi do ukształtowania się osobowości przedchorobowej (określanej przez różnych autorów jako schizotypia lub schizotaksja). Dalsze działanie niekorzystnych bodźców, do których należy np. stres związany z dojrzewaniem, przyjmowanie nowych ról społecznych, oczekiwania otoczenia i stosowanie używek, może spowodować wystąpienie klinicznej psychozy. Następnie toksyczny wpływ samej psychozy teoretycznie może prowadzić do przewlekania się procesu chorobowego [Parnowska, 2004].

I.1.3. Dziedziczenie schizofrenii

I.1.3.1. Model dziedziczenia schizofrenii

Udział czynników genetycznych w etiopatogenezie schizofrenii jest powszechnie uznawany. Najszerzej akceptowanym modelem dziedziczenia tego zaburzenia jest model wieloczynnikowy, zakładający wpływ genów oraz czynników środowiskowych. W przypadku schizofrenii postuluje się dziedziczenie oligogenowe lub poligenowe, z udziałem genów o małym i średnim wpływie [McGuffin i wsp., 1996], których efekt sumuje się, a ekspresja cech chorobowych następuje przy przekroczeniu określonego progu ich wpływu. Wykluczono mendelowski model dziedziczenia schizofrenii (pojedynczy gen lub kilka genów), nawet przy założeniu niepełnej penetracji. Za wykluczeniem tego modelu przemawiały takie przesłanki jak szybki spadek ryzyka zachorowania wraz ze zmniejszającym się stopniem pokrewieństwa, odmienność ekspresji cechy, jaka jest schizofrenia, u bliźniat monozygotycznych oraz trudność w określeniu jasnych kryteriów diagnostycznych [Owen i wsp., 2004].

Uważa się, że chociaż podłoże genetyczne ma znaczący wpływ na predyspozycje do schizofrenii, jej wystąpienie i przebieg, to określone zestawy genów warunkują raczej dziedziczną podatność na te choroby niż jej bezwarunkowe wystąpienie [McGuffin i wsp., 2002]. Odziedziczalność (ang. *heritability*) schizofrenii, czyli stopień zmienności fenotypu przypisywany czynnikom genetycznym, ocenia się w różnych badaniach na 60-85% [Cardno i Gottesman, 2000; Faraone, 2002].

Liczba i interakcje genów odgrywających rolę w zachorowaniu na schizofrenie są jak dotąd nieznane.

I.1.3.2. Badania wskazujące na genetyczne podłoże zaburzeń psychicznych, w tym schizofrenii

Role czynników genetycznych w etiologii zaburzeń psychicznych, w tym schizofrenii, określa się za pomocą badań rodzin, bliźniat i badań adopcyjnych.

W badaniach rodzin ocenia się ryzyko zachorowania dla członków rodziny chorego w porównaniu z częstością zachorowań w populacji ogólnej albo wśród krewnych osób zdrowych. Badania takie w przypadku schizofrenii są prowadzone od początku XX wieku [Rudin, 1916]. Wykazano, że ryzyko zachorowania wzrasta wraz ze stopniem pokrewieństwa, czyli z ilością genów wspólnych z osobą chora. Wynosi ono [Gottesman, 1991] 6 do 17% dla krewnych I stopnia, posiadających 50% wspólnych genów (rodzice, rodzeństwo, bliźnięta dwuzygotyczne, dzieci), 2 do 6% dla krewnych II stopnia, posiadających 25% wspólnych genów (wujowie i ciotki, siostrzency, wnuki, rodzeństwo przyrodnie) oraz około 2% dla krewnych III stopnia, posiadających 12,5% wspólnych genów (kuzyni I stopnia). W przypadku dzieci dwojga rodziców chorych na schizofrenię ryzyko wynosi 46%. W każdym z powyższych przypadków jest ono wyższe od ryzyka populacyjnego określanego jako 1%.

Szczególne odmiany badań rodzin stanowią badania bliźniat. Porównuje się w nich zgodność odnośnie określonej cechy – czy, jak w tym przypadku, choroby – między bliźniętami monozygotycznymi (MZ), posiadającymi 100% wspólnych genów, i dwuzygotycznymi (DZ), posiadającymi 50% wspólnych genów. Dla chorób uwarunkowanych w pełni genetycznie oczekuje się zgodności 100% w przypadku bliźniat MZ i 50% w przypadku bliźniat DZ. W przypadku schizofrenii odsetek zgodności wynosi natomiast około 53% dla bliźniat MZ i 14% dla DZ [Kendler, 1983], co wskazuje na udział zarówno czynników genetycznych, jak i środowiskowych. Stosując nieco odmienną strategię wykazano podobny odsetek zachorowań na schizofrenię – równy kilkanaście procent – wśród potomstwa bliźniat MZ, z których jedno było chore, drugie zdrowe, co podkreśla rolę posiadanych i przekazanych genów, choć ich wpływ nie ujawnił się u jednego z bliźniat [Gottesman i Bertelsen, 1989; Kringlen i Cramer, 1989]. Odziedziczalność, czyli procent zmienności fenotypu związany z działaniem genów i czynników środowiskowych, ocenia się właśnie w oparciu o badania bliźniat.

Na określenie udziału czynników genetycznych w etiologii choroby pozwalają także badania adopcyjne. Zakłada się w nich, że czynniki genetyczne wiążą się tylko z rodzicem biologicznym, a czynniki środowiskowe także z rodzicem adopcyjnym. Badania te mają

pozwolic na ocene, czy dziecko „uczy sie” schizofrenii od swoich rodziców (ang. *vertical cultural transmission*). Odbywaja sie w one dwóch głównych nurtach. W pierwszym nurcie (ang. *affected biological parent design*) porównuje sie czestosc zachorowan na schizofrenie u oddanych bezpośrednio po urodzeniu do adopcji dzieci osób chorych na schizofrenie oraz osób zdrowych (czynniki genetyczne sa istotne gdy choroba czesciej wystepuje wsród dzieci osób chorych). W drugim (ang. *affected adoptee design*) porównuje sie czestosc schizofrenii u rodziców biologicznych i adopcyjnych zdrowych i chorych dzieci oddanych do adopcji (czynniki genetyczne sa znaczące, gdy schizofrenia wystepuje czesciej u rodziców biologicznych osoby chorej niz u rodziców biologicznych osoby zdrowej, albo tez gdy jest ona czestsza u rodziców biologicznych niz adopcyjnych osoby chorej). W przeprowadzonych do dnia dzisiejszego okolo 10 badaniach adopcyjnych [np. Heston, 1966; Kety i wsp., 1994; Tienari i wsp., 2000] zgodnie wykazano wyzsze ryzyko zachorowania w przypadku dzieci posiadajacych rodziców ze schizofrenia, niezaleznie od stanu zdrowia osoby, która je wychowywala oraz u krewnych dzieci chorych. Ryzyko nie bylo natomiast wyzsze dla dzieci nieobciazonych rodzinnie, a wychowywanych przez osobe chora. Badania te sa cenne pomimo pewnych ograniczen, zwiazanych np. z wpływem srodowiska, gdy rodzic byl chory na schizofrenie, a adopcji dokonano w późniejszym okresie zycia dziecka, czy tez z rola czynników srodowiskowych zwiazanych z rodzicami biologicznymi, zwlaszcza powiklan w okresie ciazy i porodu [Tienari i Wynne, 1994].

Pomimo niewatpliwego znaczenia podloza genetycznego, na które wskazuja powyzsze badania, nalezy jednak pamietac, ze w ponad 50% przypadków zachorowan na schizofrenie nie mozna wykazac obciazenia rodzinnego [McGuffin, 1996].

I.1.4. Schizotaksja jako genetycznie uwarunkowana predyspozycja do schizofrenii

Koncepcje schizotaksji sformulowal w 1962 roku Paul Meehl [Meehl, 1962] na okreslenie genetycznie uwarunkowanej predyspozycji do schizofrenii i do schizotypowego zaburzenia osobowosci, które moga ujawnic sie pod wpływem czynników srodowiskowych. Zgodnie z ta teoria objawy schizotaksji – zwykle na poziomie subklinicznym – obecne sa zarówno u chorych przed wystapieniem schizofrenii, jak i u krewnych osoby chorej, posiadajacych z nia wspólne geny, u których jednak predyspozycja genetyczna nie przerodzila sie w zespól objawów klinicznych.

Podstawowymi objawami schizotaksji są zaburzenia uwagi i oceny ważności bodźców (trudności w rozróżnieniu, czy bodziec jest istotny czy nieistotny), związany z tym brak hamowania bodźców oraz zaburzenia komunikacji i interakcji społecznych.

Schizotaksja ujawnia się poprzez deficyty neuropsychologiczne i zaburzenia funkcjonowania, zwłaszcza w relacjach interpersonalnych. Objawy te zwykle utrzymują się na poziomie subklinicznym i są niezauważalne w codziennym funkcjonowaniu, ale można je wykazać w specyficznych badaniach.

Przykładowo, u krewnych osób chorych na schizofrenie częściej stwierdzano zaburzenia ruchów galek ocznych [Rybakowski i Borkowska, 2002], zaburzenia w zakresie słuchowych potencjałów wywołanych [Friedman i Squires-Wheeler, 1994], nieprawidłowości w testach neuropsychologicznych [Kremen i wsp., 1994], zaburzenia strukturalne mózgu w MRI [Seidman i wsp., 1997] oraz objawy neurologiczne [Erlenmeyer-Kimling i wsp., 1982]. Obserwowano u nich zaburzenia percepcji i spowolnienie reakcji na bodźce [Keefe i wsp., 1994], trudności w podtrzymywaniu uwagi [Cornblatt i Keilp, 1994], problemy komunikacyjne, np. niejasność wypowiedzi czy ich niespójność [Velligan i wsp., 1996], zaburzenia myślenia, np. rozluźnienie asocjacji, persewacje, trudności we właściwym doborze słów [Docherty, 1994] oraz zaburzenie funkcji wykonawczych, niezbędnych dla właściwego planowania i wykorzystywania zdobytych informacji [Faraone i wsp., 1995]. Deficyty takie mają bezpośredni wpływ na jakość życia rodzin, w których występuje schizotaksja i schizofrenia. Są jakościowo zbliżone do tych, które występują w schizofrenii, ale mniej nasilone [Faraone i wsp., 2001].

Do chwili obecnej przeprowadzono wiele badań nad genetycznymi uwarunkowaniami powyższych zaburzeń, w których uczestniczyli krewni chorych na schizofrenie. Oceniano rolę genów kodujących białka wpływające na rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego, np. genu synaptofizyny, *BDNF*, *VMAT1*, *DAOA* [Harrison i Owen, 2003; Cannon, 2005]. Badano związek między zaburzeniami neuropsychologicznymi a genami, których produkty mogą teoretycznie odgrywać rolę w procesach poznawczych. Przykładowo, wykazano asocjacje genów *COMT* [Rybakowski i wsp., 2002; Golimbet i wsp., 2006] i *DRD3* [Rybakowski i wsp., 2001] z dysfunkcjami ruchów galek ocznych, genu *DRD3* z zaburzeniami w zakresie potencjałów wywołanych P300 [Mulert i wsp., 2006] oraz genu *COMT* z funkcjami wykonawczymi (test sortowania kart Wisconsin) [Rosa i wsp., 2004]. Postulowano także związek zaburzeń strukturalnych OUN z genami potencjalnie odgrywającymi rolę w etiologii schizofrenii [Steel, 2002].

Zaburzenia funkcjonowania psychospołecznego oceniano najczęściej w grupach złożonych z dzieci, w rodzinach których występowała schizofrenia. U dzieci tych stwierdzano zawężenie zainteresowań, osłabienie interakcji społecznych, izolację [Faraone, 2001], zmniejszenie kompetencji społecznych [Dworkin i wsp., 1994], wycofanie i niesmiałość bądź zwiększenie poziomu agresji [Hans i wsp., 1992]. Badania z udziałem dzieci pozwalają jednak na wyciąganie ograniczonych wniosków, gdyż stwierdzone objawy mogą wiązać się z procesami rozwojowymi i nie muszą przetrwać do wieku dorosłego. Badania z udziałem osób dorosłych jest niestety niewiele. W jednym z takich badań u dorosłych krewnych osób ze schizofrenią stwierdzono deficyty percepcji niewerbalnych elementów komunikacji międzyludzkiej [Toomey i wsp., 1999].

Czynnikiem utrudniającym badanie kompetencji społecznych, zwłaszcza w okresie przedchorobowym, jest niewielka liczba specyficznych narzędzi oceny. Jednym z takich narzędzi jest skala Phillipsa [Phillips, 1953], pozwalająca na ocenę funkcjonowania w zakresie relacji międzyludzkich, zarówno koleżeńskich, jak partnerskich i psychoseksualnych. Wykazano jej dużą wartość kliniczną [Levinson i Campus, 1978] i silną prognostyczną [Schultz i Herron, 1979]. W oparciu o te skale wykazano, że gorsze funkcjonowanie społeczne w okresie przedchorobowym jest predyktorem cięższego przebiegu choroby i gorszego poziomu interakcji społecznych w czasie jej trwania [Harrow i wsp., 1986; Harder i wsp., 1990], wiąże się z mniejszą spontaniczną poprawą kliniczną w okresie poprzedzającym farmakoterapię [Marder i wsp., 1979] oraz z występowaniem zaburzeń neurologicznych [Guy i wsp., 1986]. W jednym z badań wykazano związek między gorszym funkcjonowaniem przedchorobowym w zakresie interakcji społecznych a wcześniejszym wiekiem zachorowania [Guy i wsp., 1986].

Funkcjonowanie społeczne stanowi jeden z wykładników predyspozycji do schizofrenii, czyli schizotaksji. Jest też predyktorem wieku zachorowania, nasilenia i przebiegu choroby.

Istnieje niewiele badań nad genetycznymi uwarunkowaniami funkcjonowania społecznego, a przeprowadzone rzadko dotyczyły schizofrenii. Oceniano związek między poziomem funkcjonowania osób zdrowych i z zaburzeniami nastroju a genem transportera serotoniny [Serretti, 2005] oraz osób z zespołem stresu pourazowego a genem *DRD2* [Lawford i wsp., 2003]. W badaniach z udziałem pacjentów ze schizofrenią stwierdzono związek genów receptorów dopaminowych D2 i D3 z funkcjonowaniem w czasie choroby [Lane i wsp., 2004, 2005]. W jednym tylko badaniu uwzględniono poziom funkcjonowania

przed zachorowaniem na schizofrenie. Wykazano jego związek z genem dysbindiny, białka uczestniczącego w procesach neurorozwojowych [Gornick i wsp., 2005].

Należy pamiętać o złożonych relacjach między raz zaistniałymi objawami. Jedna z hipotez [Cornblatt i Keilp, 1994] mówi, że obecne we wczesnym okresie życia zaburzenia neuropsychologiczne, zwłaszcza w zakresie uwagi, mogą powodować nieprawidłową obróbkę informacji pochodzących z relacji z innymi ludźmi i prowadzić do zaburzeń w interakcjach społecznych. Na pierwotną rolę deficytów neuropsychologicznych wskazuje związek czasowy między objawami: wykazano, że powstają one we wczesnym okresie życia, przed pojawieniem się dysfunkcji interpersonalnych [Fish i Hagin, 1973; Dworkin i wsp., 1993]. U osób ze schizotaksją wytwarza się następnie błędne koło: niepowodzenia w relacjach z innymi ludźmi powodują stres, który coraz bardziej nasila trudności w funkcjonowaniu, które z kolei nasilają stres. Stres społeczny może być czynnikiem wyzwalającym i powodować wcześniejsze wystąpienie choroby.

Niektóre z cech schizotaksji, jak na przykład zaburzenia ruchów gałek ocznych czy słuchowych potencjałów wywołanych, uznaje się za endofenotypy schizofrenii. Endofenotypy definiuje się jako fenotypy pośredniczące, łączące zaburzenia na poziomie genów z nieprawidłowościami procesów biologicznych, a te następnie z objawami klinicznymi [Cannon i Keller, 2006]. Endofenotyp zwykle pozostaje niezauważony, o ile nie wykorzystuje się specyficznych narzędzi jego oceny. Endofenotypy powinny być przynajmniej w umiarkowanym stopniu dziedziczne, wiązać się z przyczynami choroby, a nie jej skutkami, a ich ocena powinna być możliwa na różnych poziomach, np. neuroanatomicznym, neurofizjologicznym, neurochemicznym i behawioralnym.

Zaburzenia funkcjonowania psychospołecznego, charakterystyczne dla schizotaksji, wydają się mieć złożoną patogenezę. Przedstawione jednak wcześniej dane sugerują, że mogą być one choć w części uwarunkowane genetycznie. W związku z tym poszukiwania bliższego podłoża genetycznego wydają się być uzasadnione.

I.2. Metody genetyki molekularnej stosowane w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za zaburzenia psychiczne

Mimo wiedzy o znaczącej roli podłoża genetycznego w etiologii schizofrenii nie wiadomo, które geny warunkują te choroby. W poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za zaburzenia psychiczne, w tym schizofrenie, stosowane są głównie dwa podejścia: analiza sprzeżeń i badania asocjacyjne. Pewną rolę odgrywają też techniki cytogenetyczne,

ponieważ chromosomopatie, w przebiegu których częstość zaburzeń psychicznych przewyższa populacyjną, mogą wskazywać na lokalizację odpowiedzialnych za nie genów [Baron, 2001]. Podejścia polegające na analizie sprzężeń i asocjacji zostały dokładniej omówione poniżej. Nie wykluczają się one, a wręcz mogą się uzupełniać, np. w obszarach chromosomów wskazanych na drodze analizy sprzężeń mogą być zlokalizowane potencjalne geny kandydujące, co zwiększa prawdopodobieństwo ich roli w etiologii choroby.

I.2.1. Analiza sprzężeń

Celem analizy sprzężeń jest identyfikacja regionów chromosomów, w których mogą występować geny związane z daną chorobą. Polega ona na ocenie współwystępowania markera genetycznego i fenotypu chorobowego u poszczególnych członków rodziny. Markerem genetycznym jest określony allel danego genu. O ile marker i choroba są dziedziczone razem, może to oznaczać, że gen determinujący chorobę jest sprzężony z danym allelem i leży blisko niego na chromosomie. Znajomość genów w danym obszarze pozwala następnie na wyodrębnienie tych, które mogą wiązać się z chorobą [Friedman i wsp., 2002].

W analizie sprzężeń wykorzystuje się wiedzę o rekombinacji materiału genetycznego w czasie tworzenia gamet. Podczas tego procesu dochodzi do wymiany materiału genetycznego pomiędzy chromosomem matczynym i ojcowskim. O ile geny nie są sprzężone, ich wymiana (rekombinacja) jest przypadkowa, a jej prawdopodobieństwo wynosi 50%. Sprzężenie występuje natomiast wtedy, gdy geny leżą fizycznie na tyle blisko siebie na chromosomie, że rekombinacja zachodzi rzadziej niż przypadkowo i bardziej prawdopodobne jest ich przekazanie razem niż osobno w czasie mejozy [Friedman i wsp., 2002].

Sprzężenie jest przedstawiane jako wartość tzw. współczynnika logarytmu szans (LOD, ang. *logarithm of the odds*). LOD to logarytm dziesiętny ze stosunku prawdopodobieństwa sprzężenia dwóch loci (znalezienia danej kombinacji alleli w obu loci) do prawdopodobieństwa, że nie są sprzężone. Za mocny dowód na sprzężenie uważany jest $LOD=3$ (szanse na sprzężenie 1000:1), a $LOD=1$ wskazuje na brak sprzężenia (100:1 przeciw sprzężeniu) [Hauser i Czarny-Ratajczak, 2002].

Zaletą tej metody jest możliwość jej zastosowania, gdy etiologia choroby jest niejasna i trudno o postawienie hipotez. Jednak ze względu na istotę tych badań są one

ograniczone do przypadków rodzinnego występowania choroby. Trudność stanowi konieczność badania zarówno zdrowych, jak i chorych członków szeroko pojętej rodziny, a także określenia modelu genetycznego dla obliczeń statystycznych, co nie jest łatwe w przypadku chorób złożonych, takich jak schizofrenia. Ponadto metoda ta skutecznie wykrywa geny o dużym wpływie, może natomiast zawodzić w przypadku genów o wpływie średnim lub niewielkim [Baron, 2001; McGuffin i wsp., 2002; Owen i wsp., 2004], których udział postuluje się w etiologii schizofrenii.

Odmiana badania sprzężen jest metoda badania rodzeństwa (ang. *affected sib pair method*), w której porównuje się oczekiwaną i rzeczywistą częstość alleli określonych genów dziedziczonych przez rodzeństwo od rodzica. Częstsze występowanie markera genetycznego w parach rodzeństwa chorych w porównaniu z parami, w których tylko jedno z rodzeństwa jest chore, sugeruje, że może on być sprzężony z chorobą. Zaletą takiego podejścia jest jego większa łatwość metodologiczna (wymagany jest udział rodziców i dzieci, a nie szerszych rodzin), możliwość wykrywania genów o mniejszym wpływie oraz brak konieczności określenia modelu dziedziczenia [Hauser i wsp., 1996; Hauser i Czarny-Ratajczak, 2002].

Mimo znacznych ograniczeń badania sprzężen w schizofrenii są liczne. Badania całego genomu wskazują przede wszystkim na regiony 1q21-22, 6p24-22 i 13q32-34 [Owen i wsp., 2004]. Inne obiecujące regiony to 1q42, 5q21-33, 6q21-25, 8p21-22, 10p15-11 i 22q11-12. Niedawno przeprowadzona metaanaliza 20 badań całego genomu [Lewis i wsp., 2003] wskazała na chromosomy 1p-q, 2p-q, 5q, 6p, 8p, 11q, 14pter-q13 i 22q11 jako potencjalną lokalizację genów związanych ze schizofrenią. W obrębie tych regionów występują geny, których rolę postuluje się w etiologii tej choroby, takie jak: *RGS4*, *DRD3*, *NRG1*, *DAO*, *5HTR2A*, *G72/G30*, *PRODH* i *COMT*.

I.2.2. Badania asocjacyjne

W odróżnieniu od analizy sprzężen, która dotyczy rodzin, badania asocjacyjne są badaniami populacyjnymi. Ocenia się w nich, czy określony allel danego genu występuje częściej w grupie niespokrewnionych osób dotkniętych chorobą niż zdrowych. Ponieważ wykrycie związku z chorobą w badaniu populacyjnym bez wyboru określonych genów wymagałoby oceny nawet kilkuset tysięcy markerów, najczęściej stosuje się podejście polegające na wyborze tzw. genów kandydujących. Mianem tym określa się geny, które zgodnie z przesłankami teoretycznymi mogą mieć związek z chorobą np. geny kodujące

enzymy, neuroprzekazniki czy receptory. Allele potencjalnie związane z chorobą powinny zmieniać funkcjonowanie genu w stosunku do wariantu podstawowego, np. poprzez wpływ na ekspresję genu (polimorfizmy w obrębie promotora), jego składanie (polimorfizmy w intronach) czy też prowadzić do zmiany sekwencji lub tworzenia nieaktywnego białka (polimorfizmy w regionie kodującym). Są to tak zwane funkcjonalne geny kandydujące (ang. *functional candidates*). Niektóre geny kandydujące (ang. *positional candidates*) wybiera się w oparciu o lokalizację w obszarze wytypowanym uprzednio na drodze analizy sprzężeń lub badań cytogenetycznych [McGuffin i wsp., 2002].

Badania asocjacyjne posiadają wiele zalet [Baron, 2001]. Są to badania populacyjne, nie wymagają więc udziału rodzin, stąd większa łatwość ich przeprowadzenia, pozwalają na wykrycie związku choroby z genami o niewielkim i średnim wpływie, a ponadto nie wymagają skomplikowanych obliczeń statystycznych, jak w przypadku analizy sprzężeń. Minusem jest konieczność podstawowej choćby znajomości etiologii choroby, aby móc dokonać wyboru odpowiednich genów.

Naturalnymi kandydatami do badań asocjacyjnych w schizofrenii są geny związane z układami neuroprzekazników, które hipotetycznie wiążą się z patogenezą schizofrenii: z układem dopaminergicznym, serotonergicznym, glutaminergicznym, GABAergicznym czy histaminergicznym [Harrison i Owen, 2003]. Dotychczasowe badania najczęściej skupiały się na genach związanych z neuroprzekaznictwem dopaminergicznym i serotonergicznym, ze względu na ich potencjalną rolę w świetle podstawowych teorii etiopatogenetycznych schizofrenii.

Teoria dopaminowa mówi, że powstawanie objawów pozytywnych wiąże się z nadczynnością układu dopaminergicznego w obrębie szlaku mezolimbicznego, a objawów negatywnych (deficytowych) z niedoborem dopaminy w korze przedczołowej, a dokładniej na szlaku mezokortykalnym [Abi-Dargham, 2004]. Powstała ona w oparciu o obserwacje dotyczące działania przeciwpsychotycznego leków będących antagonistami układu dopaminergicznego [Carlsson i Lindqvist, 1963] oraz psychozotwórczego wpływu substancji powodujących uwalnianie dopaminy, takich jak kokaina i amfetamina. Dalszego wsparcia dostarczyły badania neuroobrazowe [Seemann, 1987; Seeman i Van Tol, 1994]. Teoria dopaminowa rozwinięto w latach 80-tych, gdy Andreasen i Crow przedstawili koncepcje objawów pozytywnych i negatywnych [Crow, 1980; Andreasen, 1982; Andreasen i Olsen, 1982]. Do jej rozwoju przyczyniło się następnie wykrycie kolejnych odmian receptora dopaminowego (D1-D5), przy czym największą rolę w leczeniu

objawów wytwórczych przypisuje się receptorom D2 [Kapur i Mamo, 2003; Seeman, 2006].

Ważnymi genami kandydującymi z zakresu układu dopaminergicznego są geny receptorów dopaminowych (D1-D5), transportera dopaminy (*DAT*), monoaminooksydaz A i B (*MAO-A*, *MAO-B*), katechol-O-metylotransferazy (*COMT*), oraz hydroksylazy tyrozyny (*TH*). Badania z ich udziałem są liczne, przy czym ich wyniki okazały się niejednoznaczne.

Często badane są też geny z zakresu układu serotonergicznego ze względu na działanie leków, zwłaszcza atypowych, w obrębie tego układu [Benkelfat, 1993; Kahn i Davidson, 1993]. Są to np. geny receptorów serotoninowych (*5HTR2A*, *5HTR2C*, *5HTR1A* i inne) oraz transportera serotoniny (*SERT*) [np. Fan i Sklar, 2005]. Wyniki badań odnośnie związku wariantów polimorficznych tych genów są niejednoznaczne.

O ile geny kodujące białka związane z układem dopaminergicznym i serotonergicznym są często oceniane w badaniach asocjacyjnych, ciekawym, choć rzadko badanym układem jest układ histaminergiczny. Ze względu na powszechną obecność receptorów histaminowych w OUN oraz projekcje neuronów histaminergicznych do wszystkich obszarów mózgu [Martinez-Mir i wsp., 1990; Schwartz i wsp., 1991] wysunięto hipotezę, że histamina, funkcjonując jako neuroprzekaznik i neuromodulator, może pełnić rolę koordynatora aktywności mózgu [Fernandez-Novoa i Cacabelos, 2001; Gu, 2002].

Na potencjalną rolę układu histaminergicznego w etiopatogenezie schizofrenii wskazuje np. jego nadaktywność u chorych na schizofrenię, wyrażona jako podwyższenie poziomów N-tele-metyl-histaminy, głównego metabolitu histaminy w OUN, w płynie mózgowo-rdzeniowym tych chorych [Prell i wsp., 1995]. Układ histaminergiczny bierze udział w kontroli rytmu snu i czuwania [Schwartz i wsp., 1991; Jones, 2005], procesach poznawczych [Alvarez i Banzan, 1986; Tashiro i wsp., 2002; Passani i wsp., 2000] oraz emocjonalno-motywacyjnych [Schwartz i wsp., 1991; Alvarez i wsp., 2001], które często są zaburzone u osób cierpiących na schizofrenię. W badaniach nad podłożem genetycznym schizofrenii oceniano geny receptorów histaminowych H1 i H2, opisane dokładniej poniżej.

Ostatnio uwagę badaczy przyciągnęły geny związane z rozwojem układu nerwowego (migracja i różnicowaniem neuronów, tworzeniem połączeń synaptycznych, itp.), takie jak gen *BDNF*, *SNAP-25*, dysbindiny (*DTNBP*), neureguliny (*NRG1*), *DISC1*, *G72*, *DAOA* [Harrison i Owen, 2003; Norton i wsp., 2006].

I.3. Wybrane geny kandydujące związane z układem dopaminergicznym i histaminergicznym

I.3.1. Gen receptora dopaminowego D3 (*DRD3*)

Gen receptora dopaminowego D3 jest zlokalizowany na chromosomie 3q13.3 [Le Coniat i wsp., 1991]. Ma długość ponad 53 tys. zasad i składa się z 6 egzonów, rozciągniętych na obszarze ponad 40 tys. par zasad, oraz 5 intronów [Griffon i wsp., 1996]. Białko DRD3 składa się z 446 aminokwasów. Istnieją też jego izoformy o długości 400, 208, 327, 299, 342 aminokwasów, tworzone na drodze alternatywnego składania [Sokoloff i wsp., 1990, Griffon i wsp., 1996]. Postuluje się rolę krótkich form w kontroli gęstości funkcjonalnych receptorów D3 w specyficznych warunkach lub stanach chorobowych [Giros i wsp., 1991]. Anney i wsp. zasugerowali istnienie trzech dodatkowych egzonów i dwóch potencjalnych promotorów [Anney i wsp., 2002].

DRD3 należy do rodziny białek sprzężonych z białkiem G, o siedmiu domenach przezblonowych. Działa poprzez hamowanie cykazy adenylowej. Obecność receptora można wprawdzie wykazać w całym ludzkim mózgu [Suzuki i wsp., 1998], ale istotne jego skupienia wykazano zwłaszcza w strukturach starszych filogenetycznie. Najwyższa gęstość receptora D3 stwierdzono w jądrze półleżącym, a umiarkowana w zwojach podstawy i układzie limbicznym [Gurevich i Joyce, 1999]. Sugeruje to jego powiązanie głównie z mezolimbicznym, a nie nigrostriatalnym układem dopaminergicznym [Schwartz i wsp., 2000]. Pozostaje to w zgodzie z postulowaną rolą tego obszaru w etiologii schizofrenii, zwłaszcza w zakresie objawów wytwórczych [Andreasen, 2000]. Sugerowano także rolę receptora D3 w etiologii objawów negatywnych (wykazano wzrost interakcji społecznych po podaniu wybiórczych antagonistów DRD3 zwierzętom doświadczalnym) [Reavill i wsp., 2000] oraz poznawczych (antagoniści DRD3 znacząco zwiększają poziom acetylocholiny oraz poprawiają deficyty poznawcze u zwierząt) [Schwartz i wsp., 2000; Lacroix i wsp., 2003; Laszy i wsp., 2005]. Postulowano także jego znaczenie w kontroli ruchowej. Stwierdzono, że wybiórcza blokada DRD3 nie powoduje objawów pozapiramidowych, podczas gdy taki wpływ miała blokada DRD2 [Millan i wsp., 2004].

Receptory D3 są zlokalizowane zarówno postsynaptycznie, jak i presynaptycznie, gdzie mogą pełnić rolę autoreceptora [Levant, 1997]. Postulowano także rolę DRD3 w kontroli poziomu pozakomórkowej dopaminy, być może poprzez interakcje z transporterem dopaminy [Zapata i Shippenberg, 2002].

Ze względu na dużą gęstość DRD3 w strukturach układu mezo limbicznego zaproponowano, że właśnie on odgrywa kluczową rolę w zaburzeniach procesów bramkowania i obróbki neuronalnej bodźców, do których dochodzi w tych strukturach w schizofrenii [Mogenson i wsp., 1988; Schwartz i wsp., 2000]. Może na to wskazywać np. podwyższona liczba DRD3 u chorych na schizofrenie nie otrzymujących leków [Gurevich i wsp., 1997]. Wzrost liczby DRD3 może odzwierciedlać stan nadczynności dopaminergicznej, charakterystyczny dla schizofrenii [Abi-Dargham i Laruelle, 2005].

Receptor D3 jest celem działania leków przeciwpsychotycznych. Wykazano, że powinowactwo wielu leków do tego receptora jest wprawdzie niższe niż w przypadku receptora D2, nadal jednak jest wysokie - w większości przypadków osiąga ok. 60% powinowactwa do DRD2 [Schwartz i wsp., 2000]. Ze względu na szczególne rozmieszczenie DRD3 w mózgu, postulowano rolę antagonistów DRD3, zwłaszcza ostatnio tworzonych względnie wybiórczych substancji, w leczeniu nie tylko objawów pozytywnych, ale także negatywnych i poznawczych [Levant, 1997; Joyce i Millan, 2005].

W obrębie genu *DRD3* wyróżniono wiele polimorfizmów. Większość zlokalizowana jest w intronach, a ich wpływ na funkcjonowanie genu jest nieznany.

Najczęściej badany jest funkcjonalny polimorfizm Ser9Gly. Znajduje się on w pierwszym egzonie genu i polega na substytucji adeniny przez guaninę w kodonie 9 (AGC w GGC), co powoduje powstanie miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *BalI* oraz zmianę miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *MscI* [Crocq i wsp., 1992]. Na poziomie białka dochodzi do zamiany seryny na glicynę w N-koncowej zewnątrzkomórkowej części receptora [Lannfelt i wsp., 1992], co zmienia powinowactwo receptora do dopaminy. Przy zastosowaniu specyficznych radioligandów wykazano znacząco wyższe powinowactwo wariantów Ser/Gly i Gly/Gly w porównaniu z wariantem Ser/Ser [Lundstrom i Turpin, 1996; Jeanneteau i wsp., 2006]. Warianty Ser/Gly i Gly/Gly nie różniły się natomiast znacząco pod tym względem. Dokładny mechanizm leżący u podłoża tego zjawiska nie jest znany. Lokalizacja wariantu w zewnątrzkomórkowym N-koncowym odcinku receptora sugeruje, że nie bierze on udziału w przyłączaniu ligandu. W jednym z badań wykluczono wpływ zależnych od wariantu różnic w glikozylacji, dystrybucji w komórce oraz transporcie aksonalnym [Jeanneteau i wsp., 2006]. Jednym z postulowanych mechanizmów jest wpływ glicyny i seryny na ogólną konformację receptora, poprzez odmienną interakcję obu wariantów z białkiem regulującym tę konformację [Morfis i wsp., 2003].

Polimorfizm Ser9Gly był najczęściej oceniany w kontekście schizofrenii i innych zaburzeń psychicznych. Pomimo licznych badań nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi co do związku tego polimorfizmu ze schizofrenią. Stwierdzano zarówno związek poszczególnych genotypów lub alleli z tą chorobą [Crocq i wsp., 1992; Mant i wsp., 1994; Shaikh i wsp., 1996; Spurlock i wsp., 1998; Williams i wsp., 1998], jak i brak jakichkolwiek powiązań [Jonsson i wsp., 1993; Malhotra i wsp., 1998; Hawi i wsp., 1998; Kremer i wsp., 2000; Virgos i wsp., 2001; Ambrosio i wsp., 2004]. W metaanalizie 24 badań, która objęła 2619 chorych i 2517 osób z grup kontrolnych związek między polimorfizmem Ser9Gly (a dokładniej z genotypem Ser/Ser i homozygotycznością) a schizofrenią wykazano dopiero po dokonaniu podziału na podgrupy etniczne – tylko dla rasy kaukaskiej i afrykańskiej [Dubertret i wsp., 1998]. Podnoszono też rolę poszczególnych haplotypów sugerując, że istotną rolę w schizofrenii odgrywają polimorfizmy pozostające w sprzężeniu z Ser9Gly [Ishiguro i wsp., 2000; Staddon i wsp., 2005].

Ze względu na powinowactwo leków przeciwpsychotycznych do receptora D3, rolę polimorfizmu Ser9Gly oceniano w kontekście odpowiedzi na leki przeciwpsychotyczne [Lane i wsp., 2005], głównie na klozapinę, ale też na olanzapinę, risperidon czy leki klasyczne. Wyniki tych badań są również niejednoznaczne jak w przypadku oceny roli tego polimorfizmu w etiopatogenezie schizofrenii. Role tych samych alleli i genotypów wykazywano zarówno w przypadku odpowiedzi na leczenie, jak i jej braku, często też żadnego związku nie stwierdzano [Wilffert i wsp., 2005]. Próbowano wiązać ten polimorfizm z objawami niepożądanymi występującymi podczas stosowania leków przeciwpsychotycznych, głównie z późnymi dyskinezami [Lerer i wsp., 2002] oraz z funkcjonowaniem chorych w przebiegu choroby [Lane i wsp., 2005].

Podjęto też próby oceny roli polimorfizmów genu *DRD3*, głównie Ser9Gly, w innych zaburzeniach psychicznych, takich jak choroba afektywna dwubiegunowa [Leszczynska-Rodziwicz i wsp., 2005], uzależnienie od alkoholu, kokainy i opiatów [Wodarz i wsp., 2003; Messas i wsp., 2005] czy zaburzenia osobowości [Munafò i wsp., 2003]. Istnieją też pojedyncze badania nad jego rolą w ADHD [Muglia i wsp., 2002], zaburzeniu obsesyjno-kompulsyjnym [Nicolini i wsp., 1996] i chorobie afektywnej jednobiegunowej [Dikeos i wsp., 1999].

Opisywano też inne warianty polimorficzne genu *DRD3*. Trzy spośród nich, rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *MspI*, znajdują się w intronie 4 [Crocq i wsp., 1992], w intronie 5 [Griffon i wsp., 1996] oraz w obszarze kodującym trzecią petle

cytoplazmatyczna [Sabate i wsp., 1994]. Trawienie enzymem *PvuII* fragmentu kodującego N-koncową część receptora i pierwszą oraz trzecią domenie przezłonową uwidacznia 3 inne polimorfizmy, znane jako P1, P2 i P3 [Sabate i wsp., 1994]. Opisywano także trzy polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP), silnie sprzężone ze sobą wzajemnie i z polimorfizmem Ser9Gly, występujące w obszarze 5' genu o długości 768 nukleotydów [Sivagnanasundaram i wsp., 2000]. Jeden z nich powoduje zmianę aminokwasu lizyny w kwas glutaminowy w 36 pozycji. Inne polimorfizmy pozostające w sprzężeniu z Ser9Gly to -205-G/A [Ishiguro i wsp., 2000, Staddon i wsp., 2005], -712G/C [Ishiguro i wsp., 2000] oraz -7685-G/C [Staddon i wsp., 2005]. Wykazano także istnienie dwóch polimorfizmów w rejonie kodującym: Ala38Thr w pierwszym fragmencie przezłonowym [Ishiguro i wsp., 2000] i Ala17Ala [Pettersson-Fernholm i wsp., 2004], 10 nowych SNP w 5'UTR i potencjalnym promotorze genu [Anney i wsp., 2002] oraz delecje 5 nukleotydów w sekwencji intronowej położonej 3' w stosunku do egzonu 5 [Asherson i wsp., 1996].

Związek polimorfizmów innych niż Ser9Gly ze schizofrenią oceniano w pojedynczych badaniach [Ishiguro i wsp., 2000; Baritaki i wsp., 2004; Staddon i wsp., 2005].

I.3.2. Gen receptora histaminowego H1 (*HRH1*)

Gen receptora histaminowego H1 znajduje się na chromosomie 3p25 [Le Coniat i wsp., 1994; Fukui i wsp., 1994; De Backer i wsp., 1998]. Pierwotnie był on opisywany jako gen pozbawiony intronów, o długości ok. 5,8 tysiący zasad [De Backer i wsp., 1993; Fukui i wsp., 1994]. Kolejna grupa badaczy [Max i wsp., 1996] stwierdziła jednak odmienną budowę fragmentu położonego 5' w stosunku do regionu kodującego, a De Backer i wsp. kilka lat później opisali obecność intronu o długości ok. 5,8 tysiący zasad, znajdującego się w 5'UTR tuż przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji [De Backer i wsp., 1998]. Ostateczna wielkość genu *HRH1* ma wynosić 11,7 kb.

Gen ten koduje białko receptora histaminowego H1 (HRH1), złożone z 487 aminokwasów. HRH1 należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G_q. Składa się z siedmiu domen przezłonowych, w tym bardzo długiej trzeciej domeny (212 aminokwasów), końca N- zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo oraz względnie krótkiego (17 aminokwasów) końca 5' położonego zewnątrzkomórkowo [Hill, 1990, 1992].

HRH1 jest obecny w całym organizmie – znajduje się w większości mięśni gładkich, komórkach śródbłonka, rdzeniu nadnerczy i sercu – ale największa jego gęstość stwierdzono w mózgu [Chang i wsp., 1979a; Hill, 1990; Schwartz i wsp., 1991]. Największe zagęszczenie receptorów H1 wykazano w nowej korze, hipokampie, jądrze półleżącym, wzgórzu i tylnej części podwzgórza, natomiast jego gęstość jest niewielka w mózdzku i zwojach podstawy [Chang i wsp., 1979b; Martinez-Mir i wsp., 1990; Villemagne i wsp., 1991]. Sugerowano, że ze względu na powszechną obecność w mózgu może on pełnić rolę w koordynacji czynności OUN [Hill, 1997].

Mimo powszechnej obecności receptorów H1 w mózgu człowieka przeprowadzono niewiele badań nad jego potencjalną rolą w etiologii zaburzeń psychicznych, w tym także schizofrenii. Istnieją natomiast przesłanki kliniczne wskazujące na jego możliwy udział w etiologii tego zaburzenia. Receptor ten odgrywa znaczącą rolę w regulacji stanu czuwania, spontanicznej aktywności ruchowej, funkcji poznawczych, uczenia się i pamięci oraz wzorców odżywiania [Benca, 1996; Sturman, 1996]. Są one często zaburzone u osób chorych na schizofrenię. W badaniu z zastosowaniem niaprazyny, selektywnego antagonisty receptorów H1, u osób z autyzmem zaobserwowano poprawę jakości snu i funkcjonowania społecznego [Rossi i wsp., 1999]. Obserwacja ta ma potencjalną wartość także w przypadku schizofrenii, której objawami są, między innymi, autyzm oraz zaburzenia funkcjonowania społecznego. Badania farmakologiczne wskazują na wysokie powinowactwo niektórych leków przeciwpsychotycznych, w tym kłozapiny, do HRH1. Może to przyczynić się z jednej strony do skuteczności tych leków, jak też do powstawania objawów niepożądanych związanych z leczeniem, zwłaszcza wzrostu masy ciała i sedacji [Kroeze i wsp., 2003]. Niestety, związek między powinowactwem leków do tego receptora a ich skutecznością nie był dotychczas badany, wykazano natomiast, że najwyższy przyrost masy ciała występował w przypadku leków wyróżniających się wysokim powinowactwem do tych receptorów [Kroeze i wsp., 2003]. Ciekawych informacji odnośnie roli receptora H1 dostarczają badania z udziałem zwierząt. W jednym z takich badań u myszy pozbawionych genów receptorów H1 i H2 wykazano większe zaburzenia procesów poznawczych, zwłaszcza związanych z uczeniem się i pamięcią, niż u myszy posiadających te geny [Dai i wsp., 2007]. W innym badaniu wykazano gorszą aktywność ruchową, pamięć i uczenie się zachowań społecznych u myszy pozbawionych genu *HRH1* [Dai i wsp., 2005]. Autorzy pracy sugerują, że stosowanie leków przeciwpsychotycznych będących antagonistami receptora H1 może być korzystne u chorych na schizofrenię, u których zaburzenia funkcji poznawczych i

interakcji społecznych są częstym objawem. Chociaż trudno bezpośrednio odnieść obserwacje dotyczące myszy wobec ludzi, jednak teoretycznie zagadnienie to jest interesujące. Nie wiadomo w jaki sposób receptor H1 uczestniczy w powyższych procesach. Jedną z hipotez mówi o jego interakcjach z układem dopaminergicznym, ale poza jednym badaniem, w którym wykazano zaburzenia obrotu dopaminy u myszy pozbawionych genu tego receptora, zagadnienie to nie było poruszane. Badania nad rolą receptora H1 z udziałem chorych na schizofrenię są niestety nieliczne. Dotyczy to zwłaszcza badań neurochemicznych i neuroobrazowych. W jednym z nich wykazano obniżenie gęstości receptorów H1 w korze czołowej chorych na schizofrenię [Nakai i wsp., 1991]. W niedawno przeprowadzonym badaniu za pomocą metody PET wykazano mniejszą gęstość receptorów histaminowych H1 w korze czołowej i przedczołowej oraz w zakresie obrotu chorych na schizofrenię, a także słabsze wiązanie przez nie radioligandu [Iwabuchi i wsp., 2005].

Badania genetyczne nad rolą receptora H1 są również nieliczne. Dotychczas opisano kilka wariantów polimorficznych genu *HRH1*. Większość z nich zidentyfikowano w trakcie badań nad schizofrenią, a jeden, C-17T w regionie promotorowym genu, w trakcie badań nad astmą atopową [Sasaki i wsp., 2000]. Mancama i wsp. zidentyfikowali 5 wariantów w regionie kodującym genu, trzy prowadzące do zamiany aminokwasu, jeden do utraty aminokwasu bez zmiany ramki odczytu oraz jeden „niemy”: odpowiednio Lys19Asn, Asp349Glu, Leu449Ser, Phe358? oraz A1068G [Mancama i wsp., 2000]. Grupa ta opisała też trzy nowe polimorfizmy w regionie promotorowym: -974C/A, -1023A/G i -1536G/C [Mancama i wsp., 2002]. Włączając do analizy opisany uprzednio polimorfizm C-17T stwierdzili oni występowanie sprzężenia pomiędzy: -1536G/C i -1023A/G, -1023A/G i -974C/A, -974C/A C-17T oraz -1536G/C i -974C/A. Badaczom tym nie udało się wykazać związku pomiędzy powyższymi wariantami regionu kodującego [Mancama i wsp., 2000] i niekodującego [Mancama i wsp., 2002] a schizofrenią oraz odpowiedzią na leczenie klozapiną. Inna grupa badaczy [Hong i wsp., 2002] oceniała związek polimorfizmu Glu349Asp z polekowym wzrostem masy ciała, lecz asocjacji nie stwierdzono.

I.3.3. Gen receptora histaminowego H2 (HRH2)

Gen receptora histaminowego H2 znajduje się na chromosomie 5q35.2 [Traiffort i wsp. 1995]. Ma on długość 28,1 tysiąca zasad. Składa się z 3 egzonów, które kodują mRNA o długości 2559 zasad [Gantz i wsp., 1991].

Kodowane przez ten gen białko złożone jest z 397 aminokwasów. HRH2 należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G_s [Johnson i wsp., 1979; Leurs i wsp., 1995]. Za jego pośrednictwem histamina powoduje znaczącą akumulację cAMP, zwłaszcza w komórkach OUN [Dismukes i wsp., 1976]. Co ciekawe, receptor ten jest również sprzężony z drugim systemem przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Jego pobudzenie powoduje wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych i następuje akumulacja trójfosfoinozytolu oraz cAMP [Del Valle i wsp., 1992]. Przekazywanie sygnału poprzez kaskadę wapniową może dotyczyć tylko niektórych tkanek [Hill, 1997]. HRH2 składa się z siedmiu domen przezblonowych, końca N- zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo oraz względnie krótkiego końca -C położonego zewnątrzkomórkowo [Hill, 1990, 1992]. Mimo że receptory H1 i H2 mają wspólny ligand, histaminę, różnią się znacząco pod względem budowy. Są wobec siebie homologiczne jedynie w zakresie 43% sekwencji nukleotydów i 33% sekwencji białka [Del Valle i Ganz, 1997]. HRH2 charakteryzuje się nie tak długą trzecią domeną przezblonową jak HRH1 oraz krótszym od niego końcem C. Podobnie jednak jak w przypadku HRH1, kwas asparaginowy (Asp) w trzeciej domenie przezblonowej jest niezbędny dla przyłączenia histaminy [Del Valle i Ganz, 1997]. Mimo odmiennej budowy receptorów H1 i H2, nie stwierdzono między nimi znaczących różnic we właściwościach farmakologicznych.

Wykazano szeroką lokalizację i zróżnicowaną rolę HRH2. Jest on obecny w wielu tkankach i narządach organizmu. W komórkach błony śluzowej żołądka jego stymulacja prowadzi do wzrostu wydzielania soku żołądkowego [Schubert, 1999], w kardiomiocytach wywiera dodatni wpływ chronotropowy i jonotropowy [Levi i Alloatti, 1988], w mięśniach gładkich różnych narządów, np. drogach oddechowych, macicy i naczyniach krwionośnych, prowadzi do ich relaksacji [np. Ottosson i wsp., 1989; Foreman i wsp., 1985], w komórkach układu odpornościowego hamuje reakcje immunologiczne, np. syntezę przeciwciał, proliferację limfocytów T i produkcję cytokin [Khan i wsp., 1987]. HRH2 jest także obecny w wielu obszarach mózgu. Stwierdzono, że w największym zagęszczeniu występuje on w zwojach podstawy, jądrze ogoniastym i skorupie oraz układzie limbicznym, zwłaszcza w hipokampie i jądrze migdałowatym [Traiffort i wsp.,

1992]. Wykazano też jego obecność w innych regionach mózgu, takich jak nowa kora [Martinez-Mir i wsp., 1990; Traiffort i wsp., 1992]. Gęstość tego receptora była natomiast niewielka w mózdku i podwzgórzu. Rola HRH2 w mózgu nie jest jasna. Sugerowano, że szeroka dystrybucja może wskazywać na jego potencjalną rolę jako modulatora funkcji mózgu [Traiffort i wsp., 1992]. Pobudzenie HRH2 w OUN prowadzi do hamowania komórek nerwowych [Haas i Bucher, 1975; Haas i Wolf, 1977]. Szczególną odmianą tego działania jest hamowanie długoterminowej hiperpolaryzacji neuronów, co zwiększa pobudliwość neuronów. Jest to długotrwały efekt, prowadzący do pobudzenia ludzkiego mózgu [Haas i Konnerth, 1983; Haas i Greene, 1986]. W innych badaniach wykazano, że pobudzenie HRH2 wiąże się ze wzmocnieniem transmisji synaptycznej oraz plastyczności synaptycznej w hipokampie [Kostopoulos i wsp., 1988; Brown i wsp., 1995] i we wzgórzu [McCormick i Williamson, 1991].

Istnieje niewiele badań nad rolą HRH2 w schizofrenii. Większość stanowią kliniczne obserwacje i badania dotyczące działania selektywnego antagonisty HRH2, famotydyny, u chorych na schizofrenię, u których ten lek dołączono do leków przeciwpsychotycznych. U chorych tych obserwowano poprawę w zakresie objawów negatywnych: stawali się oni mniej apatyczni, prezentowali większą chęć podejmowania rozmaitych działań i chętniej wchodził w interakcje społeczne [Kaminsky i wsp., 1990; Deutsch i wsp., 1993; Rosse i wsp., 1996; Rosenberg i wsp., 1996; Martinez, 1999]. Kliniczne obserwacje można próbować tłumaczyć w oparciu o mechanizm związany z pobudzeniem HRH2, skutkujący hamowaniem aktywności komórek nerwowych. Blokada HRH2 teoretycznie mogłaby znieść ten wpływ hamujący i prowadzić do aktywacji neuronów [Alvarez i Banzan, 1992]. Inną przesłanką wskazującą na możliwą rolę HRH2 w schizofrenii jest silny antagonizm niektórych leków przeciwpsychotycznych oraz przeciwdepresyjnych wobec tych receptorów [Hill, 1997]. Wpływ taki ma np. haloperidol, chlorpromazyna, mianseryna i imipramina [Spiker i wsp., 1976; Green i Maayani, 1977; Kanof i Greengard, 1978]. Nie wiadomo jednak, na ile działanie leków na ten receptor wiąże się z ich wpływem terapeutycznym.

Nieliczne są również badania genetyczne nad rolą HRH2 w schizofrenii. Dotychczas opisano kilka wariantów polimorficznych genu tego receptora. Pierwszym zidentyfikowanym wariantem był polimorfizm A649G, polegający na substytucji adeniny guaniną [Orange i Heath, 1996a]. Oceniono związek tego wariantu ze schizofrenią i stwierdzono częstsze występowanie allela G i genotypów G/G wśród osób chorych [Orange i wsp., 1996b]. Inna grupa badaczy nie obserwowała jednak tego polimorfizmu w

badanej przez siebie grupie [Ito i wsp., 2000]. Wykazali oni natomiast obecność trzech innych polimorfizmów, G-1018A, A-592G oraz G543A, nie stwierdzili jednak ich związku ze schizofrenią. Mancama i wsp. [2000], w badanej przez siebie grupie, także zidentyfikowali polimorfizm G543A. W kolejnym badaniu [Mancama i wsp., 2002] wykazali obecność trzech dodatkowych polimorfizmów w regionie promotora genu *HRH2*, A-249G, G-1018A oraz G-1077A. Nie stwierdzili związku powyższych polimorfizmów ani ze schizofrenią, ani z odpowiedzią na leczenie kłozapina. W badaniu nad rolą genu *HRH2* w astmie atopowej wykazano obecność dodatkowego polimorfizmu genu tego receptora, C826T [Sasaki i wsp., 2000]. Nie oceniano go jednak w kontekście schizofrenii. Podobnie nie były ocenione w kontekście tej choroby polimorfizmy stwierdzone przez Orange'a i wsp. [1996a]: T398C, A525T, A620G, A692G oraz G802A.

I.4. Hipotezy badawcze:

1. Polimorfizmy genów *DRD3*, *HRH1* oraz *HRH2* mogą wiązać się ze wzrostem ryzyka zachorowania na schizofrenię, szczególnie w grupie obciążonej rodzinnie tą chorobą.
2. Polimorfizmy powyższych genów kandydujących mogą wpływać na wcześniejsze zachorowanie oraz na jakość funkcjonowania psychospołecznego w okresie przedchorobowym.

II. Cel pracy

1. Porównanie częstości występowania, w grupie osób chorych na schizofrenie i zdrowych, genotypów i alleli wariantów polimorficznych genów:
 - a) układu dopaminergicznego:
 - polimorfizmu Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3 (*DRD3*)
 - b) układu histaminergicznego:
 - polimorfizmów: C-17T, Lys19Asn, Asp349Glu, A1068G, Phe358? i Leu449Ser genu receptora histaminowego H1 (*HRH1*) oraz polimorfizmu A649G genu receptora histaminowego H2 (*HRH2*)
2. Ocena związku powyższych polimorfizmów z funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym oraz z wiekiem zachorowania.

III. Materiały i metody

A. Osoby badane i metody oceny klinicznej

III.1. Osoby badane

Osoby włączone do badania pochodziły z populacji polskiej, z terenu województwa pomorskiego. Osoby badane nie były ze sobą spokrewnione. Wszyscy uczestnicy – chorzy oraz osoby zdrowe – wyrazili pisemnie zgodę na udział w badaniu. Wzór zgody pacjenta przedstawiono w załączniku nr 1. Projekt badania uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badan Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdansk, a badanie było prowadzone według jej wytycznych.

III.1.1. Chorzy na schizofrenie

W badaniu uczestniczyło 141 niespokrewnionych osób z rozpoznaniem schizofrenii (72 mężczyzn i 69 kobiet), spełniających kryteria diagnostyczne DSM-IV dla tego zaburzenia (Załącznik nr 2), zrekrutowanych spośród pacjentów Kliniki Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych Akademii Medycznej w Gdansk. Rozpoznanie stawiano w oparciu o badanie przeprowadzone osobiście przez lekarza psychiatrę oraz autorkę niniejszej pracy, na podstawie półstrukturalizowanego wywiadu SCID-I oraz w oparciu o dokumentację medyczną. U 131 chorych postawiono rozpoznanie schizofrenii paranoidalnej, u 9 – prostej, a u 1 – nieodróżnianej. Średni wiek pacjentów wynosił 31,9 lat, SD=11,0 (kobiety 35,0 lat, SD=11,7; mężczyźni 29,0 lat, SD=9,5), a średni czas trwania choroby 8,6 lat (SD=9,0) (kobiety 10,2 lat, SD=10,1; mężczyźni 7,0 lat, SD=7,6).

U wszystkich chorych przeprowadzono badanie funkcjonowania społecznego w okresie przedchorobowym z wykorzystaniem skali Phillipsa.

III.1.2. Grupa kontrolna

Grupa kontrolna obejmowała 146 zdrowych osób (68 mężczyzn i 78 kobiet). Średnia wieku wynosiła 36,2 lat, SD=11,7 (kobiety 37,8 lat, SD=10,7; mężczyźni 34,3 lat, SD=12,6). W skład tej grupy weszli ochotnicy spośród personelu szpitalnego oraz pracowników Akademii Medycznej w Gdansk. Zebrano od nich wywiad dotyczący

ewentualnego leczenia psychiatrycznego oraz rozpoznanych zaburzeń psychicznych u nich lub u członków ich rodzin. Wykluczono osoby, u których wywiad budził pod tym względem jakiegokolwiek podejrzenia. Zebrano też krótki wywiad w kierunku możliwych objawów wskazujących na występowanie chorób psychicznych.

III.2 Zastosowane kwestionariusze i skale oceny

III.2.1. Wywiad ustrukturyzowany

Opracowano wywiad ustrukturyzowany, który pozwolił na zebranie danych demograficznych dotyczących chorego, aktualnych w chwili przeprowadzenia badania. Obejmował on następujące dane:

- 1) Data badania
- 2) Imię i nazwisko
- 3) Data urodzenia
- 4) Wiek
- 5) Płeć
- 6) Stan cywilny: kawaler/panna; żonaty/mezatka; rozwiedziony/rozwódka; wdowiec/wdowa
- 7) Liczba dzieci
- 8) Wykształcenie: podstawowe; zawodowe; średnie; wyższe
- 9) Sytuacja zawodowa: pracuje; renta; emerytura; nie pracuje; uczy się
- 10) Diagnoza kliniczna (brano pod uwagę aktualny epizod schizofrenii, np. schizofrenia paranoidalna)
- 11) Wiek zachorowania (definiowany jako pojawienie się pierwszych objawów chorobowych; oceny dokonano w oparciu o informacje uzyskane od chorego, jego rodziny oraz na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej)
- 12) Długość trwania choroby (od momentu zachorowania, ocena jak wyżej)
- 13) Obciążenie genetyczne (odnotowywano choroby psychiczne występujące w rodzinie – uwzględniano rozpoznanie i stopień pokrewieństwa)
- 14) Inne schorzenia (zarówno psychiczne, jak i somatyczne)
- 15) Przebyte hospitalizacje (odnotowywano liczbe wcześniejszych hospitalizacji, daty, czas ich trwania oraz postawione rozpoznania)

III.2.2. SCID-I

Diagnoze schizofrenii stawiano w oparciu o kwestionariusz SCID-I (ang. *Schedule for Clinical Interview for DSM-IV*) [First i wsp., 2002]. SCID-I to standaryzowany, półustrukturyzowany wywiad kliniczny służący do całościowej oceny stanu psychicznego i diagnozowania zaburzeń osi I (zaburzeń psychicznych) według kryteriów DSM-IV. SCID-I może być wykorzystywany zarówno w badaniu pacjentów, jak i przy pomocy specjalnie w tym celu przygotowanej wersji, w badaniach przesiewowych w populacjach osób, u których wcześniej nie rozpoznawano zaburzeń psychicznych. Przeprowadzenie badania w wykorzystaniem SCID-I trwa około 1-2 godzin. Powinno być wykonane przez osobę z doświadczeniem klinicznym (np. lekarza psychiatrę, psychologa).

III.2.3. Skala Phillipsa

Włączonych do badania chorych na schizofrenie oceniano za pomocą skali Phillipsa [Phillips, 1953]. Skala ta służy do oceny poziomu funkcjonowania społecznego, osiągniętego przez chorego przed zachorowaniem na schizofrenie, możliwych czynników wyzwalających chorobę oraz stwierdzenia, w jakim stopniu osoba chora odbiega od normy w zakresie wybranych objawów psychopatologicznych.

Skale stworzono w oparciu o założenie, że dojrzałość w zakresie funkcji społecznych, zwłaszcza związków międzyludzkich, oraz większa reaktywność afektywna w przebiegu psychozy wiąże się z lepszym rokowaniem. Dodatkowe założenie mówiło o tym, że wyzwolenie choroby pod wpływem możliwych do określenia czynników wskazuje na lepsze przystosowanie przedchorobowe niż w przypadku powolnego, trudnego do zdefiniowania początku choroby, a tym samym wiąże się z lepszym rokowaniem.

Skala Phillipsa dzieli się na trzy podskale (ang. *subscale*), służące do oceny wyżej wymienionych aspektów życia chorego (społeczne funkcjonowanie przedchorobowe, czynniki wyzwalające chorobę, wybrane objawy psychopatologiczne w przebiegu choroby). Są one stosowane rozdzielnie jako niezależne elementy prognostyczne.

Wykazano, że skala Phillipsa ma dużą wartość prognostyczną, a mianowicie uzyskana na podstawie podskali I ocena społecznego funkcjonowania przedchorobowego pozwala na przewidywanie funkcjonowania w czasie choroby [Schultz i Herron, 1979; Harrow i wsp., 1986; Harder i wsp., 1990]. W niniejszej pracy wykorzystano właśnie te podskale. Przedstawiono ją w Załączniku 3.

B. Badania molekularne

III.3. Aparatura

Tabela 1. Aparatura

<i>APARATURA</i>	<i>PRODUCENT</i>
Pipety typ: Research, objętości: 0,1-2,5µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl , 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf
Aparat do elektroforezy poziomej Sub Cell GT	Bio-Rad Kucharczyk
Aparat do elektroforezy pionowej MiniPROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Wirówka	Eppendorf
Mikrowirówka MiniSpin Plus	Eppendorf
Cieplarko-suszarka BD 53	WTB Binder
Elektroniczna waga laboratoryjna WPE 30	Radwag Sartorius
Mieszadło magnetyczne typ ES 21H	Wigo
Mikrowytrzasarka BVX-10	BioMix
Vortex	IKA
pH-metr Accumet Basic	Fisher Scientific
Spektrofotometr ULTROSPEC 2000	Pharmacia Biotech
System dokumentacji zeli Gel-Doc 2000	Bio-Rad
Termocykler PTC-200	MJ Research
Termocykler	Eppendorf
Termomikser	Eppendorf

III.4. Materiały

Tabela 2. Materiały jednorazowe

<i>MATERIAL</i>	<i>PRODUCENT</i>
Probówki do pobierania krwi na EDTA, igły	Sarstedt
Probówki: 200µl, 1,5ml, 15ml, 50ml	Sarstedt
Tipsy	Eppendorf

Tabela 3. Odczynniki wykorzystane do przygotowywania odczynników złożonych (buforów, roztworów, zeli, itp.)

ODCZYNNIK	PRODUCENT
Agarozza Basica LE GQT	Prona
30% akrylamid/bis	Bio-Rad
BrEt (bromek etydyny)	Sigma
EDTA (etylenodiaminotetraoctan)	Serva
C ₂ H ₅ OH (95%) (alkohol etylowy)	Polmos Poznan
2-propanol	Riedel-de Haen
KHCO ₃ (węglan potasu)	Sigma-Aldrich
H ₃ BO ₃ (kwas borny)	Sigma
NaCl (chlorek sodu)	Sigma-Aldrich
Fenol	Merck
Chloroform	Merck
SDS (siarczan dodecylsodowy)	Sigma-Aldrich
TRIS (trihydroksymetyloaminometan)	Sigma
RBC Lysis Solution	Gentra Systems
APS (nadsiarczan amonu)	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad
dNTP (deoksynukleotydy)	Promega
MgCl ₂	Fermentas
50% glicerol	Sigma-Aldrich
10% kwas octowy	Merck
20% azotan srebra	PPH „POCh” SA Gliwice
37% formaldehyd	Merck
Tiosiarczan sodu	Merck
Na ₂ CO ₃ (węglan sodu)	Merck
TFA (formamid)	Merck

Tabela 4. Roztwory

ROZTWÓR	PRODUCENT
5M NaCl	patrz: odczynniki
10% SDS	patrz: odczynniki
10% APS	patrz: odczynniki
20% APS	patrz: odczynniki
Etanol 75 %	patrz: odczynniki
0,5M EDTA	patrz: odczynniki
25 mM MgCl ₂	MBI Fermentas
6x stezony bufor obciążający (Loading Dye Solution)	MBI Fermentas
10 mM dNTPs Mix	MBI Fermentas
Roztwór bromku etydyny	patrz: odczynniki

Tabela 5. Bufory

BUFORY	SKLAD	PRODUCENT
bufor 10x TBE (pH = 7,4)	108 g TRIS 27,5 g kwas borny 20 ml 0,5 M EDTA H ₂ O ad 1 litr	patrz: odczynniki
bufor 50xTAE	242 g Tris-base 57,1 ml lodowego kwasu octowego 100 ml 0,5M EDTA H ₂ O ad 1 litr	patrz: odczynniki
10x stezony bufor do PCR z (NH ₄) ₂ SO ₄	750mM Tris-HCl – pH 8.8 w 25°C 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% Tweed 20	MBI Fermentas
bufor B ⁺ (dla enzymu <i>BseNI</i>)	10mM Tris-HCl - pH 7.5 w 37°C 10mM MgCl ₂ 0.1mg/ml BSA	MBI Fermentas
bufor G ⁺ (dla enzymu <i>MnII</i>)	10mM Tris-HCl - pH 7.5 w 37°C 10mM MgCl ₂ 50mM NaCl 0.1mg/ml BSA	MBI Fermentas
bufor R ⁺ (dla enzymu <i>MvaI269I</i>)	10mM Tris-HCl - pH 8,5 w 37°C 10mM MgCl ₂ 100mM KCl 0.1mg/ml BSA	MBI Fermentas
bufor dla enzymu <i>TaqI</i>	10mM Tris-HCl - pH 8.0 w 37°C 5mM MgCl ₂ 100mM NaCl 0.1mg/ml BSA	MBI Fermentas
bufor dla enzymu <i>MsiI</i>	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT pH 7.9 w 25°C	New England Biolabs
bufor dla enzymu <i>Sau3AI</i>	10mM Bis-Tris-Propan-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (pH 7.0 w 25°C)	New England Biolabs

Tabela 6. Enzymy

ENZYM	PRODUCENT
Proteinaza K	Sigma- Aldrich
<i>Taq</i> polimeraza DNA	MBI Fermentas
<i>MnII</i>	MBI Fermentas
<i>MvaI269I</i>	MBI Fermentas
<i>BseNI</i>	MBI Fermentas
<i>TaqI</i>	MBI Fermentas
<i>Sau3AI</i>	New England Biolabs
<i>MsiII</i>	New England Biolabs

Tabela 7. Markery wielkosci

MARKER MAS	PRODUCENT
Marker wielkosci M1	DNA Gdansk II
pBlueSK DNA/MspI Marker	Biosan

Tabela 8. Startery do reakcji PCR uzyte w badaniu – wszystkie startery wykonano w IBB PAN

Gen i polimorfizm	Sekwencja	Zródlo
<i>DRD3</i> Ser9Gly	<i>Forward: 5' GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA 3'</i> <i>Reverse: 5' AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA 3'</i>	Lannfelt i wsp. 1992
<i>HRH1</i> C-17T	<i>Forward: 5' TCA TCA CCC AAG TCT CTG ACC 3'</i> <i>Reverse: 5' TAC TGT GAC CAA GCA GAT AG 3'</i>	Sasaki i wsp. 2000 Projekt własny
<i>HRH1</i> Lys19Asn	<i>Forward: 5' GCC AAT GAG CCT CCC CAA TTC 3'</i> <i>Reverse: 5' CCA GTG ACC ACT TGG ACA TG 3'</i>	Mancama i wsp. 2000
<i>HRH1</i> Asp349Glu	<i>Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'</i> <i>Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'</i>	Mancama i wsp. 2000
<i>HRH1</i> A1068G	<i>Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'</i> <i>Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'</i>	Mancama i wsp. 2000
<i>HRH1</i> Phe358?	<i>Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'</i> <i>Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'</i>	Mancama i wsp. 2000
<i>HRH1</i> Leu449Ser	<i>Forward: 5' GCA AGA ACT GTT GCA ATG AGC ATT 3'</i> <i>Reverse: 5' GTT GCA CCC CTC AGA GCC</i>	Mancama i wsp. 2000
<i>HRH2</i> A649G	<i>Forward: 5' CAA TCA TAC CAC CTC TAA 3'</i> <i>Reverse: 5' ACA CAA ACG CGG TGA AGT 3'</i>	Orange i wsp. 1996

III.5. Metody

Badania molekularne przeprowadzono w Katedrze Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdansk.

III.5.1. Izolacja DNA metoda fenol/chloroform

I dzien

10 ml krwi obwodowej pobierano do probówki z antykoagulantem (EDTA). W celu izolacji DNA krew przenoszono do sterylnych probówek o pojemnosci 15 ml, a nastepnie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy 5000 g. Odciegano surowice, dodawano do pozostalej czesci 1xRBC do objetosci 15 ml. Próby wytrzasano na wytrzasarce w celu uzyskania jednolitej zawiesiny. Uzyskana zawiesine pozostawiano w temp. 4°C na 30 min., w miedzyczasie dodatkowo mieszajac ja recznie. Nastepnie probówki wirowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, przy 5000 g, po czym wylewano supernatant pozostawiajac osad w probówce. Dodawano 5 ml 1xRBC i intensywnie wytrzasano na wytrzasarce, aby powstala zawiesina. Wirowano 15 min. w temperaturze pokojowej, przy 5000 g. Sekwencje wirowanie – plukanie 1xRBC powtarzano 3-5 krotnie, do uzyskania jasnego osadu. Nastepnie dodawano 5 ml NaCl/EDTA, intensywnie wstrzasano i dodawano 500 µl 10% SDS oraz 12 µl proteinazy K. Probówke z mieszanina umieszczano na noc w cieplarce w temp 37°C.

II dzien

Po wyjeciu probówki z cieplarki dodawano 4 ml fenolu, przez 15 min. delikatnie mieszano, a nastepnie przez 15 min. wirowano w temp. 4°C, przy 5000 g. Probówki pozostawiano pod wyciagiem do osadzenia sie bialka. Odciegano supernatant do sterylnych probówek o objetosci 15 ml, nastepnie dodawano do niego 1,25 ml NaCl i 6,5 ml chloroformu i intensywnie mieszano. Próby przez 1 godz. wytrzasano. Wirowano przez 15 min. w temp. 4°C, przy 5000 g. Odciegano supernatant do sterylnych probówek, uwazajac, aby nie przeniesc widocznego bialka. Dodawano 5 ml propanolu, mieszano i umieszczano na 30 min. w temp. -20°C. Nastepnie przez 1 godz. wytrzasano je na mieszadle, po czym wirowano przez 15 min. w temp. 4°C, przy 5000 g. Delikatnie

wylewano propanol, uważając, aby osad DNA na dnie probówki nie odkleił się. Dodawano 1 ml 75% EtOH o temp. -20°C , przenoszono EtOH oraz DNA do sterylnej probówki 1,5 ml, wirowano 15 min. przy 15000 g. Następnie usuwano EtOH, ponownie dodawano 1 ml 75% EtOH o temp. -20°C i wirowano przez 15 min. w temp. 4°C , przy 15000 g. Usuwano EtOH, zostawiając na dnie osad DNA. DNA suszono min. 2 godz. pod laminarem, a następnie osad DNA rozpuszczano w 300 μl ddH₂O.

III.5.2. Reakcja lancuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*)

Metoda lancuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*), stworzona w latach 80-tych XX wieku [Saiki i wsp., 1985; Mullis i wsp., 1986], pozwala na szybkie (w czasie 1,5 – 3 godzin) i niezwykle wydajne (miliony kopii) zwielokrotnienie określonego fragmentu DNA, ograniczonego oligonukleotydami pełniącymi rolę starterów, które przyłączają się do komplementarnych sekwencji przeciwległych nici DNA. Do reakcji niezbędny jest udział specjalnych enzymów – termostabilnych polimeraz, odpornych na działanie wysokich temperatur niezbędnych do przeprowadzenia reakcji PCR. Zwykle wykorzystuje się termostabilną polimerazę *Taq*, uzyskiwaną z archebakterii *Thermus aquaticus*.

Reakcja PCR składa się z następujących etapów:

- 1) Termiczna denaturacja podwójnej nici DNA na drodze inkubacji w temp. $95-98^{\circ}\text{C}$, w celu umożliwienia przyłączenia starterów.
- 2) Przyłączenie się starterów do komplementarnych odcinków amplifikowanego DNA, w temperaturze mieszczącej się zwykle w zakresie $50-70^{\circ}\text{C}$, uzależnionej od długości i sekwencji starterów, najczęściej dobieranej empirycznie.
- 3) Elongacja – enzymatyczna reakcja powielania fragmentu DNA zawartego między starterami, przy udziale polimerazy *Taq*, która dołącza dezoksynukleotydy do starterów w kierunku 3' komplementarnie do nici stanowiącej matrycę – proces ten zachodzi w temperaturze 72°C .
- 4) Zatrzymanie reakcji poprzez podwyższenie temperatury.
- 5) Reakcja rozpoczyna się ponownie po obniżeniu temperatury – cykl opisany w punktach 1)-4) jest powtarzany, zwykle 30-35 razy, przy czym nowo powstałe nici

sa wykorzystywane jako matryca, co, w związku z eksponencjalnym wzrostem ilości DNA, zapewnia duza wydajnosć procesu.

Sklad mieszaniny reakcyjnej i profil termiczny reakcji PCR zastosowanych w niniejszej pracy przedstawiono szczególowo przy opisie metodologii identyfikacji poszczególnych polimorfizmów.

III.5.3. PCR-RFLP

Polimorfizmy dlugosci fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *restriction fragments length polymorphism*) to warianty sekwencji DNA, które charakteryzują się powstawaniem lub zanikiem miejsca o określonej sekwencji nukleotydów, rozpoznawanego przez restrykcyjne enzymy o charakterze endonukleaz, co umożliwia ich analize [Grodzicker i wsp., 1975].

Zamplifikowany w reakcji PCR fragment DNA w zaleznosci od obecności miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny zostaje pocięty na fragmenty o określonej dlugosci. Obecność lub brak danych fragmentów, przewidywanych w oparciu o znajomość sekwencji badanego fragmentu DNA, ocenia się poprzez rozdział produktów trawienia na zelu agarozowym bądź poliakrylamidowym (fragmenty o różnej dlugosci wedrują z odmienną predkoscia w polu elektrycznym) i porównanie z markerem o znanej dlugosci. Wizualizacji fragmentów DNA w zelu dokonuje się za pomoca bromku etydydy, który interkaluje między nici DNA i jest widoczny w swietle UV.

III.5.4. PCR-SSCP

Metoda SSCP (SSCP, ang. *single strand conformation polymorphism*), która opisali Orita i wsp. [Orita i wsp., 1989], pozwala na wykrywanie niewielkich różnic w sekwencji DNA, nawet dotyczących jednego tylko nukleotydu. Wykorzystuje się fakt, że zmiana jednego nukleotydu w sekwencji fragmentu DNA jest wystarczająca, aby migrował on w zelu poliakrylamidowym z inną predkoscia niż fragment niezmienny. Metoda ta znalazła zastosowanie przy poszukiwaniu nowych mutacji, a także przy analizie polimorfizmów, gdzie jako wzorzec stosowane są fragmenty DNA o znanej strukturze.

Wizualizacji produktów dokonuje się metoda barwienia srebrem (dokładniej omówiona przy opisie metodologii analizy polimorfizmu C-17T genu receptora histaminowego H1, gdzie została zastosowana).

Zastosowane w niniejszej pracy metody (PCR-RFLP, PCR-SSCP), warunki analizy i odczynniki przedstawiono szczegółowo przy opisie metodologii identyfikacji poszczególnych polimorfizmów.

III.6. Analiza poszczególnych polimorfizmów

III.6.1. Gen receptora dopaminowego D3: wariant polimorficzny Ser9Gly

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w kodonie 9 genu receptora dopaminowego D3. W wyniku substytucji A/G w tym kodonie powstaje miejsce restrykcyjne dla enzymu *BalI*. W łańcuchu białkowym dochodzi do zmiany seryny na glicyne w N-koncowej zewnątrzkomórkowej części receptora.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA 3'

Reverse: 5' AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 μ l, skład: 250 ng genomowego DNA, 1,0 μ M obu starterów, 40 mM dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 Tween 20; 0,5U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 95°C przez 2 min; 35 cykli obejmujących: 30 sek. w 94°C, 30 sek. w 60°C, 30 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 5 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 304 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

5µl produktu PCR o długości 304 par zasad trawiono przez noc w temp. 37°C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej równej 10 µl, przy pomocy 0,5U enzymu *MlsI* (izoschizomeru *BalI*), z zastosowaniem buforu R+.

Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w stężeniu 0,25 µg/ml żelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

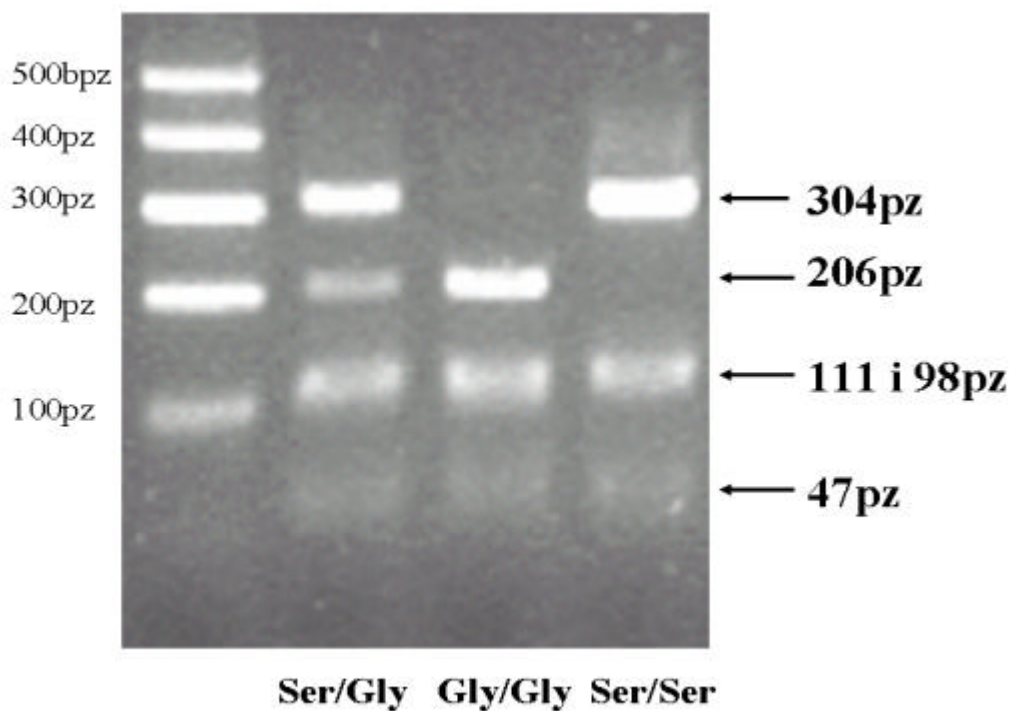
Na obecność allele Ser wskazywała obecność fragmentu DNA o długości 304 par zasad.

Na obecność allele Gly wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 206 i 98 par zasad.

Ponadto zawsze były obecne fragmenty o długości 111 i 47 par zasad, powstające ze względu na obecność w analizowanym produkcie reakcji PCR niepolimorficznych miejsc restrykcyjnych dla enzymu *MlsI*.

Wzór prążków dla poszczególnych wariantów przedstawiono na Ryc.1.

Rycina 1. Polimorfizm Ser9Gly genu *DRD3*. Na Ryc. przedstawiono wzór prasków obrazujący poszczególne genotypy; zaznaczono długość poszczególnych prasków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa scieżka).



III.6.2. Gen receptora histaminowego H1

III.6.2.1. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny C-17T

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie promotorowym genu receptora histaminowego H1, polega on na tranzycji C/T w pozycji -17. Ze względu na to, że tranzycja ta nie powoduje zmian aktywności enzymów restrykcyjnych, polimorfizm ten był analizowany metoda PCR-SSCP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' TCA TCA CCC AAG TCT CTG ACC 3'

Reverse: 5' TAC TGT GAC CAA GCA GAT AG 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 μ l, skład: 200 ng genomowego DNA; 1,0 μ M obu starterów; 200 mM dNTP; 2,0 mM MgCl₂; 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 95°C przez 5 min; 30 cykli obejmujących: 30 sek. w 95°C, 30 sek. w 61°C, 30 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 7 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 206 par zasad.

Analiza metoda SSCP

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego do analizy SSCP:

Skład: 2 ml ddH₂O, 2 ml 30% poliakrylamidu, 500 μ l 10xTBE, 500 μ l 50% glicerolu, 50 μ l 10% APS, 12,5 μ l TEMED – żel wylewano przy użyciu zestawu do elektroforezy pionowej firmy BioRad.

Przygotowanie próbek do analizy SSCP:

do 5 μ l produktu reakcji PCR dodawano 5 μ l formamidu (TFA), mieszano na wytrzasarce i denaturowano przez 5 min. w temp. 95°C w termomikserze. Po denaturacji próbki umieszczano w temp. -20°C na okres kilku min., w czasie którego były przygotowywane do analizy. Do każdej próbki dodawano 2 μ l buforu obciążającego. Tak przygotowane próbki nakładano na żel.

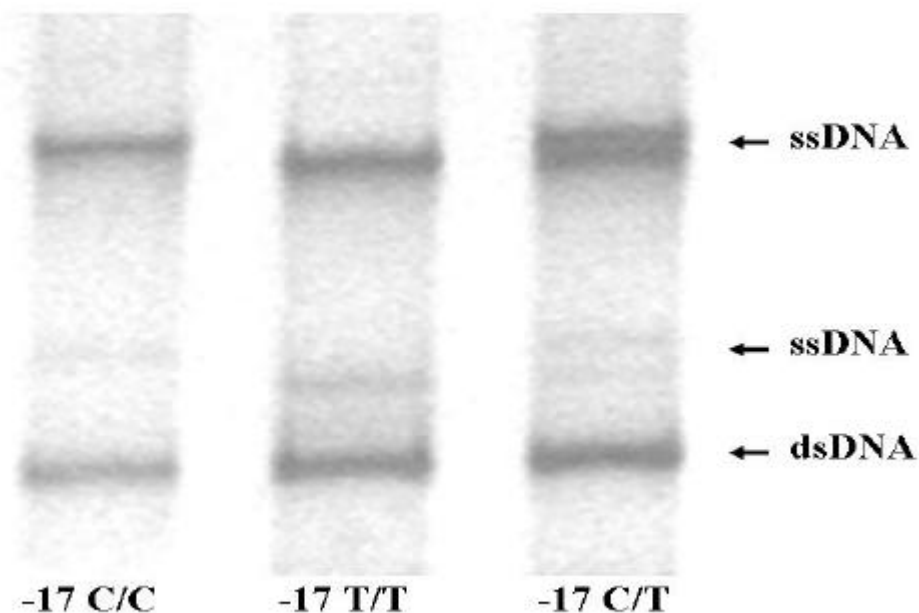
Warunki elektroforezy: 1,5 godz., 200 mV, w temp. 4°C (elektroforeze przeprowadzano w chłodni). Elektroforeze przeprowadzano w buforze 1xTBE, przy użyciu zestawu do elektroforezy pionowej firmy BioRad.

Wizualizacja metoda barwienia srebrem:

Po zakończeniu elektroforezy żel umieszczano na 20 min. w 10% roztworze kwasu octowego, na mieszadle. Następnie żel trzykrotnie płukano ddH₂O i umieszczano na 30 min. w roztworze: 50ml ddH₂O, 250 µl 20% azotanu srebra, 75 µl formaldehydu. Płukano kilkakrotnie ddH₂O. Zalewano roztworem wywoływacza o składzie: 50 ml ddH₂O, 1,5g Na₂CO₃, 75 µl formaldehydu i 10 µl tiosiarczanu, mieszano kilkanaście sekund, do momentu zobaczenia wyraźnych prążków. Zalewano go wówczas 10% roztworem kwasu octowego dla utrwalenia, po kilku minutach przepłukiwano ddH₂O i analizowano w białym świetle.

Wzór prążków dla poszczególnych wariantów przedstawiono na Ryc.2.

Rycina 2. Polimorfizm C-17T genu *HRHI*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący poszczególne genotypy; ssDNA – jednoniciowe DNA, dsDNA – dwuniciowe DNA.



III.6.2.2. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Lys19Asn

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu receptora histaminowego H1. W wyniku substytucji G/C w pozycji 57 pojawia się miejsce restrykcyjne dla enzymu *MspI*. W lancuchu białkowym dochodzi do zmiany lizyny na asparagine pozycji 19.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' GCC AAT GAG CCT CCC CAA TTC 3'

Reverse: 5' CCA GTG ACC ACT TGG ACA TG 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 µl, skład: 100 ng genomowego DNA, 0,5 µM obu starterów, 50 mM dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 96°C przez 3 min; 35 cykli obejmujących: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 58°C, 45 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 10 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 290 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

20µl uprzednio poddanego precipitacji EtOH produktu PCR o długości 290 par zasad trawiono przez noc w temp. 37°C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej równej 10 µl, przy użyciu 1U enzymu *MspI*, z zastosowaniem odpowiedniego buforu.

Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdział na 2% zelu agarozowym z bromkiem etydyny w stezeniu 0,25 $\mu\text{g/ml}$ zelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

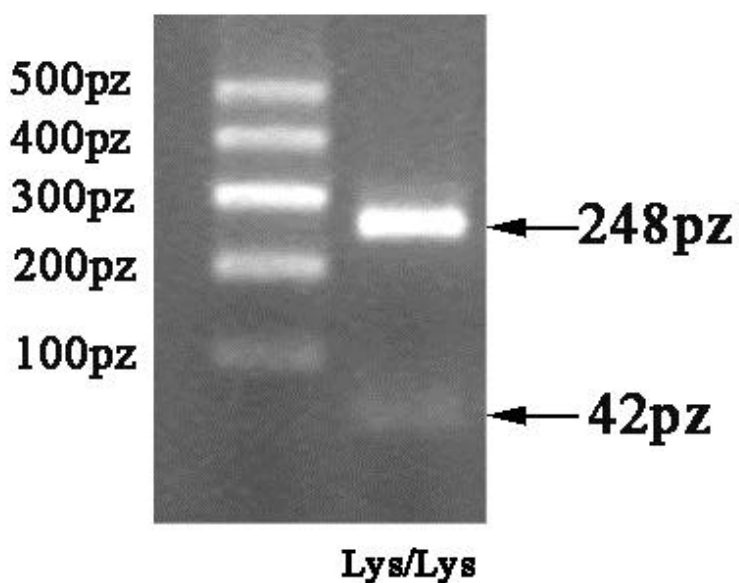
Na obecność allele Lys wskazywała obecność fragmentu DNA o długości 248 par zasad.

Na obecność allele Asn wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 65 i 183 par zasad.

Ponadto zawsze był obecny fragment o długości 42 par zasad, powstający ze względu na obecność w analizowanym produkcie reakcji PCR niepolimorficznego miejsca restrykcyjnego dla enzymu *Msp*I.

W niniejszym badaniu uzyskano tylko jeden allel: Lys (genotyp Lys/Lys), który przedstawiono na Ryc.3.

Rycina 3. Polimorfizm Lys19Asn genu *HRH1*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący genotyp Lys/Lys; zaznaczono długość poszczególnych prążków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.6.2.3. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Asp349Glu

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu receptora histaminowego H1. W wyniku substytucji T/G w pozycji 1047 zanika miejsce restrykcyjne dla enzymu *Sau3AI*. W lancuchu bialkowym dochodzi do zmiany kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy w pozycji 349.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierajacego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'

Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'

Sklad mieszaniny reakcyjnej PCR

objetosc 25 μ l, sklad: 100 ng genomowego DNA, 0,5 μ M obu starterów, 40 mM dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstepna denaturacja w temp. 96°C przez 3 min; 35 cykli obejmujacych: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 67°C, 45 sek. w 72°C; koncowa elongacja przez 10 min. w 72°C

Dlugosc produktu reakcji PCR: 330 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

20 μ l uprzednio poddanego precypitacji EtOH produktu PCR o dlugosci 330 par zasad trawiono przez noc w temp. 37°C, w calkowitej objetosci mieszaniny restrykcyjnej rownej 10 μ l, przy uzyciu 3U enzymu *Sau3AI*, z zastosowaniem buforu G+.

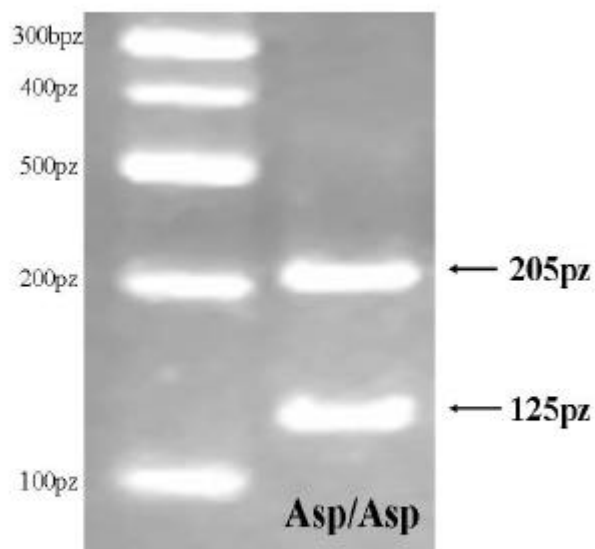
Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydy w stężeniu 0,25 µg/ml żelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

Na obecność allele Asp wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 205 i 125 par zasad.

Na obecność allele Glu wskazywała obecność niestrawionego oryginalnego produktu reakcji PCR o długości 330 par zasad.

W niniejszym badaniu uzyskano tylko jeden allel: Asp (genotyp Asp/Asp), który przedstawiono na Ryc.4.

Rycina 4. Polimorfizm Asp349Glu genu *HRH1*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący genotyp Asp/Asp; zaznaczono długość poszczególnych prążków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.6.2.4. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny A1068G

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu receptora histaminowego H1. W wyniku substytucji A/G w pozycji 1068 powstaje miejsce restrykcyjne dla enzymu *Bse*NI (izoschizomeru *Bsr*I). Mutacja nie powoduje zmiany sekwencji nukleotydów.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'

Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 µl, skład: 100 ng genomowego DNA, 0,5 µM obu starterów, 40 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 96°C przez 3 min; 35 cykli obejmujących: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 67°C, 45 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 10 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 330 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

20µl uprzednio poddanego precipitacji EtOH produktu PCR o długości 330 par zasad trawiono przez noc w temp. 65°C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej wynoszącej 10 µl, przy użyciu 1U enzymu *Bse*NI, z zastosowaniem buforu B+.

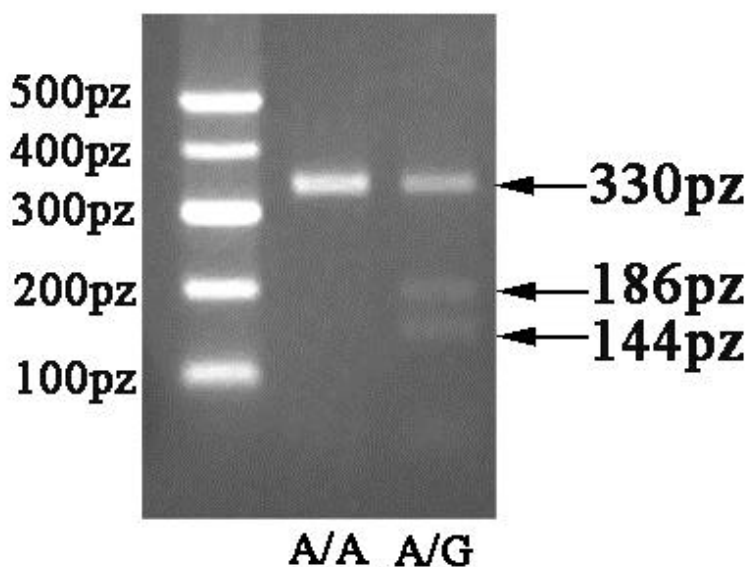
Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w stężeniu 0,25 µg/ml żelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

Na obecność allela A wskazywała obecność pierwotnego produktu reakcji PCR o długości 330 par zasad.

Na obecność allela G wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 144 i 186 par zasad.

Wzór prążków dla poszczególnych wariantów przedstawiono na Ryc.5.

Rycina 5. Polimorfizm A1068G genu *HRH1*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący poszczególne genotypy; zaznaczono długość poszczególnych prążków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.6.2.5. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Phe358?

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm polega na delecji trzech nukleotydów w regionie kodującym genu receptora histaminowego H1, w wyniku czego dochodzi do delecji fenyloalaniny z pozycji 358 białka i powstania miejsca restrykcyjnego dla enzymu *MnII*.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' GTG CAC ATG CAG GCT GCG GCA 3'

Reverse: 5' CAA CTG TTT GGC GGC CTT CCT T 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 µl, skład: 100 ng genomowego DNA, 0,5 µM obu starterów, 40 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 96°C przez 3 min; 35 cykli obejmujących: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 67°C, 45 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 10 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 330 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

20µl uprzednio poddanego precypitacji EtOH produktu PCR o długości 330 par zasad trawiono przez noc w temp. 37°C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej równej 10 µl, przy użyciu 0,4U enzymu *MnII*, z zastosowaniem buforu G+.

Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 17% żelu poliakrylamidowym, który wybarwiano w roztworze bromku etydyny o stężeniu 1 µg/1 ml 1xTAE, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

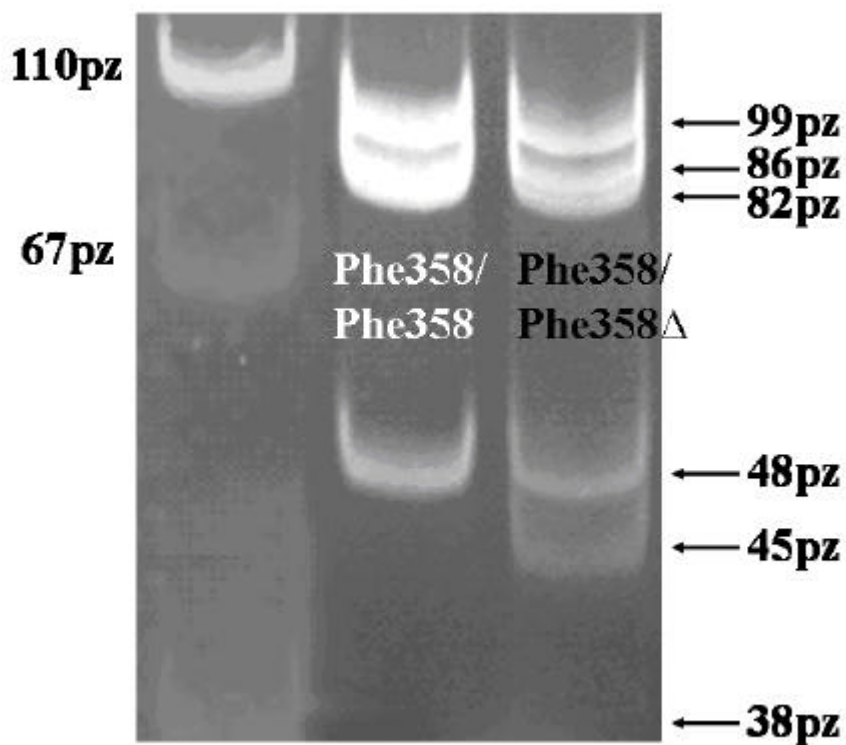
Na obecność allele Phe358 wskazywała obecność fragmentu DNA o długości 86 par zasad.

Na obecność allele Phe358[?] wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 38 i 45 par zasad.

Ponadto zawsze były obecne fragmenty o długości 15, 48, 82 i 99 par zasad, powstające ze względu na obecność w analizowanym produkcie reakcji PCR niepolimorficznych miejsc restrykcyjnych dla enzymu *MnII*.

Wzór prążków dla poszczególnych wariantów przedstawiono na Ryc.6.

Rycina 6. Polimorfizm Phe358[?] genu *HRHI*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący poszczególne genotypy; zaznaczono długość poszczególnych prążków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.6.2.6. Gen receptora histaminowego H1: wariant polimorficzny Leu449Ser

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu receptora histaminowego H1. W wyniku substytucji T/C w pozycji 1346 powstaje miejsce restrykcyjne dla enzymu *Mva*1269I (izoschizomeru *Bsm*I). Mutacja powoduje zmianę leucyny w serynę w pozycji 449 białka.

Polimorfizm analizowano metodą PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierającego badany polimorfizm metodą PCR

Startery:

Forward: 5' GCA AGA ACT GTT GCA ATG AGC ATT 3'

Reverse: 5' GTT GCA CCC CTC AGA GCC TCC 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 µl, skład: 100 ng genomowego DNA, 0,5 µM obu starterów, 50 mM dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 96°C przez 3 min; 35 cykli obejmujących: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 58°C, 45 sek. w 72°C; końcowa elongacja przez 10 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 166 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

20µl uprzednio poddanego precipitacji EtOH produktu PCR o długości 166 par zasad trawiono przez noc w temp. 37°C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej równej 10 µl, przy użyciu 1,5U enzymu *Bse*NI, z zastosowaniem buforu R+.

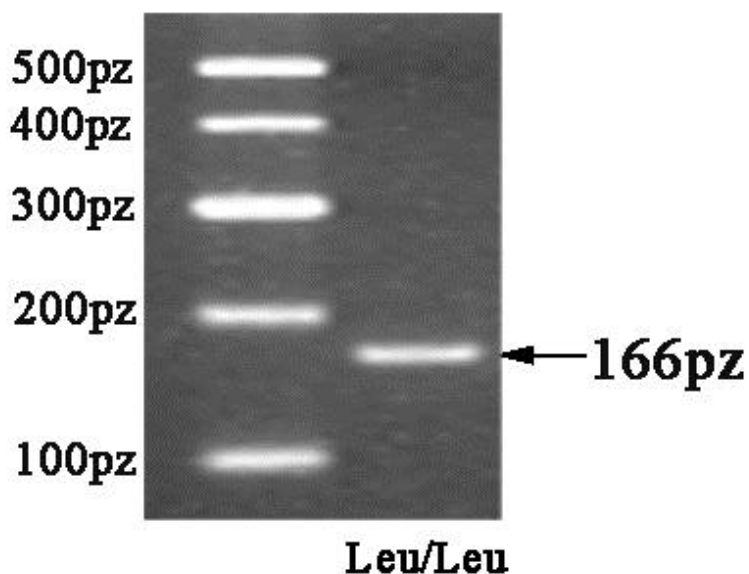
Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydy w stężeniu 0,25 µg/ml żelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

Na obecność allela Leu wskazywała obecność pierwotnego produktu reakcji PCR o długości 166 par zasad.

Na obecność allela Ser wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 141 i 25 par zasad.

W niniejszym badaniu uzyskano tylko jeden allel: Leu. Genotyp Leu/Leu przedstawiono na Ryc. 7 poniżej.

Rycina 7. Polimorfizm Leu449Ser genu *HRH1*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący genotyp Leu/Leu; zaznaczono długość poszczególnych prążków określoną w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.6.3. Gen receptora histaminowego H2: wariant polimorficzny A649G

Opis polimorfizmu

Badany polimorfizm to polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu receptora histaminowego H2. W wyniku substytucji A/G w pozycji 649 powstaje miejsce restrykcyjne dla enzymu *TaqI*. W lancuchu bialkowym w pozycji 217 dochodzi do zmiany asparginy na kwas asparginowy.

Polimorfizm analizowano metoda PCR-RFLP.

Amplifikacja fragmentu zawierajacego badany polimorfizm metoda PCR

Startery:

Forward: 5' CAA TCA TAC CAC CTC TAA 3'

Reverse: 5' ACA CAA ACG CGG TGA AGT 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

objętość 25 μ l, skład: 150 ng genomowego DNA, 1,5 μ M obu starterów, 50 mM dNTP, 2,0 mM $MgCl_2$, 1xPCR bufor: 75 mM Tris-HCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 Tween 20; 1,0U polimerazy *Taq*.

Profil termiczny reakcji PCR

wstępna denaturacja w temp. 96°C przez 5 min; 35 cykli obejmujacych: 45 sek. w 96°C, 45 sek. w 56°C, 45 sek. w 72°C; koncowa elongacja przez 5 min. w 72°C

Długość produktu reakcji PCR: 266 par zasad.

Analiza metoda RFLP

Trawienie enzymatyczne

5 μ l produktu PCR o długości 266 par zasad trawiono przez noc w temp. 65C, w całkowitej objętości mieszaniny restrykcyjnej wynoszącej 10 μ l, przy użyciu 1,5U enzymu *TaqI*, z zastosowaniem buforu *TaqI*.

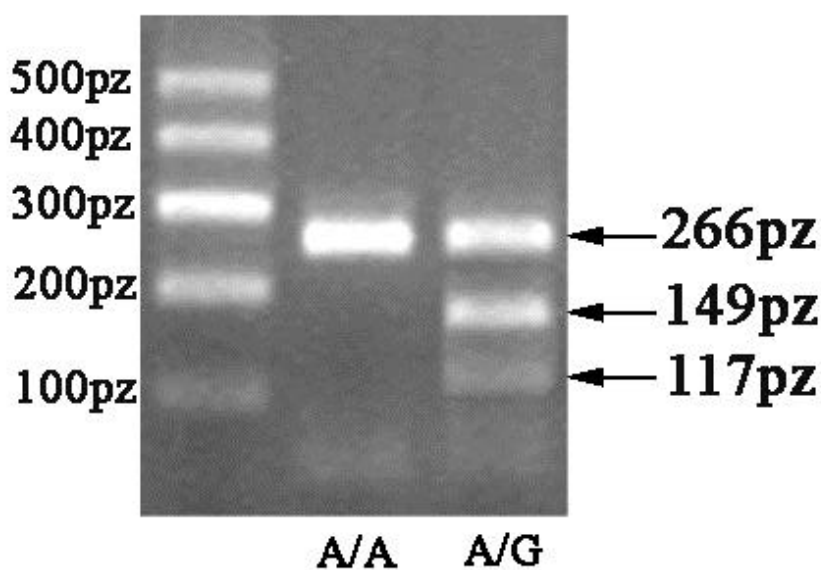
Uzyskane na drodze analizy restrykcyjnej produkty wizualizowano poprzez rozdzielanie na 3% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w stężeniu 0,25 µg/ml żelu, co pozwoliło na określenie poszczególnych genotypów.

Na obecność allele A wskazywała obecność pierwotnego produktu reakcji PCR o długości 266 par zasad.

Na obecność allele G wskazywała obecność dwóch fragmentów DNA o długości 149 i 117 par zasad.

Wzór prążków dla poszczególnych wariantów przedstawiono na Ryc.8.

Rycina 8. Polimorfizm A1068G genu *HRH2*. Na Ryc. przedstawiono wzór prążków obrazujący poszczególne genotypy; zaznaczono długość poszczególnych prążków określona w oparciu o marker wielkości (skrajna lewa ścieżka).



III.7. Prawo Hardy'ego-Weinberga

Obliczenia dotyczące związku polimorfizmów ocenianych w niniejszej pracy z badanymi aspektami schizofrenii zostały poprzedzone oceną zgodności rozkładów poszczególnych genotypów i alleli z prawem Hardy'ego-Weinberga. Prawo to opisuje związek między częstością alleli i genotypów danego genu. Zgodnie z tym prawem związek ten jest stały w kolejnych pokoleniach. Prawo Hardy'ego-Weinberga dla locus o dwóch allelach jest opisane równaniem: $(pA + qa)^2 = p^2 AA + 2pq Aa + q^2 aa$, w którym częstość występowania allela A wynosi p, a częstość allela a wynosi q.

Prawo Hardy'ego-Weinberga opisuje teoretyczną populację, złożoną z organizmów diploidalnych, rozmnażających się płciowo, na tyle dużą, żeby zapewnić swobodne krzyżowanie się osobników, w której nie ma migracji, nie zachodzą w niej mutacje ani dobór naturalny badanego genu. Odstępstwa od prawa Hardy'ego-Weinberga mogą być spowodowane wieloma przyczynami, np. doбором naturalnym określonych alleli, występowaniem nowych mutacji, „dryfem genetycznym” (losowa eliminacja określonych genotypów w małych populacjach), krzyżowaniem się osobników spokrewnionych w niewielkich populacjach.

III.8. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 7.0 firmy Statsoft, Polska.

Analizy częstości genotypów i alleli dokonano przy użyciu testu χ^2 Pearsona. W analizie z zastosowaniem tabel 2x2, w przypadku grup o liczebności <10 , zastosowano poprawkę Yatesa.

Obliczenia statystyczne dotyczące cech ciągłych wykonano w oparciu o analizę rozkładu tych cech. W związku z tym, że rozkład wieku i punktacji w skali Phillipsa dla całej grupy i podgrup wyróżnionych w zależności od płci odbiegał od normalnego, związek tych parametrów z poszczególnymi genotypami i allelami oceniano za pomocą testów nieparametrycznych – testu U Manna-Whitney'a przy porównaniu dwóch grup i testu Kruskala-Wallisa przy porównaniu większej liczby grup.

Jako znamiennej poziom istotności statystycznej uznano $p < 0,05$.

Do oceny zgodności rozkładu genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga zastosowano program „Utility Programs For Analysis Of Genetic Linkage” Otta (1988).

IV. Wyniki

1. Czestosc alleli badanych wariantów polimorficznych

Przed rozpoczęciem analizy z udziałem badanych wariantów polimorficznych dokonano oceny czestosci ich alleli. Wyniki przedstawiono w Tab.9 na sasiedniej stronie. Wykazano niska czestosc wariantów pieciu polimorfizmów genu *HRH1* (Lys19Asn, Asp349Glu, A1068G, 358?Phe i Leu449Ser) oraz polimorfizmu genu *HRH2* (A649G). Z obliczen calkowicie wylaczono cztery polimorfizmy: Asp349Glu i Leu449Ser genu *HRH1*, w przypadku których stwierdzono jedynie wystepowanie podstawowej odmiany (odpowiednio allele Asp i Leu), zarówno w grupie osób chorych na schizofrenie, jak i zdrowych, polimorfizm Lys19Asn, w przypadku którego obecność allele Asn stwierdzono jedynie u dwóch zdrowych osób (czestosc 0,7%) oraz polimorfizm A649G genu *HRH2*, o bardzo niskiej czestosci zarówno w grupie osób chorych na schizofrenie, jak i zdrowych.

W przypadku dwóch kolejnych polimorfizmów genu *HRH1*, Phe358? oraz A1068G, czestosc wariantów była zbyt niska, aby można było uwzględnić te polimorfizmy przy obliczeniach z udziałem podgrup. Z tego względu obliczenia z ich udziałem przeprowadzono tylko przy ocenie ich potencjalnego związku z zachorowaniem na schizofrenie.

Pozostałe badane polimorfizmy, Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*, uwzględniono we wszystkich przeprowadzonych analizach.

Tabela 9. Czestosc (%) alleli wybranych polimorfizmów genów *DRD3*, *HRH1* i *HRH2*. Liczby oznaczaja czestosc wyrazona w procentach.

Gen	<i>DRD3</i>		<i>HRH1</i>										<i>HRH2</i>			
	Polimorfizm Ser9Gly		C-17T		Lys19Asn		Asp349Glu		A1068G		358?Phe		Leu449Ser		A649G	
Allel	Ser	Gly	C	T	Lys	Asn	Asp	Glu	A	G	Phe	Phe?	Leu	Ser	A	G
Czestosc																
Chorzy (cała grupa)	69,3	30,7	83,7	16,3	100,0	0,0	100,0	0,0	97,8	2,2	98,5	1,5	100,0	0,0	99,3	0,7
Zdrowi (cała grupa)	67,1	32,9	87,9	12,1	99,3	0,7	100,0	0,0	97,3	2,7	98,6	1,4	100,0	0,0	99,7	0,3
Chorzy (mężczyźni)	73,6	26,4	79,9	20,1	100,0	0,0	100,0	0,0	97,9	2,1	99,3	0,7	100,0	0,0	100,0	0,0
Zdrowi (mężczyźni)	68,6	31,4	89,7	10,3	99,3	0,7	100,0	0,0	97,1	2,9	100,0	0,0	100,0	0,0	99,3	0,7
Chorzy (kobiety)	64,9	35,1	87,7	12,3	100,0	0,0	100,0	0,0	97,8	2,2	97,7	2,3	100,0	0,0	99,3	0,7
Zdrowi (kobiety)	62,8	37,2	86,3	13,7	99,3	0,7	100,0	0,0	97,5	2,5	97,3	2,7	100,0	0,0	100,0	0,0

2. Prawo Hardy’ego-Weinberga

Przed rozpoczęciem obliczeń statystycznych dla czterech polimorfizmów włączonych do analiz oceniono ich zgodność z prawem Hardy’ego-Weinberga, z uwzględnieniem wyodrębnionych podgrup badanych osób (osoby zdrowe i chore, mężczyźni i kobiety, chorzy obciążeni rodzinnie schizofrenia i chorzy nieobciążeni rodzinnie tym zaburzeniem). Obliczeń dokonano przy pomocy testu χ^2 , a za odstępstwo od prawa Hardy’ego-Weinberga przyjęto poziom $p < 0,05$. Wyniki oceny przedstawiono w Tab.10.

Tabela 10. Ocena zgodności z prawem Hardy’ego-Weinberga dla czterech polimorfizmów badanych genów u 141 chorych ze schizofrenia i 146 osób zdrowych, z uwzględnieniem badanych podgrup. Oceny dokonano przy pomocy testu χ^2 . W Tab. przedstawiono wartość p (istotność statystyczna). Bold oznacza poziom istotności $p < 0,05$, który wskazuje na odstępstwo od prawa Hardy’ego-Weinberga. M – mężczyzna, K – kobieta.

Badana grupa		Gen i jego polimorfizm			
		<i>DRD3</i> Ser9Gly	<i>HRH1</i> C-17T	<i>HRH1</i> A1068G	<i>HRH1</i> 358Phe?
		P			
Chorzy (n=141)		0,119	0,045*	0,793	0,861
M		0,585	0,127	0,853	0,952
K		0,082	0,288	0,852	0,852
Grupa kontrolna (n=146)		0,073	0,450	0,734	0,864
M		0,271	0,714	0,803	(-)
K		0,133	0,533	0,816	0,810
Obciążenie rodzinne schizofrenia	(-)	0,068	0,061	0,794	0,875
	(+)	0,552	0,764	(-)	(-)

Niezgodność z prawem Hardy’ego-Weinberga stwierdzono w przypadku polimorfizmu C-17T genu *HRH1* dla całej grupy pacjentów ($p=0,045$). Grupy tej nie wylaczono z dalszych analiz, ponieważ odchylenie mieściło się na granicy istotności statystycznej, a ponadto dotyczyło osób chorych, więc teoretycznie mogło wiązać się z chorobą. Dla pozostałych grup wykazano zgodność z prawem Hardy’ego-Weinberga.

IV.1. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T, A1068G i Phe358? genu *HRH1* z zachorowaniem na schizofrenie

Związek wybranych polimorfizmów z zachorowaniem na schizofrenia był pierwszym zagadnieniem, którego oceny podjęto się w niniejszej pracy. Ocenie związku wariantów polimorficznych z zachorowaniem na schizofrenie przeprowadzono dla czterech spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych czterech polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9). W przypadku polimorfizmów A1068G i Phe358? genu *HRH1* nie przeprowadzono analiz w podgrupach wyodrębnionych ze względu na płeć. Także w tym przypadku przyczyną była zbyt niska częstość alleli.

Dla polimorfizmów Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T, A1068G i Phe358? genu *HRH1* porównano liczebności genotypów w grupie osób ze schizofrenia i w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych oraz, poprzez porównanie liczebności genotypów posiadających dany allel w grupie osób ze schizofrenia i w grupie osób zdrowych, oceniono wpływ obecności poszczególnych alleli na wystąpienie tego zaburzenia.

IV.1.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3

W badaniu oceniono związek polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* ze schizofrenia. Pierwszym etapem tej oceny było porównanie liczebności genotypów tego polimorfizmu w grupie osób ze schizofrenia i w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych, z uwzględnieniem podziału na podgrupy według płci. Wyniki tego porównania przedstawiono w Tab.11.

Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,83$). Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono także przy porównaniu podgrup pacjentów i osób zdrowych wyodrębnionych na podstawie płci (mężczyźni $p=0,79$, kobiety $p=0,94$).

Tabela 11. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3** w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupa kontrolna, z uwzględnieniem podziału na podgrupy według płci; n - liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>DRD3</i> Ser9Gly: n (%)			
	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly	n
Chorzy (całosc)	62 (45,3)	66 (48,2)	9 (6,5)	137 (100,0)
Zdrowi (całosc)	61 (41,8)	74 (50,7)	11 (7,5)	146 (100,0)
n	123	140	20	283
$\chi^2=0,38$; $df=2$; $p=0,83$				
Chorzy (mężczyźni)	37 (52,9)	29 (41,4)	4 (5,7)	70 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	32 (47,0)	32 (47,0)	4 (6,0)	68 (100,0)
n	69	61	8	138
$\chi^2=0,48$; $df=2$; $p=0,79$				
Chorzy (kobiety)	25 (37,3)	37 (55,2)	5 (7,5)	67 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	29 (37,2)	42 (53,8)	7 (9,0)	78 (100,0)
n	54	79	12	145
$\chi^2=0,11$; $df=2$; $p=0,94$				

Drugim etapem analizy była ocena wpływu obecności alleli Ser oraz Gly na wystąpienie schizofrenii. Ocene te przeprowadzono porównując liczebności genotypów posiadających allele Ser i Gly w grupie osób ze schizofrenia i w grupie osób zdrowych. Wyniki analizy przedstawiono w Tab.12 (dla allele Ser) i Tab.13 (dla allele Gly).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* zawierających allel Ser i allel Gly w grupie pacjentów w porównaniu z grupa kontrolna (odpowiednio $p=0,93$ i $0,56$). Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono także przy porównaniu podgrup pacjentów i osób zdrowych wyodrębnionych na podstawie płci (allel Ser: mężczyźni $p=0,75$, kobiety $p=0,98$; allel Gly: mężczyźni $p=0,50$, kobiety $p=0,99$). Wyniki uzyskane przy ocenie wpływu obecności allele Ser w genotypie na zachorowanie na schizofrenie należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność wyodrębnionych podgrup.

Tabela 12. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3**, w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupa kontrolna, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela Ser**, z uwzględnieniem podziału na podgrupy według płci; n - liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela Ser: n (%)		n
	Ser (+)	Ser (-)	
Chorzy (całość)	128 (93,4)	9 (6,6)	137 (100,0)
Zdrowi (całość)	135 (92,5)	11 (7,5)	146 (100,0)
n	263	20	283
	χ ² =0,007; df=1; p=0,93 *		
Chorzy (mężczyźni)	66 (94,3)	4 (5,7)	70 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	64 (94,1)	4 (5,9)	68 (100,0)
n	130	8	138
	χ ² =0,10; df=1; p=0,75 *		
Chorzy (kobiety)	62 (92,5)	5 (7,5)	67 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	71 (91,0)	7 (9,0)	78 (100,0)
n	133	12	145
	χ ² =0,0007; df=1; p=0,98 *		

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Tabela 13. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3**, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela Gly**, w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupa kontrolna, z uwzględnieniem podziału według płci; n – liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela Gly: n (%)		n
	Gly (+)	Gly (-)	
Chorzy (całość)	75 (54,7)	62 (45,3)	137 (100,0)
Zdrowi (całość)	85 (58,2)	61 (41,8)	146 (100,0)
n	160	123	283
	χ ² =0,35; df=1; p=0,56		
Chorzy (mężczyźni)	33 (47,1)	37 (52,9)	70 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	36 (52,9)	32 (47,1)	68 (100,0)
n	69	69	138
	χ ² =0,46; df=1; p=0,50		
Chorzy (kobiety)	42 (62,7)	25 (37,3)	67 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	49 (62,8)	29 (37,2)	78 (100,0)
n	91	54	145
	χ ² =0,0003; df=1; p=0,99		

IV.1.2. Polimorfizmy genu receptora histaminowego H1

Kolejnym genem oceniany w kontekście wystąpienia schizofrenii był gen *HRH1*. Analizie przeprowadzono dla jego trzech polimorfizmów. Pierwszy z nich stanowił polimorfizm C-17T. Porównano liczebność genotypów tego polimorfizmu w grupie osób ze schizofrenią i w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych, z uwzględnieniem podziału na podgrupy według płci. Wyniki tego porównania przedstawiono w Tab.14.

Tabela 14. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego C-17T genu *HRH1* w grupie pacjentów ze schizofrenią z grupą kontrolną, z uwzględnieniem podziału na podgrupy według płci; n – liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>HRH1</i> C-17T: n (%)			n
	C/C	C/T	T/T	
Chorzy (całosc)	102 (72,3)	32 (22,7)	7 (5,0)	141 (100,0)
Zdrowi (całosc)	110 (78,0)	28 (19,9)	3 (2,1)	141 (100,0)
n	212	60	10	282
$\chi^2=2,17$; $df=2$; $p=0,34$				
Chorzy (mężczyźni)	48 (66,7)	19 (26,4)	5 (6,9)	72 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	55 (80,9)	12 (17,6)	1 (1,5)	68 (100,0)
n	103	31	6	140
$\chi^2=4,61$; $df=2$; $p=0,10$				
Chorzy (kobiety)	54 (78,3)	13 (18,8)	2 (2,9)	69 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	55 (75,3)	16 (21,9)	2 (2,8)	73 (100,0)
n	109	29	4	142
$\chi^2=0,21$; $df=2$; $p=0,90$				

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRH1* w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,34$). Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono także przy porównaniu podgrup pacjentów i osób zdrowych wyodrębnione na podstawie płci (mężczyźni $p=0,10$, kobiety $p=0,90$).

Kolejnym etapem analizy była ocena wpływu obecności alleli powyższego polimorfizmu – C oraz T - na wystąpienie schizofrenii. Wyniki analizy przedstawiono w Tab.15 (dla allela C) i Tab.16 (dla allela T).

Tabela 15. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **C-17T** genu **HRH1**, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela C**, w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupa kontrolna, z uwzględnieniem podziału według płci; n – liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela C: n (%)		n
	C (+)	C (-)	
Chorzy (całość)	134 (95,0)	7 (5,0)	141 (100,0)
Zdrowi (całość)	138 (97,9)	3 (2,1)	141 (100,0)
n	272	10	282
	$\chi^2=0,93$; $df=1$; $p=0,33$ *		
Chorzy (mężczyźni)	67 (93,1)	5 (6,9)	72 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	67 (98,5)	1 (1,5)	68 (100,0)
n	134	6	140
	$\chi^2=1,39$; $df=1$; $p=0,24$ *		
Chorzy (kobiety)	67 (97,1)	2 (2,9)	69 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	71 (97,3)	2 (2,7)	73 (100,0)
n	138	4	142
	$\chi^2=0,20$; $df=1$; $p=0,65$ *		

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Tabela 16. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **C-17T** genu **HRH1**, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela T**, w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupa kontrolna, z uwzględnieniem podziału według płci; n – liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela T: n (%)		n
	T (+)	T (-)	
Chorzy (całość)	39 (27,7)	102 (72,3)	141 (100,0)
Zdrowi (całość)	31 (22,0)	110 (78,0)	141 (100,0)
n	70	212	282
	$\chi^2=1,22$; $df=1$; $p=0,27$		
Chorzy (mężczyźni)	24 (33,3)	48 (66,7)	72 (100,0)
Zdrowi (mężczyźni)	13 (19,1)	55 (80,9)	68 (100,0)
n	37	103	140
	$\chi^2=3,63$; $df=1$; $p=0,06$		
Chorzy (kobiety)	15 (21,7)	54 (78,3)	69 (100,0)
Zdrowi (kobiety)	18 (24,7)	55 (75,3)	73 (100,0)
n	33	109	142
	$\chi^2=0,17$; $df=1$; $p=0,68$		

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRHI* zawierających allel C oraz T w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $p=0,33$ i $0,27$). Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono także przy porównaniu podgrup pacjentów i osób zdrowych wyodrębnionych na podstawie płci (allel C: mężczyźni $p=0,24$, kobiety $p=0,65$; allel T: mężczyźni $p=0,06$, kobiety $p=0,68$), chociaż stwierdzono tendencje w kierunku częstszego występowania genotypów posiadających allel T wśród chorych mężczyzn. Wyniki uzyskane przy ocenie wpływu obecności allela C w genotypie na zachorowanie na schizofrenie należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność wyodrębnionych podgrup.

Drugim polimorfizmem genu *HRHI* ocenianym w kontekście zachorowania na schizofrenie był polimorfizm A1068G. Porównano liczebność jego genotypów w grupie osób ze schizofrenią i w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych. Ze względu na niską częstość allela G nie przeprowadzono oddzielnej analizy dla obu płci. Ze względu na brak homozygot G/G wyniki uzyskane dla genotypów są zarazem wynikami dla wpływu allela G na zachorowanie. Wykonanie analizy uwzględniającej wpływ obecności allela A w genotypie było niemożliwe, gdyż był on obecny u 100% osób z badanych grup. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab.17.

Tabela 17. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **A1068G** genu *HRHI* w grupie pacjentów ze schizofrenią z grupą kontrolną; n - liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>HRHI</i> A1068G: n (%)			n
	A/A	A/G	G/G	
Chorzy (całose)	131 (95,6)	6 (4,4)	0 (0,0)	137 (100,0)
Zdrowi (całose)	138 (94,5)	8 (5,5)	0 (0,0)	146 (100,0)
n	269	14	0	283
$\chi^2=0,02$; $df=1$; $p=0,88$ *				

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu A1068G genu *HRHI* w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,88$). Wyniki należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność podgrupy, w której występuje allel G.

Trzecim ocenianym polimorfizmem genu *HRHI* był polimorfizm Phe358?. Porównano liczebność jego genotypów w grupie osób ze schizofrenia i w grupie kontrolnej złożonej z osób zdrowych. Ze względu na niską częstość allele Phe? nie przeprowadzono oddzielnej analizy dla obu płci. Ze względu na brak homozygot Phe?/Phe? wyniki uzyskane dla genotypów są zarazem wynikami dla wpływu allele Phe? na zachorowanie. Wykonanie analizy uwzględniającej wpływ obecności allele Phe? było niemożliwe, gdyż był on obecny u 100% osób z badanych grup. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab.18.

Tabela 18. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Phe358?** genu *HRHI* w grupie pacjentów ze schizofrenia z grupą kontrolną; n - liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>HRHI</i> Phe358? : n (%)			n
	Phe/Phe	Phe/Phe?	Phe?/Phe?	
Chorzy (całość)	131 (97,0)	4 (3,0)	0 (0,0)	135 (100,0)
Zdrowi (całość)	136 (97,0)	4 (3,0)	0 (0,0)	140 (100,0)
n	267	8	0	275
$\chi^2=0,09$; $df=1$; $p=0,76$ *				

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic w częstości genotypów polimorfizmu Phe358? genu *HRHI* w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,76$). Wyniki należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność podgrupy, w której występuje allele Phe?.

Związek badanych wariantów polimorficznych z zachorowaniem na schizofrenie – podsumowanie

Ocene związku wariantów polimorficznych z zachorowaniem na schizofrenie przeprowadzono dla czterech spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Oceniono polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T, A1068G i Phe358? genu *HRHI*. Przeprowadzenie analizy dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9). W przypadku polimorfizmów A1068G i Phe358? genu *HRHI* nie przeprowadzono analiz w podgrupach

wyodrebnionych ze względu na plec. Także w tym przypadku przyczyną była zbyt niska częstość alleli.

Dla całej badanej grupy oraz podgrup wyodrebnionych na podstawie płci nie wykazano związku badanych wariantów polimorficznych genów *DRD3* i *HRH1* z zachorowaniem na schizofrenię, zarówno przy ocenie różnic w liczebności poszczególnych genotypów, jak i wpływu obecności alleli w genotypie.

IV.2. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1* z rodzinnym obciążeniem schizofrenia

Ocenę związku wariantów polimorficznych z rodzinnym obciążeniem schizofrenia wykonano dla dwóch spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Oceniono polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

W pracy oceniono związek polimorfizmów: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1* z występowaniem obciążenia rodzinnego schizofrenia, zdefiniowanego jako posiadanie krewnych I i II stopnia chorych na schizofrenię. W tym celu porównano liczebności genotypów powyższych polimorfizmów w grupie osób chorych na schizofrenię, obciążonych rodzinnie tym zaburzeniem oraz w grupie osób chorych, ale bez obciążenia rodzinnego tym zaburzeniem. Następnie, poprzez porównanie liczebności genotypów posiadających dany allel badanego polimorfizmu, oceniono wpływ obecności tych alleli na zachorowanie w powyższych grupach.

IV.2.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3

Pierwszym ocenianym polimorfizmem był wariant Ser9Gly genu *DRD3*. Porównano liczebności genotypów tego polimorfizmu w grupie osób chorych na schizofrenię, obciążonych rodzinnie tym zaburzeniem oraz osób chorych, ale nim nie obciążonych. Wyniki tego porównania przedstawiono w Tab.19.

Tabela 19. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3** w grupie osób chorych na schizofrenie, obciążonych i nieobciążonych rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale i nieobciążonych; n - liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>DRD3</i> Ser9Gly: n (%)			Ser/Ser
	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly	
Schizofrenia w rodzinie (-)	41 (42,3)	50 (51,5)	6 (6,2)	97 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	15 (55,6)	11 (40,7)	1 (3,7)	27 (100,0)
n	56	61	7	124
$\chi^2 = 1,56; df=2; p=0,46$				

Częstość genotypów wariantu polimorficznego Ser9Gly genu *DRD3* nie różni się istotnie w grupie pacjentów obciążonych rodzinnie schizofrenia w porównaniu z grupą nieobciążoną tym zaburzeniem ($p=0,46$).

Drugim etapem analizy była ocena wpływu obecności alleli polimorfizmu Ser9Gly – Ser oraz Gly – na wystąpienie schizofrenii w grupach wyodrębnionych na podstawie występowania obciążenia rodzinnego tym zaburzeniem. Oceny te przeprowadzono porównując liczebności genotypów posiadających allele Ser i Gly w grupie osób chorych obciążonych rodzinnie schizofrenia oraz w grupie osób chorych nieobciążonych tym zaburzeniem. Wyniki analizy przedstawiono w Tab.20 (dla allele Ser) i Tab.21 (dla allele Gly).

Tabela 20. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3** w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych i nieobciążonych rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale i nieobciążonych, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność allele **Ser**; n - liczebność grupy.

Grupa	Obecność allele Ser: n (%)		n
	Ser (+)	Ser (-)	
Schizofrenia w rodzinie (-)	91 (93,8)	6 (6,2)	97 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	26 (96,3)	1 (3,7)	27 (100,0)
n	117	7	124
$\chi^2=0,0005; df=1; p=0,98 *$			

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa

Tabela 21. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **Ser9Gly** genu **DRD3** w grupie osób chorych na schizofrenie, obciążonych nie rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nie obciążonych, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela Gly**; n - liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela Gly: n (%)		n
	Gly (+)	Gly (-)	
Schizofrenia w rodzinie (-)	56 (57,7)	41 (42,3)	97 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	12 (44,4)	15 (55,6)	27 (100,0)
n	68	56	124
$\chi^2=1,51$; $df=1$; $p=0,22$			

Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości genotypów w grupie osób chorych na schizofrenie, obciążonych nie rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nie obciążonych, w podgrupach wyodrębnionych ze względu na obecność allela Ser ($p=0,98$) i allela Gly ($p=0,22$).

IV.2.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1

Drugim polimorfizmem badanym w kontekście obciążenia rodzinnego schizofrenia był wariant C-17T genu *HRH1*. Porównano liczebności genotypów tego polimorfizmu w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych rodzinnie tym zaburzeniem oraz osób chorych, ale nim nie obciążonych. Wyniki tego porównania przedstawiono w Tab.22.

Tabela 22. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **C-17T** genu **HRH1** w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych nie rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nie obciążonych; n - liczebność grupy.

Grupa	Genotypy <i>HRH1</i> C-17T: n (%)			n
	C/C	C/T	T/T	
Schizofrenia w rodzinie (-)	67 (67,0)	26 (26,0)	7 (7,00)	100 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	25 (89,3)	3 (10,7)	0 (0,0)	28 (100,0)
n	102	32	7	128
$\chi^2 = 5,73$; $df=2$; $p=0,06$				

Przy porównaniu podgrup chorych obciążonych rodzinnie schizofrenia (krewni I i II stopnia) i nieobciążonych stwierdzono tendencje w kierunku istotności statystycznej wynikająca z występowania genotypów T/T jedynie w grupie chorych nieobciążonych rodzinnie schizofrenia oraz z częstszego występowania genotypów C/T w tej grupie ($p=0,06$).

Następnie oceniono wpływ obecności alleli polimorfizmu C-17T genu *HRHI* – C oraz T – na wystąpienie schizofrenii w grupach wyodrębnionych na podstawie występowania obciążenia rodzinnego tym zaburzeniem. Ocene te przeprowadzono porównując liczebności genotypów posiadających allele Ser i Gly w grupie osób chorych obciążonych rodzinnie schizofrenia oraz w grupie osób chorych nieobciążonych. Wyniki analizy przedstawiono w Tab.23 (dla allele C) i Tab.24 (dla allele T).

Tabela 23. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego C-17T genu *HRHI* w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych nie rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nie obciążonych, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność allele C; n - liczebność grupy.

Grupa	Obecność allele C: n(%)		n
	C (+)	C (-)	
Schizofrenia w rodzinie (-)	93 (93,0)	7 (7,0)	100 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	28 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
n	121	7	128
	$\chi^2=0,94$; $df=1$; $p=0,33$ *		

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości genotypów w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych nie rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nie obciążonych, w podgrupach wyodrębnionych ze względu na obecność allele C ($p=0,33$). Wykazano natomiast istotnie częstsze występowanie genotypów zawierających allele T w grupie chorych nieobciążonych rodzinnie schizofrenia w porównaniu z grupą obciążoną tym zaburzeniem ($p=0,04$).

Tabela 24. Porównanie liczebności genotypów wariantu polimorficznego **C-17T** genu **HRH1** w grupie osób chorych na schizofrenie i obciążonych nią rodzinnie (krewni I i II stopnia) oraz osób chorych, ale nią nie obciążonych, w podgrupach wyróżnionych ze względu na obecność **allela T**; n - liczebność grupy.

Grupa	Obecność allela C: n (%)		n
	T (+)	T (-)	
Schizofrenia w rodzinie (-)	33 (33,0)	67 (67,0)	100 (100,0)
Schizofrenia w rodzinie (+)	3 (10,7)	25 (89,3)	28 (100,0)
n	36	92	128
$\chi^2=4,33$; $df=1$; $p=0,04$ *			

* Ze względu na niewielką liczebność w grupach zastosowano poprawkę Yatesa.

Ocena związku badanych wariantów polimorficznych z rodzinnym obciążeniem schizofrenia u krewnych I i II stopnia - podsumowanie

Ocena związku wariantów polimorficznych z rodzinnym obciążeniem schizofrenia przeprowadzono dla dwóch spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Oceniono polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

Wykazano istotnie częstsze występowanie genotypów zawierających allel T polimorfizmu C-17T genu *HRH2* w grupie chorych nieobciążonych rodzinnie schizofrenia w porównaniu z grupą obciążoną tym zaburzeniem ($p=0,04$).

W przypadku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

IV.3. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1* z wiekiem zachorowania na schizofrenie

Kolejnym ocenianym zagadnieniem był związek badanych polimorfizmów z wiekiem zachorowania na schizofrenie.

Ocene związku wariantów polimorficznych z wiekiem zachorowania na schizofrenie przeprowadzono dla dwóch spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Oceniono polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

Przedstawiono wiek zachorowania na schizofrenie dla poszczególnych genotypów i alleli, uwzględniono także różnice zależne od płci.

W związku z tym, że rozkład wieku dla całej grupy i podgrup wyróżnionych w zależności od płci odbiegał od normalnego, związek wieku zachorowania z poszczególnymi genotypami i allelami oceniano za pomocą testów nieparametrycznych – testu Kruskala-Wallisa dla genotypów i testu U Manna-Whitney’a dla alleli.

Pierwszym etapem analizy było porównanie wieku zachorowania na schizofrenie między mężczyznami i kobietami w badanej grupie. Wyniki przedstawiono w Tab.25.

Tabela 25. Związek między wiekiem zachorowania na schizofrenie a płcią; n - liczebność grupy, M – mężczyźni, K – kobiety, bold oznacza wynik istotny statystycznie.

Plec	M	K
n	72	69
Wiek zachorowania: mediana (lata) (min.-maks.)	22,0 (13,0-39,0)	23,0 (7,0-45,0)
Test U Manna-Whitney’a	Z=-2,38; p=0,02	

Zaobserwowano istotnie niższy wiek zachorowania na schizofrenie w grupie mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet (p=0,02).

IV.3.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3

W pracy dokonano oceny związku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* z wiekiem zachorowania na schizofrenie. Analizowano różnice w wieku zachorowania dla poszczególnych genotypów oraz oceniano wpływ obecności poszczególnych alleli na ten parametr.

Pierwszym etapem była ocena różnic między poszczególnymi genotypami. Wyniki przedstawiono w Tab.26 i na Wykresie 1.

Tabela 26. Wiek zachorowania na schizofrenie dla poszczególnych genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3*, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Genotyp	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test Kruskala- Wallisa H	p
Cala grupa				
Ser/Ser	62	22,0 (13,0-42,0)	0,009	0,99
Ser/Gly	66	22,0 (7,0-45,0)		
Gly/Gly	9	22,0 (15,0-29,0)		
Mężczyźni				
Ser/Ser	37	21,0 (13,0-39,0)	4,37	0,11
Ser/Gly	29	22,0 (15,0-29,0)		
Gly/Gly	4	25,5 (22,0-29,0)		
Kobiety				
Ser/Ser	25	27,0 (16,0-42,0)	5,72	0,06
Ser/Gly	37	22,0 (7,0-45,0)		
Gly/Gly	5	20,0 (15,0-27,0)		

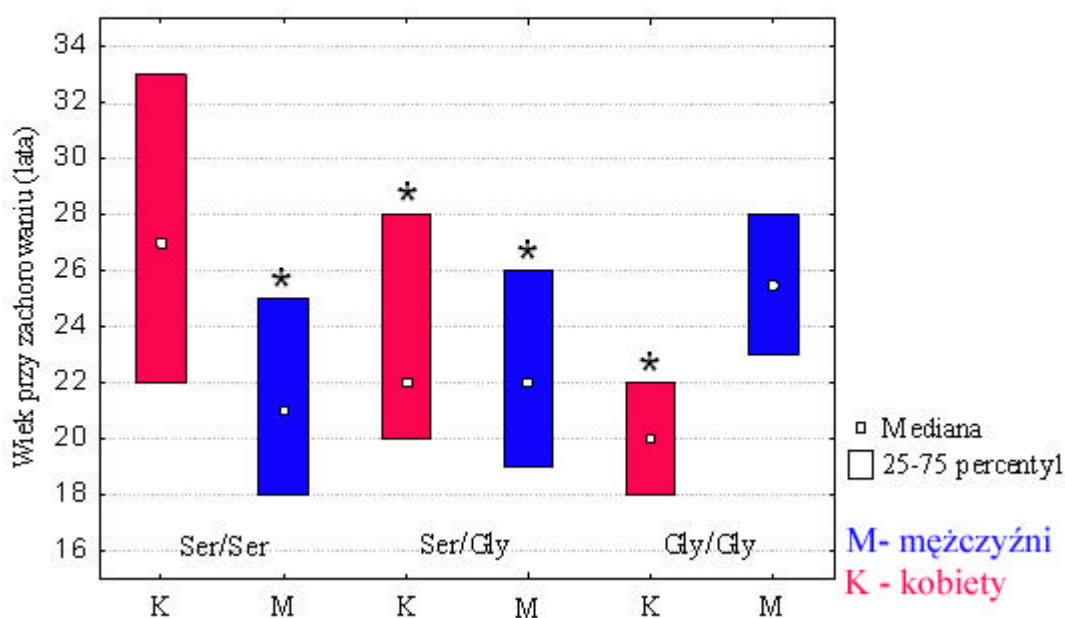
Zaobserwowano tendencje w kierunku wyższego wieku zachorowania kobiet z genotypem Ser/Ser w porównaniu z kobietami o genotypach Ser/Gly i Gly/Gly ($p=0,06$; Tab.1).

Najwyższy wiek zachorowania stwierdzono w przypadku kobiet z genotypem Ser/Ser. Był on istotnie wyższy w porównaniu z kobietami z pozostałymi genotypami oraz mężczyznami: z genotypem Ser/Ser (tu różnica była największa, $Z=3,08$, $p=0,002$) oraz Ser/Gly ($p=0,05$). Istotnych różnic nie wykazano jedynie w porównaniu z mężczyznami z genotypem Gly/Gly ($Z=0,56$, $p=0,58$), przy czym wynik ten należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność podgrupy mężczyzn ($n=4$) (Wykres 1).

Wykazano, że u kobiet obecność jednego allela Gly była wystarczająca, aby w zbliżony do istotnego sposób obniżyć wiek zachorowania (Ser/Ser a Ser/Gly: $Z=1,77$; $p=0,08$). Obecność drugiego allela Gly nie powodowała istotnych różnic (Ser/Gly a Gly/Gly: $Z=1,25$; $p=0,21$; Ser/Ser a Gly/Gly: $Z=2,01$; $p=0,04$) (Wykres 1).

W całej grupie i podgrupie mężczyzn wiek zachorowania nie różnił się istotnie w zależności od genotypu ($p>0,05$).

Wykres 1. Wiek przy zachorowaniu 137 pacjentów (mediana, 25-75 percentyl) dla poszczególnych genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3*, z uwzględnieniem płci



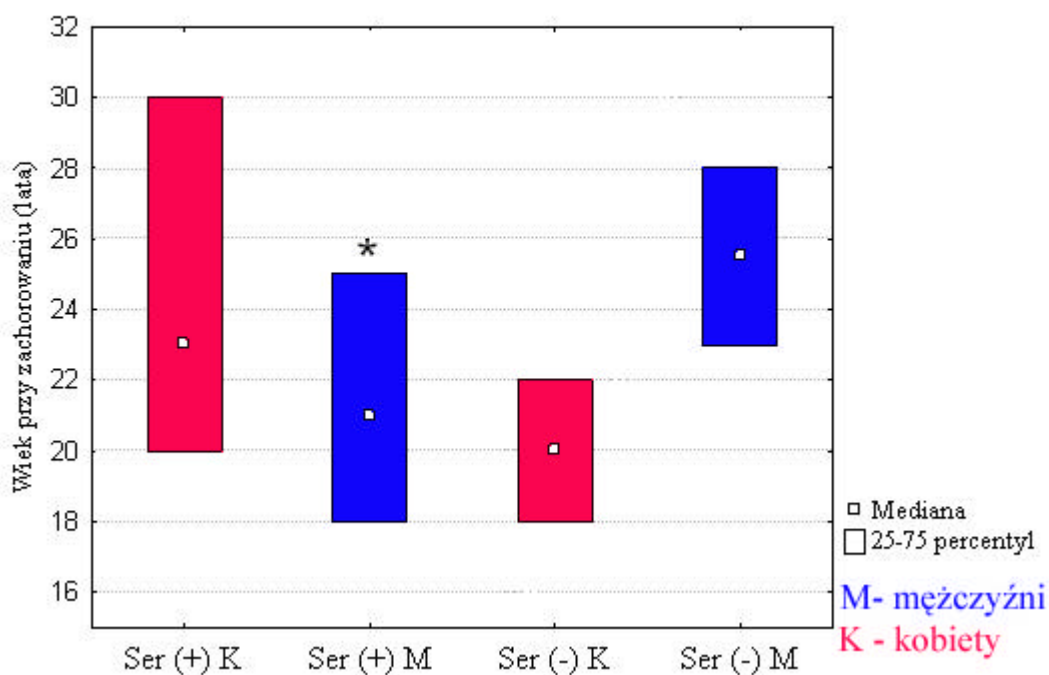
* $p<0,05$ w porównaniu z Ser/Ser K. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

Kolejnym krokiem w ocenie związku polimorfizmu Ser/Gly genu *DRD3* z wiekiem zachorowania na schizofrenie była ocena wpływu obecności alleli Ser i Gly. Wyniki dotyczące wpływu obecności allela Ser na wiek zachorowania przedstawiono w Tab.27 oraz na Wykresie 2. Wyniki oceny związku między obecnością allela Gly a wiekiem zachorowania na schizofrenie przedstawiono w Tab.28 i na Wykresie 3.

Tabela 27. Wpływ obecności **allela Ser** polimorfizmu **Ser9Gly** genu **DRD3** na wiek zachorowania na schizofrenie, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Obecność allela Ser w genotypie	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
Ser (+)	128	22,0 (7,0-45,0)	0,09	0,93
Ser (-)	9	22,0 (15,0-29,0)		
Mezcyźni				
Ser (+)	66	21,0 (13,0-39,0)	1,71	0,09
Ser (-)	4	25,5 (22,0-29,0)		
Kobiety				
Ser (+)	62	23,0 (7,0-45,0)	1,62	0,10
Ser (-)	5	20,0 (15,0-27,0)		

Wykres 2. Wiek przy zachorowaniu 137 pacjentów (mediana, 25-75 percentyl) w zależności od obecności **allela Ser**, z uwzględnieniem płci



* $p < 0,05$ w porównaniu z Ser(+)**K**. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pod względem wieku zachorowania w zależności od obecności allele Ser, zarówno dla całej grupy, jak i dla podgrup wyodrębnionych w oparciu o płeć (Tab.27).

Obserwowano istotną statystycznie różnicę między kobietami i mężczyznami posiadającymi allele Ser ($Z=2,28$; $p=0,006$) (Wykres 2). Różnica między kobietami i mężczyznami pozbawionymi allele Ser nie była statystycznie istotna ($Z=1,71$; $p=0,11$), przy czym wynik ten należy interpretować z ostrożnością ze względu na niewielką liczebność porównywanych grup.

Obserwowano istotnie niższy wiek zachorowania u kobiet posiadających allele Gly w porównaniu z kobietami, które go nie posiadały ($p=0,04$) (Tab.28).

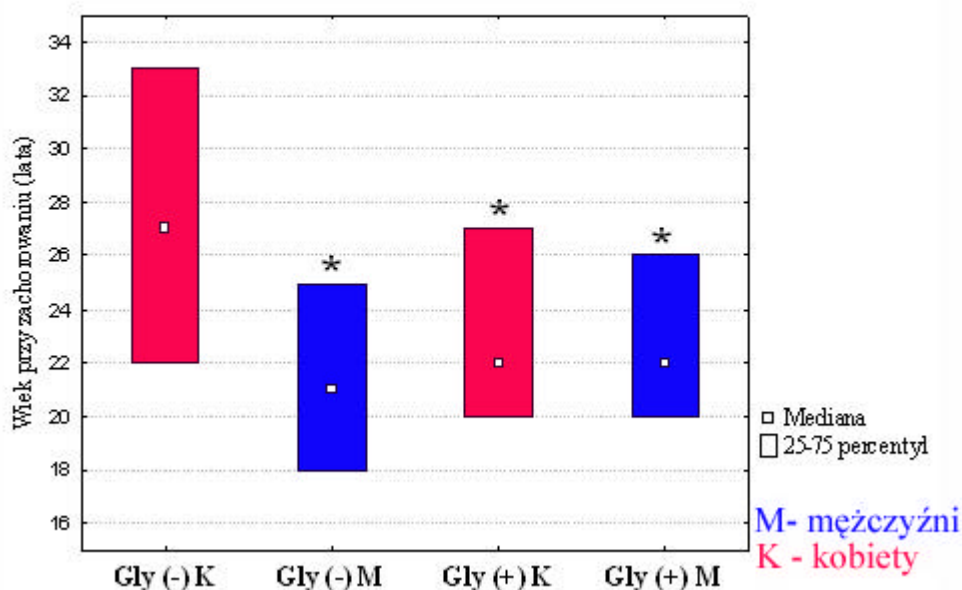
Wiek zachorowania w przypadku kobiet pozbawionych allele Gly był istotnie wyższy niż w przypadku pozostałych ocenianych podgrup: kobiet posiadających ten allele ($Z=-2,07$; $p=0,04$) oraz mężczyzn, zarówno posiadających ten allele ($Z=2,48$; $p=0,01$), jak i go pozbawionych ($Z=3,07$; $p=0,002$) (Wykres 3). Kobiety posiadające allele Gly chorowały na schizofrenię w wieku zbliżonym do mężczyzn, zarówno posiadających ($Z=0,03$; $p=0,98$), jak i nie posiadających allele Gly ($Z=1,60$; $p=0,11$) (Wykres 3).

Obecność allele Gly nie miała wpływu na wiek zachorowania w podgrupie mężczyzn ($p=0,46$) (Wykres 3).

Tabela 28. Wpływ obecności allele Gly polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* na wiek zachorowania na schizofrenię, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy, bold oznacza wynik istotny statystycznie.

Obecność allele Gly w genotypie	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
Gly (+)	75	22,0 (7,0-45,0)	0,06	0,95
Gly (-)	62	22,0 (13,0-42,0)		
Mężczyźni				
Gly (+)	33	22,0 (15,0-29,0)	1,60	0,11
Gly (-)	37	21,0 (13,0-39,0)		
Kobiety				
Gly (+)	42	22,0 (7,0-45,0)	-2,07	0,04
Gly (-)	25	27,0 (16,0-42,0)		

Wykres 3. Wiek przy zachorowaniu 137 pacjentów (mediana, 25-75 percentyl) w zależności od obecności allele Gly, z uwzględnieniem płci



* $p < 0,05$ w porównaniu z Gly(-)K. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

IV.3.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1

Drugim polimorfizmem badanym w kontekście wieku zachorowania na schizofrenie był polimorfizm C-17T genu *HRH1*. Analizowano różnice w wieku zachorowania dla poszczególnych genotypów oraz oceniano wpływ obecności jego alleli.

W Tab.29 przedstawiono wyniki dotyczące związku genotypów polimorfizmu C-17T z wiekiem zachorowania na schizofrenie, z uwzględnieniem podziału pod względem płci.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku zachorowania dla poszczególnych genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRH1*, zarówno dla całej grupy, jak i po uwzględnieniu podziału w zależności od płci.

Wyniki należy interpretować z ostrożnością ze względu na niewielką liczebność grupy z genotypem T/T.

Tabela 29. Wiek zachorowania na schizofrenie dla poszczególnych genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRHI*, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Genotyp	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test Kruskala- Wallisa H	p
Cala grupa				
C/C	102	22,0(7,0-45,0)	0,12	0,94
C/T	32	22,0 (13,0-42,0)		
T/T	7	22, 0 (17,0-29,0)		
Mezcyźni				
C/C	48	22,0 (15,0-39,0)	0,76	0,68
C/T	19	22,0 (13,0-35,0)		
T/T	5	20,0 (17,0-28,0)		
Kobiety				
C/C	54	23,0 (7,0-45,0)	0,67	0,71
C/T	13	25,0 (17,0-42,0)		
T/T	2	25,5 (22,0-29,0)		

Oceniono wpływ obecności alleli C oraz T na wiek zachorowania na schizofrenie, z uwzględnieniem podgrup wyróżnionych na podstawie płci.

W Tab.30 przedstawiono związek między obecnością allela C z wiekiem zachorowania na schizofrenie.

Tabela 30. Wpływ obecności allela C polimorfizmu C-17T genu *HRHI* na wiek zachorowania na schizofrenie, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Obecność allela C	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test U Manna- Whitney'a Z	p
Cala grupa				
C (+)	134	22,0 (7,0-45,0)	0,29	0,77
C (-)	7	22,0 (17,0-29,0)		
Mezcyźni				
C (+)	67	22,0 (13,0-39,0)	0,46	0,64
C (-)	5	20,0 (17,0-28,0)		
Kobiety				
C (+)	67	23,0 (7,0-45,0)	0,39	0,69
C (-)	2	25,5 (22,0-29,0)		

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku zachorowania w zależności od obecności allela C, zarówno dla całej grupy, jak i po uwzględnieniu podziału w zależności od płci. Wyniki należy interpretować z ostrożnością ze względu na niewielką liczebność grupy nie posiadającej allela C (C(-)).

Wyniki oceny związku obecności allela T z wiekiem zachorowania na schizofrenię przedstawiono w Tab.31.

Tabela 31. Wpływ obecności allela T polimorfizmu C-17T genu *HRHI* na wiek zachorowania na schizofrenię, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Obecność allela T	n	Mediana (lata) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
T (+)	39	22,0 (13,0-42,0)	-0,28	0,79
T (-)	102	22,0 (7,0-45,0)		
Mężczyźni				
T (+)	24	21,5 (13,0-35,0)	0,86	0,39
T (-)	48	22,0 (15,0-39,0)		
Kobiety				
T (+)	15	25,0 (17,0-42,0)	-0,81	0,42
T (-)	54	23,0 (7,0-45,0)		

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku zachorowania w zależności od obecności allela T, zarówno dla całej grupy, jak i po uwzględnieniu podziału w zależności od płci.

Ocena związku badanych wariantów polimorficznych z wiekiem zachorowania na schizofrenię – podsumowanie

Ocenę związku wariantów polimorficznych z zachorowaniem na schizofrenię przeprowadzono dla dwóch spośród osmiu wytypowanych do badania polimorfizmów. Oceniono polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRHI*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

W przypadku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* zaobserwowano istotnie niższy wiek zachorowania na schizofrenie w grupie mężczyzn w porównaniu z grupa kobiet ($p=0,02$) (Tab.24).

Wiek zachorowania w przypadku kobiet pozbawionych allele Gly był istotnie wyższy niż w przypadku pozostałych ocenianych podgrup: kobiet posiadających ten allel ($p=0,04$) oraz mężczyzn, zarówno posiadających ten allel ($p=0,01$), jak i go pozbawionych ($p=0,002$) (Wykres 3). Kobiety posiadające allel Gly w genotypie chorowały na schizofrenie w wieku zbliżonym do mężczyzn. Obecność allele Gly nie miała wpływu na wiek zachorowania w podgrupie mężczyzn ($p=0,46$). Obserwowano ponadto istotną statystycznie różnicę między kobietami i mężczyznami posiadającymi allel Ser ($p=0,006$), przy czym wynik ten należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność grup pozbawionych allele Ser (Wykres 2).

W przypadku polimorfizmu C-17T genu *HRH1* nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w wieku zachorowania na schizofrenie w zależności od genotypu oraz posiadania alleli C i T.

IV.4. Ocena związku wariantów polimorficznych: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1* z funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym, ocenianym przy pomocy podskali I skali Phillipa

Kolejnym ocenianym zagadnieniem był związek badanych polimorfizmów z funkcjonowaniem społecznym chorych na schizofrenie w okresie przedchorobowym. Ocenie tego związku przeprowadzono dla dwóch spośród wytypowanych do badania osmiu polimorfizmów. Oceniano polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

W niniejszym rozdziale dla poszczególnych genotypów oraz alleli badanych polimorfizmów przedstawiono punktację uzyskaną w podskali I skali Phillipa, z uwzględnieniem różnic zależnych od płci. Wyższa punktacja oznacza gorsze funkcjonowanie społecznego w okresie przedchorobowym.

W związku z tym, że rozkład punktacji dla całej grupy i podgrup wyróżnionych w zależności od płci odbiegał od normalnego, związek poszczególnych genotypów i alleli z uzyskana punktacja oceniano za pomocą testów nieparametrycznych – testu Kruskala-Wallis dla genotypów i testu U Manna-Whitney’a dla alleli.

Pierwszym etapem było porównanie różnic w funkcjonowaniu społecznym, wyrażonym punktacja w podskali I skali Phillipsa, między mężczyznami i kobietami w badanej grupie. Wyniki przedstawiono w Tab.32.

Tabela 32. Punktacja w poskali I skali Phillipsa w zależności od płci; n - liczebność grupy, M – mężczyźni, K - kobiety.

Plec	n	Srednia±SD	Mediana (punktacja) (min.-max.)	Test U Manna-Whitney’a	p
M	72	15,55±7,11	14,0 (2,0-29,0)	1,40	0,16
K	69	13,65±9,28	13,0 (2,0-30,0)		

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między kobietami i mężczyznami w zakresie funkcjonowania społecznego w okresie przedchorobowym wyrażonym punktacja w podskali I skali Phillipsa.

IV.4.1. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3

W pracy dokonano oceny związku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* z funkcjonowaniem społecznym w okresie przed zachorowaniem na schizofrenie, wyrażonym punktacja w podskali I skali Phillipsa. Analizowano różnice w punktacji dla poszczególnych genotypów oraz oceniano wpływ obecności alleli tego polimorfizmu na uzyskana liczbę punktów.

Pierwszym etapem była ocena różnic w punktacji dla poszczególnych genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3*. Wyniki przedstawiono w Tab.33 i na Wykresie 4.

Tabela 33. Punktacja w skali Phillipsa dla poszczególnych genotypów polimorfizmu **Ser9Gly** genu **DRD3**, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy; czcionka bold oznacza wynik istotny statystycznie.

Genotyp	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test Kruskala-Wallis H	p
Cala grupa				
Ser/Ser	62	12,0 (2,0-29,0)	7,62	0,02
Ser/Gly	66	14,0 (2,0-30,0)		
Gly/Gly	9	23,0 (7,0-30,0)		
Mężczyźni				
Ser/Ser	37	13,0 (4,0-29,0)	0,72	0,70
Ser/Gly	29	14,0 (2,0-26,0)		
Gly/Gly	4	18,5 (7,0-29,0)		
Kobiety				
Ser/Ser	25	7,0 (2,0-27,0)	9,59	0,008
Ser/Gly	37	14,0 (2,0-30,0)		
Gly/Gly	5	23,0 (19,0-30,0)		

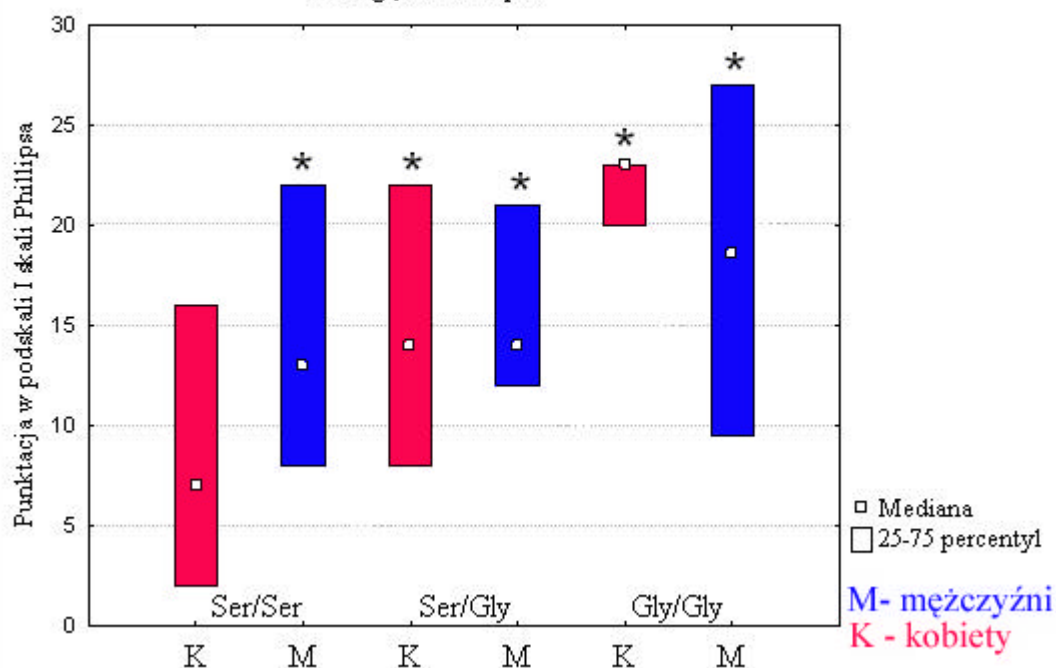
Dla całej grupy chorych obserwowano istotnie wyższe punkcje w przypadku genotypu Gly/Gly w porównaniu z genotypami Ser/Gly i Ser/Ser ($p=0,02$) (Tab.33).

W analizie przeprowadzonej niezależnie dla obu płci istotne statystycznie różnice w punktacji obserwowano jedynie w podgrupie kobiet ($p=0,008$) (Tab.33); w podgrupie tej wykazano je dodatkowo między poszczególnymi genotypami: między Ser/Ser i Ser/Gly ($Z=1,82$; $p=0,07$) oraz między Ser/Gly i Gly/Gly ($Z=2,31$; $p=0,02$).

Nie zaobserwowano zależnych od genotypu różnic w podgrupie mężczyzn ($p=0,70$) (Tab.33).

Dodatkowo, u kobiet z genotypem Ser/Ser obserwowano istotnie niższe punkcje ($p<0,05$) niż u kobiet i mężczyzn z pozostałymi genotypami (Wykres 4). Różnica między kobietami i mężczyznami z genotypem Ser/Ser była istotna statystycznie ($Z=2,52$; $p=0,01$) (Wykres 4).

Wykres 4. Punkcja w podskali I skali Phillipsa (mediana, 25-75 percentyl) 137 pacjentów, dla poszczególnych genotypów polimorfizmu Ser9Gly genu DRD3, z uwzględnieniem płci



* $p < 0,05$ w porównaniu z Ser/Ser K. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

Kolejnym krokiem w ocenie roli polimorfizmu Ser/Gly w społecznym funkcjonowaniu w okresie przedchorobowym była ocena wpływu obecności poszczególnych alleli. W Tab.34 oraz na Wykresie 5 przedstawiono wyniki dotyczące wpływu obecności allela Ser punkcje obrazująca jakość funkcjonowania społecznego przed zachorowaniem.

Dla całej grupy chorych stwierdzono istotnie wyższe punkcje w przypadku braku allela Ser ($p=0,03$; Tabela 34). W analizie przeprowadzonej niezależnie dla obu płci istotne statystycznie różnice (wyższe punkcje przy nieobecności allela Ser) zaobserwowano jedynie w podgrupie kobiet ($p=0,03$; Tab.34). W podgrupie mężczyzn nie zaobserwowano różnic w punktacji zależnych od obecności allela Ser. Stwierdzono, że wynik uzyskany dla całej badanej grupy zależał od włączenia do niej podgrupy kobiet.

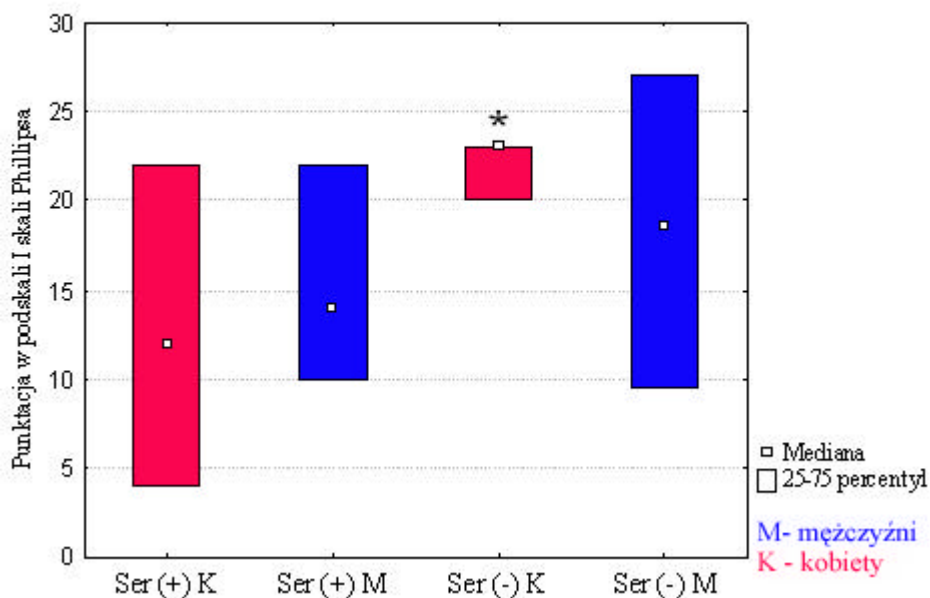
Nie obserwowano także różnic między kobietami i mężczyznami posiadającymi allel Ser oraz mężczyznami i kobietami pozbawionymi tego allela (Wykres 5).

Uzyskane wyniki należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność podgrupy osób pozbawionych allela Ser.

Tabela 34. Wpływ obecności **allela Ser** polimorfizmu **Ser9Gly** genu **DRD3** punktacje w podskali I skali Phillipsa, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy, bold oznacza wynik istotny statystycznie.

Obecność allela Ser w genotypie	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
Ser (+)	128	13,5 (2,0-30,0)	-2,22	0,03
Ser (-)	9	23,0 (7,0-30,0)		
Mezcyżni				
Ser(+)	66	14,0 (2,0-29,0)	0,59	0,55
Ser(-)	4	18,5 (7,0-29,0)		
Kobiety				
Ser(+)	62	12,0 (2,0-30,0)	-2,15	0,03
Ser(-)	5	23,0 (19,0-30,0)		

Wykres 5. Punktacja w podskali I skali Phillipsa (mediana, 25-75 percentyl) 137 pacjentów, w zależności od obecności **allela Ser**, z uwzględnieniem płci



* $p < 0,05$ w porównaniu z Ser(+),K. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

Wyniki oceny związku między obecnością allele Gly polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* a funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym wyrażonym punktacją w podskali I skali Phillipsa przedstawiono w Tab.35 i na Wykresie 6.

Tabela 35. Wpływ obecności allele Gly polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* na punktacje w podskali I skali Phillipsa, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy, bold oznacza wynik istotny statystycznie.

Obecność allele Gly w genotypie	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
Gly (+)	75	15,0 (2,0-30,0)	-2,12	0,03
Gly (-)	62	12,0 (2,0-29,0)		
Mezcyźni				
Gly (+)	33	14,0 (2,0-29,0)	0,74	0,46
Gly (-)	37	13,0 (4,0-29,0)		
Kobiety				
Gly (+)	42	15,0 (2,0-30,0)	2,63	0,008
Gly (-)	25	7,0 (2,0-27,0)		

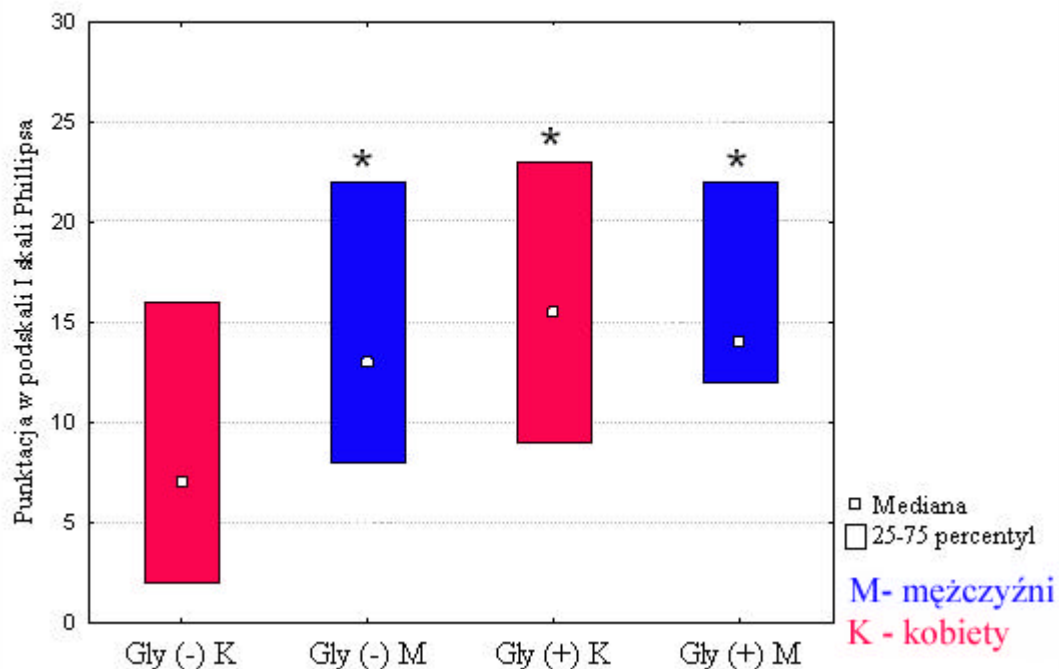
Dla całej grupy stwierdzono istotnie wyższą punktację w przypadku obecności allele Gly w genotypie ($p=0,03$) (Tab.35).

Po dokonaniu podziału w zależności od płci istotnie statystycznie różnice, wynikające z wyższej punktacji w przypadku obecności allele Gly, obserwowano jedynie w podgrupie kobiet ($p=0,008$) (Tab.35).

Brak allele Gly u kobiet wiązał się z niższą punktacją w podskali I skali Phillipsa, czyli lepszym funkcjonowaniem przedchorobowym, zarówno w porównaniu z kobietami z allele Gly ($Z=2,63$; $p=0,008$), jak i mężczyznami, zarówno posiadającymi ten allel ($Z=2,64$; $p=0,008$), jak i go pozbawionymi ($Z=2,52$; $p=0,01$) (Wykres 6).

Obecność allele Gly u kobiet wiązała się z wyższą punktacją, zbliżoną do tej, którą uzyskali mężczyźni, zarówno posiadający ten allel ($Z=0,22$; $p=0,82$), jak i go pozbawieni ($Z=0,58$; $p=0,56$) (Wykres 6).

Wykres 6. Punktacja w podskali I skali Phillipsa (mediana, 25-75 percentyl) 137 pacjentów, w zależności od obecności allele Gly, z uwzględnieniem płci



* $p < 0,05$ w porównaniu z Gly(-)K. Różnice między pozostałymi grupami nieistotne statystycznie.

IV.4.2. Polimorfizm C-17T genu receptora histaminowego H1

Drugim polimorfizmem badanym w kontekście funkcjonowanie społecznego w okresie przedchorobowym był polimorfizm C-17T genu *HRH1*. Analizowano różnice w funkcjonowaniu przedchorobowym, wyrażone punktacją w podskali I skali Phillipsa, dla poszczególnych genotypów oraz oceniano wpływ obecności poszczególnych alleli na te punktacje. Uwzględniono różnice związane z płcią.

W Tab.36 przedstawiono wyniki dotyczące związku genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRH1* z funkcjonowaniem przedchorobowym wyrażonym punktacją w podskali I skali Phillipsa, z uwzględnieniem podziału pod względem płci.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla poszczególnych genotypów w zakresie powyższej punktacji.

Tabela 36. Punktacja w podskali I skali Phillipsa dla poszczególnych genotypów polimorfizmu C-17T genu *HRHI*, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Genotyp	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test Kruskala-Wallisa H	p
Cala grupa				
C/C	102	15,0 (2,0-30,0)	3,07	0,21
C/T	32	12,5 (2,0-29,0)		
T/T	7	11,0 (2,0-14,0)		
Mezcyźni				
C/C	48	14,5 (2,0-26,0)	3,30	0,19
C/T	19	16,0 (4,0-29,0)		
T/T	5	11,0 (4,0-14,0)		
Kobiety				
C/C	54	15,0 (2,0-30,0)	2,18	0,34
C/T	13	10,0 (2,0-27,0)		
T/T	2	8,0 (2,0-14,0)		

Kolejnym krokiem była ocena wpływu obecności alleli C oraz T polimorfizmu C-17T na funkcjonowanie przedchorobowe, wyrażone punktacją w podskali I skali Phillipsa, z uwzględnieniem podgrup wyodrębnionych na podstawie płci. Wyniki uzyskane dla allela C przedstawiono w Tab.37, a wyniki uzyskane dla allela T – w Tab. 38.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem punktacji w zależności od obecności allela C oraz allela T, zarówno dla całej grupy, jak i po uwzględnieniu podziału w zależności od płci.

Tabela 37. Wpływ obecności **allela C** polimorfizmu **C-17T** genu *HRHI* na punktacje w skali Phillipsa, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Obecność allela C w genotypie	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Skala Phillipsa – podskala I				
Cała grupa				
C (+)	134	14,0 (2,0-30,0)	1,66	0,10
C (-)	7	11,0 (2,0-14,0)		
Mezcyźni				
C (+)	67	15,0 (2,0-29,0)	1,79	0,07
C (-)	5	11,0 (4,0-14,0)		
Kobiety				
C (+)	67	13,0 (2,0-30,0)	0,95	0,34
C (-)	2	8,0 (2,0-14,0)		

Tabela 38. Wpływ obecności **allela T** polimorfizmu **C-17T** genu *HRHI* na punktacje w skali Phillipsa, z uwzględnieniem płci; n - liczebność grupy.

Obecność allela T w genotypie	n	Mediana (punktacja) (min.-maks.)	Test U Manna-Whitney'a Z	p
Cała grupa				
T (+)	39	12,0 (2,0-29,0)	-1,13	0,26
T (-)	102	15,0 (2,0-30,0)		
Mezcyźni				
T (+)	24	14,0 (4,0-29,0)	0,45	0,65
T (-)	48	14,5 (2,0-26,0)		
Kobiety				
T (+)	15	10,0 (2,0-27,0)	1,37	0,17
T (-)	54	15,0 (2,0-30,0)		

Ocena związku badanych wariantów polimorficznych z funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym, ocenianym przy pomocy podskali I skali Phillipsa - podsumowanie

Ocene związku wariantów polimorficznych z funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym przeprowadzono dla dwóch spośród wytypowanych do badania osmiu polimorfizmów. Oceniano polimorfizmy: Ser9Gly genu *DRD3* oraz C-17T genu *HRH1*. Przeprowadzenie oceny dla pozostałych polimorfizmów było niemożliwe ze względu na zbyt niską częstość ich rzadszych alleli (Tab.9).

Istotnie statystycznie różnice w punktacji stwierdzono dla polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3*. Dla całej grupy stwierdzono istotnie wyższe punktacje w przypadku obecności allela Gly w genotypie ($p=0,03$) (Tab.35). Po dokonaniu podziału w zależności od płci stwierdzono iż brak allela Gly u kobiet wiąże się z niższą punktacją w skali Phillipsa, czyli z lepszym funkcjonowaniem przedchorobowym, zarówno w porównaniu z kobietami z allelem Gly ($Z=2,63$; $p=0,008$), jak i mężczyznami, zarówno posiadającymi ten allel ($Z=2,64$; $p=0,008$), jak i go pozbawionymi ($Z=2,52$; $p=0,01$) (Wykres 6). Obecność allela Gly u kobiet wiąże się z wyższą punktacją, zbliżoną do tej, którą uzyskują mężczyźni, zarówno posiadający ten allel ($Z=0,22$; $p=0,82$), jak i go pozbawieni ($Z=0,58$; $p=0,56$) (Wykres 6).

W podgrupie kobiet wraz ze zwiększeniem się liczby alleli Gly obserwowano wzrost punktacji w podskali I skali Phillipsa, przy czym różnice w punktacji między poszczególnymi genotypami były przynajmniej na granicy istotności statystycznej (Ser/Ser i Ser/Gly: $p=0,07$; Ser/Gly i Gly/Gly: $p=0,02$).

W przypadku polimorfizmu C-17T genu *HRH1* nie wykazano istotnych statystycznie różnic w funkcjonowaniu przedchorobowym wyrażonym podskala I skali Phillipsa w zależności od genotypu oraz obecności alleli C oraz T.

V. Dyskusja

V.1. Wstęp do dyskusji

W niniejszym badaniu podjęto próbe oceny związku między polimorfizmami genów: *DRD3*, *HRH1* i *HRH2* a zachorowaniem na schizofrenie, obciążeniem rodzinnym tym zaburzeniem, wiekiem zachorowania oraz funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym. Dane z piśmiennictwa wskazują, że geny *DRD3*, *HRH1* i *HRH2* mogą odgrywać rolę w kształtowaniu się predyspozycji do schizofrenii, czyli schizotaksji oraz w samym zachorowaniu.

W badaniu zastosowano coraz powszechniej stosowany ustrukturalizowany wywiad SCID-I, który pozwolił na wyodrębnienie bardziej jednolitej klinicznie grupy chorych, porównywalnej z innymi badaniami, w których był on wykorzystany. Badano nie tylko związek polimorfizmów z samą schizofrenią, ale też z innymi parametrami klinicznymi. Uwzględniono płeć, wiek zachorowania i obciążenie rodzinne tym zaburzeniem, co może pozwolić na wyodrębnienie bardziej jednolitych grup chorych niż przy zastosowaniu samego rozpoznania schizofrenii. Zrezygnowano z oceny podłoża genetycznego poszczególnych obszarów psychopatologicznych ze względu na wątpliwości metodologiczne i heterogenność badanej grupy, szczególnie pod względem długości trwania choroby i farmakoterapii. Uznano, że nawet w przypadku stwierdzenia związku, trudno byłoby go uznać za przyczynowy. Wydaje się natomiast, że charakterystyczny dla danej osoby może być poziom funkcjonowania psychospołecznego w okresie przedchorobowym, dlatego zdecydowano się na ocenę tego parametru.

V.2. Polimorfizm Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3

W niniejszej pracy badano związek polimorfizmu Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3 (*DRD3*) ze schizofrenią. Oceniano częstość alleli i genotypów w grupie osób chorych na schizofrenie w porównaniu z grupą kontrolną. Uwzględniono dodatkowo podgrupy wyodrębnione w oparciu o płeć. Wyszczególniono grupę obciążoną rodzinnie schizofrenią i porównano ją z grupą złożoną z osób nie posiadających krewnych I lub II stopnia chorych na schizofrenie. Oceniano także, czy posiadanie określonych genotypów

oraz alleli wiąże się z wiekiem zachorowania oraz jakością funkcjonowania społecznego w okresie przedchorobowym będącym wyznacznikiem schizotaksji.

Nie stwierdzono związku między genotypami ani allelami polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* a zachorowaniem na schizofrenie, ani w całej badanej grupie, ani po uwzględnieniu podziału na podgrupy pod względem płci. Nie wykazano także związku badanego wariantu ze schizofrenią po uwzględnieniu podziału na podgrupy pod względem rodzinnego obciążenia tym zaburzeniem. Stwierdzono natomiast jego związek z wiekiem zachorowania oraz z jakością funkcjonowania społecznego w okresie przed zachorowaniem na schizofrenie, w obu przypadkach w podgrupie kobiet.

Badania nad udziałem polimorfizmu Ser9Gly w etiopatogenezie schizofrenii są prowadzone od lat. Pierwsze badania asocjacyjne dotyczące tego polimorfizmu, przeprowadzone w ośrodkach francuskim i angielskim i wspólnie opublikowane, wykazały wysoce istotny związek między schizofrenią a układami homozygotycznymi alleli (Ser/Ser i Gly/Gly), zarówno oddzielnie w obu populacjach, jak i po ich połączeniu [Crocq i wsp., 1992]. Badania te stały się inspiracją dla dalszych poszukiwań, których wyniki były jednak sprzeczne. Pierwotny związek z genotypami homozygotycznymi został potwierdzony w nielicznych tylko badaniach [Morell i wsp., 1993; Mant i wsp., 1994], wiele innych go zanegowało [Yang i wsp., 1993; Nöthen i wsp., 1993; Rietschel i wsp., 1996]. W niektórych badaniach stwierdzano związek z jednym tylko genotypem homozygotycznym, Ser/Ser [Shaikh i wsp., 1996], albo też z allelem Ser [Shaikh i wsp., 1996; Nimgaonkar i wsp., 1996]. Mant i wsp. [1994] wykazali wpływ polimorfizmu Ser9Gly jedynie w przypadku płci męskiej. W wielu badaniach, podobnie jak w niniejszej pracy, nie udało się jednak wykazać związku polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią [Yang i wsp., 1993; Jonsson i wsp., 1993; Malhotra i wsp., 1998; Hawi i wsp., 1998; Kremer i wsp., 2000; Virgos i wsp., 2001; Lorenzo i wsp., 2007], także po uwzględnieniu płci [Nanko i wsp., 1993; Chen i wsp., 1997]. Wynik uzyskany w niniejszej pracy, wskazujący na brak związku polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią, jest zgodny z wykazanym w przypadku większości badań.

Wyniki badań nad rolą polimorfizmu Ser9Gly w etiologii schizofrenii są wyjątkowo niejednoznaczne. Wykazany w niniejszej pracy brak związku tego polimorfizmu ze schizofrenią jest zgodny z wynikami uzyskanymi w części z przytoczonych powyżej badań, sprzeczny zaś z innymi, które taki związek wykazały. Rozbieżność wyników może mieć wiele przyczyn. Schizofrenia jest chorobą o wieloczynnikowej etiologii. Gen *DRD3* stanowi tylko jeden z hipotetycznych czynników

warunkujących jej wystąpienie. Uznaje się przy tym, że wpływ czynników genetycznych, w tym genu *DRD3*, jest niewielki bądź umiarkowany. Ekspresja genu może ulegać modyfikacji, a wpływ genu może się nawet wcale nie ujawnić. Choć przesłanki wskazujące na rolę samego receptora D3 w etiologii schizofrenii są przekonujące, nie można wykluczyć, że polimorfizm Ser9Gly genu tego receptora nie odgrywa znaczącej roli w tym procesie, a wyniki wskazujące na jego związek z chorobą są artefaktami [Talkowski i wsp., 2006]. Jedną z możliwych przyczyn powstawania takich artefaktów jest niecałkowite sprzężenie danego wariantu z innym polimorfizmem, który nie musiał zostać zidentyfikowany. Przykładowo, o ile allel X polimorfizmu faktycznie związanego z występowaniem zaburzenia oraz allel Ser zawsze występują razem, badanie będzie wykazywało związek allela Ser z zachorowaniem. Jeżeli jednak w przypadku obecności allela X w *locus* Ser9Gly może być obecny zarówno allel Ser, jak i Gly, związek może się nie ujawnić.

Inną przyczyną różnic w uzyskanych wynikach może być stosowanie odmiennych kryteriów diagnostycznych w poszczególnych badaniach. Dotyczy to szczególnie zaburzeń, których definicja ewoluuje w czasie, a do których należy schizofrenia. Sprawia to, że badane grupy chorych, u których schizofrenie rozpoznano posługując się odmiennymi klasyfikacjami (np. DSM-III i DSM-IV), różnią się między sobą. Klinicznie różnice te nawet nie muszą być znaczące, zwłaszcza w kontekście leczenia, jednak obie grupy mogą obejmować zaburzenia o odmiennym tle genetycznym. Przeciwno takiej interpretacji przemawia jednak fakt, że sprzeczne wyniki uzyskiwano także w przypadku stosowania tych samych kryteriów diagnostycznych [np. Rietschel i wsp., 1996; Nimgaonkar i wsp., 1996].

Kolejnym zagadnieniem stanowi pochodzenie etniczne badanych osób. W przypadku choroby złożonej, jaką jest schizofrenia, w poszczególnych grupach etnicznych te same geny mogą ulegać różnej ekspresji, a ponadto inne geny mogą odgrywać wiodącą rolę. Wykazano też różną częstość alleli genu *DRD3* w populacjach różniących się pod względem pochodzenia etnicznego. Ocena roli danego polimorfizmu w różnych etnicznie grupach może dać odmienne wyniki. Problem może także stanowić włączenie do badania osób o różnym pochodzeniu etnicznym, co nosi nazwę efektu stratyfikacji. Zagadnienie to wydaje się być szczególnie istotne w populacjach zróżnicowanych pod względem etnicznym i kulturowym, np. w USA oraz Wielkiej Brytanii.

Kolejnym ważnym zagadnieniem jest wielkość badanej grupy. Odpowiednia wielkość grupy ma szczególne znaczenie w badaniach asocjacyjnych nad rolą genów o

niewielkim bądź umiarkowanym wpływie na wystąpienie choroby, tak jak w przypadku schizofrenii. Zbyt mała liczebność badanej grupy może spowodować, że wpływ genu pozostanie niezauważony. W przypadku badań nad związkiem polimorfizmu Ser9Gly z wystąpieniem schizofrenii za badania z udziałem dużej liczby osób uznawano już natomiast te, w których oceniano grupy liczące do 200 osób [np. Hawi i wsp., 1998; Lorenzo i wsp., 2007]. Najczęściej jednak przeprowadzano badania z udziałem mniej licznych grup, obejmujących około 100 osób. W niektórych badaniach oceniano skrajnie małe grupy, jak np. liczące 53 pacjentów i 61 osób zdrowych [Nimgaonkar i wsp., 1993] czy 35 pacjentów i 79 osób zdrowych [Maziade i wsp., 1997].

Ze względu na to, że w liczebność większości badań jest niewystarczająca do oceny związku polimorfizmu z chorobą, szczególne znaczenie przypisuje się metaanalizom. Niestety, chociaż ograniczają one problem niedostatecznej liczebności grup, stają się podatne na inne problemy, takie jak niejednorodność grupy związana z efektem stratyfikacji albo różnicami w zakresie kryteriów diagnostycznych stosowanych przy włączaniu chorych do poszczególnych badań. W trzech metaanalizach [Spurlock i wsp., 1998; Williams i wsp., 1998; Dubertet i wsp., 1998] potwierdzono opisywany uprzednio związek polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią. Wykazano w nich częstsze występowanie homozygot i genotypu Ser/Ser w grupie osób chorych w porównaniu ze zdrowymi. Pierwsza metaanaliza objęła 311 pacjentów i 306 osób zdrowych, druga łącznie 5351 osób, a trzecia 2619 chorych na schizofrenię oraz 2517 osób z grupy kontrolnej. W metaanalizie przeprowadzonej przez Williamsa i wsp. [1998] związek homozygot i genotypu Ser/Ser ze schizofrenią potwierdzono dodatkowo w 57 triadach rodzice-dziecko, obciążonych rodzinnie tym zaburzeniem. Metaanaliza, którą przeprowadzili Dubertet i wsp. [1998], wykazuje ponadto rolę efektu stratyfikacji i możliwości zafalszowania wyników w przypadku włączenia do badania osób o różnym pochodzeniu etnicznym. Wykazany w niej związek polimorfizmu Ser9Gly nie dotyczył całej badanej grupy, a jednolitych etnicznie podgrup złożonych z osób należących do rasy kaukaskiej i afrykańskiej. W kolejnej metaanalizie, która objęła 8761 osób, stwierdzono związek genotypów homozygotycznych ze schizofrenią [Jonsson i wsp., 2003], nie potwierdzono w niej natomiast częstszego występowania genotypu Ser/Ser u osób chorych. Przeprowadzone metaanalizy wskazują na możliwość znaczenia polimorfizmu Ser9Gly w etiopatogenezie schizofrenii. Możliwe, że stwierdzony w niniejszej pracy brak związku tego polimorfizmu ze schizofrenią wynika z niedostatecznej liczebności badanej grupy.

Kolejna interesująca hipoteza mówi o tym, że wpływ genu nie dotyczy samego wystąpienia schizofrenii, a określonych aspektów tego zaburzenia, np. wieku zachorowania, przebiegu klinicznego czy podtypu schizofrenii. Wydaje się też możliwe, że związek danego genu ze schizofrenią uwidacznia się tylko w grupie obciążonej rodzinie ta choroba. W takiej grupie wpływ genu na wystąpienie choroby teoretycznie może być silniejszy niż w grupie osób nieobciążonych tym zaburzeniem. Wiąże się to np. z możliwością istnienia fenokopii, czyli postaci choroby o zbliżonym fenotypie, który nie jest jednak uwarunkowany genetycznie.

W kilku badaniach podejmowano próbe oceny związku polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią u osób, które posiadały krewnych z tym zaburzeniem. Wyniki tych badań były niejednoznaczne. Brak związku polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią w grupie osób obciążonych rodzinie tym zaburzeniem wykazano zarówno w niniejszej pracy, jak i w wielu przeprowadzonych wcześniej badaniach [Nanko i wsp., 1993; Inada i wsp., 1995; Tanaka i wsp., 1996; Gaitonde i wsp., 1996; Nimgaonkar i wsp., 1996; Rietschel i wsp., 1996; Chen i wsp., 1997]. Istnieją jednak nieliczne doniesienia wskazujące na związek tego polimorfizmu ze schizofrenią w tej grupie pacjentów. W jednym z nich w grupie obciążonej rodzinie schizofrenią, w porównaniu z grupą nieobciążoną tym zaburzeniem, obserwowano częstsze występowanie allela Ser [Nimgaonkar i wsp., 1996], a w kolejnym - obu genotypów homozygotycznych [Mant i wsp., 1994]. W obu tych badaniach wykazano związek polimorfizmu Ser9Gly ze schizofrenią dla całej grupy pacjentów, obejmującej chorych obciążonych i nieobciążonych rodzinie, ale w grupie obciążonej rodzinie schizofrenią związek ten był bardziej istotny.

Uwzględnienie wpływu obciążenia rodzinnego schizofrenią na istnienie związku genów z tym zaburzeniem jest ciekawe, gdyż może wskazywać na grupę pacjentów, u których czynniki genetyczne odgrywają szczególną rolę. W praktyce napotyka jednak na wiele ograniczeń. Poza wymienionymi powyżej przyczynami mogącymi leżeć u podłoża uzyskiwania sprzecznych wyników w badaniach nad rolę polimorfizmów genów w etiologii choroby, w przypadku oceny uwzględniającej obciążenie rodzinne schizofrenią dodatkową trudność stanowi brak pewności odnośnie rzetelności uzyskanych danych, na których opiera się analiza. Informacje dotyczące rodzinnego występowania chorób uzyskuje się głównie w oparciu o wywiad przeprowadzony z chorym oraz z członkami jego rodziny. Niekiedy tylko można uzupełnić je danymi z dokumentacji medycznej. Zafalszowanie danych jest możliwe z wielu powodów. Osoba informująca może być nieswiadoma występowania zaburzeń psychicznych w rodzinie, zwłaszcza wśród dalszych

krewnych. Inna przyczyna może być niechęć do udzielania takich informacji ze względu na poczucie wstydu związane z występowaniem takich zaburzeń w rodzinie, bądź nieufność pacjenta wobec badającego, wynikająca np. z objawów chorobowych. Z tego powodu wyniki badań z udziałem grup wyróżnionych w oparciu o rodzinne występowania chorób, zwłaszcza psychicznych, należy traktować z dużą ostrożnością.

W niniejszej pracy wykazano związek polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* z wiekiem zachorowania na schizofrenię, przy czym dotyczył on jedynie kobiet. Podobnego związku nie stwierdzono u mężczyzn.

W oparciu o uzyskane wyniki wydaje się, że u kobiet wiek zachorowania wiąże się z posiadaniem lub brakiem allela Gly. Kobiety pozbawione tego allela zapadały na schizofrenię znacząco później niż kobiety, które go posiadały oraz mężczyźni, niezależnie od ich genotypu. Obecność allela Gly w genotypie kobiety wiązała się ze wcześniejszym zachorowaniem, w wieku charakterystycznym dla mężczyzn. Tym samym jedyną grupą, w której zachorowanie było znacząco późniejsze, była grupa kobiet pozbawionych allela Gly. W badanej w niniejszej pracy grupie kobiet obecność jednego allela Gly wystarczała, aby w sposób zbliżony do istotnego obniżyć wiek zachorowania. Obecność dwóch alleli wiązała się z dalszym przyspieszeniem zachorowania, choć w sposób nieistotny statystycznie. U mężczyzn nie obserwowano związku między genotypami i allelami polimorfizmu Ser9Gly a wiekiem zachorowania.

Ocena związku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* z wiekiem zachorowania na schizofrenię była dotychczas podejmowana w nielicznych badaniach. W jednym z nich wykazano związek allela Gly oraz genotypu Gly/Gly z wczesnym wiekiem zachorowania [Ebstein i wsp., 1997]. Wspiera to wykazana w niniejszej pracy rola allela Gly, chociaż w powyższym badaniu nie dokonano oddzielnej analizy w zależności od płci. W kolejnym badaniu stwierdzono wcześniejsze zachorowanie wśród mężczyzn o genotypie Gly/Gly [Nimgaonkar i wsp., 1996]. Wynik tego badania wskazuje, że polimorfizm Ser9Gly może odgrywać jakąś rolę odnośnie wieku wystąpienia pierwszych objawów schizofrenii. Związek tego polimorfizmu z wiekiem zachorowania wykazano jednak u mężczyzn, podczas gdy w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano go u kobiet. W innym badaniu stwierdzono wcześniejsze występowanie schizofrenii u pacjentów z którymkolwiek z dwóch genotypów homozygotycznych [Durany i wsp., 1996], jednak bez uwzględnienia podziału w zależności od płci. Rola polimorfizmu Ser9Gly została zanegowana w badaniu z udziałem grupy osób o wczesnym zachorowaniu, przed 16 rokiem życia, w porównaniu z osobami zdrowymi [Iwata i wsp., 2003], podobnie jak w większości prac, w których

zajmowano się tym zagadnieniem [Nanko i wsp., 1993; Inada i wsp., 1995; Tanaka i wsp., 1996; Gaitonde i wsp., 1996]. W badaniach tych nie uwzględniono jednak możliwych różnic związanych z płcią, natomiast w świetle wyników niniejszej pracy, w której związek polimorfizmu Ser9Gly z wiekiem zachorowania wykazano tylko dla płci żeńskiej, uwzględnienie tego czynnika może być znaczące.

Kolejnym zagadnieniem ocenianym w niniejszej pracy był związek polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* z funkcjonowaniem społecznym chorych na schizofrenie w okresie przedchorobowym. Funkcjonowanie społeczne w tym okresie jest ważnym parametrem, ponieważ jest jednym z predyktorów przebiegu choroby oraz, według wielu badań, stanowi wyznacznik schizotaksji, czyli genetycznie uwarunkowanej predyspozycji do schizofrenii. Ocena tego ciekawego i ważnego zagadnienia jest jednak bardzo trudna ze względu na jego złożony charakter. Funkcjonowanie społeczne człowieka podlega wielu wpływom, w tym działaniu licznych czynników środowiskowych. W świetle dotychczasowych badań, przedstawionych dokładniej we Wstępie, wydaje się jednak, że przynajmniej w pewnym stopniu może ono być uwarunkowane genetycznie. Przy aktualnym stanie wiedzy trudno ocenić, które geny mogą odgrywać rolę w kształtowaniu się zachowań społecznych. Badania wskazują na możliwy udział genu *DRD3* w tych procesach [Reavill i wsp. 2000; Laszy i wsp., 2005]. Choć większość z nich dotyczy modeli zwierzęcych, których wnioski trudno jest bezpośrednio odnieść do człowieka, inspirują one do badań z udziałem genu tego receptora.

Kolejny problem badań nad funkcjonowaniem społecznym stanowi możliwość jego rzetelnej oceny, zwłaszcza, gdy oceniane jest retrospektywnie. Niestety, aktualnie istnieje niewiele sposobów jej przeprowadzenia, zwłaszcza w odniesieniu do osób chorych psychicznie. Skale oceny są zbyt ogólne, czego przykładem jest skala GAF (ang. *General Assessment of Functioning*), albo odnoszą się jedynie do nielicznych aspektów funkcjonowania. Przeznaczone są przy tym do oceny aktualnego funkcjonowania badanej osoby. W świetle tego ważnym wyznacznikiem przydatności skali wydaje się być możliwość jej praktycznego zastosowania. Zastosowanie skali Phillipsa pozwala na ocenę tego funkcjonowania w przeszłości. Uzyskane na jej podstawie wyniki korelują z wiekiem pojawienia się klinicznych objawów schizofrenii oraz z funkcjonowaniem w okresie choroby [Schultz i Herron, 1979; Harrow i wsp., 1986; Harder i wsp., 1990]. Także ta skala posiada jednak liczne ograniczenia – np. duża jej część odnosi się do funkcjonowania psychoseksualnego i jego tła społecznego, nie bada natomiast innych aspektów, np. funkcjonowania zawodowego. Mimo to ze względu na jej wykazaną wartość

prognostyczna zdecydowaliśmy się na jej zastosowanie w niniejszej pracy. Nie można jednak zapominać, że funkcjonowanie społeczne ma wiele aspektów, być może podlegających wpływowi odmiennych czynników społecznych i genetycznych. Dlatego, ze względu na wieloczynnikowy charakter funkcjonowania społecznego, jak też wątpliwości związane z możliwościami pełnej oceny tego funkcjonowania, do wyników niniejszego badania należy odnieść się z ostrożnością.

W oparciu o uzyskane wyniki wydaje się, że funkcjonowanie społeczne badanych kobiet przed zachorowaniem na schizofrenię wiąże się z obecnością lub brakiem allela Gly. Kobiety pozbawione tego allela funkcjonowały przed zachorowaniem znacząco lepiej niż kobiety go posiadające oraz mężczyźni, niezależnie od ich genotypu. Obecność allela Gly w genotypie kobiety wiązała się z istotnie gorszym funkcjonowaniem społecznym przed zachorowaniem, zbliżonym się do funkcjonowania mężczyzn w tym okresie. Tym samym jedyną grupą, której funkcjonowanie społeczne w okresie przedchorobowym było znacząco lepsze, była grupa kobiet pozbawionych allela Gly. W badanej grupie kobiet obecność jednego allela Gly była wystarczająca dla znaczącego pogorszenia jakości funkcjonowania (Wykres 6). Obecność dwóch alleli wiązała się z dalszym jego pogorszeniem, przy czym wpływ obecności drugiego allela Gly był bardziej zaznaczony niż w przypadku analogicznego wpływu tego allela na wiek zachorowania.

W pracy wykazano również różnice w funkcjonowaniu zależne od obecności allela Ser, jednak wynik ten należy interpretować z dużą ostrożnością, ponieważ liczebność grupy pozbawionej tego allela była niewielka, co mogło zafałszować wyniki. W świetle uzyskanych danych można rzetelnie odnieść się jedynie do wyników dotyczących wpływu allela Gly.

W podgrupie kobiet stwierdzono ponadto związek między jakością funkcjonowania społecznego w okresie przedchorobowym a wiekiem zachorowania (Tabela 32). Gorsze funkcjonowanie wiązało się z wcześniejszym wiekiem wystąpienia objawów schizofrenii. Takiego związku nie wykazano w podgrupie mężczyzn.

W piśmiennictwie istnieje niewiele badań dotyczących genetycznych uwarunkowań funkcjonowania społecznego chorych na schizofrenię. Tylko jedno dotyczy funkcjonowania przed zachorowaniem [Gornick i wsp., 2005]. W badaniu tym wykazano związek polimorfizmu genu dysbindiny, białka uczestniczącego w procesach neurorozwojowych, z jakością funkcjonowania społecznego w tym okresie. Badanie to dotyczyło jednak dzieci z psychozą, a nie osób dorosłych, jak w niniejszej pracy. W dwóch innych badaniach stwierdzono związek genów receptorów dopaminowych D2 i D3 z

funkcjonowaniem społecznym oraz wykonywaniem czynności codziennych w czasie choroby, ocenianych za pomocą kwestionariusza NOSIE [Lane i wsp., 2004, 2005]. W przypadku genu *DRD3* wykazano lepsze funkcjonowanie pacjentów posiadających allel Ser (genotypy Ser/Ser i Ser/Gly), co wspiera wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Niestety, w badaniu tym nie dokonano osobnej oceny w podgrupach kobiet i mężczyzn. Chociaż omawiane badanie dotyczy funkcjonowania w późniejszym okresie życia pacjenta niż oceniany w niniejszej pracy, jego wyniki są istotne, gdyż jakość funkcjonowania prawdopodobnie jest funkcją ciągłą: uprzednio wykazano, że osoby społecznie źle funkcjonujące w okresie przed zachorowaniem zwykle gorzej funkcjonują także w czasie choroby [Dworkin i wsp., 1993].

Wyniki niniejszej pracy wydają się interesujące w świetle koncepcji nadmiernej aktywności dopaminergicznej jako jednej z najważniejszych hipotez etiopatogenetycznych schizofrenii. Uprzednio wykazano, że warianty receptora zawierające glicyne (kodowane przez genotypy Ser/Gly i Gly/Gly) cechowało znacznie wyższe powinowactwo do dopaminy niż forma pozbawiona tego aminokwasu (kodowana przez genotyp Ser/Ser) [Landstrom i Turpin, 1996; Jeanneteau i wsp., 2006]. Stwierdzono też, że wariant receptora zawierający glicyne wiąże się ze wzmocnieniem typowych odpowiedzi na pobudzenie receptora D3, np. zwiększa hamowanie tworzenia cAMP oraz nasila aktywację kinazy MAP [Jeanneteau i wsp., 2006]. We wcześniej przeprowadzonych badaniach wykazano, że obniżenie wrażliwości receptora D3 poprawia funkcjonowanie społeczne u zwierząt [Reavill i wsp., 2000; Schwartz i wsp. 2000]. W świetle wyników niniejszej pracy wydaje się jednak, że samo obniżenie wrażliwości *DRD3* może być niewystarczające dla wywołania tego efektu, na co wskazuje stwierdzony brak różnic w funkcjonowaniu społecznym przed zachorowaniem oraz wieku zachorowania mężczyzn, niezależnie od posiadanego przez nich wariantu polimorfizmu Ser9Gly. Jedynie w grupie kobiet brak allela Gly zdawał się wiązać z późniejszym wiekiem zachorowania i lepszym funkcjonowaniem przedchorobowym. Obserwacja ta pozwala na postawienie hipotezy, że u kobiet działają dodatkowe czynniki ochronne, zapewniające lepsze funkcjonowanie i opóźniające zachorowanie, które jednak wywierają swój wpływ jedynie w przypadku, gdy allel Gly jest nieobecny. Możliwe, że w przypadku genotypu Ser/Ser, który wiąże się ze słabszą transmisją dopaminergiczną niż genotypy zawierające allel Gly, działanie ochronne takich czynników jest wystarczające dla zrównoważenia efektu nadaktywności dopaminergicznej. Jednak w obecności allela Gly transmisja jest na tyle silna, że ich

wplyw staje sie niewystarczajacy, co powoduje zrównanie sie poziomu funkcjonowania spolecznego i wieku zachorowania mezczyzn i kobiet.

Istnieje wiele substancji, które moglyby pelnic role ochronna u kobiet. W swietle aktualnej wiedzy potencjalnie interesujacym kandydatem wydaja sie byc estrogeny. Za hipoteza ochronnego wplywu estrogenów u kobiet przemawia wiele badan i obserwacji klinicznych, np. specyfika wieku zapadalnosci na schizofrenie i jej przebiegu u obu plci [Grigoriadis i Seeman, 2002]. Po pierwszym szczycie zachorowan u kobiet, który ma miejsce w wieku ok. 25-30 lat, pojawia sie drugi w okresie okolomenopauzalnym, w wieku ok.45-50 lat, gdy stezenie estrogenów znacząco sie obniza. W przypadku pocztku choroby w tym okresie objawy sa zwykle bardziej nasilone, a przebieg ciezszy niz przy wystapieniu choroby we wczesniejszej fazie zycia oraz w porównaniu z pierwszymi epizodami u mezczyzn, niezaleznie od ich wieku [Häfner, 2003]. W jednym z badan wykazano zwiazek miedzy wczesniejszym osiagnieciem dojrzalosci plciowej przez kobiety, powiazanym z obecnością funkcjonalnych stezen estrogenów, oraz późniejszym pocztkiem schizofrenii [Cohen i wsp., 1999]. Podobnego zwiazku miedzy osiagnieciem dojrzalosci plciowej oraz wiekiem zachorowania nie obserwowano natomiast w przypadku mezczyzn.

Estrogeny wiazano takze z symptomatologia schizofrenii. Postulowano ich role w nasileniu zarówno objawów pozytywnych, jak i negatywnych. Obserwowano np. szybsza poprawe w zakresie objawów pozytywnych u mlodych kobiet, u których do leczenia dolaczono estrogeny [Kulkarni i wsp., 2001], zwiazek miedzy nizszymi stezeniami estrogenów u kobiet i wiekszym nasileniem objawów negatywnych oraz zaburzen poznawczych [Ko i wsp., 2006], a takze mniejsze nasilenie objawów negatywnych u kobiet, u których po menopauzie zastosowano hormonalna terapie zastepcza [Lindamer i wsp., 2001]. Stwierdzono, ze wplyw tych hormonów w pewnym stopniu przypomina dzialanie neuroleptyków, co moglyby tłumaczyc ogólnie lagodniejszy przebieg schizofrenii u kobiet w porównaniu z mezczyznami [Fields i Gordon, 1982]. Sugerowano, ze opisywane różnice w funkcjonowaniu spolecznym miedzy kobietami i mezczyznami, np. wieksza czestosc zachowan spolecznie negatywnych u chlopców i prospolecznych u dziewczat [Mueser i wsp., 1990], takze moga byc wynikiem protekcyjnego dzialania estrogenów [Häfner, 2003].

Wykazywano uprzednio, ze pierwsze objawy schizofrenii pojawiaja sie u kobiet później niz u mezczyzn, a takze lepiej funkcjonuja one w czasie trwania zaburzenia. Jedno z mozliwych wyjasnien tego faktu mówi, ze wyzszy poziom kompetencji spolecznych

wiaze sie z mniejszymi trudnościami w interakcjach społecznych, które mogą być czynnikiem wyzwalającym schizofrenie. Prowadzi to do późniejszego wystąpienia zaburzenia. O ile przyjmie się, że poziom kompetencji społecznych zależy w jakimś stopniu od działania estrogenów, to teoria ta pozwala na wyjaśnienie różnic w wieku zachorowania i funkcjonowania społecznego w czasie choroby między mężczyznami i kobietami. Późniejszy początek schizofrenii u kobiet pozwala im na osiągnięcie przed zachorowaniem wyższego poziomu kompetencji społecznych i rozwoju struktur poznawczych niż ma to miejsce w przypadku mężczyzn, u których ich rozwój zostaje zahamowany na wcześniejszym etapie poprzez wystąpienie choroby. Sprawia to, że w momencie zachorowania kobiety częściej niż mężczyźni znajdują się już w związkach małżeńskich bądź partnerskich, posiadają dzieci i pracują [Häfner, 2000].

W oparciu o wyniki niniejszej pracy ciekawa wydaje się być hipoteza dotycząca ograniczeń protekcyjnego działania estrogenów w zależności od istnienia dodatkowych czynników. Uprzednio wykazano np. zrównanie się wieku zachorowania kobiet i mężczyzn w przypadku istnienia obciążenia rodzinnego schizofrenia, a także, choć w nieco mniejszym stopniu, powikłań okresu ciąży i okołoporodowych [Konnecke i wsp., 2000; Häfner, 2003]. Czynnikiem ograniczającym ochronny wpływ estrogenów u kobiet teoretycznie mógłby być polimorfizm Ser9Gly genu *DRD3*, a dokładniej posiadanie jego wariantów zawierających allel Gly. Choć hipoteza ta wydaje się możliwa, nie należy zapominać, że wiek zachorowania, a zwłaszcza funkcjonowanie społeczne, zależy od bardzo wielu czynników, zarówno środowiskowych, jak i genetycznych. Ponadto wśród czynników genetycznych gen *DRD3* nie jest jedynym genem kandydującym. Inne potencjalnie interesujące w tym kontekście geny to m.in. geny kodujące białka ważne dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego, takie jak synaptofizyna, BDNF, VMAT1, DAOA, geny, których produkty mogą odgrywać rolę w procesach poznawczych i powstawaniu zaburzeń neuropsychologicznych, jak np. COMT [Rybakowski i wsp., 2002; Golimbet i wsp., 2006] oraz geny, których produkty mogą uczestniczyć w powstawaniu objawów negatywnych, np. gen receptora 5HT_{1A}, itp.

Wyniki niniejszego badania mogą mieć znaczenie praktyczne. Ponieważ leki przeciwpsychotyczne działają na receptor dopaminowy D₃, powodując zmniejszenia jego wrażliwości i obniżając transmisję dopaminergiczną, można spodziewać się, że ich stosowanie mogłoby prowadzić do poprawy funkcjonowania społecznego oraz opóźnienia zachorowania. Wpływ leków, podobnie jak ochronne działanie czynników biologicznych, może jednak zależeć od genotypu polimorfizmu Ser9Gly, zwłaszcza u kobiet. Ocena tego

polimorfizmu byłaby więc pomocna przed rozpoczęciem leczenia. Hipoteza dotycząca klinicznego zastosowania wniosków z obecnego badania jest dość śmiała ze względu na złożony proces warunkujący funkcjonowanie społeczne oraz na fakt, że niniejsze badanie jest jednym z pierwszych dotyczących jego genetycznego podłoża. Niemniej jednak badania nad lekami będącymi antagonistami receptora D3 już trwają, przy czym podstawowym założeniem przy ich tworzeniu jest ich wpływ nie tylko na objawy pozytywne schizofrenii, ale przede wszystkim na objawy negatywne (do których należą objawy związane ze złą jakością funkcjonowania społecznego) oraz na zaburzenia funkcji poznawczych [Joyce i Millan, 2005].

Choć ze względu na swą funkcjonalność polimorfizm Ser9Gly wydaje się być interesującym kandydatem w badaniach nad różnymi aspektami schizofrenii, nie można wykluczyć znaczenia innych polimorfizmów, które mogą być z nim sprzężone. Staddon i wsp. [2005] wykazali na przykład częstsze występowanie allele -7685-C, sprzężonego z Ser9Gly, w grupie chorych na schizofrenię. Możliwe także, że związek ze schizofrenią nie dotyczy jednego polimorfizmu, ale kilku występujących jako haplotypy. Przykładowo, Ishiguro i wsp. [2000] sugerowali istnienie znamiennej zależności między haplotypami polimorfizmów -712G/C, -205A/G i Ser9Gly oraz schizofrenią, a Staddon i wsp. [2005] między haplotypami polimorfizmów Ser9Gly, -205-G/A, -7685-G/C a tym zaburzeniem. Na możliwość asocjacji z innymi polimorfizmami, pozostającymi w sprzężeniu z Ser9Gly, wskazują też Talkowski i wsp. [2006]. Badania dotyczące związku innych niż Ser9Gly polimorfizmów genu *DRD3* oraz ich haplotypów ze schizofrenią są jednak nieliczne i wymagają kontynuacji w celu wyciągnięcia bardziej rzetelnych wniosków.

V.3. Polimorfizmy genu receptora histaminowego H1

Jednym z celów niniejszej pracy była ocena związku 6 polimorfizmów genu *HRH1*: C-17T w regionie promotora oraz Lys19Asn, Asp349Glu, Phe358?, A1068G i Leu449Ser w regionie kodującym genu z zachorowaniem na schizofrenię, obciążeniem rodzinnym tą chorobą, wiekiem zachorowania i funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym.

Wszystkie powyższe cele zrealizowano jedynie w przypadku polimorfizmu C-17T ze względu na niską częstość wariantów pozostałych 5 polimorfizmów. Z obliczeń całkowicie wyłączono polimorfizmy Asp349Glu i Leu449Ser genu *HRH1*, w przypadku których stwierdzono jedynie występowanie podstawowego wariantu (odpowiednio allele

Asp i Leu) oraz polimorfizm Lys19Asn, w przypadku którego obecność allele Asn wykazano jedynie u 2 zdrowych osób (częstość 0,7%). W przypadku dwóch kolejnych polimorfizmów genu *HRHI*, Phe358? oraz A1068G, częstość wariantów była zbyt niska, aby można je było uwzględnić przy obliczeniach z udziałem podgrup. Z tego względu obliczenia z ich udziałem przeprowadzono tylko przy ocenie ich potencjalnego związku z zachorowaniem na schizofrenie.

Nie stwierdzono związku między genotypami ani allelami polimorfizmów C-17T, Phe358? oraz A1068G a zachorowaniem na schizofrenie w całej badanej grupie, a w przypadku polimorfizmu C-17T także w podgrupach wyróżnionych ze względu na płeć. W przypadku tego ostatniego polimorfizmu wykazano istotnie częstsze występowanie genotypów zawierających allel T w grupie chorych nieobciążonych dziedzicznie schizofrenia w porównaniu z grupą obciążoną tą chorobą ($p=0,04$). Nie stwierdzono natomiast jego związku z wiekiem zachorowania ani z jakością funkcjonowania społecznego w okresie przed zachorowaniem na schizofrenie.

Wyniki te trudno odnieść do piśmiennictwa ze względu na to, że do chwili obecnej przeprowadzono jedynie dwa badania nad związkiem polimorfizmów genu *HRHI* ze schizofrenia. Mancama i wsp. [2000], którzy zidentyfikowali i opisać badane w niniejszej pracy warianty regionu kodującego, ocenili ich związek ze schizofrenia i odpowiedzią na leczenie kłozapina. Podobnie jak w przypadku populacji badanej w niniejszej pracy, stwierdzili oni niską częstość wariantów, przy czym występowały one jedynie w układzie heterozygotycznym. Częstość alleli w grupie złożonej ze 124 osób chorych i 113 osób zdrowych przedstawiała się następująco:

- allel Asn polimorfizmu Lys19Asn: osoby zdrowe (Z) - 2%, osoby chore na schizofrenie (Ch) - 0,5%;
- allel Glu polimorfizmu Asp349Glu: Z - 1%, Ch - 0%;
- allel Ser polimorfizmu Leu449Ser: Z - 6,5%, Ch - 3,5%;
- allel Phe? polimorfizmu Phe358?: Z - 0%, Ch - 1,5%;
- allel G polimorfizmu A1068G: Z - 3%, Ch - 3,5%.

Częstość powyższych alleli była wprawdzie wyższa niż wykazana w niniejszej pracy, nadal jednak dość niska. Możliwe, że badane polimorfizmy nie mają dużej częstości, do oceny tego konieczne jednak by były dalsze badania.

Wstępne wyniki przedstawionego powyżej badania [Mancama i wsp., 2000] sugerowały związek polimorfizmu Leu449Ser ze schizofrenia, wynikający z częstszego występowania allele Ser u osób zdrowych. Po zwiększeniu grupy do niemal 300 osób

wykazano jednak, że związek ten był marginalny ($p=0,047$). W badaniu tym zanegowano związki powyższych polimorfizmów z odpowiedzią na leczenie klozapiną oraz związków haplotypów powyższych polimorfizmów z podatnością na schizofrenię i z odpowiedzią na klozapinę. Pomiedzy powyższymi polimorfizmami nie zaobserwowano sprzężenia. Sami autorzy poddali w wątpliwość rolę polimorfizmu Leu449Ser ze względu na jego lokalizację w zewnątrzkomórkowym regionie receptora, który nie uczestniczy ani w wiązaniu histaminy, ani w przekazywaniu sygnału.

Spośród powyższych polimorfizmów najważniejszą rolę mógłby odgrywać Lys19Asn, ze względu na największe prawdopodobieństwo jego funkcjonalności wynikającej z jego lokalizacji w regionie zaangażowanym w N-glikozylację i składanie receptora. Jednak ani w poprzednim badaniu, ani w niniejszej pracy nie wykazano jego roli.

W innej pracy ci sami autorzy [Mancama i wsp., 2002] badali polimorfizmy w regionie promotora genu *HRH2*: C-17T, -974C/A, -1023A/G i -1536G/C w grupie 158 chorych i 105 osób zdrowych. Badacze ci nie przytoczyli częstości poszczególnych wariantów. Wykazali sprzężenie między polimorfizmami: -1536G/C i -1023A/G ($p<10^{-6}$), -1023A/G i -974C/A ($p=0,002$), -974C/A C-17T ($p=0,001$) oraz -1536G/C i -974C/A ($p=0,02$). Nie wykazano natomiast znaczenia powyższych polimorfizmów w zachorowaniu na schizofrenię, a jedynie tendencje w kierunku asocjacji między allelem C polimorfizmu G-1536C a tą chorobą, która jednak nie zyskała potwierdzenia w drugiej grupie pacjentów ocenianej przez autorów tego badania. Teoretycznie polimorfizm ten mógłby być ważny, gdyż znajduje się w regionie promotora i może uczestniczyć w kontroli ekspresji genu. Nie wchodzi on jednak w skład żadnej istotnej sekwencji promotorowej. Do analizy autorzy włączyli ponadto pięć ocenianych uprzednio polimorfizmów regionu kodującego [Mancama i wsp., 2000]. Nie stwierdzili ich związku ze schizofrenią, ani dla poszczególnych polimorfizmów, ani dla haplotypów wszystkich dziewięciu badanych polimorfizmów.

W prezentowanej pracy nie stwierdzono związku polimorfizmu C-17T ze schizofrenią, co jest zgodne z wynikami powyższego badania. Badania są jednak nieliczne, nie można więc wyciągać z nich rzetelnych wniosków.

W niniejszej pracy po raz pierwszy stwierdzono częstsze występowanie genotypów zawierających allel T w grupie chorych nieobciążonych dziedzicznie schizofrenią w porównaniu z grupą obciążoną tą chorobą, co może sugerować ochronne działanie tego allela. Wyniki należy jednak traktować z dużą ostrożnością ze względu na niewielką

liczebność grupy obciążonej rodzinie schizofrenia i posiadającej allel T w genotypie, co może prowadzić do błędnych wniosków. Konieczne byłaby ocena większych grup. Przy interpretacji wyników należy też pamiętać o problemach związanych z rzetelnością ocenianych danych, wynikających np. z trudnościami w zebraniu wywiadu czy zatajaniem danych odnoszących się do występowania chorób psychicznych w rodzinie. Zagadnienie to omówiono dokładniej w rozdziale dotyczącym genu *DRD3*.

Należy też pamiętać, że badane polimorfizmy mogą być sprzężone z innymi wariantami zlokalizowanymi w dalszym odcinku genu w kierunku 5', zwłaszcza że uprzednio stwierdzono dużą heterogenność tego regionu i sprzężenia między allelami znajdującymi się tam polimorfizmów [Mancama i wsp. 2002]. Interesujący wydaje się być także region położony w pozycji ok. 19 tysięcy zasad od miejsca początku transkrypcji genu *HRH2*, który zawiera wiele potencjalnie funkcjonalnych motywów DNA uczestniczących w regulacji ekspresji genu [DeBacker i wsp., 1998]. Niestety, nie został on dotychczas dokładnie zbadany.

Gen *HRH1* wydaje się być interesującym kandydatem do dalszych badań, zwłaszcza w zakresie trzech zagadnień. Pierwsze z nich dotyczy podłoża genetycznego i objawów negatywnych schizofrenii, wobec których aktualnie brakuje skutecznego leczenia. Badania z udziałem zwierząt [Dai i wsp., 2007] oraz obserwacje kliniczne dotyczące wykorzystania antagonisty *HRH1*, niaprazyny, u ludzi [Rossi i wsp., 1999], wskazują natomiast na możliwą rolę tego receptora w etiologii tej grupy objawów. W badaniu, które przeprowadzili Rossi i wsp., wykazano poprawę jakości snu i funkcjonowania społecznego [Rossi i wsp., 1999] u chorych z autyzmem, co pozwala postawić hipotezę, że także w przypadku schizofrenii, której objawami mogą być autyzm i zaburzenia funkcjonowania społecznego, lek ten – albo inny działający na *HRH1*, mógłby mieć wartość kliniczną. Mimo że powyższe badanie przeprowadzono z udziałem małej grupy osób, w związku z czym wypływająca z niego wniosek można uznać jedynie za wstępne, kierunek badań wydaje się ciekawy. W niniejszej pracy zrezygnowano z oceny związku polimorfizmów z poszczególnymi objawami schizofrenii bądź ich grupami ze względu na dużą heterogenność badanej grupy w zakresie czasu trwania choroby, długości leczenia i stosowanych leków. Mogło to wpłynąć znacząco na obraz kliniczny, a uzyskane wyniki trudno byłoby zinterpretować. W przypadku takich badań cenny jest udział pacjentów, którzy wcześniej nie byli leczeni. Kolejne dwa zagadnienia wiążą się z leczeniem, a dokładniej z odpowiedzią na leki i objawami niepożądanymi. Wiele leków przeciwpsychotycznych oddziałuje na *HRH1*, co może wiązać się zarówno z ich

skutecznością, jak i objawami ubocznymi. Wśród tych ostatnich podnosi się szczególnie przyrost masy ciała i sedacje [Kroeze i wsp., 2003]. U podłoża różnic w odpowiedzi na leczenie i w występowaniu objawów ubocznych u części leczonych osób mogą leżeć m.in. polimorfizmy genów [Basile i wsp., 2001]. Ocena tych zagadnień nie była jednak tematem niniejszej pracy.

V.4. Polimorfizm A649G genu receptora histaminowego H2

W niniejszym badaniu planowano ocenę związku polimorfizmu A649G genu *HRH2* z zachorowaniem na schizofrenię, obciążeniem rodzinnym tym zaburzeniem, wiekiem zachorowania oraz funkcjonowaniem przedchorobowym.

Powyzszych założeń nie udało się zrealizować ze względu na zbyt niską częstość występowania allela G. Wykazano go jedynie u dwóch osób, w tym jednej chorej kobiety i jednego zdrowego mężczyzny, u których występował on w układzie heterozygotycznym jako genotyp A/G.

W nielicznych przeprowadzonych dotychczas badaniach genetycznych z udziałem genu *HRH2* stwierdzono znaczce rozbieżności dotyczące częstości jego alleli [Orange i wsp., 1996a]. W badaniu, w którym zidentyfikowano ten polimorfizm, w grupie 58 osób stwierdzono częstość allela A równą 44% i allela G – 56%. Rozkład genotypów był następujący: A/A – 34,5%, A/G – 43,1% oraz G/G – 22,4%. Powszechne występowanie obu wariantów genu tego receptora potwierdzono następnie w pracy, w której oceniano jego związek ze schizofrenią w grupie 47 chorych i 46 zdrowych osób [Orange i wsp., 1996b]. Wykazano w niej 1,8 raza częstsze występowanie allela G ($p=0,004$) i 2,8 raza częstsze występowanie genotypu G/G ($p=0,03$) u chorych na schizofrenię w porównaniu z osobami zdrowymi.

Niestety, w kolejnych badaniach nie stwierdzono obecności tego polimorfizmu, zarówno wśród osób chorych na schizofrenię, jak i zdrowych [Ito i wsp., 2000; Mancama i wsp., 2000; Mancama i wsp., 2002], bądź obciążonych innymi chorobami, jak na przykład astmą atopową [Sasaki i wsp., 2000]. Ito i wsp. [2000] zbadali 88 osób chorych i 103 osoby zdrowe, Mancama i wsp. [2002] – 50 osób chorych i 50 osób zdrowych. Były to na tyle liczne grupy, że polimorfizm o częstości nawet znacząco niższej niż w badaniu Orange'a i wsp. [1996a, 1996b] powinien się ujawnić. Wyniki niniejszej pracy są zgodne z większością badań. Wprawdzie wykazano obecność układów heterozygotycznych, ale były

one obecne jedynie u dwóch osób, co wskazuje na to, że polimorfizm ten może być bardzo rzadki.

Przyczyny tak dużych rozbieżności między poszczególnymi badaniami nie są jasne. Możliwe, że w badaniach tych oceniano odmienne populacje pacjentów, różniące się np. pochodzeniem etnicznym. We wszystkich badaniach deklarowano wprawdzie przynależność pacjentów do rasy kaukaskiej, ale nie można z całkowitą pewnością wykluczyć efektu stratyfikacji, szczególnie w przypadku grupy z Wielkiej Brytanii, gdzie przebywają osoby należące do różnych grup etnicznych. Możliwe także, że gen *HRH2* cechuje się dużą heterogennością w zakresie występowania odmian polimorficznych. Wskazuje na to fakt, że nawet w nielicznych przeprowadzonych badaniach wykazano wiele polimorfizmów w obrębie tego genu.

Ito i wsp. [2000] na drodze sekwencjonowania wykazali istnienie polimorfizmu regionu kodującego, G543A, oraz potencjalnie interesujących wariantów w promotorze genu, G-1018A, A-592G, które, ze względu na swoją lokalizację, mogą wpływać na ekspresję genu. Nie przeprowadzono jednak badań nad ich funkcjonalnością. Warianty te występują powszechnie w populacji, co potwierdzili Mancama i wsp. [2000, 2002]. Nie stwierdzono jednak ich związku ze schizofrenią [Ito i wsp., 2000; Mancama i wsp., 2000]. W przeprowadzonych badaniach wykazano też obecność innych wariantów polimorficznych genu *HRH2*: A-249G oraz G-1077A w regionie promotora [Mancama i wsp., 2002], a także T398C, A525T, A620G, A692G G802A [Orange i wsp., 1996a] oraz C826T [Sasaki i wsp., 2000] w regionie kodującym genu. Warianty, które opisali Mancama i wsp. [2000, 2002], zostały przez nich zbadane pod kątem związku ze schizofrenią i odpowiedzią na leczenie kłozapiną, ale w obu przypadkach nie stwierdzono asocjacji. Innych polimorfizmów nie oceniano w kontekście zaburzeń psychicznych.

W świetle powyższych rozważań pojawia się pytanie o sens badań genetycznych z udziałem polimorfizmów tego receptora. Wydaje się, że mimo wszystko badania takie są zasadne. Szczególnie warte uwagi mogą być polimorfizmy w regionie promotora genu, ze względu na ich możliwy wpływ na jego ekspresję. Cenne w tym kontekście byłyby badania ekspresji genu, których dotychczas nie przeprowadzono. Gen *HRH2* jest interesującym kandydatem ze względu na obserwacje kliniczne wskazujące na możliwą rolę tego receptora w leczeniu objawów negatywnych schizofrenii. Dołączenie famotydyny, selektywnego antagonisty tego receptora, do leczenia przeciwpsychotycznego w kilku badaniach spowodowało poprawę w zakresie tych objawów – większą aktywność społeczną, poprawę napedu psychoruchowego, poprawę funkcji poznawczych [np. Rosse i

wsp. 1996; Martinez, 1999]. Kontynuacja badań w tym kontekście wydaje się szczególnie ciekawa ze względu na nieskuteczność obecnie dostępnych leków w stosunku do tych objawów, znacząco upośledzających życie chorego. *HRH2* może też odgrywać rolę w zakresie innych aspektów schizofrenii, a mianowicie wiązać się zarówno ze skutecznością leczenia, jak i ze związanymi z nim objawami niepożądanymi. Mancama i wsp. [2002] wykazali związek polimorfizmu G-1018A z odpowiedzią na leczenie klozapina. Wprawdzie wynik ten nie przetrwał korekty dla testów wielokrotnych, jednak wskazuje on na możliwy kierunek badań, szczególnie ze wcześniej sugerowano, iż polimorfizm ten znajduje się w regionie promotora i może wpływać na ekspresję genu [Ito i wsp., 2000]. W kontekście objawów niepożądanych związanych z leczeniem wykazano, że nizatydyna, antagonistą *HRH2*, może powstrzymywać przyrost masy ciała związany z niektórymi lekami przeciwpsychotycznymi, np. olanzapina [Atmaca i wsp., 2003]. Wynik ten nie został potwierdzony we wszystkich pracach [Assuncao i wsp., 2006]. Jedną z przyczyn rozbieżności może być np. istnienie odmian polimorficznych genu *HRH2*, czego wynikiem mogłaby być odmienna reakcja pacjentów na lek.

Podsumowując, chociaż w niniejszym badaniu nie udało się ocenić związku między polimorfizmem A649G genu *HRH2* ze względu na jego skrajnie niską częstość w badanej populacji, wydaje się, że sam gen może być interesującym przedmiotem badań w kontekście schizofrenii, zwłaszcza, że dotychczas nie był szeroko badany.

VI. Wnioski

- 1) U kobiet chorych na schizofrenie występuje związek między polimorfizmem Ser9Gly genu *DRD3* a poziomem funkcjonowania społecznego ocenianym skala Phillipsa oraz wiekiem zachorowania: brak allela Gly wiąże się z lepszym funkcjonowaniem społecznym oraz późniejszym zachorowaniem.
- 2) W niniejszej pracy nie wykazano związku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* oraz polimorfizmów C-17T, Phe358? i A1068G genu *HRHI* z zachorowaniem na schizofrenie.
- 3) Obecność obciążenia rodzinnego schizofrenia wśród krewnych I i II stopnia w zasadzie nie różnicowała wyodrębnionych na jej podstawie podgrup pacjentów pod względem badanych polimorfizmów.

VII. Streszczenie

Układy dopaminergiczny i histaminergiczny są kandydatami w badaniach nad genetycznymi uwarunkowaniami schizofrenii. O ile geny układu dopaminergicznego były często badane, o tyle układ histaminergiczny jest nowym kandydatem, interesującym zwłaszcza ze względu na postulowaną rolę w zaburzeniach funkcji poznawczych, etiologii objawów negatywnych oraz związanych z nimi zaburzeniami funkcjonowania. Geny kandydujące kodujące białka należące do powyższych układów mogą nie tylko wiązać się z predyspozycją do zachorowania na schizofrenie, szczególnie w grupie obciążonej rodzinnie tą chorobą, ale także wpływać na wiek zachorowania oraz na jakość funkcjonowania psychospołecznego w okresie przedchorobowym.

Celem niniejszej pracy były: 1) ocena częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu Ser9Gly genu receptora dopaminowego D3 (*DRD3*), polimorfizmów C-17T, Lys19Asn, Asp349Glu, Phe358?, A1068G i Leu449Ser genu receptora histaminowego H1 (*HRH1*) oraz polimorfizmu A649G genu receptora histaminowego H2 (*HRH2*) w grupie pacjentów ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną złożoną z osób zdrowych; 2) ocena częstości występowania powyższych genotypów i alleli w grupie obciążonej rodzinnie schizofrenią w porównaniu z grupą chorych nieobciążonych tym zaburzeniem; 3) ocena wpływu powyższych genotypów i alleli na wiek zachorowania i poziom funkcjonowania społecznego w okresie przedchorobowym. Przy ocenie powyższych parametrów uwzględniano wpływ płci.

Grupa badana obejmowała 141 niespokrewnionych osób z rozpoznaniem schizofrenii (72 mężczyzn i 69 kobiet), spełniających kryteria diagnostyczne DSM-IV dla tego zaburzenia. Osoby badane rekrutowano spośród pacjentów Kliniki Chorób Psychicznych i Zaburzeń Nerwicowych Akademii Medycznej w Gdańsku. U wszystkich chorych przeprowadzono retrospektywną ocenę funkcjonowania psychospołecznego w okresie przedchorobowym z wykorzystaniem skali Phillipsa. Grupa kontrolna obejmowała 146 zdrowych osób (68 mężczyzn i 78 kobiet), pracowników Akademii Medycznej w Gdańsku.

DNA izolowano z krwi obwodowej metodą fenol-chloroform. Poszczególne genotypy oznaczano metodą PCR-RFLP (polimorfizmy Ser9Gly genu *DRD3*, Lys19Asn, Asp349Glu, Phe358?, A1068G i Leu449Ser genu *HRH1*) i PCR-SSCP (polimorfizm C-17T genu *HRH1*).

Analize statystyczna czestosci genotypów i alleli przeprowadzono przy pomocy testu χ^2 Pearsona, a zwiazek genotypów i alleli z wiekiem zachorowania i poziomem funkcjonowania psychospolecznego w okresie przedchorobowym oceniano za pomoca testów nieparametrycznych –Kruskala-Wallisa dla genotypów i U Manna-Whitney'a dla alleli.

Stwierdzono obecność jedynie podstawowych wariantów dwóch polimorfizmów genu *HRH1*: Asp349Glu oraz Leu449Ser, występowanie allela Asn polimorfizmu Lys19Asn jedynie w grupie osób zdrowych oraz obecność allela G polimorfizmu A649G jedynie u dwóch osób. Z tego względu warianty te wyłączono z analizy. Polimorfizmy Phe358? oraz A1068G genu *HRH1* wyłączono z obliczeń z udziałem podgrup ze względu na niską czestotliwość wariantów.

W pracy stwierdzono istotnie czestsze występowanie genotypów zawierających allel T w grupie chorych nieobciążonych dziedzicznie schizofrenia w porównaniu z grupą obciążoną tą chorobą. Poza tym nie obserwowano związku między badanymi polimorfizmami genów *DRD3*, *HRH1* i *HRH2* a zachorowaniem na schizofrenie oraz obciążeniem dziedzicznym tą chorobą.

W przypadku polimorfizmu Ser9Gly genu *DRD3* wykazano wpływ genotypu na wiek zachorowania i poziom funkcjonowania społecznego przed zachorowaniem. Dotyczył on jedynie podgrupy kobiet. Brak allela Gly w genotypie kobiet wiązał się z późniejszym zachorowaniem na schizofrenie oraz z lepszym funkcjonowaniem społecznym w okresie przedchorobowym.

Postulowano, że brak allela Gly, prowadzący do zmniejszenia wrażliwości receptora D3, odgrywać może pewną rolę w poprawie funkcjonowania przedchorobowego. Stwierdzone w pracy różnice pod względem płci sugerują, iż czynnikiem współdziałającym mogłyby być hormony płciowe.

VIII. Pismiennictwo

Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2004;7:S1-5.

Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry.* 2005;20:15-27.

Alvarez EO, Banzan AM. Histamine in dorsal and ventral hippocampus. II. Effects of H1 and H2 histamine antagonists on exploratory behavior in male rats. *Physiol Behav.* 1986;37:39-45.

Alvarez EO, Banzan AM. The role of histamine in the anterior hypothalamus and its functional interaction with the hippocampus on exploratory behavior in adult male rats. *Behav Brain Res.* 1992 Jun 8;48:127-133.

Alvarez EO, Ruarte MB, Banzan AM. Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. *Behav Brain Res.* 2001;124:195-202.

Ambrosio AM, Kennedy JL, Macciardi F, Macedo A, Valente J, Dourado A, Oliveira CR, Pato C. Family association study between DRD2 and DRD3 gene polymorphisms and schizophrenia in a Portuguese population. *Psychiatry Res.* 2004;125:185-191.

Andreasen NC. Negative symptoms in schizophrenia. Definition and reliability. *Arch Gen Psychiatry.* 1982;39:784-788.

Andreasen NC, Olsen S. Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry.* 1982;39:789-794.

Andreasen NC. Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;31:106-112.

Anney RJ, Rees MI, Bryan E, Spurlock G, Williams N, Norton N, Williams H, Cardno A, Zammit S, Jones S, Jones G, Hoogendoorn B, Smith K, Hamshere ML, Coleman S, Guy C, O'Donovan MC, Owen MJ, Buckland PR. Characterisation, mutation detection, and association analysis of alternative promoters and 5' UTRs of the human dopamine D3 receptor gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002;7:493-502.

Asherson P, Mant R, Holmans P, Williams J, Cardno A, Murphy K, Jones L, Collier D, McGuffin P, Owen MJ. Linkage, association and mutational analysis of the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 1996;1:125-132.

Assuncao SS, Ruschel SI, Rosa Lde C, Campos JA, Aves MJ, Bracco OL, de Lima MS. Weight gain management in patients with schizophrenia during treatment with olanzapine in association with nizatidine. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28:270-276.

Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. Nizatidine treatment and its relationship with leptin levels in patients with olanzapine-induced weight gain. *Hum Psychopharmacol.* 2003;18:457-461.

Baritaki S, Rizos E, Zafiropoulos A, Soufla G, Katsafouros K, Gourvas V, Spandidos DA. Association between schizophrenia and DRD3 or HTR2 receptor gene variants. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:535-541.

Baron M. Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am J Hum Genet.* 2001;68:299-312.

Basile VS, Masellis M, McIntyre RS, Meltzer HY, Lieberman JA, Kennedy JL. Genetic dissection of atypical antipsychotic-induced weight gain: novel preliminary data on the pharmacogenetic puzzle. *J Clin Psychiatry.* 2001;62:45-66.

Bateson G, Jackson DD, Haley J, Weakland J. A note on the double bind – 1962. *Family Process;*1962;2:154-161.

Benca RM. Sleep in psychiatric disorders. *Neurol Clin.* 1996;14:739-764.

Benkelfat C. Serotonergic mechanisms in psychiatric disorders: new research tools, new ideas. *Int Clin Psychopharmacol.* 1993;8:53-56.

Brown RE, Fedorov NB, Haas HL, Reymann KG. Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology.* 1995;34:181-190.

Cannon TD. The inheritance of intermediate phenotypes for schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry.* 2005;18:135-140.

Cannon TD, Keller MC. Endophenotypes in the genetic analyses of Mental Disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 2006;2:267-290.

Cardno AG, Gottesman II: Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to Star Wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 2000;97:12-17.

Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1963;20:140-144.

Chang RS, Tran VT, Snyder SH. Characteristics of histamine H1-receptors in peripheral tissues labeled with [3H]mepyramine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979a;209:437-442.

Chang RS, Tran VT, Snyder SH. Heterogeneity of histamine H1-receptors: species variations in [3H]mepyramine binding of brain membranes. *J Neurochem.* 1979b;32:1653-1663.

Chen CH, Liu MY, Wei FC, Koong FJ, Hwu HG, Hsiao KJ. Further evidence of no association between Ser9Gly polymorphism of dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1997;74:40-43.

- Cohen RZ, Seeman MV, Gotowiec A, Kopala L. Earlier puberty as a predictor of later onset of schizophrenia in women. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1059-1064.
- Cornblatt BA, Keilp JG. Impaired attention, genetics, and the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1994;20:31-46.
- Crocq MA, Mant R, Asherson P, Williams J, Hode Y, Mayerova A, Collier D, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC, et al.: Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J Med Genet* 1992;29:858-860.
- Crow TJ. Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry*. 1980;137:383-386.
- Dai H, Okuda T, Sakurai E, Kuramasu A, Kato M, Jia F, Xu AJ, Inuma K, Sato I, Yanai K. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;183:285-293.
- Dai H, Kaneko K, Kato H, Fujii S, Jing Y, Xu A, Sakurai E, Kato M, Okamura N, Kuramasu A, Yanai K. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. *Neurosci Res*. 2007;57:306-313.
- De Backer MD, Gommeren W, Moereels H, Nobels G, Van Gompel P, Leysen JE, Luyten WH. Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197:1601-1608.
- De Backer MD, Loonen I, Verhasselt P, Neefs JM, Luyten WH. Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem J*. 1998;335:663-670.
- Del Valle J, Wang L, Gantz I, Yamada T. Characterization of H2 histamine receptor: linkage to both adenylate cyclase and $[Ca^{2+}]_i$ signaling systems. *Am J Physiol*. 1992;263:G967-972.
- Del Valle J, Gantz I. Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol*. 1997;273:G987-996.
- Deutsch SI, Rosse RB, Kendrick KA, Fay-McCarthy M, Collins JP Jr, Wyatt RJ. Famotidine adjunctive pharmacotherapy for schizophrenia: preliminary data. *Clin Neuropharmacol*. 1993;16:518-524.
- Dikeos DG, Papadimitriou GN, Avramopoulos D, Karadima G, Daskalopoulou EG, Souery D, Mendlewicz J, Vassilopoulos D, Stefanis CN. Association between the dopamine D3 receptor gene locus (DRD3) and unipolar affective disorder. *Psychiatr Genet*. 1999;9:189-195.
- Dismukes K, Rogers M, Daly JW. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation in guinea-pig brain slices: effect of H1- and H2-histaminergic agonists. *J Neurochem*. 1976 Apr;26(4):785-90. Dluzen DE. Unconventional effects of estrogen uncovered. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:485-487.

- Docherty NM. Cognitive characteristics of the parents of schizophrenic patients. *J Nerv Ment Dis.* 1994;182:443-451.
- Dubertret C, Gorwood P, Ades J, Feingold J, Schwartz JC, Sokoloff P. Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: ethnic heterogeneity and significant association in Caucasians. *Am J Med Genet.* 1998;81:318-322.
- Durany N, Thome J, Palomo A, Foley P, Riederer P, Cruz-Sanchez FF. Homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenic patients. *Neurosci Lett.* 1996;220:151-154.
- Dworkin RH, Cornblatt BA, Friedmann R, Kaplansky LM, Lewis JA, Rinaldi A, Shilliday C, Erlenmeyer-Kimling L. Childhood precursors of affective vs. social deficits in adolescents at risk for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1993;19(3):563-577.
- Dworkin RH, Lewis JA, Cornblatt BA, Erlenmeyer-Kimling L. Social competence deficits in adolescents at risk for schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.* 1994;182:103-108.
- Ebstein RP, Macciardi F, Heresco-Levi U, Serretti A, Blaine D, Verga M, Nebamov L, Gur E, Belmaker RH, Avnon M, Lerer B. Evidence for an association between the dopamine D3 receptor gene DRD3 and schizophrenia. *Hum Hered.* 1997;47:6-16.
- Erlenmeyer-Kimling L., Cornblatt B., Friedman D., Marcuse Y., Rutschmann J., Simmens S., Devi F. Neurological, electrophysiological, and attentional deviations in children at risk for schizophrenia. W: *Schizophrenia as a Brain Disease.* Henn FA and Nasrallah HA (red). Oxford University Press, New York 1982.
- Fan JB, Sklar P. Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2005;10:928-938.
- Faraone SV, Seidman LJ, Kremen WS, Pepple JR, Lyons MJ, Tsuang MT. Neuropsychological functioning among the nonpsychotic relatives of schizophrenic patients: a diagnostic efficiency analysis. *J Abnorm Psychol.* 1995;104:286-304.
- Faraone SV, Green AI, Seidman LJ, Tsuang MT. "Schizotaxia": clinical implications and new directions for research. *Schizophr Bull.* 2001;27:1-18.
- Faraone SV, Taylor L, Tsuang MT. The molecular genetics of schizophrenia: an emerging consensus. *Expert Rev Mol Med.* 2002;2002:1-13.
- Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res.* 1982-83;17:319-334.
- Fernandez-Novoa L, Cacabelos R. Histamine function in brain disorders. *Behav Brain Res.* 2001;124:213-233.
- Fields JZ, Gordon JH. Estrogen inhibits the dopaminergic supersensitivity induced by neuroleptics. *Life Sci.* 1982;30:229-234.

First, Michael B., Spitzer, Robert L, Gibbon Miriam, and Williams, Janet B.W.: Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition. (SCID-I/P) New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, November 2002.

Fish B, Hagin R. Visual-motor disorders in infants at risk for schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1973;28:900-904.

Foreman JC, Rising TJ, Webber SE. A study of the histamine H₂-receptor mediating relaxation of the parenchymal lung strip preparation of the guinea-pig. Br J Pharmacol. 1985;86:465-473.

Friedman D, Squires-Wheeler E. Event-related potentials (ERPs) as indicators of risk for schizophrenia. Schizophr Bull. 1994;20:63-74.

Friedman J, Dill FJ, Hayden M, McGillivray B (red.). Genetics. Williams & Wilkins 2002.

Friston KJ. Schizophrenia and the disconnection hypothesis. Acta Psychiatr Scand Suppl. 1999;395:68-79.

Fromm-Reichmann F. Notes on the development of treatment of schizophrenia by psychoanalytic psychotherapy. Psychiatry. 1948;11:263-273.

Fukui H, Fujimoto K, Mizuguchi H, Sakamoto K, Horio Y, Takai S, Yamada K, Ito S. Molecular cloning of the human histamine H₁ receptor gene. Biochem Biophys Res Commun. 1994;201:894-901.

Gaitonde EJ, Morris A, Sivagnanasundaram S, McKenna PJ, Hunt DM, Mollon JD. Assessment of association of D₃ dopamine receptor MspI polymorphism with schizophrenia: analysis of symptom ratings, family history, age at onset, and movement disorders. Am J Med Genet. 1996;67:455-458.

Gantz I, Munzert G, Tashiro T, Schaffer M, Wang L, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning of the human histamine H₂ receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1991;178:1386-1392.

Giros B, Martres MP, Pilon C, Sokoloff P, Schwartz JC. Shorter variants of the D₃ dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun. 1991;176:1584-1592.

Golimbet V, Gritsenko I, Alfimova M, Lebedeva I, Lezheiko T, Abramova L, Kaleda V, Ebstein R. Association study of *COMT* gene Val158Met polymorphism with auditory P300 and performance on neurocognitive tests in patients with schizophrenia and their relatives. World J Biol Psychiatry. 2006;7:238-245.

Gornick MC, Addington AM, Sporn A, Gogtay N, Greenstein D, Lenane M, Gochman P, Ordonez A, Balkissoon R, Vakkalanka R, Weinberger DR, Rapoport JL, Straub RE. Dysbindin (DTNBP1, 6p22.3) is associated with childhood-onset psychosis and endophenotypes measured by the Premorbid Adjustment Scale (PAS). J Autism Dev Disord. 2005;35:831-838.

Gottesman II, Bertelsen A. Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Arch Gen Psychiatry*. 1989;46:867-872.

Gottesman II. *Schizophrenia genesis: the origins of madness*. New York, W.H. Freeman and Co. 1991.

Green JP, Maayani S. Tricyclic antidepressant drugs block histamine H2 receptor in brain. *Nature*. 1977;269:163-165.

Griffon N, Crocq MA, Pilon C, Martres MP, Mayerova A, Uyanik G, Burgert E, Duval F, Macher JP, Javoy-Agid F, Tamminga CA, Schwartz JC, Sokoloff P: Dopamine D3 receptor gene: organization, transcript variants, and polymorphism associated with schizophrenia. *Am J Med Genet* 1996;67:63-70.

Grigoriadis S, Seeman MV. The role of estrogen in schizophrenia: implications for schizophrenia practice guidelines for women. *Can J Psychiatry*. 2002;47:437-442.

Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J: Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1975;39:439-446.

Gu Q. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*. 2002;111:815-835.

Gurevich EV, Bordelon Y, Shapiro RM, Arnold SE, Gur RE, Joyce JN. Mesolimbic dopamine D3 receptors and use of antipsychotics in patients with schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:225-232.

Gurevich EV, Joyce JN. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20:60-80.

Guy JD, Liaboe GP, Wallace CJ. Premorbid adjustment in adult male schizophrenics, as related to process vs. reactive, chronic vs. acute, age of onset, and neurologically impaired vs. non-impaired. *J Clin Psychol*. 1986;42:62-67.

Haas HL, Bucher UM. Histamine H2-receptors on single central neurones. *Nature*. 1975;255:634-635.

Haas HL, Wolf P. Central actions of histamine: microelectroretic studies. *Brain Res*. 1977;122:269-279.

Haas HL, Konnerth A. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 1983 Mar 31-Apr 6;302:432-434.

Haas HL, Greene RW. Effects of histamine on hippocampal pyramidal cells of the rat in vitro. *Exp Brain Res*. 1986;62:123-130.

Häfner H. Gender differences in schizophrenia. *PNEC*. 2003;28:17-54.

Häfner H, Maurer K, Löffler W, an der Heiden W, Hambrecht M, Schultze-Lutter F. Modeling the early course of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2003;29:325-340.

Hans SL, Marcus J, Henson L, Auerbach JG, Mirsky AF. Interpersonal behavior of children at risk for schizophrenia. *Psychiatry.* 1992;55:314-335.

Harder DW, Strauss JS, Greenwald DF, Kokes RF, Ritzler BA, Gift TE. Predictors of outcome among adult psychiatric first-admissions. *J Clin Psychol.* 1990;46:119-128.

Harrison PJ, Owen MJ. Genes For Schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 2003;361:417-419.

Harrow M, Westermeyer JF, Silverstein M, Strauss BS, Cohler BJ. Predictors of outcome in schizophrenia: the process-reactive dimension. *Schizophr Bull.* 1986;12:195-207.

Hauser ER, Bohnke M, Guo S-W, Risch N. Affected sib pair interval mapping and exclusion for complex genetic traits. *Genet Epidemiol.* 1996;13:117-137.

Hauser J, Czarny-Ratajczak M. Badania genetyczne w psychiatrii. W: *Psychiatria*, tom I. Bilikiewicz A, Puzynski S, Rybakowski J, Wciórka J (red.). Urban & Partner, Wrocław 2002.

Hawi Z, McCabe U, Straub RE, O'Neill A, Kendler KS, Walsh D, Gill M: Examination of new and reported data of the DRD3/MscI polymorphism: no support for the proposed association with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1998;3:150-155.

Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull.* 2005;31:608-612.

Heston LL. Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry.* 1966;112:819-825.

Hill SJ. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev.* 1990;42:45-83.

Hill SJ. Multiple histamine receptors: properties and functional characteristics. *Biochem Soc Trans.* 1992;20:122-125.

Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 1997;49:253-278.

Hong CJ, Lin CH, Yu YW, Chang SC, Wang SY, Tsai SJ. Genetic variant of the histamine-1 receptor (glu349asp) and body weight change during clozapine treatment. *Psychiatr Genet.* 2002;12:169-171.

Inada T, Sugita T, Dobashi I, Inagaki A, Kitao Y, Matsuda G, Kato S, Takano T, Yagi G, Asai M. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and the psychiatric symptoms seen in first-break schizophrenic patients. *Psychiatr Genet.* 1995;5:113-116.

Ishiguro H, Okuyama Y, Toru M, Arinami T: Mutation and association analysis of the 5' region of the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia patients: identification of the Ala38Thr polymorphism and suggested association between DRD3 haplotypes and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000;5:433-438.

Ito C, Morisset S, Krebs MO, Olie JP, Loo H, Poirier MF, Lannfelt L, Schwartz JC, Arrang JM. Histamine H2 receptor gene variants: lack of association with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2000;5:159-164.

Iwabuchi K, Ito C, Tashiro M, Kato M, Kano M, Itoh M, Iwata R, Matsuoka H, Sato M, Yanai K. Histamine H1 receptors in schizophrenic patients measured by positron emission tomography. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15:185-191.

Iwata Y, Matsumoto H, Minabe Y, Osada N, Nakamura K, Sekizawa T, Suzuki K, Sekine Y, Takei N, Mori N. Early-onset schizophrenia and dopamine-related gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;116:23-26.

Jablensky A: Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000;250:274-285.

Jeanneteau F, Funalot B, Jankovic J, Deng H, Lagarde JP, Lucotte G, Sokoloff P. A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10753-10758.

Johnson CL, Weinstein H, Green JP. Studies on histamine H2 receptors coupled to cardiac adenylate cyclase. Effects of guanylnucleotides and structural requirements for agonist activity. *Biochim Biophys Acta*. 1979;587:155-168.

Jones BE. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:578-586.

Jonsson E, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G. Lack of association between schizophrenia and alleles in the dopamine D3 receptor gene. *Acta Psychiatr Scand*. 1993;87:345-349.

Jonsson EG, Flyckt L, Burgert E, Crocq MA, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Nimgaonkar VL, Edman G, Bjerkenstedt L, Wiesel FA, Sedvall GC. D3 receptor gene Ser9Gly variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Psychiatr Genet*. 2003;13:1-12.

Joyce JN, Millan MJ. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today*. 2005;10:917-925.

Kahn RS, Davidson M. Serotonin receptor responsivity in schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*. 1993;8:47-51.

Kaminsky R, Moriarty TM, Bodine J, Wolf DE, Davidson M. Effect of famotidine on deficit symptoms of schizophrenia. *Lancet*. 1990;335:1351-1352.

Kanof PD, Greengard P. Brain histamine receptors as targets for antidepressant drugs. *Nature*. 1978;272:329-333.

Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:1081-1090.

Keefe RS, Silverman JM, Roitman SE, Harvey PD, Duncan MA, Alroy D, Siever LJ, Davis KL, Mohs RC. Performance of nonpsychotic relatives of schizophrenic patients on cognitive tests. *Psychiatry Res*. 1994;53:1-12.

Kendler KS. Overview: a current perspective on twin studies of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1983;140:1413-1425.

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;28:239-265.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK. Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51:442-455.

Khan MM, Marr-Leisy D, Goodman M, Melmon KL. Receptor and tissue specific derivatives of histamine: novel immune modulators. *Proc West Pharmacol Soc*. 1987;30:383-387.

Ko YH, Joe SH, Cho W, Park JH, Lee JJ, Jung IK, Kim L, Kim SH. Estrogen, cognitive function and negative symptoms in female schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2006;53:169-175.

Konnecke R, Hafner H, Maurer K, Loffler W, an der Heiden W. Main risk factors for schizophrenia: increased familial loading and pre- and peri-natal complications antagonize the protective effect of oestrogen in women. *Schizophr Res*. 2000;44:81-93.

Kostopoulos G, Psarropoulou C, Haas HL. Membrane properties, response to amines and to tetanic stimulation of hippocampal neurons in the genetically epileptic mutant mouse tottering. *Exp Brain Res*. 1988;72:45-50.

Kovalenko S, Bergmann A, Schneider-Axmann T, Ovary I, Majtenyi K, Havas L, Honer WG, Bogerts B, Falkai P. Regio entorhinalis in schizophrenia: more evidence for migrational disturbances and suggestions for a new biological hypothesis. *Pharmacopsychiatry*. 2003;36:S158-161.

Kremen WS, Seidman LJ, Pepple JR, Lyons MJ, Tsuang MT, Faraone SV. Neuropsychological risk indicators for schizophrenia: a review of family studies. *Schizophr Bull*. 1994;20:103-119.

Kremer I, Rietschel M, Dobrusin M, Mujaheed M, Murad I, Blanaru M, Bannoura I, Muller DJ, Schulze TG, Reshef A, Gathas S, Schwab S, Wildenauer D, Bachner-Melman R, Belmaker RH, Maier W, Ebstein RP: No association between the dopamine D3 receptor

Bal I polymorphism and schizophrenia in a family-based study of a Palestinian Arab population. *Am J Med Genet* 2000;96:778-780.

Kringlen E, Cramer G. Offspring of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1989;46(10):873-877.

Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, Roth BL. H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:519-526.

Kulkarni J, Riedel A, de Castella AR, Fitzgerald PB, Rolfe TJ, Taffe J, Burger H. Estrogen - a potential treatment for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001;48:137-144.

Lacroix LP, Hous ME, Shah AJ, Hagan JJ, Heidbreder CA. Selective antagonism at dopamine D3 receptors enhances monoaminergic and cholinergic neurotransmission in the rat anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:839-849.

Lane HY, Lee CC, Chang YC, Lu CT, Huang CH, Chang WH. Effects of dopamine D2 receptor Ser311Cys polymorphism and clinical factors on risperidone efficacy for positive and negative symptoms and social function. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7:461-470.

Lane HY, Hsu SK, Liu YC, Chang YC, Huang CH, Chang WH. Dopamine D3 receptor Ser9Gly polymorphism and risperidone response. *J Clin Psychopharmacol*. 2005;25:6-11.

Lannfelt L, Sokoloff P, Martres M, Pilon C, Giros B, Jonsson E, Sedvall G, Schwartz JC: Amino-acid substitution in the dopamine D3 receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet* 1992;2:249-256.

Laszy J, Laszlovszky I, Gyertyan I. Dopamine D3 receptor antagonists improve the learning performance in memory-impaired rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;179:567-575.

Lawford BR, McD Young R, Noble EP, Kann B, Arnold L, Rowell J, Ritchie TL. D2 dopamine receptor gene polymorphism: paroxetine and social functioning in posttraumatic stress disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003;13:313-320.

Le Coniat M, Sokoloff P, Hillion J, Martres MP, Giros B, Pilon C, Schwartz JC, Berger R: Chromosomal localization of the human D3 dopamine receptor gene. *Hum Genet*. 1991;87:618-620.

Le Coniat M, Traiffort E, Ruat M, Arrang JM, Berger R. Chromosomal localization of the human histamine H1-receptor gene. *Hum Genet*. 1994;94:186-188.

Lerer B, Segman RH, Fangerau H, Daly AK, Basile VS, Cavallaro R, Aschauer HN, McCreadie RG, Ohlraun S, Ferrier N, Masellis M, Verga M, Scharfetter J, Rietschel M, Lovlie R, Levy UH, Meltzer HY, Kennedy JL, Steen VM, Macciardi F. Pharmacogenetics of tardive dyskinesia: combined analysis of 780 patients supports association with dopamine D3 receptor gene Ser9Gly polymorphism. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27:105-119.

Leszczynska-Rodziewicz A, Hauser J, Dmitrzak-Weglarz M, Skibinka M, Czerski P, Zakrzewska A, Kosmowska M, Rybakowski JK. Lack of association between polymorphisms of dopamine receptors, type D2, and bipolar affective illness in a Polish population. *Med Sci Monit.* 2005;11:CR289-295.

Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther.* 1995;66:413-463.

Levant B. The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol Rev.* 1997;49:231-252.

Levi RC, Alloati G. Histamine modulates calcium current in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;246:377-383.

Levinson P, Campus N. A comparison of four scales that assess premorbid competence. *J Nerv Ment Dis.* 1978;166:204-208.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonnqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2003;73:34-48.

Lindamer LA, Buse DC, Lohr JB, Jeste DV. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with schizophrenia: positive effect on negative symptoms? *Biol Psychiatry.* 2001;49:47-51.

Lorenzo CV, Baca-Garcia E, Hernandez MD, Martin CB, Perez-Rodriguez MM, Saiz-Gonzalez MD, Fernandez P, Gutierrez FJ, Saiz-Ruiz J, Piqueras JF, de Rivera JL, de Leon J. No association between the Ser9Gly polymorphism of the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia in a Spanish sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144:344-346.

Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:1068-1072.

Maki P, Veijola J, Jones PB, Murray GK, Koponen H, Tienari P, Miettunen J, Tanskanen P, Wahlberg KE, Koskinen J, Lauronen E, Isohanni M. Predictors of schizophrenia—a review. *Br Med Bull.* 2005;73-74:1-15.

Malhotra AK, Goldman D, Buchanan RW, Rooney W, Clifton A, Kosmidis MH, Breier A, Pickar D. The dopamine D3 receptor (DRD3) Ser9Gly polymorphism and schizophrenia: a

haplotype relative risk study and association with clozapine response. *Mol Psychiatry*. 1998;3:72-75.

Mancama D, Arranz MJ, Munro J, Makoff A, Kerwin R. The histamine 1 and histamine 2 receptor genes – candidates for schizophrenia and clozapine drug response. *GeneScreen I*. 2000;29-34.

Mancama D, Arranz MJ, Munro J, Osborne S, Makoff A, Collier D, Kerwin R. Investigation of promoter variants of the histamine 1 and 2 receptors in schizophrenia and clozapine response. *Neurosci Lett*. 2002;333:207-211.

Mant R, Williams J, Asherson P, Parfitt E, McGuffin P, Owen MJ. Relationship between homozygosity at the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 1994;54:21-26.

Marder SR, van Kammen DP, Docherty JP, Rayner J, Bunney WE Jr. Predicting drug-free improvement in schizophrenic psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 1979;36:1080-1085.

Martinez MC. Famotidine in the management of schizophrenia. *Ann Pharmacother*. 1999;33:742-747.

Martinez-Mir MI, Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC, Palacios JM. Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates. *Brain Res*. 1990;526:322-327.

Max SI, Chowdhury BA, Fraser CM. Sequence analysis of the 5'-untranslated region of the human H1 histamine receptor-encoding gene. *Gene*. 1996;171:309-310.

Maziade M, Martinez M, Rodrigue C, Gauthier B, Tremblay G, Fournier C, Bissonnette L, Simard C, Roy MA, Rouillard E, Merette C. Childhood/early adolescence-onset and adult-onset schizophrenia. Heterogeneity at the dopamine D3 receptor gene. *Br J Psychiatry*. 1997;170:27-30.

McCormick DA, Williamson A. Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal. *J Neurosci*. 1991;11:3188-3199.

McGuffin P, Owen MJ, O'Donovan MV, Thapar A, Gottesman II (red.). *Seminars in Psychiatric Genetics*. Gaskell Press, London 1996.

McGuffin P, Owen MJ, Gottesman II (red.). *Psychiatric Genetics and Genomics*. Oxford University Press 2002.

Meehl PE. Schizotaxia, schizotypy, schizophrenia. *Am Psychol* 1962;1:827-838.

Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, Laranjeira R, Vallada H. Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet*. 2005;15:171-174.

Millan MJ, Seguin L, Gobert A, Cussac D, Brocco M. The role of dopamine D3 compared with D2 receptors in the control of locomotor activity: a combined behavioural and neurochemical analysis with novel, selective antagonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174:341-357.

Mogenson GJ, Yang CR, Yim CY. Influence of dopamine on limbic inputs to the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;537:86-100.

Morell RT. Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J Med Genet*. 1993;30:708-709.

Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM. RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:596-601.

Mueser KT, Bellack AS, Morrison RL, Wixted JT. Social competence in schizophrenia: premorbid adjustment, social skill, and domains of functioning. *J Psychiatr Res*. 1990;24:51-63.

Muglia P, Jain U, Kennedy JL. A transmission disequilibrium test of the Ser9/Gly dopamine D3 receptor gene polymorphism in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*. 2002;130:91-95.

Mulert C, Juckel G, Giegling I, Pogarell O, Leicht G, Karch S, Mavrogiorgou P, Moller HJ, Hegerl U, Rujescu D. A Ser9Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene (DRD3) and event-related P300 potentials. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:1335-1344.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263-273.

Munafò MR, Clark TG, Moore LR, Payne E, Walton R, Flint J. Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2003;8:471-484.

Nakai T, Kitamura N, Hashimoto T, Kajimoto Y, Nishino N, Mita T, Tanaka C. Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1991;30:349-356.

Nanko S, Sasaki T, Fukuda R, Hattori M, Dai XY, Kazamatsuri H, Kuwata S, Juji T, Gill M. A study of the association between schizophrenia and the dopamine D3 receptor gene. *Hum Genet*. 1993;92:336-338.

Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Orozco B, Kennedy JL, King N, Weissbecker K, de la Fuente JR, Sidenberg D. DRD2, DRD3 and 5HTR2A receptor genes polymorphisms in obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 1996;1:461-465.

Nimgaonkar VL, Zhang XR, Caldwell JG, Ganguli R, Chakravarti A. Association study of schizophrenia with dopamine D3 receptor gene polymorphisms: probable effects of family history of schizophrenia? *Am J Med Genet*. 1993;48:214-217.

Nimgaonkar VL, Sanders AR, Ganguli R, Zhang XR, Brar J, Hogge W, Fann WE, Patel PI, Chakravarti A. Association study of schizophrenia and the dopamine D3 receptor gene locus in two independent samples. *Am J Med Genet.* 1996;67:505-514.

Norton N, Williams HJ, Owen MJ. An update on the genetics of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry.* 2006;19:158-164.

Nöthen MM, Cichon S, Propping P, Fimmers R, Schwab SG, Wildenauer DB. Excess of homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia not confirmed. *J Med Genet.* 1993;30:708.

Orange PR, Heath PR, Wright SR, Pearson RC. Allelic variations of the human histamine H2 receptor gene. *Neuroreport.* 1996a;7:1293-1296.

Orange PR, Heath PR, Wright SR, Ramchand CN, Kolkeiwicz L, Pearson RC. Individuals with schizophrenia have an increased incidence of the H2R649G allele for the histamine H2 receptor gene. *Mol Psychiatry.* 1996b;1:466-469.

Ottosson A, Jansen I, Edvinsson L. Pharmacological characterization of histamine receptors in the human temporal artery. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;27:139-145.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2766-2770.

Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol Psychiatry.* 2004;9:14-27.

Parnowska D. Schizotaksja – konstrukt czysto teoretyczny czy tez pomocne narzedzie do badan klinicznych? *Psychiatr Pol.* 2004;38:783-794.

Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P. Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24:107-113.

Pettersson-Fernholm KJ, Forsblom CM, Perola M, Fagerudd JA, Groop PH; FinnDiane Study Group. Dopamine D3 receptor gene polymorphisms, blood pressure and nephropathy in type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1432-1436.

Phillips L. Case history data and prognosis in schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.* 1953;117:515-525.

Prell GD, Green JP, Kaufmann CA, Khandelwal JK, Morrishow AM, Kirch DG, Linnoila M, Wyatt RJ. Histamine metabolites in cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia: their relationships to levels of other aminergic transmitters and ratings of symptoms. *Schizophr Res.* 1995;14:93-104.

Puzynski S, Rybakowski J: *Neurobiologia zaburzen psychicznych.* W: *Psychiatria*, tom I. Bilikiewicz A, Puzynski S, Rybakowski J, Wciórka J (red.). Urban & Partner, Wroclaw 2002.

Rabe-Jablonska J i Kotlicka-Antczak M. Koncepcja neurorozwojowego pochodzenia niektórych postaci schizofrenii. *Medipress Psychiatria-Neurologia*. 1998;2:15-22.

Reavill C, Taylor SG, Wood MD, Ashmeade T, Austin NE, Avenell KY, Boyfield I, Branch CL, Cilia J, Coldwell MC, Hadley MS, Hunter AJ, Jeffrey P, Jewitt F, Johnson CN, Jones DN, Medhurst AD, Middlemiss DN, Nash DJ, Riley GJ, Routledge C, Stemp G, Thewlis KM, Trail B, Vong AK, Hagan JJ. Pharmacological actions of a novel, high-affinity, and selective human dopamine D(3) receptor antagonist, SB-277011-A. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294:1154-1165.

Rietschel M, Nothen MM, Albus M, Maier W, Mingos J, Bondy B, Korner J, Hemmer S, Fimmers R, Moller HJ, Wildenauer D, Propping P. Dopamine D3 receptor Gly9/Ser9 polymorphism and schizophrenia: no increased frequency of homozygosity in German familial cases. *Schizophr Res*. 1996;20:181-186.

Rosa A, Peralta V, Cuesta MJ, Zarzuela A, Serrano F, Martinez-Larrea A, Fananas L. New evidence of association between *COMT* gene and prefrontal neurocognitive function in healthy individuals from sibling pairs discordant for psychosis. *Am J Psychiatry*. 2004;161:1110-1112.

Rosenberg PB, Rosse RB, Johri SK, Kendrick K, Fay-McCarthy M, Collins JP Jr, Tsui LC, Wyatt RJ, Deutsch SI. Smooth pursuit eye movements in the evaluation of famotidine adjunctive therapy of schizophrenia: a preliminary report. *Clin Neuropharmacol*. 1996;19:276-281.

Rosse RB, Kendrick K, Fay-McCarthy M, Prell GD, Rosenberg P, Tsui LC, Wyatt RJ, Deutsch SI. An open-label study of the therapeutic efficacy of high-dose famotidine adjuvant pharmacotherapy in schizophrenia: preliminary evidence for treatment efficacy. *Clin Neuropharmacol*. 1996;19:341-348.

Rossi PG, Posar A, Parmeggiani A, Pipitone E, D'Agata M. Niaprazine in the treatment of autistic disorder. *J Child Neurol*. 1999;14:547-550.

Rudin E: *Zur Vererbung und Nuenentstehung der Dementia Praecox*. Springer-Verlag, Berlin, 1916.

Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Hauser J. Dopamine D3 receptor (DRD3) gene polymorphism is associated with the intensity of eye movement disturbances in schizophrenic patients and healthy subjects. *Mol Psychiatry*. 2001;6:718-724.

Rybakowski JK, Borkowska A. Eye movement and neuropsychological studies in first-degree relatives of schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2002;54:105-110.

Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Hauser J. Eye movement disturbances in schizophrenia and a polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene. *Psychiatry Res*. 2002;113:49-57.

Sabate O, Champion D, d'Amato T, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Leboyer M, Jay M, Guedj F, Thibaut F, et al. Failure to find evidence for linkage or association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1994;151:107-111.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.

Sasaki Y, Ihara K, Ahmed S, Yamawaki K, Kusuhara K, Nakayama H, Nishima S, Hara T. Lack of association between atopic asthma and polymorphisms of the histamine H1 receptor, histamine H2 receptor, and histamine N-methyltransferase genes. *Immunogenetics*. 2000;51:238-240.

Schubert ML. Regulation of gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 1999;15:457.

Schultz CL, Herron WG. Comparison of process-reactive measures in schizophrenia. *J Clin Psychol*. 1979;35:270-277.

Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev*. 1991;71:1-51.

Schwartz JC, Diaz J, Pilon C, Sokoloff P. Possible implications of the dopamine D(3) receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;31:277-287.

Seeman P: Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987;1:133-152.

Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15:264-270.

Seeman P. Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets*. 2006;10:515-531.

Seidman LJ, Faraone SV, Goldstein JM, Goodman JM, Kremen WS, Matsuda G, Hoge EA, Kennedy D, Makris N, Caviness VS, Tsuang MT. Reduced subcortical brain volumes in nonpsychotic siblings of schizophrenic patients: a pilot magnetic resonance imaging study. *Am J Med Genet*. 1997;74:507-514.

Serretti A, Mandelli L, Lorenzi C, Smeraldi E. Social adjustment could be associated with the serotonin transporter gene in remitted patients with mood disorders and healthy subjects. *Psychiatry Res*. 2005;134:191-194.

Shaikh S, Collier DA, Sham PC, Ball D, Aitchison K, Vallada H, Smith I, Gill M, Kerwin RW. Allelic association between a Ser-9-Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Hum Genet*. 1996;97:714-719.

Sivagnanasundaram S, Morris AG, Gaitonde EJ, McKenna PJ, Mollon JD, Hunt DM: A cluster of single nucleotide polymorphisms in the 5'-leader of the human dopamine D3 receptor gene (DRD3) and its relationship to schizophrenia. *Neurosci Lett* 2000;279:13-16.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC: Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990;347:146-151.

Spiker MD, Palmer GC, Manian AA. Action of neuroleptic agents on histamine-sensitive adenylate cyclase in rabbit cerebral cortex. *Brain Res.* 1976;104:401-406.

Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, Sieghart WC, Meszaros K, Fathi N, Laurent C, Mallet J, Macciardi F, Pedrini S, Gill M, Hawi Z, Gibson S, Jazin EE, Yang HT, Adolfsson R, Pato CN, Dourado AM, Owen MJ. European Multicentre Association Study of Schizophrenia: a study of the DRD2 Ser311Cys and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *Am J Med Genet.* 1998;81:24-28.

Staddon S, Arranz MJ, Mancama D, Perez-Nievas F, Arrizabalaga I, Anney R, Buckland P, Elkin A, Osborne S, Munro J, Mata I, Kerwin RW. Association between dopamine D3 receptor gene polymorphisms and schizophrenia in an isolate population. *Schizophr Res.* 2005;73:49-54.

Steel RM, Whalley HC, Miller P, Best JJ, Johnstone EC, Lawrie SM. Structural MRI of the brain in presumed carriers of genes for schizophrenia, their affected and unaffected siblings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;72:455-458.

Sturman G. Histaminergic drugs as modulators of CNS function. *Pflugers Arch.* 1996;431:R223-224.

Suzuki M, Hurd YL, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G: D3 dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain Res* 1998;779:58-74.

Talkowski ME, Mansour H, Chowdari KV, Wood J, Butler A, Varma PG, Prasad S, Semwal P, Bhatia T, Deshpande S, Devlin B, Thelma BK, Nimgaonkar VL. Novel, replicated associations between dopamine D3 receptor gene polymorphisms and schizophrenia in two independent samples. *Biol Psychiatry.* 2006;60:570-577.

Tanaka T, Igarashi S, Onodera O, Tanaka H, Takahashi M, Maeda M, Kameda K, Tsuji S, Ihda S. Association study between schizophrenia and dopamine D3 receptor gene polymorphism. *Am J Med Genet.* 1996;67:366-368.

Tashiro M, Mochizuki H, Iwabuchi K, Sakurada Y, Itoh M, Watanabe T, Yanai K. Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain. *Life Sci.* 2002;72:409-414.

Tienari PJ, Wynne LC. Adoption studies of schizophrenia. *Ann Med.* 1994;26:233-237.

Tienari P, Wynne LC, Moring J, Laksy K, Nieminen P, Sorri A, Lahti I, Wahlberg KE, Naarala M, Kurki-Suonio K, Saarento O, Koistinen P, Tarvainen T, Hakko H, Miettunen J. Finnish adoptive family study: sample selection and adoptee DSM-III-R diagnoses. *Acta Psychiatr Scand.* 2000;101:433-443

Toomey R, Seidman LJ, Lyons MJ, Faraone SV, Tsuang MT. Poor perception of nonverbal social-emotional cues in relatives of schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 1999;40:121-130.

Traiffort E, Pollard H, Moreau J, Ruat M, Schwartz JC, Martinez-Mir MI, Palacios JM. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [¹²⁵I]iodoaminopotentidine. *J Neurochem.* 1992;59:290-299.

Traiffort E, Vizuete ML, Tardivel-Lacombe J, Souil E, Schwartz JC, Ruat. The guinea pig histamine H2 receptor: gene cloning, tissue expression and chromosomal localization of its human counterpart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211:570-577.

Velligan DI, Miller AL, Eckert SL, Funderburg LG, True JE, Mahurin RK, Diamond P, Hazelton BC. The relationship between parental communication deviance and relapse in schizophrenic patients in the 1-year period after hospital discharge. A pilot study. *J Nerv Ment Dis.* 1996;184:490-496.

Villemagne VL, Dannals RF, Sanchez-Roa PM, Ravert HT, Vazquez S, Wilson AA, Natarajan TK, Wong DF, Yanai K, Wagner HN Jr. Imaging histamine H1 receptors in the living human brain with carbon-11-pyramilamine. *J Nucl Med.* 1991;32:308-311.

Virgos C, Martorell L, Valero J, Figuera L, Civeira F, Joven J, Labad A, Vilella E: Association study of schizophrenia with polymorphisms at six candidate genes. *Schizophr Res* 2001;49:65-71.

Wciórka J. Schizofrenia, zaburzenia schizotypowe i schizoafektywne. W: *Psychiatria*, tom II. Bilikiewicz A, Puzynski S, Rybakowski J, Wciórka J red. Urban & Partner, Wrocław 2002.

Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1987;44:660-669.

Wilffert B, Zaal R, Brouwers JR. Pharmacogenetics as a tool in the therapy of schizophrenia. *Pharm World Sci.* 2005;27:20-30.

Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L, Cardno A, Asherson P, Blackwood D, Muir W, Meszaros K, Aschauer H, Mallet J, Laurent C, Pekkarinen P, Seppala J, Stefanis CN, Papadimitriou GN, Macciardi F, Verga M, Pato C, Azevedo H, Crocq MA, Gurling H, Owen MJ, et al.: A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1998;3:141-149.

Wodarz N, Bobbe G, Eichhammer P, Weijers HG, Wiesbeck GA, Johann M. The candidate gene approach in alcoholism: are there gender-specific differences? *Arch Women Ment Health.* 2003;6:225-230.

Yang L, Li T, Wiese C, Lannfelt L, Sokoloff P, Xu CT, Zeng Z, Schwartz JC, Liu X, Moises HW. No association between schizophrenia and homozygosity at the D3 dopamine receptor gene. *Am J Med Genet.* 1993;48:83-86.

Zapata A, Shippenberg TS. D(3) receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem.* 2002;81:1035-1042.

IX. Załączniki

IX.1. Załącznik nr 1: Zgoda na udział w badaniu

Ja,....., zgadzam się na udział w badaniu dotyczącym genetycznego podłoża zachorowania na schizofrenie. Oświadczam, że otrzymałem/am pełną informację na temat założeń, celów i przebiegu badania. Wyrażam zgodę na jednokrotne pobranie 10ml krwi żyłnej i wykorzystanie jej w powyższym badaniu.

Niniejsze badanie służy WYŁACZNIE celom naukowym, uzyskane informacje nie będą użyte w żadnym innym celu. Wszystkie uzyskane wiadomości są objęte TAJEMNICĄ LEKARSKĄ.

(Podstawa: Ustawa o zawodzie lekarza z 05.12.97; Rozdział 4, Art.25)

.....
(czytelny podpis)

IX.2. Załącznik nr 2: Kryteria diagnostyczne schizofrenii wg DSM-IV:

A. Charakterystyczne objawy – obecność co najmniej dwóch z poniższych objawów, co najmniej przez miesiąc:

- 1) urojenia
- 2) omamy
- 3) zdezorganizowana mowa
- 4) zachowania silnie zdezorganizowane lub katatoniczne
- 5) objawy negatywne tj. spłycenie afektywne, alogia, awolucja

Jeżeli urojenia mają charakter dziwaczny, a halucynacje mają postać głosu komentującego lub głosów dyskutujących, to wymagany jest tylko jeden z powyższych objawów.

B) Dysfunkcja społeczna/zawodowa: przez istotną część czasu, w jednym lub kilku zakresach funkcjonowania.

C) Czas trwania: co najmniej 6 miesięcy, w tym co najmniej miesiąc objawów fazy aktywnej (patrz A), a ponadto okresy objawów zwiastunowych lub rezydualnych

D) Wykluczono:

- 1) zaburzenia schizoafektywne i afektywne (jednocześnie z aktywną fazą choroby nie wystąpił epizod depresyjny ani maniackalny albo ich całkowity czas trwania był krótszy od okresów aktywnego i rezydualnego)
- 2) uwarunkowania somatyczne (zaburzenia psychiczne nie są spowodowane działaniem substancji ani stanami ogólnomedycznymi)
- 3) całościowe zaburzenia rozwoju (w przypadku stwierdzenia całościowych zaburzeń rozwoju, np. autyzmu dziecięcego, w wywiadzie, schizofrenie można rozpoznać tylko wtedy, gdy ponadto występują urojenia lub omamy trwające co najmniej miesiąc)

(za: Wciórka J. Schizofrenia, zaburzenia schizotypowe i schizoafektywne. W: Psychiatria, tom II. Bilikiewicz A, Puzynski S, Rybakowski J, Wciórka J red. Urban & Partner, Wrocław 2002.)

IX.3. Załącznik nr 3: Podskala I skali Phillipa.

- I. Wywiad dotyczący okresu bezpośrednio poprzedzającego zachorowanie
- A. Przystosowanie seksualne w okresie poprzedzającym zachorowanie
1. Stabilny związek heteroseksualny i małżeństwo.....0
 2. Stały związek heteroseksualny i małżeństwo, przy niezdolności stworzenia rodziny.....1
 3. Stały związek heteroseksualny i małżeństwo, przerwane przez stałą separację..... 2
 4. a) Stały związek heteroseksualny i małżeństwo, ale z niewielkimi potrzebami seksualnymi..... 3
 - b) Stały związek heteroseksualny o dużym znaczeniu emocjonalnym, przy niezdolności stworzenia związku małżeńskiego; stały, głęboki emocjonalnie związek homoseksualny.....3
 5. a) Przypadkowe, ale powtarzające się związki heteroseksualne, „przygody”, ale nic ponadto..... 4
 - b) Kontakty homoseksualne przy braku doświadczeń heteroseksualnych lub przy stałych niepowodzeniach w kontaktach heteroseksualnych 4
 6. a) Okazjonalne doświadczenia heteroseksualne lub homoseksualne, ale bez głębokiej więzi emocjonalnej..... 5
 - b) Samotna masturbacja bez aktywnych prób w kierunku doświadczeń heteroseksualnych lub homoseksualnych..... 5
 7. Brak zainteresowania zarówno mężczyznami, jak kobietami, w kontekście seksualnym 6
- B. Aspekty społeczne życia seksualnego w okresie nastoletnim i krótko po nim
1. Zawsze wykazywał(a) zdrowe zainteresowanie płcią przeciwną, posiadał(a) stałego partnera w okresie nastoletnim 0
 2. Początek regularnych randek w okresie nastoletnim..... 1
 3. Bliskie relacje z chłopcami i dziewczętami..... 2
 4. Stale głębokie zaangażowanie w relacje z osobami tej samej płci przy ograniczonym, bądź braku zainteresowaniu płcią przeciwną..... 3
 5. a) Okazjonalne relacje z osobami tej samej płci przy niepowodzeniach w próbach kontaktu z osobami przeciwnej płci..... 4
 - b) Przypadkowe kontakty z chłopcami i dziewczętami..... 4
 6. a) Przypadkowe kontakty z osobami tej samej płci, przy braku zainteresowania płcią przeciwną..... 5
 - b) Okazjonalne kontakty z osobami przeciwnej płci..... 5
 7. Brak potrzeby przebywania z chłopcami i dziewczętami; nigdy nie umawiał(a) się z dziewczętami (chłopcami)..... 6

Należy wybrać C albo D kierując się kryterium wieku zachorowania (C<30 roku życia, D=30 roku życia):

- C. Aspekty społeczne życia seksualnego w okresie bezpośrednio poprzedzającym zachorowanie: dotyczy osób do 30 roku życia
1. Pozostaje w związku małżeńskim i posiada dzieci, funkcjonuje jako część rodziny..... 0
 2. Pozostaje w związku małżeńskim i posiada dzieci, ale nie jest w stanie stworzyć bądź utrzymać domu rodzinnego..... 1
 3. Pozostaje w związku małżeńskim i posiada dzieci, ale jest w stanie stać się separacją..... 2
 4. a) Pozostaje w związku małżeńskim, ale w małżeństwie panuje znacząca dysharmonia..... 3
b) Samotny(a), ale był(a) zaręczony(a) lub głęboko zaangażowany(a) w związek heteroseksualny, którego z przyczyn emocjonalnych nie był(a) w stanie przekształcić w małżeństwo..... 3
 5. Samotny(a); w przeszłości krótkie związki z osobami płci przeciwnej, które nie zdawały się mieć dużej głębi emocjonalnej dla żadnego z partnerów, tzw. „przygody”..... 4
 5. a) Samotny(a); kilkakrotnie umawiał(a) się z osobami przeciwnej płci, ale brakuje innych oznak stałego zainteresowania płcią przeciwną..... 5
b) Samotny(a); stałe głęboko zainteresowany(a) relacjami z osobami tej samej płci, przy braku oznak zainteresowania osobami płci przeciwnej..... 5
 7. a) Samotny(a), okazjonalne kontakty z osobami tej samej płci, przy braku oznak zainteresowania osobami płci przeciwnej..... 6
b) Samotny(a), niezainteresowany(a) osobami ani tej samej, ani przeciwnej płci..... 6
- D. Aspekty społeczne życia seksualnego w okresie bezpośrednio poprzedzającym zachorowanie: dotyczy osób = 30 roku życia
1. Pozostaje w związku małżeńskim, funkcjonuje jako część rodziny, posiada dzieci albo ich nie posiada..... 0
 2. a) Pozostaje w związku małżeńskim, posiada dzieci albo ich nie posiada; nie jest w stanie stworzyć bądź utrzymać domu rodzinnego..... 1
b) Samotny(a), ale zaręczony(a) lub głęboko zaangażowany(a) w związek heteroseksualny (z dużym prawdopodobieństwem prowadzący do małżeństwa)..... 1
 3. Samotny(a), ale był(a) zaręczony(a) lub głęboko zaangażowany(a) w związek heteroseksualny, którego z przyczyn emocjonalnych nie był(a) w stanie przekształcić w małżeństwo 2
 4. Samotny(a), stałe głęboko zainteresowany(a) osobami tej samej płci, przy ograniczonym zainteresowaniu osobami płci przeciwnej lub jego braku..... 3
 5. Samotny(a), okazjonalne kontaktami z osobami tej samej płci, przy ograniczonym zainteresowaniu płcią przeciwną lub jego braku..... 4
 6. Samotny, kilkakrotnie umawiał(a) z osobami płci przeciwnej, przy braku innych oznak stałego zainteresowania płcią przeciwną 5
 7. a) Samotny(a), nigdy nie był(a) zainteresowany(a) ani związany(a) z mężczyzną bądź kobietą..... 6
b) Aspołeczny(a)..... 6

E. Relacje osobiste: przeszlosc

1. Zawsze mial(a) kilkoro bliskich kolegow/kolezank, ale zwykle nie odgrywal(a) wiodacej roli w grupie..... 1
2. Od okresu nastoletniego mial(a) niewielu bliskich kolegow..... 2
3. Od okresu nastoletniego mial(a) niewielu przypadkowych kolegow..... 3
4. Od okresu nastoletniego przestal(a) miec znajomych..... 4
5. a) Brak bliskich kolegow od dzieciinstwa..... 5
b) Przypadkowe znajomosci, bez intymnych, odwzajemnionych przyjazni..... 5
6. Nigdy nie interesowal(a) sie chlopcow ani dziewczeta, nie mial(a) potrzeby przebywania z chlopcami i dziewczetami..... 6

F. Przystosowanie w relacjach osobistych w okresie bezposrednio poprzedzajacym zachorowanie

1. Zwykle przebywal(a) z innymi ludzmi, ale nie byl(a) liderem grupy..... 1
2. Przebywal(a) tylko z bliskim przyjacielem lub grupa bliskich kolezank i kolegow..... 3
3. Brak bliskich kolezank i kolegow; bardzo niewielu kolegow; nawiazywal(a) relacje kolezenskie, ale nigdy nie byl(a) w pelni akceptowany(a)..... 4
4. Cichy(a); wycofany(a); woli przebywac w samotnoscii..... 5
5. Aspoeczny(a)..... 6