

Медицински университет „Проф. Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет по медицина
Катедра по Психиатрия и медицинска психология

Риналдо Савов Шишков

**Някои патогенетични аспекти на
параноидната шизофрения**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**За присъждане на научната степен
„доктор на науките“**

Шифър: 03.01.20 – Психиатрия

Варна, 2012

Дисертационният труд съдържа общо 335 страници, онагледен е с 58 фигури и 79 таблици. Книгописът включва 671 заглавия, от които 9 на кирилица и 662 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на
2012 година от часа в аудитория „Владимир Иванов“ –
Медицински университет „Проф. П. Стоянов“ – Варна

Материалите по защитата са публикувани на интернет страни-
цата на Медицински университет – Варна

Съдържание

Използвани съкращения	6
1. Въведение	7
2. Цел	10
3. Задачи	11
4. Контингент и методи.....	13
4.1. Епидемиологично изследване.....	14
4.1.1. Изследване на общата соматична коморбидност при страдащи от шизофрения	14
4.1.2. Изследване на коморбидност между шизофрения и бронхиална астма (J45 по МКБ10)	14
4.1.3. Изследване на кръстосана коморбидност между страдащи от шизофрения, астма, ревматоиден артрит и карцином	15
4.1.4. Изследване на коморбидност при страдащи от депресивен синдром и маниен епизод спрямо астма	15
4.1.5. Изследване болестността от астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на пациенти, страдащи от шизофрения.....	15
4.2. Патологоанатомично изследване	15
4.3. Ядрено-магнитно резонансно изследване.....	15
4.4. Изследване на ген <i>Cyclon</i>	16
4.4.1. Изследване на ген <i>Cyclon</i> в периферна кръв	16
4.4.2. Изследване на ген <i>Cyclon</i> в мозъчна тъкан.....	16
4.5. Изследване бионаличността на BDNF в периферна кръв.....	18
4.6. Имунологично изследване.....	18
4.7. Изследване бионаличността на кортизол и кортизолов ритъм	19

4.8.	Изследване на съня	19
4.8.1.	Изследване фазите на съня (полисомнографско изследване)	19
4.8.2.	Изследване ритъма на съня	20
4.9.	Изследване „качеството на живот“	20
4.10.	Изследване на „стресогенни жизнени събития“	20
4.11.	Статистически анализ	21
5.	Резултати и обсъждане	21
5.1.	Епидемиологично изследване	22
5.1.1.	Шизофрения – епидемиологично изследване	22
5.1.2.	Депресивен синдром и маниен епизод – епидемиологично изследване.....	27
5.2.	Шизофрения и депресивен епизод – морфологично мозъчно изследване – патологоанатомично и изследване чрез ядрено-магнитен резонансен метод	27
5.3.	Експресия и динамика в активността на ген Cyclon/CCDC86 при шизофрения, депресивен синдром, астма и контроли	36
5.3.1.	В периферна кръв	36
5.3.2.	Изследване на мозък	43
5.3.2.1.	В мозък на примати	43
5.3.2.2.	Експресията на ген Cyclon в ЦНС и в човешки мозък при боледували от шизофрения.....	56
5.4.	Експресия и динамика в активността на ген BDNF при шизофрения, депресивен синдром и астма. Зависимост между експресията на ген Cyclon и BDNF	65
5.5.	Имунна активност при шизофрения. Връзка между имунологичните показатели и експресия на ген Cyclon.....	69
5.6.	Шизофрения – циркадност, кортизолов ритъм и фази на съня. Бионаличност на кортизол.	

Кортизолов ритъм и връзката му с експресията на ген <i>Cyclon</i>	72
5.7. Шизофрения – стресогенни житейски събития и качество на живот.....	77
5.8. Шизофрения и депресивен синдром – общи патогенетични звена	80
6. Заключение	82
7. Изводи	87
8. Справка за очаквани приноси	92
8.1. Фундаментални приноси	92
8.2. Практически.....	93
8.3. Потвърдителен характер.....	93
Публикации по темата	95

Исползвани съкращения

ДНК	– Дезоксирибонуклеинова киселина
БАР	– Биполярно афективно разстройство
ЯМР	– Магнитно-резонансна томография
РДР	– Рекурентно депресивно разстройство
РНК	– Рибонуклеинова киселина
ЦНС	– Централна нервна система
ГАМАК	– Гама-аминомаслена киселина
BDNF	– Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	– Bromodeoxyuridine
CCDC86	– Coiled-coil domain containing 86
Ген Cyclon	– Cytokine-induced protein with coiled-coil domain
DISC1	– Disrupted-In-Schizophrenia-1
DTNBP1	– Dysbindin-1, Dystrobrevin-binding protein-1
EGF	– Epidermal growth factor
ErbB	– Avian erythroblastosis class B
GD	– Gyrus dentatus
GFAP	– Glial fibrillary acidic protein
FGF2	– Fibroblast growth factor 2 (basic FGF)
ICAM	– Intercellular Adhesion Molecule
Iba1	– Ionized calcium binding adapter molecule 1
IL-3	– Interleukin-3
NeuN	– Neuronal Nuclei
NMDA	– N-methyl-D-aspartate
NRG1	– Neuregulin-1
SGZ	– Subgranular zone
SVZ	– Subventricular zone

1. Въведение



Шизофренията е изключително актуално социално значимо заболяване. Актуалността е многоаспектна. Тя е свързана с честотата на заболяването в човешката популация, неясната патогенеза, а от там и неясните границите на болестта. Свързана е също и с нарастващата в хода на болестта социална дезадаптация, както и с високия процент на инвалидизиране на заболялите, с множеството социални проблеми в тесния семеен и широкия социален кръг, както и с липса на достатъчно ефективен терапевтичен подход.

Шизофренията засяга около 1% от общата популация в световен мащаб и от нея страдат около 30 милиона души.

В социален план заболяването налага диспропорционален икономически товар от хоспитализация, хронично лечение, рехабилитация и загуба на продуктивност. Тази прогресираща инвалидизация и висока икономическа цена налагат шизофренията като социалнозначимо заболяване.

Въпреки дългата историята на хипотезите, свързани с патогенезата на шизофрението, за голям период от време не са представяни категорични доказателства за връзката между конкретни мозъчни структури и специфични психични прояви. Причината е в липсата на адекватни технологии. Повечето от разработките до 80^{те} години на ХХ в. са базирани на методи, непозволяващи оценка на фините промени в мозъка. Въпреки това, през споменатия период са представени някои резултати, *post mortem*, показващи различия в мозъчните структури при шизофренично болни спрямо здрави индивиди. Тези резултати, макар и не категорични, са били предпоставка за формулиране на нови хипотези относно взаимовръзката между мозъка и поведението. Като цяло обаче преобладаващото мнение в психиатричните среди до 80^{те} години на ХХ в. е, че шизофренията като заболяване е свързана с неврофизиологични мозъчни феномени без ясна органична генеза.

С навлизането на компютърната томография след 1976 г. се появява първото съобщение за „необичайно“ големи странични венстрикули при пациенти с шизофрениа.

Следващата стъпка свързана с изучаване на мозъка е през 1984 г., с появата на ядрено-магнитния резонансен метод на невроизобразяване. Чрез него още в първите изследвания при пациенти с шизофрениа се представят промени в сивото мозъчно вещество в региони като амигдала, хипокампуса, парахипокампусен и горен темпорален гирус. Изказва се становище, че посочените промени са свързани с „разстройства в мисленето и вероятно обуславят патологични промени в дейността на важни невронни вериги, участващи във вербална преработка и консолидация на информацията“.

Новите доказателства налагат и нов подход по отношение на шизофренията както като диагностика, така и като класификация. Шизофрението заболяване започва да се разглежда от редица автори като група от заболявания, които имат „припокриващи се признаци и симптоми“.

Налага се идеята, че биологичният фактор категорично присъства в нейното развитие. Налице са множество доказателства за структурни и функционални абнормности в мозъка на пациенти с шизофрения.

След навлизане в практиката на компютърната томография през 80^{те} години на ХХ в., трактовката на идеята за патогенезата на шизофренията търпи развитие. Освен конкретните анатомични особености, намерени при болни от шизофрения, вниманието на изследователите е насочено и към промени на молекулно ниво. Те включват механизми, обуславящи невротрансмисията, участието на имунната система, наследствени генетични моменти, дегенеративни промени и най-вече такива, касаещи нормалното развитие на нервната система. В този аспект днес, според редица автори, шизофренията се дефинира като „заболяване на невроналното развитие с частично разстройство на невроналната цитоархитектоника в хипокампусната и фронтална кора“ .

Въпреки напредъка на съвременните научни достижения, те не могат да дадат окончателна представа за патогенезата, а от там и за лечението на шизофренията. Това се свързва и с вероятната нозологична хетерогенност на шизофренията, както и с липсата на категорични критерии за разрешаване на този проблем.

Шизофренията като заболяване според някои автори е понятие, обединяващо няколко нозологични единици, според други – една болест с различни клинични форми, а според трети шизофренията се определя като „мозъчно заболяване, съпроводено от хронично протичащо психично разстройство, водещо до „опустошаване“ на личността“. Друг поглед относно рамките на шизофренията е като „група разстройства, които са съпроводени от промени в когници-

ята – спектър от симптоми, включващи алтерация на перцепцията, себеразбирането, както и разстройство на волята, психомоторна забавеност и социална дезадаптация“. В действителност, синдромологично, представените подходи не се различават.

Въпреки добре описаната симптоматика в класическите граници, дефинирането на шизофренията като едно заболяване или нозологична група се затруднява и от прилаганите различни диагностични подходи. Към момента основните класификационни схеми са две – МКБ10 и ДСМ IV (трета ревизия). Независимо от класификационната схема – те се различават основно в диагностичния подход – „обемът“ и характеристиката на шизофренията в граници, очертани от класиците в психиатрията, в основни линии се запазват.

В научен аспект и за целите на настоящата работа двете схващания, че шизофренията е единно заболяване или сбор от няколко болести със сходна клинична картина, не би повлияло върху направените изследвания и изводи, тъй като обектът на изследване са само пациенти с еднотипна фенотипна изява – „параноидна шизофрения“.

Предвид набелязаните научни проблеми, свързани най-вече с патогенезата на шизофренията, си поставихме следните цел и задачи:

2. Цел

Изследване на звена от патогенезата на параноидната шизофрения в контекста на съществуващите теории и евентуалната роля на гена *Cyclon/CCDC86* и *BDNF* в патогенетичния процес.

3. Задачи

Въз основа на литературните данни и целта на изследването си поставихме следните задачи:

1. Да се проведе епидемиологично проучване, целящо изследване на:
 - 1.1. Обща соматична коморбидност при параноидна шизофрения*;
 - 1.2. Коморбидност между боледуващи от параноидна шизофрения, бронхиална астма**, ревматоиден артрит*** и злокачествено новообразование****;
 - 1.3. Коморбидност на депресивен синдром***** и маниен епизод***** при боледуващи от бронхиална астма;
2. Да се изследва болестността от астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на боледуващи от шизофрения.
3. Да се проведе патологоанатомично проучване, целящо установяване на обща соматична коморбидност и морфологични мозъчни промени при боледуващи от шизофрения;
4. Да се проведе изследване на главен мозък чрез ЯМР при боледуващи от шизофрения и психично здрави лица;
5. Да се проведе изследване на експресията на ген Cyclon/CCDC86 в периферна кръв при боледуващи от шизофрения, депресивен синдром, астма и психично здрави лица;
6. Да се проведе изследване на експресията на ген Cyclon/CCDC86 в мозък на: примати; пациенти, боледуващи от шизофрения, и психично здрави лица;
7. Да се изследва бионаличността на BDNF в плазма и серум при боледуващи от шизофрения, депресивен синдром, астма и психично здрави лица;
8. Да се изследва имунната активност при боледуващи от шизофрения и психично здрави лица;
9. Да се изследва ритъмът и бионаличността на кортизол при боледуващи от шизофрения в период на релапс и ремисия.

10. Да се изследват фазите и ритъмът на съня при боледуващи от шизофрения в период на ремисия;
11. Да се изследват показателите „Качество на живот“ и „Жизнени събития със стресорно/дистресорно действие“ при боледуващи от шизофрения;
12. Да се проучи наличието на патогенетична „близост“ между шизофрения и депресивен синдром;
13. Да се анализират и обобщят резултатите от изследванията и литературните данни в единна хипотеза относно патогенетичните аспекти на шизофрениото заболяване;
14. Да се публикуват резултатите от проведените изследвания в наши и чуждестранни научни издания.

** диагнозата параноидна шизофрения (F20 по МКБ 10) в текста е посочена като „шизофрения“*

*** диагнозата бронхиална астма, неатопична форма (J45 по МКБ10) в текста е означена като „астма“.*

**** диагнозата ревматоиден артрит включва „Ревматоиден артрит – серопозитивен“ и „Други ревматоидни артрити (вкл. серонегативен)“ (M05 и M06) по МКБ10.*

***** диагнозата „Злокачествено новообразувание“ (от C00 до C97 МКБ10 – различни хистологични варианти) в текста е означена като карцином.*

****** диагнозата „Депресивен синдром“ е използвана в текста като обозначение на диагнозите: Рекурентно депресивно разстройство (F33), Биполарно афективно разстройство (F 31), Умерено тежък депресивен епизод (F32.1) и Тежък депресивен епизод с психотични симптоми (F32.3) по МКБ10.*

****** диагноза „Маниен епизод“ (F30) по МКБ10.*

4. Контингент и методи

Контингентът, обхванат в изследването, включва пациенти с психични заболявания и синдроми, класифицирани по МКБ-9 и МКБ-10. С оглед улесняване на работата, диагнозите и синдромите са приравнени към кодовете на МКБ10. В тази връзка контингентът от пациенти е следният:

- изследвани, боледуващи от **шизофрения** – към тази група се отнасят всички с диагноза „параноидна шизофрения“ (F20.0) по МКБ10;
- изследвани, боледуващи от **депресивен синдром** – към тази група се отнасят всички с диагноза: рекурентно депресивно разстройство (F33), биполярно афективно разстройство (F31), депресивен епизод – умерено тежък депресивен епизод (F32.1) и тежък депресивен епизод с психотични симптоми (F32.3) по МКБ10 Поради методологични причини обединяваме депресивните епизоди и тези в рамките на БАР и РДР в „депресивен синдром“;
- изследвани, боледуващи от **маниен епизод** – към тази група се отнасят болни с диагноза „Маниен епизод“ (F30) по МКБ10;
- изследвани пациенти, боледуващи от **бронхиална астма** – тук се отнасят болни с диагноза „неатопична бронхиална астма“ (J45) по МКБ10;
- пациенти, боледуващи от **ревматоиден артрит** – към тази група се отнасят болни с диагноза „Ревматоиден артрит“ (M05 и M06) по МКБ10;
- пациенти, боледуващи от **карцином** – тук се отнасят всички преминали болни с диагноза „Злокачествено новообразуване“ (от C00 до C97) по МКБ10.

Изследванията бяха извършени след разрешение на Комисията за етика на научните изследвания (КЕНИ) към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна и в съответствие с Декларацията от Хелзинки на Световната медицинска асоциация.

4.1. Епидемиологично изследване

4.1.1. Изследване на общата соматична коморбидност при боледуващи от шизофрения

Изследвани са 266 пациенти, боледуващи от шизофрения, при които е проучена съпътстващата соматична патология. Методът на изследване е документален.

4.1.2. Изследване на коморбидност между шизофрения и бронхиална астма (J45 по МКБ10)

При 1560 пациенти, боледуващи от шизофрения, е проведено проучване, насочено към изследване на коморбидност с бронхиална астма. Методът на изследване е документален.

4.1.3. Изследване на кръстосана коморбидност между боледуващи от шизофрения, астма, ревматоиден артрит и карцином

При 1891 болни, боледуващи от шизофрения, 1591 от бронхиална астма, 1458 болни с ревматоиден артрит и 12279 болни, боледуващи от карцином, е потърсена кръстосана коморбидност. Изследването е извършено чрез компютърна обработка и съпоставка на масиви от данни за периода 2002-2011 г.

4.1.4. Изследване на коморбидност при боледуващи от депресивен синдром и маниен епизод спрямо астма

При 2564 болни с депресивен епизод, умерен и тежък с психотични симптоми, 1796 с РДР; 714 пациенти с БАР и 54 с маниен епизод. Изследването е извършено чрез компютърна обработка и съпоставка на масиви от данни, за периода 2002-2011 г.

4.1.5. Изследване болестността от астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на пациенти, боледуващи от шизофрения

Интервюирани бяха 50 пациенти, боледуващи от шизофрения. При всички бе проведено структурирано интервю, регистриращо болестност от бронхиална астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на боледуващи от шизофрения.

4.2. Патологоанатомично изследване

Проведено при починали 22 пациенти, боледували от шизофрения.

Методът за изследване е документален и микроскопско изследване на мозъка. То е извършено чрез оцветяване с hemalaun/eosin, PAS и van-Gieson-elastica.

4.3. Ядрено-магнитно резонансно изследване

При 61 пациенти, структурирани групи „до 16 год.“ – 6 пациенти; „над 18 год.“ – 15 пациенти; депресивен синдром – 10 пациенти; контролна група от 30 лица, не боледували от психични заболявания, е проведено чрез апарат тип Signa HDxtl.5T. Изследването е извършено в следните проекции: Сагитална равнина – T1; Аксиална равнина – T2: Аксиална равнина – T2 Flair: Коронарна равнина – T2 Flair. Изследваните показатели са Cella media index („СМІ/СМИ“); Ширина на централния париетален сулкус (мм); Ширина на III вентрикул (мм); Фронтален кортекс – gyrus frontalis superior; Темпорален кортекс – gyrus temporalis superior.

4.4. Изследване на ген *Cyclon*

4.4.1. Изследване на ген *Cyclon* в периферна кръв

- При 36 пациенти, боледуващи от шизофрения, на фона на антипсихотична терапия са проведени двукратни изследвания – в релепс и ремисия.
- При 15 пациенти с депресивен синдром, на фона на еднотипно лечение са проведени двукратни изследвания – в релепс и ремисия.
- При 12 пациенти, боледуващи от бронхиална астма, изследването е проведено еднократно.
- При 10 клинично здрави индивида – „контролна група“, изследването е проведено еднократно.

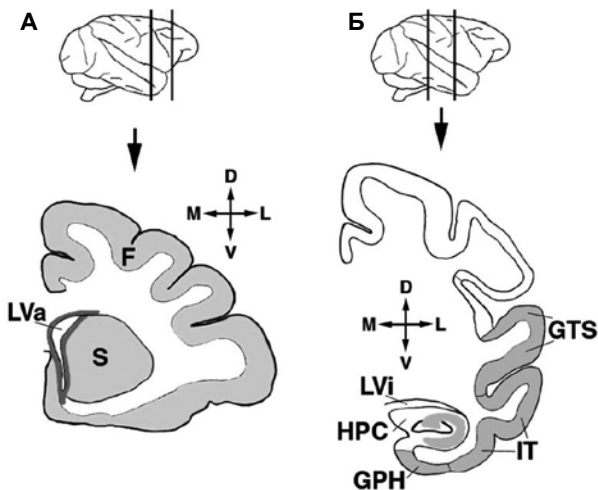
Методът на изследване включва: Изолиране на тотална рибонуклеинова киселина от кръвни левкоцити чрез кит QIAamp RNA Blood Mini Kit на фирмата QIAGEN според протокола на производителя; Обратна транскрипция на РНК до комплементарна дезоксирибонуклеинова киселина с Precision™ Reverse Transcription Kit на фирмата PrimerDesign според протокола на производителя; Полимеразна верижна реакция с Precision™ 2X qPCR Mastermix, съдържащ ДНК-свързващото багрило SYBR Green на фирмата PrimerDesign и ген-специфични праймери за таргетния ген *CCDC86* и референтния ген *ACTB* на същата фирма, според протокола на производителя.

Относителната генна експресия на информационната РНК на таргетния ген *CCDC86* е изчислена с $\Delta\Delta C_t$ метод спрямо референтния ген (*ACTB*) чрез софтуера към апарата (StepOne Software v2.0) и е представена като отношение спрямо референтна проба.

4.4.2. Изследване на ген *Cyclon* в мозъчна тъкан

Изследвана е тъкан от 5 възрастни маймуни и двама починали пациенти, страдали от шизофрения.

Методиката на изследване е имунохимично изследване чрез срези от следните региони на мозъка: (1) префронтална кора, включително преден сегмент на перивентрикуларна зона около предния рог на латералното мозъчно стомахче (anterior subventricular zone, SVZa); темпорална кора, включително хипокампуса, Gyrus dentatus и перивентрикуларна зона около долния рог на латералното мозъчно стомахче (inferior subventricular zone, SVZi); (3) вермис на малък мозък. (Фигура 4.1)



Фигура 4.1. Региони на интерес във фронтален и темпорален дялове на кората на краен мозък на маймуни.

(А) Изглед на дясна хемисфера, коронален срез. В долния панел се виждат: LVa, преден рог на латералния вентрикул; SVZa, SVZ около предния рог на латералния вентрикул; S, стриатум; F, фронтален неокортекс. (Б) Изглед на дясна хемисфера, показваща частта на темпоралния дял, включваща gyrus dentatus (между вертикалните черти). В долния панел се виждат темпоралните гънки (IT, inferior temporal cortex) и gyrus parahippocampalis (GPH). HPC, hippocampus, LVi, долен рог на латералния вентрикул; SVZi, SVZ около долния рог на латералния вентрикул. Посоки: D, дорзална; V, вентрална; M, медиална; L, латерална.

Приложените оцветявания са: BrdU – за ДНК при клетъчно деление; GFAP-глиален и прогениторен маркер; S100β-маркер за астроглия; NeuN – невронален маркер.

4.5. Изследване бионаличността на BDNF в периферна кръв

Проведено при 61 пациенти, като всички изследвания са дублирани – в плазма и в серум, в релапс и ремисия. При контролната група изследването е еднократно. Изследването по групи е както следва:

- Група боледуващи от шизофрения – 31 пациенти. Изследването е проведено на фона на еднотипно лечение;
- Контролна група – изследвани са еднократно 10 пациенти;
- Пациенти с бронхиална астма – изследвани еднократно – 10 пациенти;
- Група с депресивен синдром – изследвани 10 пациенти.

Методиката на изследване е ELISA с тестов набор Quantikine Human BDNF Immunoassay на фирмата R&D Systems според протокола на производителя. Изследването е проведено в плазма и серум, в релапс и ремисия.

4.6. Имунологично изследване

Проведено при 14 пациенти, боледуващи от шизофрения, с давност на болестта от 1 до 10 години и 10 психично здрави лица – контролна група.

Методиката на изследване е проследяване на имунологични показатели двукратно – в период на релапс и след 20 дни при настъпване на медикаментозна ремисия. При контролната група – еднократно. Изследването е проведено на фона на еднотипно лечение.

Изследвана е лимфоцитна популация. Определени са абсолютният брой и относителният дял на Т-лимфоцити, В-лимфоцити и НК-лимфоцити, както и на Т-лимфоцитните субпопулации CD4+ (хелпърно – индусерни) и CD8+ (супресорно – цитотоксични). За

оцветяване са ползвани тройни комбинации от моноклонални антитела TriTEST и епруветки за определяне на абсолютния брой на клетките TruCOUNT на фирмата Becton Dickinson.

Пробите са анализирани на флуоцитометър FACSsort на фирмата Becton Dickinson.

4.7. Изследване бионаличността на кортизол и кортизолов ритъм

Проведено при 26 пациенти, боледуващи от шизофрения. Изследвано е кортизоловото ниво и проследен ритъмът на кортизола в 8 ч. и 22 ч. по време на релапс и ремисия (20 дни период).

Методиката на изследване е хемилуминесценция с автоматичен имуноанализатор ADVIA centaur. Системата измерва серумна концентрация на кортизол до 75 µg/dL с минимум на откриваната концентрация – 0.20 µg/dL.

4.8. Изследване на съня

4.8.1. Изследване фазите на съня (полисомнографско изследване)

Проведено при 5 пациенти, боледуващи от шизофрения.

Методиката на изследване е: целонощно PSG изследване с мониторираща система MEAPAL (MAP, Medizin-Technologie, Martinsried, Germany). Минималното време за изследване е 6 часа, съответно на познатите диагностични стандарти. Сънят се документира при използването на стандартно осъществена 16-18 канална полисомнография, включваща електроенцефалограма (EEG: C3–A2, C4–A1, O1–A2, O2–A1), електроокулограми (EOG), електромиограма – Chin EMG, ЕМГ на крайници ляв/десен, ЕКГ, сърдечна честота, назален и орален въздушен поток, торакални и абдоминални движения, регистрация на хъркане, позиция на тялото, SaO₂, мониторирана чрез пулсова оксиметрия, асоциирано с полисомнографския запис видеонаблюдение. Стадиите на съня са анализирани въз

основа на използване на валидирани, всеобщо възприети критерии по Rechtschaffen и Kales.

Резултатите от анализа на съня при изследваната група сравнихме с тези на група на пациенти ($n = 122$) с дихателни нарушения по време на сън и данните от популационни проучвания, анализиращи съня при здрави: проучване на Morrell и сътр. (389) за пациентите от Wisconsin Sleep Cohort ($n = 1\,021$) и тези на Quan и сътр. За Sleep Health Heart Study (458).

Изследването е проведено във фаза на медикаментозна ремисия.

4.8.2. Изследване ритъма на съня

Проведено при 25 пациенти, боледуващи от шизофрения, с давност на болестта от 3 – 8 г.

Методиката на изследване е чрез „Стандартизирано интервю“, търсещо промяна в ритъма на съня преди началото на болестта, в стадий на обостряне и ремисия. Изследвани бяха показателите: „сън в обичайно време“, „изместен по време, но ношен сън“, „изместен по време сън, късно вечер до късно сутрин“ и „дневна сънливост“. Интервюто е структурирано на база Stanford sleep disorders questionnaire

4.9. Изследване „качеството на живот“:

Проведено при 25 пациенти, боледуващи от шизофрения.

Методиката на изследване – чрез модифициран вариант на скалата на Homes и Rahe (262) приложена еднократно.

4.10. Изследване на „стресогенни житейски събития“

Проведено при 50 пациенти, боледуващи от шизофрения.

Методиката на изследване е чрез „отворено интервю“. В него пациентите са поканени да посочат до 10 житейски събития, които считат за стресогенни и да ги рейтинат.

4.11. Статистически анализ

Приложените статистически методи са: „статистическата значимост“ на изследваните резултати (ефекти), представена чрез стойността на оцененото ниво на значимост p ; „Сравнителен анализ“ – тестът на Стюдънт за сравняване средни величини на две извадки; „алтернативен анализ“ за представяне на структури, структурни изменения, сравнения на относителни дялове и други; „анализ на хипотези“ – методът на Хи квадрат – параметричен метод за анализ на статистически хипотези; „корелационен анализ“, проведен чрез „линеен коефициент на корелация“ използван за отчитане на „посока“ и „сила“ на линейната статистическа зависимост между променливите, за които е изчислен, и чрез „метода на Спирман“ за рангова корелация, използван за проверка на наличието на еднопосочност (съгласие) в оценките, давани от анкетираните; „дисперсионен анализ“ ANOVA – за проверка на хипотези между повече от две средни величини; „регресионен анализ“ – за изучаване на възможните функционални зависимости между две или повече случайни величини.

5. Резултати и обсъждане

Наличието на множество схващания за патогенезата на шизофренията показва липсата на единно, достатъчно аргументирано и експериментално потвърдено становище. Направените до момента проучвания обясняват отделни страни от това комплексно заболяване. Трудностите в изясняване на патогенетичните звена са свързани с многопластовостта на клиничната картина, която е още една пречка в категоричното очертаване на клиничните граници при болестта. В този смисъл се говори, че шизофренията като диагноза вероятно обхваща група от заболявания със сходни клинични прояви, сходни или еднакви патогенетични механизми, един и същи материален субстрат, предимно мозъчната кора и

хипокампуса, но вероятно различни по степен мозъчни увреждания, функционални разстройства, различие в генетичната предрасположеност, а от там – и различия в клиничната картина.

5.1. Епидемиологично изследване

5.1.1. Шизофрения – епидемиологично изследване

Един от пътищата за разгадаване на патогенетични звена от генезата на шизофренията е изследване на коморбидността – с други по-добре изучени заболявания. Предвид също и факта, че боледуващите от шизофрения имат по-малка продължителност на живот от общата популация, проведохме изследване, целящо регистриране на най-честите соматични заболявания и тези свързани с причината за смърт.

Намереното показва като най-честа причина за смърт съдово-мозъчна болест. Това е обичайно и за общата популация.

По отношение регистрираната соматична болестност с най-висока честота е захарният диабет – по-висока от средната за страната, следван от язвената болест, а при астма регистрираната честота е по-ниска от обичайната.

Болестността от захарен диабет при боледуващи от шизофрения е широко обсъждан в литературата факт, търсец обяснение за причините и наличието на „положителната коморбидност“ при тези две заболявания.

Другото заболяване, което представлява интерес, но поради „отрицателната коморбидност“ с шизофрения, е бронхиалната астма. За този факт в литературата има изключително оскъдни данни.

Предвид това проведохме мащабно проучване при 1 591 пациенти с бронхиална астма и 1891 с шизофрения на коморбидните взаимоотношения между астма и шизофрения. (Таблица 5.1)

Таблица 5.1. Коморбидност между астма, неатопична форма, ревматоиден артрит и карцином.

	Астма (брой болни)	Шизофрения (брой болни)	Ревматоиден артрит (брой болни)	Карцином (брой болни)
	1591	1891	1458	12 279
Астма	-	4(0.21%)	11(0,75%)	42(0.34%)
Шизофрения	4 (0.25 %)	-	6(0.41%)	38(0.30%)
Рев.артрит	11(0.69%)	6(0.3%)	-	28(0.22%)
Карцином	42(2,6%)	38(2.0%)	28(1,9%)	-

За такъв тип изследване бе намерена само една публикация на Chen и сътр. (2009) години по-късно от първото ни проучване. Резултатите на Chen и сътр. (2009) по отношение коморбидността на шизофрения и бронхиална астма не са в съответствие с намереното от нас.

Предвид различията в резултатите на вероятно единствените или едни от малкото изследвания, публикувани в литературата, потърсихме обяснение. Една от посоките на разсъждения бе свързана с това, че Chen и сътр. (2009) изследват атопичната бронхиална астма, докато нашето проучване е с таргет неатопична (инфекционно алергична) астма.

Друго обяснение би могло да бъде свързано с методологията на проучването. Считаме, че постановката на нашето изследване не позволява голяма степен на грешка. То е проведено за дълъг период от време (десетки години) и бе триетапно. В първия етап е проучена соматичната болестност от астма при пациенти на Психиатрична клиника – Варна. Във втория етап бе проведено проучване документално в три области на страната и на трети етап бяха съпоставени данните за деветгодишен период в информационния масив на многопрофилна болница. Резултатите показаха изключително ниска болестност – четириима пациенти, коморбидни на

неатопична бронхиална астма и шизофрения от проучени 1591 боледуващи от астма и 1891 боледуващи от шизофрения. При така проведеното изследване считаме, че постановката предполага резултати с голяма степен на достоверност. Аргументите за такова твърдение са свързани и с факта, че и двете заболявания – астма и шизофрения, са с висока степен на експресия и разпознаваемост, за разлика от такива като язвена болест, хроничен колит и пр. Те въпреки наличието им могат за много години да останат недиагностицирани и нелекувани. В този смисъл както шизофренията, така и бронхиалната астма е малко вероятно да останат скрити и съответно да не се потърси помощ, с оглед на техните прояви.

Предвид направената констатация относно коморбидното взаимоотношение на астма и шизофрения, потърсихме този феномен при други заболявания, описани в литературата като такива с „отрицателна коморбидност“. В тази връзка бе направено и изследване, обхващащо голяма група пациенти, боледуващи от ревматоиден артрит и карцином. (Таблица 5.1)

Констатирано бе, че с шизофренията те показват по-ниска коморбидност, различна от средната за тези заболявания.

В друг аспект на идеята за коморбидността между шизофрения и посочените по-горе соматични заболявания бе изследвана „кръстосаната“ им коморбидност. Резултатите потвърдиха по-ниската и от обичайната коморбидност – както между тях и шизофрения, така и между тях самите.

Изследването е проведено и с идеята, че всички от споменатите заболявания имат автоимунен елемент от патогенезата си (астмата – инфекциозно алергичен) и че всички те имат отрицателна коморбидност с астма.

Резултатът от отрицателна коморбидност между изследваните заболявания дава основание да се мисли, че при наличие на един изразен автоимунен процес по-рядко би се развил втори, паралелен във времето. Това дава известно основание шизофренията да се включи в групата заболявания с имунна /автоимунна генеза и е още едно потвърждение на „автоимунната теория за шизофренията“.

Вниманието на редица изследователи, занимаващи се с патогенезата на шизофренията, е насочено към автоимунните механизми. Интересът за това е свързана с редицата данни за автоимунна увреда на мозъчната тъкан при шизофрения. Такава връзка се търси и поради факта, че в хода на шизофренното заболяване се разкриват невронни увреждания, които по своя характер биха могли да имат и автоимунна генеза. От друга страна, автоимунният механизъм може да доведе до стимулиране на рецептори, например D2, което би довело до типичната за шизофрения хипердопаминергия.

Друг интересен аспект от автоимунната „посока“ на изследване на патогенезата на шизофренията е търсене наследственост за автоимунни заболявания. В тази връзка проведеното в настоящата работа интервю относно болестност към изследваните соматични заболявания сред група шизофренни пациенти показва, че морбидността от бронхиална астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на боледуващи от шизофрения е по-висока от средната за страната. (Таблица 5.2)

Таблица 5.2. Болестност при родственици на боледуващи от шизофрения, от ревматоиден артрит, астма, карцином

При групата	Брой роднини страдащи от ...	Първа линия	Втора линия	Трета линия	Нямат родственици страдащи от ...
Мъже (n = 20)					
Психично заболяване	7 (35%)	4 (57.1%)	3 (42.8%)	0 (0%)	13 (65%)
Астма	2 (10%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	18 (90%)
Ревматоиден артрит	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
Карцином	1 (5%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	19 (95.0%)
Жени (n = 30)					
Психично заболяване	9 (30.0%)	7 (77.7%)	1 (11.1%)	1 (11.1%)	21 (70.0%)
Астма	5 (16.6%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	25 (83.0%)
Ревматоиден артрит	4 (13.3%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	26 (86.6%)
Карцином	4 (20%)	2 (50.0%)	1 (25%)	1 (25%)	26 (86.6%)

Въпреки възможността за не особена прецизност на изследването, тъй като е проведено чрез анкета, резултатите се потвърждават от други изследвания, като това на Eaton и сътр. (2006). Заедно с нашите и тези в литературата показват, че автоимунните заболявания имат по-висока честота между родственици на пациентите спрямо общата популация.

Тази констатация за по-високата честота на автоимунна патология в родственици и съответно по-високия „генетичен товар“ с автоимунна нагласа на боледуващите от шизофрения, множество изследвания, показващи наличие на невронална увреда по типа на възпалителната при шизофренното заболяване (596), насочват към идеята за автоимунна увреда на мозъчни клетки и структури, която много вероятно е свързана с патогенезата на шизофренното заболяване.

Епидемиологичните резултати намират потвърждение и обяснение и в редица генетични изследвания.

Вескер и сътр. (2004) изказват предположение, че комплексът от увреждания (автоимунни) са резултат от общия ефект на специфични за болестта локуси (61). Тези локуси сами по себе си не са „болестни“, но при специфични условия на средата могат да отключват патологични прояви и в този смисъл са предпоставка за т.нар. „мултифакторна болестна хипотеза“. Обсъжда се мястото на HLA антигени или дори физическа скаченост на локуси за автоимунни заболявания и шизофренни локуси в HLA региони.

Разгледан по този начин, многоаспектно, проблемът за коморбидността на шизофренията с класическите имунни/автоимунни заболявания, изучени чрез модерните имунологични методи, заедно с новите схващания за функционалната диференциация на имунния отговор и неговото влияние върху невроналната миграция, диференциация и синаптична пластичност, представят интегративен поглед за ролята на имунните отклонения в патогенезата на шизофренията.

5.1.2. Депресивен синдром и маниен епизод – епидемиологично изследване

Общият брой изследвани болни, боледуващи от астма, с диагностициран депресивен синдром и маниен епизод са представени в Таблица 5.3.

Таблица 5.3. Коморбидност на астма, депресивен синдром и маниен епизод

Брой болни	Астма ****	Депресивен синдром		Маниен епизод***
		БАР**	РДР*	
	1591	714	1796	54
Астма	-	1 (1.14 %)	28 (1.5 %)	2 (3.7 %)

Резултатите показват по-ниска болестност от астма в групата с депресивен синдром спрямо средната за страната.

Комплексният подход относно коморбидността на шизофренията се допълва и от резултатите за коморбидността на депресивния синдром и маниен епизод. Те, както и шизофренията, показват по-ниска коморбидност на астмата със съответното заболяване. Това е аргумент в полза на единната или сходна патогенеза. Той е и основание известното в патогенетичните механизми при едното да бъдат търсени и при разглеждане на другото заболяване.

5.2. Шизофрения и депресивен епизод – морфологично мозъчно изследване – патологоанатомично и изследване чрез ядрено-магнитен резонансен метод

Друг аспект на изследване на патогенетичните процеси при шизофрения в настоящата работа е този, изучаващ морфологичните мозъчни феномени, които потенциално са свързани с болестта.

При патологоанатомично изследване на мозъци на починали пациенти, боледували от шизофрения, регистрираната патология е свързана с два аспекта:

Първо, промени в съдовите стени, изразяващи се в хиалиноза, склероза, промяна в структурата на стените. При някои от случаите

има развитие на интрамурални кръвоизливи или микроаневризми.

Второ, промени в мозъчното вещество спонгиоза, микромалатични огнища и развитие на псевдокисти, дегенеративни промени в невроните и микроглиална пролиферация.

От така представените резултати интерес представляват наблюдаваните дегенеративни промени в невроните и микроглиалната пролиферация – находка, конкордантна с проучванията, свързани с „дегенеративната теория“, търсеща обяснение на патогенетични звена при шизофренията. Това се потвърждава и от намерената „невронална увреда“ и наличната глиоза при мозък на шизофрено болни спрямо психично здрави – контроли (фигура 5.20.Б) Намереното е потвърждение на хипотезата, приемаща възпалението като причина за развитие на шизофренията.

От друга страна би могло да се приеме, че глиозата не е първична по отношение на болестния шизофреничен процес, а е насложена върху съществуваща увреда, т.е. е вторична.

Тъй като патологоанатомичният метод, както бе посочено, не е достатъчно показателен за верифициране на редица структурни промени в мозъка, проведехме изследване чрез ядрено-магнитна резонансна техника.

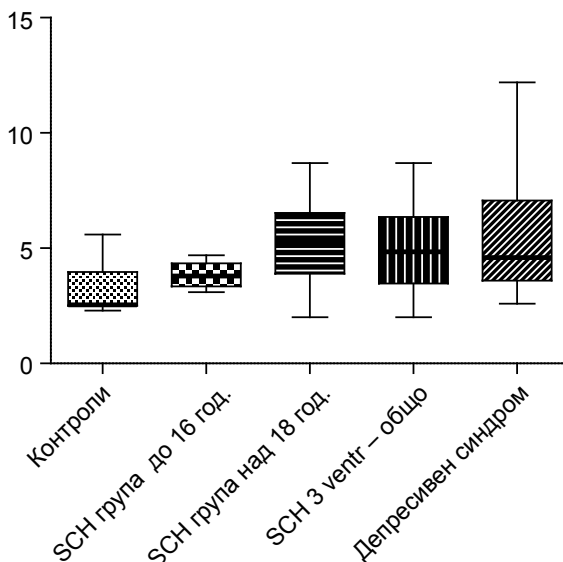
Резултатите от изследването показаха следното:

При групата „шизофрения до 16 год.“ липса на белези за патологични отклонения в проследените показатели Cella media index, Ширина на централния париетален сулкус, Ширина на III вентрикул, Фронтален кортекс – gygus frontalis superior, Темпорален кортекс – gygus temporalis superior, Gyrgus cinguli с изключение показателя „ширина на III вентрикул“ .

При групата „шизофрения над 18 год.“ бяха отбелязани атрофични промени и в показателите СМІ, ширина на сулкус централис. Промените са еднотипни с тези за групата „депресивен синдром“.

Резултатите от изследване на показателя „ширина на III вентрикул“ са представени на фигура 5.1.

Шизофрения – ширина на III-ти вентр.



Фигура 5.1. При изследване чрез дисперсионен анализ на показателя „Ширина на III вентрикул“ статистически достоверно различие се намира между група „контроли“ и останалите групи: „до 16 год.“, „над 18 год.“, „шизофрения“ и „депресивен с-м“.

За останалите показатели такова различие не се установява.

Подобни са и резултатите от сравняване показателя „ширина на III вентрикул“ между група „контроли“ и останалите групи: „до 16 год.“, „над 18 год.“, „шизофрения“ и „депресивен синдром“.

По отношение влиянието на показателя „диагноза“ при групите „шизофрения“, „депресивен синдром“ и „контроли“, „диагноза“ се намира в статистически достоверна зависимост, като е най-изразена за показателите СМИ, фронтален кортекс, гирус цингули и ширина на III вентрикул. Този резултат се потвърждава и от потърсената „обратна“ зависимост – „промени диагноза“.

За да се установи дали възрастта е причина за регистрираните мозъчни промени, бе проверено въздействието на критерия „възраст“ при групите „шизофрения“. Резултатите не показват статистически значимо влияние (само тенденция) на този показател върху атрофичните мозъчни промени при изследваните параметри. Представеният резултат, въпреки че е в съгласие с редица изследвания, би следвало да се разглежда само като тенденция, тъй като групата „до 16 г.“ е съставена от 5 лица. Този резултат в известна степен предполага, че намерените в проучването и цитирани в литературата промени са болестно, а не възрастово обусловени. Същите са и резултатите от регресионния анализ и за група „депресия“. Тази връзка бе потърсена с оглед вижданията за еднотипната патогенеза на двете заболявания.

Свързвайки намерените промени в изследваните показатели като вероятен резултат от болестта, бе направен и корелационен анализ. При боледуващите от шизофрения, корелационна връзка бе намерена между показателите „фронтален кортекс“ и „темпорален кортекс“, „ширина на III вентрикул“ и СМИ, а при групата „до 16 год.“ – и между показателите „темпорален кортекс“ и „гирус цингули“.

Така представените резултати за изследваните региони показват тенденция за еднородни мозъчни промени, свързани с редукция на сиво мозъчно вещество при шизофренни пациенти и при боледуващи от депресия, но по-слабо изразени. Параметърът, който се позитивира в най-висока степен при шизофренните пациенти, е „ширина на III вентрикул“ и за двете групи шизофренни пациенти (до 16 и над 18 год.). Тези резултати в известна степен подкрепят виждането, че болестните промени по отношение на сивото мозъчно вещество започват от ранна възраст и прогресират в хода на болестта. От друга страна би могло да се каже, че ширината на III вентрикул е по-голяма още с раждането, т.е. това би било предиктор на болестта (*фигура 5.1*).

От представеното при морфологичното изследване на мозъчни структури, свързани с шизофрения, би могло да се каже, че в хода

на болестта се регистрира промяна – редукция на сиво мозъчно вещество както при шизофрения, така и при депресивен синдром. Тази редукция е по-изразена при шизофренно болните. Намираме и уголемен трети вентрикул също при двете групи, като уголемяването също е по-изразено при шизофренните спрямо депресивните пациенти, съпоставено с контролна група.

За връзката между изследваните показатели потърсихме корелационната им зависимост. Този резултат показва взаимосвързаността на отделните показатели на представените по-горе резултати от различните измервания и съпоставки.

Резултатите са представени на таблица 5.4.

Таблица 5.4. Корелационни зависимости при пациентите от всички изследвани групи

Коефициент на корелация – r	Корелации	СМІ	Фронтален кортекс	Темпорален кортекс	Гирус цингули	Ширина на централен сулкус	Ширина на III венгтрикул
СМІ	Pearson Correlation	1.000	-.054	-.070	.000	-.196	-.559**
	Sig. (2-tailed)		.722	.648	.996	.197	.000
	N	45	45	45	45	45	45
Фронтален кортекс	Pearson Correlation	-.054	1.000	.664**	.081	.104	-.082
	Sig. (2-tailed)	.722		.000	.597	.496	.590
	N	45	45.000	45	45	45	45
Темпорален кортекс	Pearson Correlation	-.070	.664**	1.000	.130	.007	-.113
	Sig. (2-tailed)	.648	.000		.393	.963	.459
	N	45	45	45	45	45	45
Гирус цингули	Pearson Correlation	.000	.081	.130	1.000	-.210	-.525**
	Sig. (2-tailed)	.996	.597	.393		.166	.000
	N	45	45	45	45	45	45
Ширина на централен сулкус	Pearson Correlation	-.196	.104	.007	-.210	1.000	.325*
	Sig. (2-tailed)	.197	.496	.963	.166		.030
	N	45	45	45	45	45.000	45
Ширина на III венгтрикул	Pearson Correlation	-.559**	-.082	-.113	-.525**	.325*	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.590	.459	.000	.030	
	N	45	45	45	45	45	45

* Корелацията е сигнификантна на ниво 0.05 (2-tailed).

** Корелацията е сигнификантна на ниво 0.01 (2-tailed).

Резултатите показват наличие на корелационна зависимост между следните показатели:

- значителна по сила корелация между СМІ и Ширина на III вентрикул ($r = -0.55$; $p < 0,01$);
- значителна по сила корелация между Фронтален кортекс и Темпорален кортекс ($r = 0.66$; $p < 0,01$);
- значителна по сила корелация между Темпорален кортекс и Фронтален кортекс ($r = 0.66$; $p < 0,01$);
- значителна по сила корелация между Гирус цингули и Ширина на III вентрикул ($r = -0.52$ $p < 0,01$);
- умерена по сила корелация между Ширина на централен sulcus и Ширина на III вентрикул ($r = 0.32$; $p < 0,03$);
- значителна по сила корелация между Ширина на III вентрикул и СМІ ($r = -0.55$; $p < 0,01$).

Другият приложен в работата статистически метод, доказващ влиянието на показателите *възраст* и *диагноза* върху измерваните параметри, е регресионният анализ. Резултатите са представени на таблици 5.5-5.9.

Проследяване на влиянието на независимата променлива ДИАГНОЗА върху стойностите на показателите: СМІ, ширина на фронтален кортекс, ширина на темпорален кортекс, ширина на гирус цингули, ширина на централен sulcus, ширина на III вентрикул.

Таблица 5.5. Влияние на независимата променлива *диагноза* – регресионен анализ чрез метод ANOVA^b

Модел	Сума на квадратите	Степени на свобода	Mean Square	F-тест	Статистическа значимост
Регресия	33.139	6	5.523	6.704	.000 ^a
Резидуал.	31.306	38	.824		
Общ	64.444	44			

a. Предиктори: (постоянни), ширина на III вентрикул, фронтален кортекс, ширина на централен sulcus, ширина на гирус цингули, СМІ, темпорален кортекс

Извод: Наблюдава се закономерно влияние на диагнозата на пациентите върху параметрите на показателите СМІ, ширина на фронтален кортекс, ширина на темпорален кортекс, ширина на гирус цингули, ширина на централен сулкус, ширина на III венстрикул. Избраният модел на връзката е адекватен по отношение на данните.

Таблица 5.6. Влияние на показателите, изследвани чрез ЯМР върху диагнозата на пациентите

Модел	Нестандартизирани		Стандартизирани	t	Статистическа значимост
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	7.489	3.365		2.225	.032
СМІ	-1.079	.374	-.438	-2.887	.006
Фронтален кортекс	-1.135	.526	-.330	-2.157	.037
Темпорален кортекс	.450	.603	.114	.746	.460
Гирус цингули	.373	.186	.293	2.002	.052
Ширина на централен сулкус	-.141	.192	-.089	-.733	.468
Ширина на III венстрикул	-.283	.103	-.496	-2.741	.009

Резултатите показват, че СМІ, Фронтален кортекс, Ширина на гирус цингули, Ширина на III венстрикул оказват влияние върху променливата *диагноза*. Най-силно влияние върху променливата *диагноза* оказва Girus singuli (0,293).

Независимата променлива ***възраст*** е изследвана при групите пациенти с депресивен синдром, шизофрения „до 16 г.“ и „над 18 г.“, и контролна група. Резултатите са представени в Таблица 5.7.

Таблица 5.7. Влияние на независимата променлива **възраст** – регресионен анализ чрез метод ANOVA^b

Модел	Сума на квадратите	Степени на свобода	Mean Square	F-тест	Статистическа значимост
Регресия	4686.307	6	781.051	5.430	.000 ^a
Резидуал.	5466.004	38	143.842		
Общ	10152.311	44			

a. Предиктори: (постоянни), ширина на III вентрикул, Фронтален кортекс, Ширина на централен сулкус, Girus cinguli, СМІ, Темпорален кортекс

Наблюдава се статистически достоверно влияние на възрастта върху стойностите на изследваните с ЯМР показатели. **Най-силно влияние възрастта оказва върху ширина на гирус цингули и ширина на централен сулкус.**

При изследването влиянието на независимата променлива **възраст** при пациентите, боледуващи от шизофрения при групи „до 16 г.“ и „над 18 г.“ бяха установени следните резултати (Таблица 5.8.).

Таблица 5.8. Влияние на независимата променлива **възраст** – регресионен анализ чрез метод ANOVA^b

Модел	Сума на квадратите	Степени на свобода	Mean Square	F-тест	Статистическа значимост
Регресия	658.141	6	109.690	2.046	.172 ^a
Резидуал.	428.793	8	53.599		
Общ	1086.933	14			

a. Предиктори: (конст.), Ширина на III вентрикул, Ширина на централен сулкус, Ширина на гирус цингули, Темпорален кортекс, СМІ, Фронтален кортекс

Резултатите **не показват статистически значимо влияние на възрастта** върху изследваните параметри при пациентите, боледуващи от шизофрения „до 16 г.“ и „над 18 г.“.

Изследвано бе влиянието на независимата променлива **възраст** върху пациентите с депресивен синдром:

Таблица 5.9. Влияние на независимата променлива **възраст** – регресионен анализ чрез метод ANOVA^b

Модел	Сума на квадратите	Степени на свобода	Mean Square	F-тест	Статистическа значимост
Регресия	3586.525	6	597.754	4.461	.011^a
Резидуал.	1742.025	13	134.002		
Общ	5328.550	19			

а. Предиктори: (Constant), Ширина на III вентрикул, Темпорален кортекс, Ширина на централен сулкус, Ширина на гирус цингули, Фронтален кортекс, СМІ

Получените резултати **показват зависимост между възрастта и изследваните параметри**. Най-силно е влиянието на **възрастта** върху ширината на централен сулкус и ширина на III вентрикул.

В обобщение: Промените в изследваните чрез ЯМР показатели (СМІ, фронтален кортекс, темпорален кортекс, ширина на гирус цингули, ширина на централен сулкус, ширина на III вентрикул) се влияят от независимата променлива **диагноза** – депресивен синдром и шизофрения и има тенденция за повлияването им от фактора **възраст**.

5.3. Експресия и динамика в активността на ген Cysl0n/CCDC86 при шизофрения, депресивен синдром, астма и контроли

5.3.1. В периферна кръв

Интересните и необяснени до момента факти, свързани с шизофренията, са много. Един от тях е разпространението на болестта – болестност около 1% в цял свят. Устойчивостта на тази болест-

ност в най-голяма степен се дължи вероятно на генетични фактори. Във връзка с това възниква въпросът: влиянието на един или много гени.

Ако болестта е свързана с единствен ген, то високото разпространение на шизофренията в общата популация трябва да означава, че мутационното ниво по отношение на този ген е необичайно високо (което е малко вероятно). Другата възможност е хетерозиготът да притежава някакво селективно предимство, тъй като заболяването би имало тенденцията да се елиминира от естествения подбор. Предвид тези възможности, в съвременната литература се е оформило схващането, че предразположеността към шизофрения се дължи на комбинирания ефект на голям брой генетични варианти. Счита се, че всеки от тях има „малък самостоятелен принос“ в етиологията на болестта. Това схващане е в основата на т.нар. „мултилокусен модел“ за патогенезата на шизофренията. Тя приема, че екзогенни фактори вероятно имат „пусков“ ефект за проявите на болестта. Подобна е и картината с бронхиалната астма. И при нея унаследяемостта, посочена от Manson и сътр. (2002) е висока – 80%. При шизофренията е 85% .

От друга страна, интерес представлява проучването на Bin Xu и сътр. Според тях, въпреки високата наследственост при шизофрения, голяма група от индивиди, боледуващи от болестта, нямат положителна фамилна история за нея. Авторите изказват предположението и изучават вероятността за *de novo* настъпващи алтерации (мутации) като генетични компоненти на шизофренното заболяване.

Друг от разгледаните механизми, свързани с патогенезата на шизофренията, е този свързан с IL-3, но не по пътя на възпалението, а чрез невропротективната му роля. За него Zambrano и сътр. (2007) привеждат преки доказателства чрез функционалната експресия на IL-3 рецептори в невроните.

Доказано е, че IL-3 е важен медиатор във физиологичните и патофизиологичните процеси в ЦНС. Той има ефекти, както върху глията, така и върху невроните. Стимулира пролиферацията и ак-

тивацията на микроглията, от една страна, и от друга – регулира диференциацията на холинергични и сензорни неврони. Ефектите на IL-3 се свързват и с клетъчната преживяемост, повишава трофиката на CA1 хипокампусните неврони и има протективен ефект към тези неврони при исхемична нокса. Редуцира невроналното увреждане, причинено от свободни радикали, свърхактивирани през и след мозъчна исхемия. IL-3 има протективен ефект върху NGF-диференцирани неврони относно апоптотичната клетъчна смърт, причинена от липсата на NGF. Всички тези свойства на IL-3 се свързват със сигналния път JAK/STAT, за който бе показано, че е свързан и с регулацията на експресията на гена *Cyclon*. Такива са и заключенията на Saint Fleur и сътр. (2009), които показват, че един от вероятните механизми на въздействие на IL-3 е посредством гена *Cyclon*,

Друга линия на активност на IL-3 е свързана с данни *in vitro*, показващи, че IL-3 е и растежен фактор, важен за преживяването на таргетните клетки, вкл. чрез модулиране на апоптозата. IL-3 е и мощен антиапоптотичен агент, който по време на развитието на нервната система профилактира развитието на свърхмерни апоптоични процеси.

Така описаните ефекти на IL-3, свързани с невропротекция и антиапоптозна активност, на пръв поглед отричат мястото му в патогенезата на шизофренията. От друга страна имат категорични данни за нарушения в активността на IL-3 системата и видими последици, свързани с шизофренната патогенеза. Вероятно по тази причина редица проучвания намират несъмнена връзката на IL-3 с шизофренията. Това в най-висока степен е доказано от констатираната при шизофрения абнормност в IL-3 рецептори. Резултатите на Sun и сътр. (2009) сигнификантно доказват, че полиморфизмът на IL3RA и CSFRA е свързан с шизофрения и изказват предположение, че сигналният път на IL-3 твърде вероятно е свързан с отключването и развитието на шизофренията (549). Това е потвърдено и от други проучвания, свързани с изучаване на абнормна продукция на IL-3 при шизофрения.

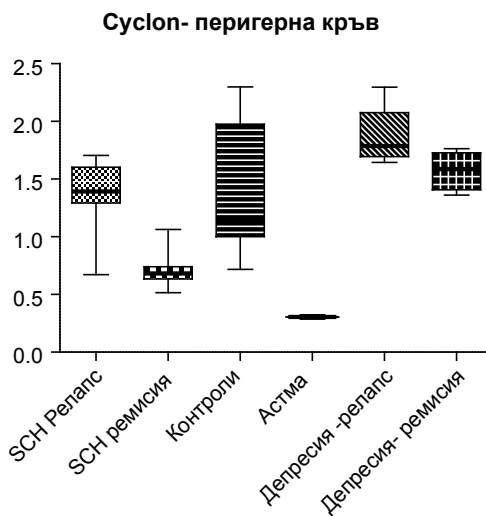
Нови проучвания идентифицират няколко свързани с шизофренията нуклеотидни полиморфизми, които се свързват с гена за *IL-3* на хромозома 5q.

Описаните множество функции на гена *IL-3* в процесите на невроналното развитие, повлияване на апоптозата, хематопоезата и имунната реактивност вероятно имат съществено отношение към участието на *IL-3* в етиологията на шизофренията.

Разглеждайки шизофренията и астмата като болести, свързани с генетична предиспозиция и общ, участващ в патогенезата механизъм *IL-3* (по литературни данни), проучихме неговата експресия в контекста на астма и шизофренията. Изследване на *IL-3* бе проведено индиректно, чрез експресията на индуцирания от него ген *Cyclon*. От друга страна, чрез изучаване на новооткрития през 2008 г. ген *Cyclon* се създаде възможност да се проучат и други патогенетични аспекти, свързани с шизофрениния депресивен синдром (БАР и РДР).

Резултатите от изследването са представени на фигура 5.2.

Фигура 5.2. Експресията на гена *Cyclon* в релапс или ремисия при шизофренията, депресия и астма. Най-ниски са нивата при астма.



Представеното показва, че експресията на *Ген Cyclon* в периферна кръв е статистически достоверно по-висока в период на релапс на шизофренията спрямо ремисия. Статистически достоверна е и разликата в експресията му между релапс спрямо контроли. Липсва такава за изследванията на *Ген Cyclon* в ремисия спрямо контроли.

Интерес представлява резултатът за *Cyclon в релапс*. При него се обособяват две подгрупи – на висока и ниска експресия. Различието между тях е статистически значимо. (Фигура 5.2.) В продължение на това изследване пациентите с **висок ген Cyclon** в клиничната си картина показват наличие на **предимно позитивна** симптоматика (по DSM IV), а тези с **нисък ген Cyclon** – **предимно негативна** симптоматика. Интересът към тази находка е свързан с описаните в литературата различия – функционални, морфологични и клинични при тези две подгрупи пациенти.

В *ремисия*, независимо от клиничното проявление, експресията на *Ген Cyclon* е с малък диапазон в стойности и за двете групи, с негативна или позитивна симптоматика, т.е. експресията е еднотипна.

Интересът към тази находка е свързан с констатацията, че при шизофрения активността на апоптозата е повишена в релапс и понижена в хроничния стадий на болестта (275). Това евентуално би могло да бъде свързано с експресията на ген *Cyclon* и съответно свързано с IL-3.

При изследване на експресията на *ген Cyclon* спрямо пола – не намираме статистически достоверни разлики при изследваната група шизофренно болни. Това е потвърдено относно нивото и ефектите на IL-3 при шизофренно болни, констатирано от Xiu и сътр. (2008). Те показват, че полът не е сигнификантно свързан с нивото на IL-3.

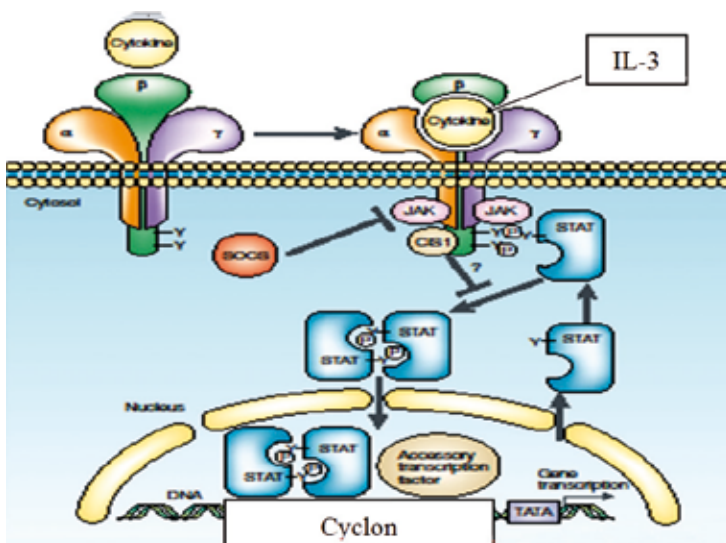
Резултатът от експресията на ген *Cyclon* при боледуващите от астма. Намираме подчертано ниско ниво (статистически достоверно) спрямо това на останалите сравнявани групи. Тази констатация корелира с предположението за участие на Fas рецептора, повлия-

яван от експресията на ген *Cyclon* в Т-клетъчната смърт, на активирани проинфламаторни кръвни клетки (по-слаба активност на Fas рецептора при ниска експресия на ген *Cyclon* и съответно по-висока Т-клетъчна активност с клиничните последици на астмата и автоимунните заболявания).

Другата линия на изследване в експресията на ген *Cyclon* е свързана с неговата активност при „ендогенен“ депресивен синдром. В това изследване е заложена идеята за еднотипен патогенетичен механизъм между шизофрения, БАР и РДР и множеството съобщения за генетична агрегация на „ендогенния депресивен синдром“ с шизофренията. Резултатите показват наличие на статистически достоверно различие при запазено статистическо взаимоотношение спрямо групите астма и контроли, и шизофрения и контроли. Интересният факт е, че при групата депресии експресията на *Cyclon* е по-висока от тази на шизофрения и контроли. Категорична интерпретация на този факт не се представя поради сравнително малкия брой изследвани депресивни пациенти и положителните статистически данни. Единственото, което би могло да се твърди, е, че „поведението“ на ген *Cyclon* в релапс и ремисия при „ендогенния депресивен синдром“ е подобно на това на шизофрения.

Интерпретирайки резултатите от изследването на експресията на гена *Cyclon* по отношение неговите ефекти върху мозъчната тъкан, свързани с развитие на шизофрения и депресивен синдром, би следвало да се има предвид, че индуциращият го ИЛ-3 има и множество функционални роли в ЦНС. Тези си ефекти той осъществява вероятно освен по пътя на *ген Cyclon*, но и чрез други сигнални пътища.

При така направените констатации и според други, независими проучвания, които представят конвергиращи доказателства, включващи ИЛ-3-свързани сигнални пътища в патофизиологията на шизофренията, би следвало да се обсъди „пътят“, по който протеиновият продукт на гена *Cyclon* се включва в патогенетичните процеси на шизофренията. Необходимо е уточняване на неговата локализация в клетките и вероятния механизъм на действие. Тези аспекти са резюмирани на фигура 6.3 (модифицирана по *Leonard*).



Фигура 5.3 Представени са рецепторните субединици (α , β and γ) на рецептора на IL-3. След захващане се активира JAK-STAT сигналният път с последваща вътреядрена активация, водеща до транскрипция на таргетни гени, като ген *Cyclon*. По Leonard (340) – модифицирана

Представеният път е класически за опосредстване на действието на цитокините в клетката. Счита се, че пътят JAK2/STAT5 е основен за IL-3. В първото изследване относно ролята на IL-3 за регулацията на гена *Cyclon* авторите не откриват STAT5 елементи в промотора на гена *Cyclon* и изказват предположение, че той се активира, независимо от STAT5.

Очертаната по този начин връзка между IL-3 и гена *Cyclon*, натрупаните факти за ролята на IL-3 върху мозъчните процеси, от една страна свързани с невротрофен ефект, от друга вероятно свързан и с възпалителни процеси, намерената корелация между експресията на ген *Cyclon* в кръвната плазма и фазата, и клиничната характеристика на шизофренията го правят много вероятен участник в патогенезата на шизофренията.

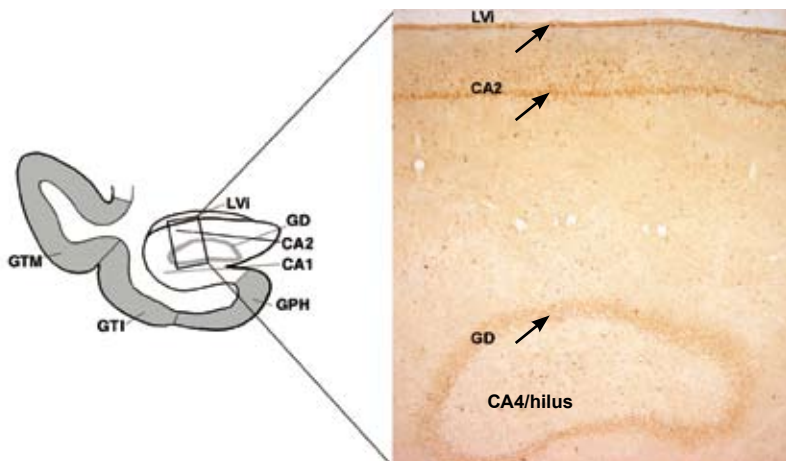
5.3.2. Изследване на мозък

5.3.2.1. В мозък на примати

Получените от изследването на ген *Cyclon* в периферна кръв резултати ни дадоха основание да заключим, че ген *Cyclon/CCDC86* се експресира по различен начин в имунни клетки при пациенти с шизофрения в релапс и ремисия и спрямо контролни индивиди. В тази връзка бе извършено директно изследване на експресията на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* в ЦНС.

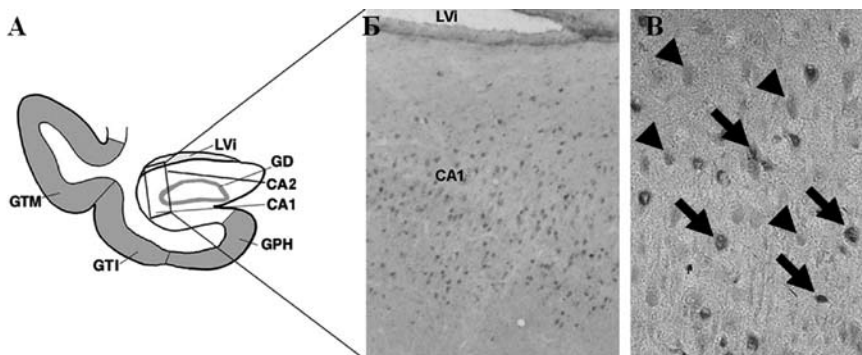
Регион на интерес бе хипокампусът – регион с известни от литературата промени при шизофрения (Tamminga et al., 2010; Small et al., 2011).

Приложеното имунопероксидазно оцветяване за ген *Cyclon/CCDC86* в хипокампуса на маймуни очерта наличие на позитивни клетки в *Cornu Ammonis* (*hippocampus proprius*) и *Gyrus dentatus* (Фигура 5.4).



Фигура 5.4. Имунохистохимично оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* в хипокампуса на възрастна маймуна. Рамката на схемата на темпорален дял (вляво) показва локализацията на микрографията (вдясно). *LVi*, долен рог на латералния вентрикул; *CA1/2/4*, *Cornu Ammonis* сектору 1/2/4; *GD*, *Gyrus dentatus*; *GPH*, *Gyrus parahippocampalis*; *GTI*, *Gyrus temporalis inferior*; *GTM*, *Gyrus temporalis medius*.

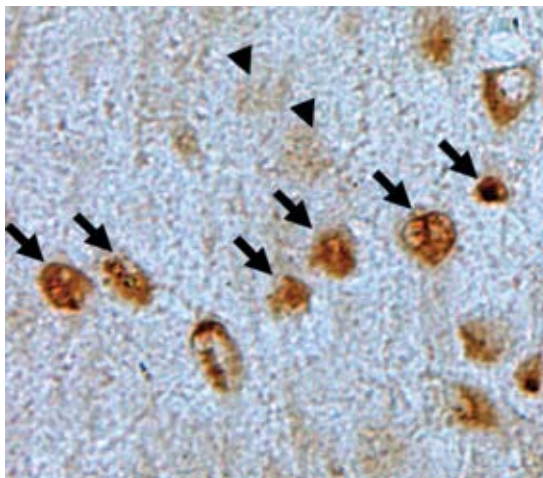
Наблюдавано е позитивно оцветяване както в сектора CA2 (Фигура 5.5), така и в сектора CA1 (Фигура 5.5) на hippocampus proprius.



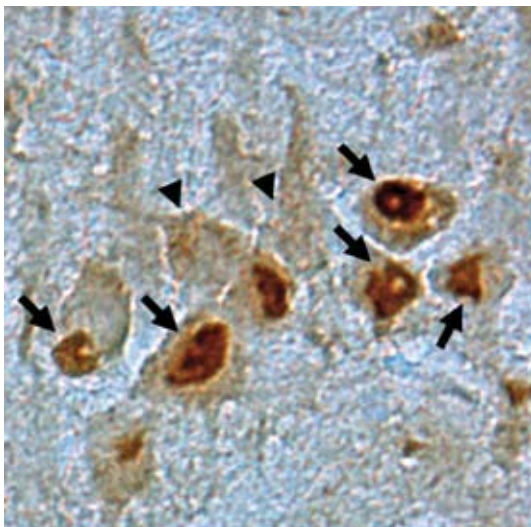
Фигура 5.5. Имунохистохимично оцветяване на протеина на ген *Cyclon* в хипокампуса на възрастна маймуна. Рамката на схемата на темпорален дял (A) показва локализацията на микрографията на панел Б. Микрографията на панел В представлява увеличен образ от снимката на панел Б. Позитивните клетки са показани със стрелки, а негативните – с глави на стрелки, на панел В. LVi, долен рог на латералния вентрикул; CA1/2, Cornu Ammonis сектору 1/2; GD, Gyrus dentatus; GPH, Gyrus parahippocampalis; GTI, Gyrus temporalis inferior; GTM, Gyrus temporalis medius.

Наблюдения на по-големи увеличения показват, че сигналът, позитивен за ген *Cyclon*, се локализира в ядрата на клетките (Фигура 5.6), което е в съгласие с литературните данни, че ген *Cyclon* е ядрен фосфопротеин (Hoshino and Fujii, 2007).

Фиг. 5.6. Имунохистохимично оцветяване на протеина на ген *Cyclon* в СА1 сектор на хипокампуса на възрастна маймуна. Позитивните клетки са показани със стрелки, а негативните – с глави на стрелки.



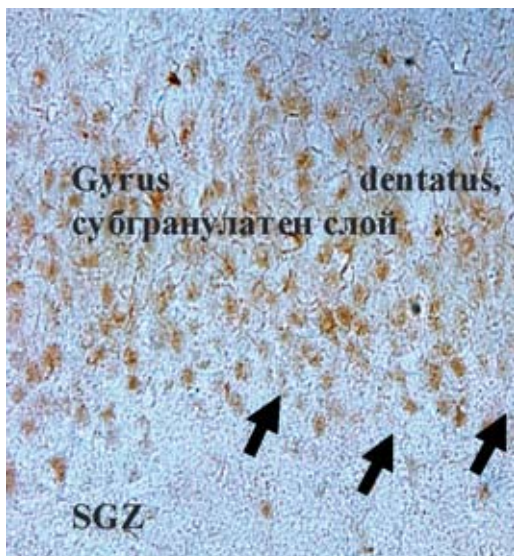
Прави впечатление, че позитивен сигнал е наличен в част от клетките на сектора СА1 (ок. 60-70%; **Фигури 5.5** и **5.6** (стрелки), докато 30-40% остават негативни за ген *Cyclon/CCDC86* (**Фигури 5.5** и **5.6**, глави на стрелки). Подобна картина е наблюдавана и в хипокампусния сектор СА2 (**Фигура 5.7**).



Фиг. 5.7. Имунохистохимично оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* в СА2 сектор на хипокампуса на възрастна маймуна. Позитивните клетки са показани със стрелки, а негативните – с глави на стрелки.

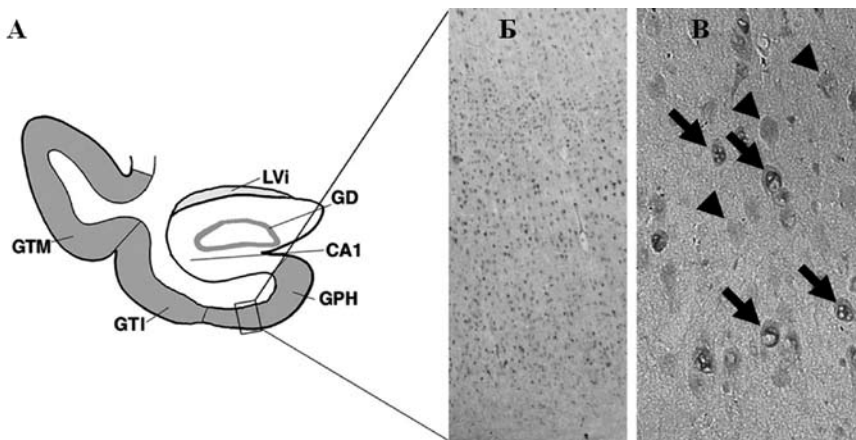
Според видимия си голям размер и форма, болшинството клетки в Cornu Ammonis на хипокампуса, експресиращи ген *Cyclon/CCDC86*, имат изглед на неврони (**Фигури 5.6 и 5.7**, стрелки). Наблюдават се обаче и клетки с по-малки по размер позитивни ядра, което показва, че ген *Cyclon/CCDC86* може да се локализира и в ненеуронни клетки.

В *Gyrus dentatus*, зона на постнатална неврогенеза в хипокампусната формация, също е наблюдавана имунопозитивност за ген *Cyclon/CCDC86* (**Фигура 5.8**). В този регион, обаче, почти всички клетки в гранулния слой показват положителна реакция за таргетния ген, докато в субгрануларната зона, която съдържа стволови/прогениторни клетки в постнаталния живот, се регистрират само отделни позитивни клетки (**Фигура 5.8** стрелки).



Фигура 5.8. Имунохистохимично оцветяване на протеина на *Cyclon/CCDC86* в *Gyrus dentatus* на хипокампусна формация на възрастна маймуна, субгрануларна зона.

В парахипокампусната кора, основна свързваща зона на хипокампусната формация с неокортекса, също е наблюдавана имунопозитивна реакция за ген *Cyclon/CCDC86* (**Фигура 5.9**, стрелки).



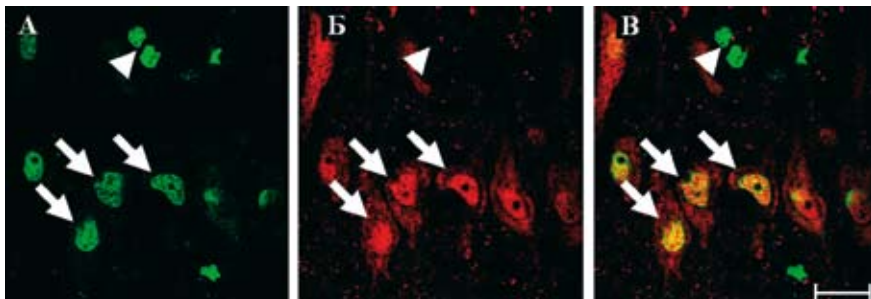
Фигура 5.9. Иммунохистохимично оцветяване на протеина на *Cyclon/CCDC86* в парахипокампусен кортекс на възрастна маймуна. Рамката на схемата на темпорален дял (А) показва локализацията на микрографията на панел Б. Микрографията на панел В' представлява увеличен образ от снимката на панел Б. Позитивните клетки са показани със стрелки, а негативните – с глави на стрелки, на панел В. *LVi*, долен рог на латералния вентрикул; *CA1*, Cornu Ammonis сектор 1; *GD*, *Gyrus dentatus*; *GPH*, *Gyrus parahippocampalis*; *GTL*, *Gyrus temporalis inferior*; *GTM*, *Gyrus temporalis medius*.

И в *Gyrus parahippocampalis*, както и в хипокампуса, само част от клетките са позитивни за ген *Cyclon/CCDC86* и повечето от тях имат размери и форма на неврони (**Фигура 5.9В'**, стрелки).

За да се потвърди фенотипът на клетките, експресиращи *Cyclon/CCDC86*, са осъществени двойно имунофлуоресцентни оцветявания за таргетния протеин и маркери за различни клетъчни типове в ЦНС.

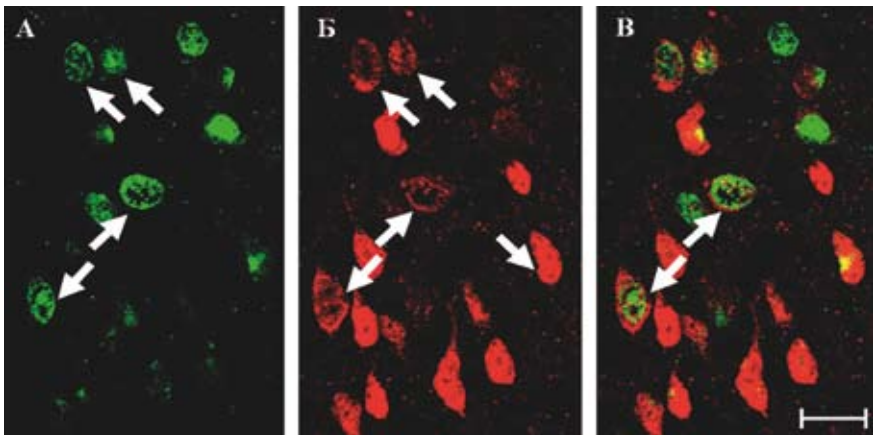
Като маркер за зрели неврони беше използван антигенът *NeuN*, който в ЦНС избирателно оцветява невроните, но не и глиалните клетки (Mullen et al., 1992). В приматен мозък *NeuN* дава силно оцветяване в ядрото на невроните и по-слабо – в цитоплазмата (Gould et al., 1999). Двойни имунохистохимични оцветявания за ген

Cyclon/CCDC86 и NeuN в хипокампта потвърждават впечатлението от единичните оцветявания: огромното мнозинство от клетките, експресиращи ген Cyclon/CCDC86, демонстрираха ко-експресия за NeuN, което ги характеризира като зрели неврони (**Фигури 5.10-5.12**, стрелки).



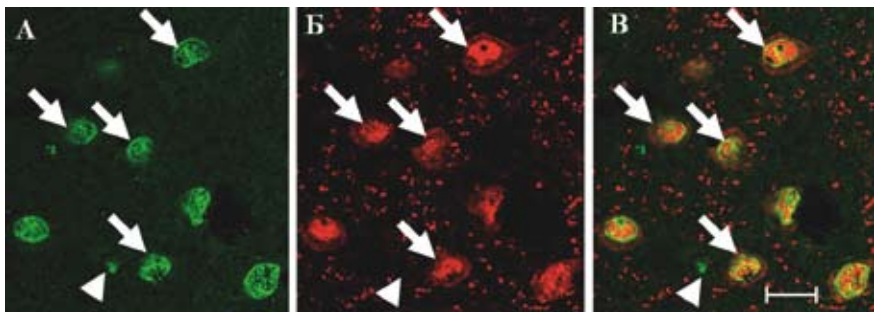
Фигура 5.10. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген Cyclon (А, зелен канал) и невронния маркер NeuN**** (Б, червен канал) сектор СА2 на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивните клетки са демонстрирани със стрелки. Две клетки, позитивни за ген Cyclon/CCDC86, но имунонегативни за NeuN, са посочени с глава на стрелка. Мащаб, 20 μm .

Сходни резултати са получени в секторите на hippocampus proprius CA2 (**Фигура 5.11** стрелки), CA1 (**Фигура 5.10**, стрелки) и CA4 (**Фигура 5.12**, стрелки).



Фигура 5.11. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyslop* (А, зелен канал) и невронния маркер *NeuN*^{****} (Б, червен канал) в сектор СА2 на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивните клетки са демонстрирани със стрелки. Мащаб 20 μm .

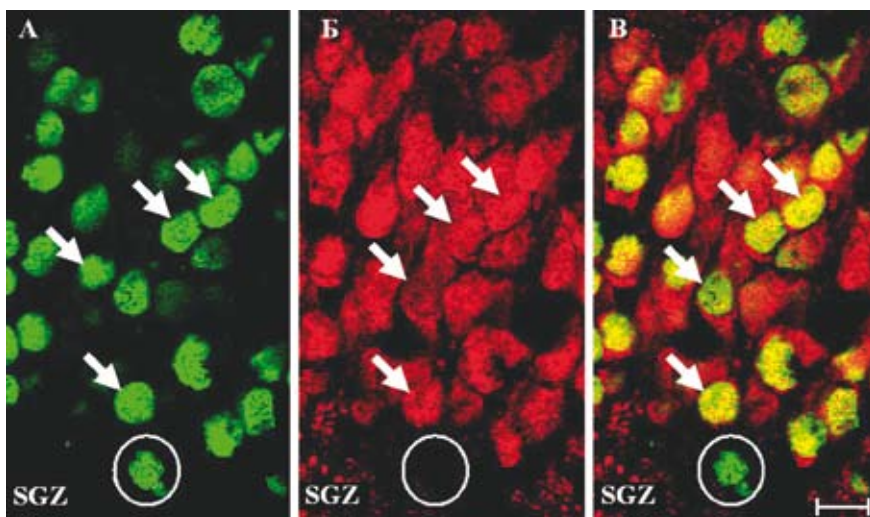
В същото време са наблюдавани и по-малък брой клетки, които бяха позитивни за ген *Cyslop*, но негативни за *NeuN* (Фигура 5.12, глава на стрелка).



Фигура 5.12. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyslop* (А, зелен канал) и невронния маркер *NeuN*^{****} (Б, червен канал) в хипус (сектор СА4) на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивните клетки са демонстрирани със стрелки. Клетките, позитивни за ген *Cyslop*, но негативни за *NeuN*, са посочени с глава на стрелка. Мащаб 20 μm .

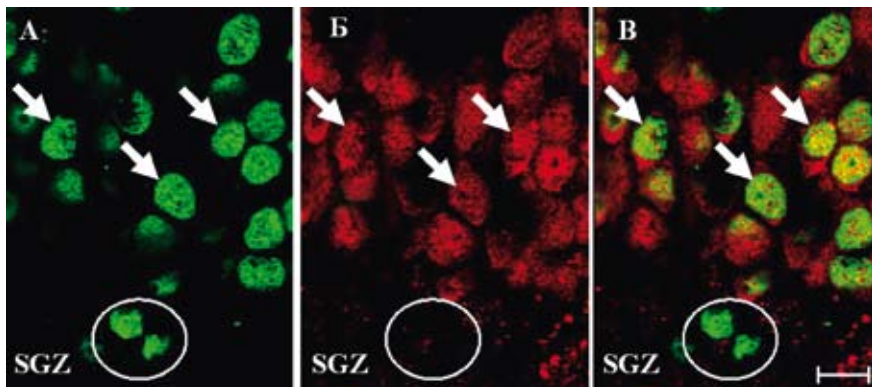
Характерна особеност на такива клетки е техният по-малък размер, който заедно с имунонегативитета за NeuN подсказва не-невронална идентичност. В тази връзка са използвани и други клетъчно-специфични маркери, за да се установи техният фенотип.

В *Gyrus dentatus* на хипокампусната формация над половината от NeuN-позитивните клетки показват експресия на ген *Cyclon* (Фигура 5.13, стрелки), подобно на ситуацията в *Cornu Ammonis*. Наблюдават се и клетки, които експресират ген *Cyclon/CCDC86*, но не и NeuN. Тези клетки са локализирани в SGZ, зоната на прогениторите в *Gyrus dentatus* (Фигура 5.13, кръг) и са по-малки по размер двойно-позитивните клетки.



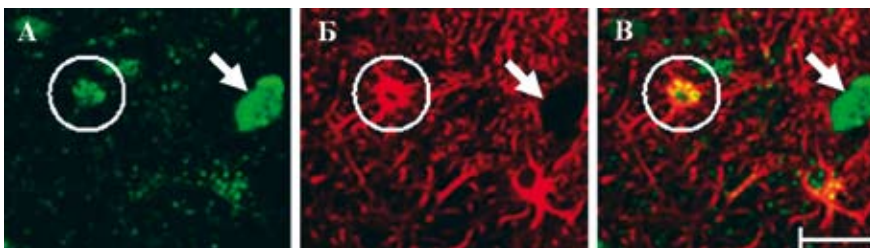
Фигура 5.13. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* (А, зелен канал) и невронния маркер *NeuN*^{****} (Б, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампуа. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивните клетки са демонстрирани със стрелки. Клетка в SGZ, позитивна за ген *Cyclon/CCDC86*, но негативна за *NeuN*, е в белия кръг. Мащаб 20 μ m.

Клетките, позитивни за ген *Cyclon/CCDC86* и негативни за *NeuN*, се наблюдават поединично (**Фигура 5.13**, кръг) или в дублети, (**Фигура 5.14**, кръг) като последното е индикация за скоро извършено делене.



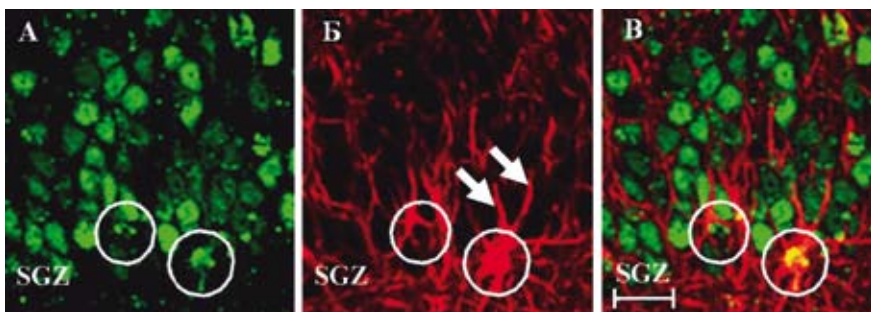
Фигура 5.14. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* (А, зелен канал) и невронния маркер *NeuN***** (Б, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивните клетки са демонстрирани със стрелки. Клетъчен дублет в SGZ, позитивен за ген *Cyclon/CCDC86*, но негативен за *NeuN*, е в белия кръг. Мащаб 20 μm .

Изследвайки фенотипа на клетките, позитивни за ген *Cyclon/CCDC86* и негативни за *NeuN*, бе осъществено с двойни оцветявания за таргетния протеин и GFAP, маркер за астроцити в мозъка при възрастни (86). Резултатите от тези оцветявания показат, че редица от по-малките по размер *Cyclon/CCDC86*-положителни клетки са двойно позитивни за GFAP, в *Cornu Ammonis* (**Фигура 5.15**, кръг) и *Gyrus dentatus* (**Фигура 5.16**, кръг).



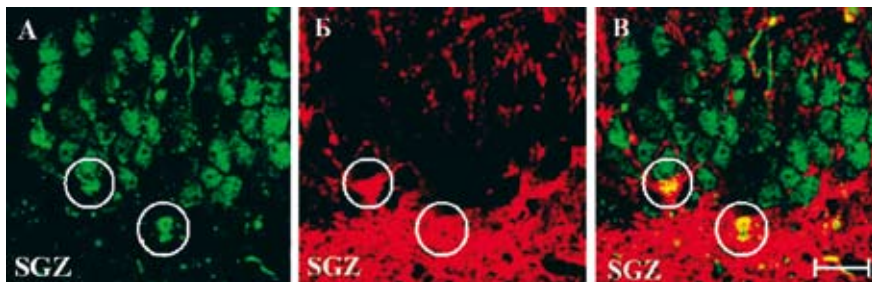
Фигура 5.15. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Sclon/CCDC86* (А, зелен канал) и глиалния маркер *GFAP*** (Б, червен канал) в сектор *CA4* на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел *V*. Двойно-позитивната клетка е показана в белия кръг. Клетката, позитивна за ген *Sclon/CCDC86*, но негативна за *NeuN*, е посочена със стрелка. Прави впечатление по-големият размер на последната клетка спрямо двойно-оцветената. Мащаб 20 μm .

В *Gyrus dentatus* такива двойно-положителни клетки се локализат в *SGZ*, зоната на прогениторните клетки (Фигура 5.16, кръг) и притежават израстъци, навлизащи в гранулния слой (Фигура 5.16, стрелки).



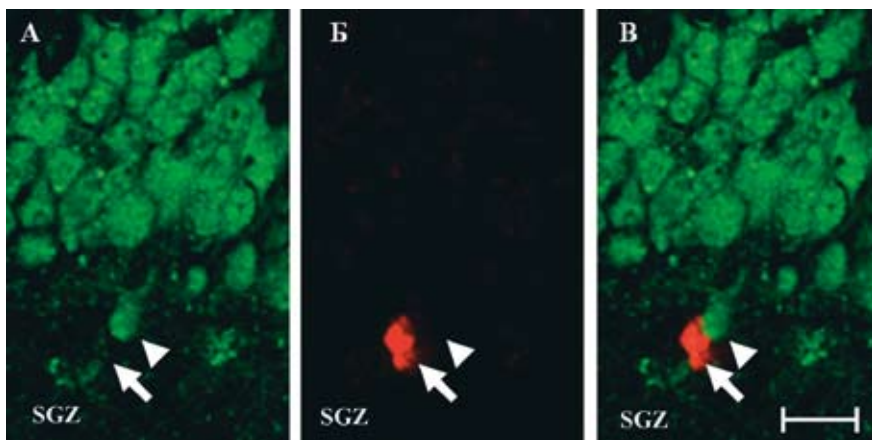
Фигура 5.16. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Sclon/CCDC86* (А, зелен канал) и глиалния маркер *GFAP*** (Б, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел *V*. Двойно-позитивните клетки са показани в бял кръг. Позитивните израстъци на една такава клетка навлизат в гранулния слой (стрелки). Мащаб 20 μm .

Подобен резултат е получен и след използване на алтернативен астроцитен маркер, S100 β (Boyes et al., 1986 (86) (Фигура 5.17.).



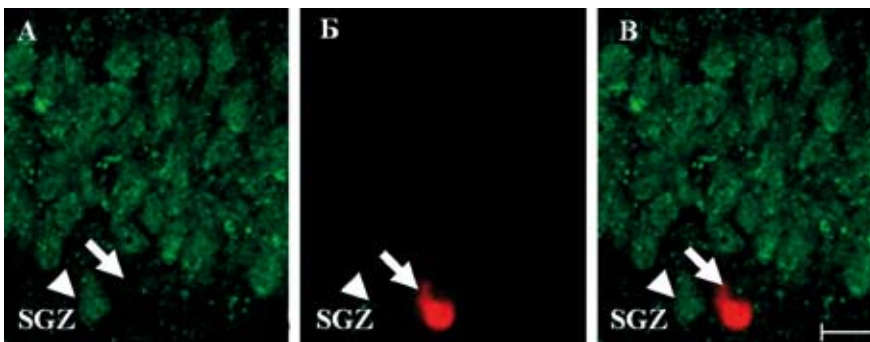
Фигура 5.17. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon* (A, зелен канал) и глиалния маркер S100 β ***- експресиращ в астроглия (B, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел C. Двойно-позитивните клетки са показани в бял кръг. Мащаб 20 μ m.

Тъй като част от GFAP-позитивните клетки в SGZ, чиито израстъци се разполагат радиално и навлизат в гранулния слой на *Gyrus dentatus*, са потенциални стволови клетки в този регион (510), бе извършено двойно оцветяване за ген *Cyclon/CCDC86* и BrdU, маркер за *de novo* образувани клетки в организма, включително ЦНС (Miller and Nowakowski, 1988) (Фигури 5.18)



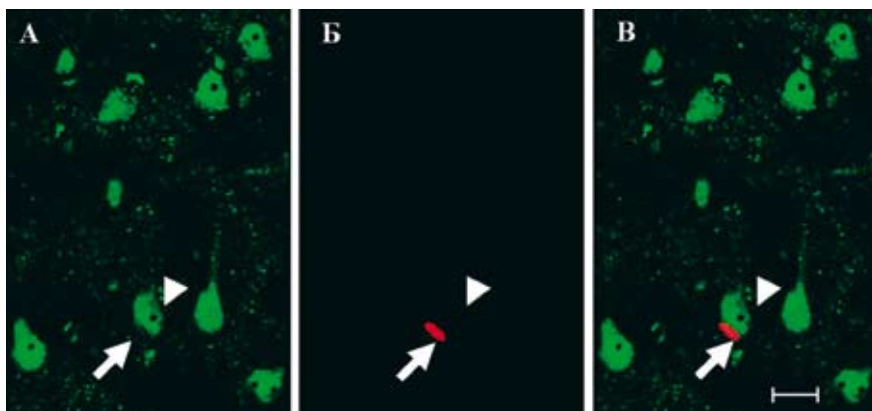
Фигура 5.18. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* (А, зелен канал) и маркера за пролифериращи, *de novo* образувани клетки, *BrdU** (Б, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивни клетки не се установяват, въпреки че *BrdU*-положителната клетка (стрелка) и *Cyclon*-позитивната клетка (глава на стрелка) се намират непосредствено една до друга. Мащаб 20 μm .

За целта субстанцията *BrdU* е инжектирана на възрастни маймуни и инкорпорираният в клетките *BrdU* е използван като индикатор за това, че клетки са образувани след инжектирането му, т.е. във възрастния мозък. Както бе очаквано, в *SGZ* на *Gyrus dentatus* са открити *BrdU*-експресиращи клетки, в съответствие с предишни резултати (Tonchev et al., 2003; Tonchev and Yamashima, 2006). Резултатите от двойни оцветявания на ген *Cyclon/ BrdU* не показват наличие на двойно-положителни клетки в *SGZ* на *Gyrus dentatus* (Фигури 5.18 и 5.19).



Фигура 5.19. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* (А, зелен канал) и маркера за пролифериращи, *de novo* образувани клетки, *BrdU**- (Б, червен канал) в *Gyrus dentatus* на хипокампусус. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивни клетки не се установяват, въпреки че *BrdU*положителната клетка (стрелка) и *Cyclon*-позитивната клетка (глава на стрелка) се намират непосредствено една до друга. Мащаб, 20 μm .

По подобие на *Gyrus dentatus*, липса на ко-локализация между ген *Cyclon/CCDC86* и *BrdU* бе наблюдавана и в *Cornu Ammonis* на хипокампуса (Фигура 5.20).



Фигура 5.20. Двойно имунофлуоресцентно оцветяване на протеина на ген *Cyclon/CCDC86* (А, зелен канал) и маркера за пролифериращи, *de novo* образувани клетки, *BrdU** (Б, червен канал) в СА1 сектор на хипокампуса. Слят образ от двата канала е показан на панел В. Двойно-позитивни клетки не се установяват, въпреки че *BrdU*-положителната клетка (стрелка) и *Cyclon*-позитивната клетка (глава на стрелка) се намират непосредствено една до друга. Мащаб 20 μm .

**BrdU* – включва се в ДНК при клетъчно делене;

***GFAP* – глиален и прогениторен маркер;

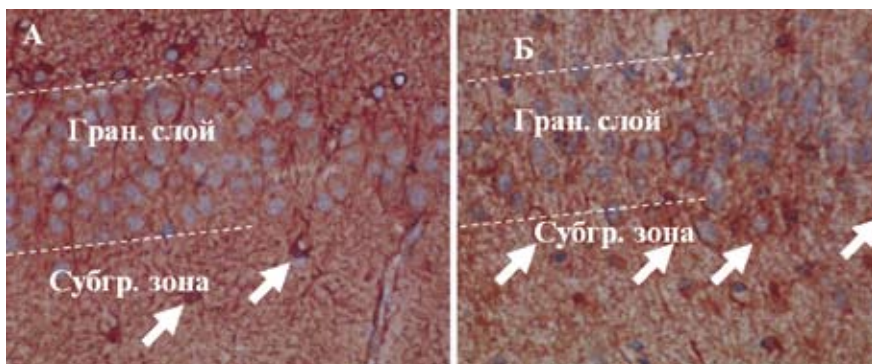
****S100 β* – маркер за астроглия

**** *NeuN* – невронален маркер

5.3.2.2. Експресията на ген *Cyclon* в ЦНС и в човешки мозък при боледували от шизофрения

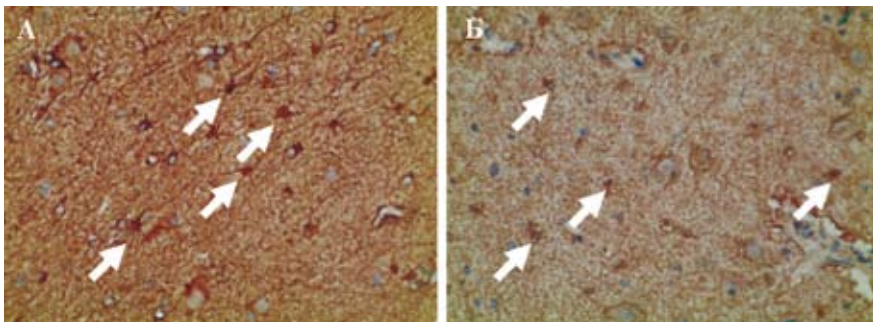
За да проверим дали протеинът на ген *Cyclon* се експресира в ЦНС на хора, по подобие на ЦНС на маймуни, осъществихме имунохистохимично оцветяване на мозъчни срези за ген *Cyclon* в постмортем препарати от пациенти, страдали приживе от шизофрения и контролни субекти. Вниманието бе насочено към хипокампуса. Това бе и зоната на интерес при примати. Имунохис-

тохимично оцветяване в човешка SGZ с маркера GFAP-маркер за астроцити и прогенитори демонстрира наличие на по-голяма плътност на позитивни клетки (глиозна реакция) при липса на добре видими, издължени израстъци на астроцитите при шизофрения. При контролната група, в гранулатната зона са видими ядра на неврони, които са повече от тези при шизофренно болните. Другият регистриран феномен е, че при шизофрениния пациент се намират повече прогенитори/ астроцити в субгранулатния слой. По литературни данни би следвало те да мигрират към гранулатната зона. (Фигура 5.21. А, Б).



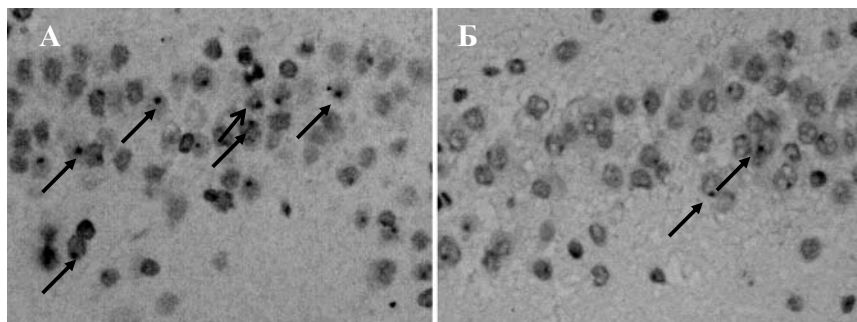
Фигура 5.21. Имунупероксидазно оцветяване на протеина GFAP в *Gyrus dentatus* на контролен (А) и шизофренен (Б) случай. Наблюдава се по-голям брой позитивни клетки при шизофрения, докато израстъците на тези клетки са прибрани, т.е. реакция се наблюдава предимно перинуклеарно

Подобен резултат по отношение на израстъците на астроцитите бе наблюдаван и в региона СА4 на хипокампуса (Фигура 5.22).



Фигура 5.22. Имунпероксидазно оцветяване на протеина GFAP в СА4 на контролен (А) и шизофренен (Б) случай. Наблюдава се ретракция на израстъците на позитивните клетки (стрелки).

Оцветяване за ген *Cyclon* в SGZ, където открихме експресия в астроцити при примати, показва наличие на позитивни клетки (Фигура 5.22).



Фигура 5.23. Имунпероксидазно оцветяване на протеина на ген *Cyclon* в Gyrus dentatus на контролен (А) и шизофренен (Б) случай. Наблюдава се позитивна нуклеоларна реакция в ядра на неврони и клетки в SGZ, като при контролата те са значително повече, отколкото при шизофрения (стрелки). x20

Реакцията бе от нуклеоларен тип (т.е. в ядръцето на ядрото на клетките), като позитивни бяха както клетки в зърнистия слой, така

и в SGZ (Фигура 5.22; стрелки). Важно е да се отбележи, че позитивните клетки при контролите бяха значително повече от тези при шизофрения, където почти не се наблюдаваха *Cyclon*-позитивни ядърца (Фигура 5.23 А спрямо 5.23 Б).

Както бе посочено, интерес представлява находката на фигура 5.21. Там при контролната група в субгранулатната зона на хипокампа (за ориентация, Фигура 5.4), откъдето започва миграцията на прогениторните клетки, се намират много по-малко прогениторни клетки от аналогичния срез при боледуващи от шизофрения (фигура 5.21.Б). Находката потвърждава литературните данни за смутена прогениторна миграция при шизофрения.

Втората интересна находка са добре структурираните неврони в гранулатната зона при групата контроли (фигура 5.21.А) за разлика от тези при шизофрения. Намереното потвърждава литературните данни за невронално нарушение от типа „реална“ и „функционална“ апоптоза.

Трета находка е наличието на изразена глиоза при групата боледуващи от шизофрения спрямо контроли (фигура 5.21.А,Б). Представеното е още едно потвърждение за евентуалната възпалителна компонента в патогенезата на шизофренията.

Намерените и представени резултати за експресията на гена *Cyclon* в периферна кръв и в мозък и доказателствата за корелацията между експресия и клинична картина на шизофренията се подкрепят и от епидемиологичното проучване – изключително рядка коморбидност с астмата. От друга страна намерената от нас категорична разлика в експресията на ген *Cyclon* при астма – ниска, а при шизофрения, особено в релапс с позитивна симптоматика статистически значимо различна – висока (фигура 5.2.), още веднъж доказват ролята на гена *Cyclon* в патогенезата на шизофренията.

По отношение на механизма на активиране на ген *Cyclon*. Както бе посочено, би могло да приемем, че част от ефектите на IL-3 се опосредстват от ген *Cyclon* чрез клетъчните рецептори α (IL3RA) и β (CSF2RB). Тези ефекти са свързани с доказаното влияние вър-

ху оцеляването на невроните и повишената трофика на хипокампалната зона, спасявайки я от исхемично увреждане. Вероятно при шизофрения и депресивен синдром съществува абнормност в цитокиновата активност и/или цитокиновите рецептори. Сигналът от рецептора до вътреклетъчните системи е *абнормен*. Това води до маладаптивна клетъчна реакция. Тя е последвана от смутена невронална функция. Според Saint Fleur и сътр., в този механизъм вероятно участва ген *Cyclon*. Силна подкрепа на тези спекулативни разсъждения е и намерената в нашето проучване експресия на протеина на ген *Cyclon* в структури на мозъка, доказани като „важни“ в шизофрениния процес (гирус дентатус, СА1-3 зони).

Интерпретирайки резултатите от намерената експресия на ген *Cyclon* в различни фази на шизофрения и депресивен синдром, би следвало да се има предвид, че измерванията са осъществени на фона на лечение, което е еднотипно за съответната група – шизофрения, депресивен синдром. Този дизайн би могъл да внесе трудности при интерпретацията на данните, но поради медицински и етични съображения бе изпълнен по този начин.

Въпреки представеното съображение относно направените изследвания на фона на медикаментозно лечение, считаме, че представеното – ако не като лабораторни стойности, то като тенденция – е вярно, тъй като всички измервания са на фона на единно лечение. В потвърждение на това се отчита, че динамика в активността на експресията на ген *Cyclon* и BDNF е паралелна на клиничната симптоматика.

Друга линия на изследване свързва експресията на гена *Cyclon* с активността на микроглията и Т-лимфоцитната система.

Микроглията, както бе посочено, са мозъчни клетки с произход от моноцитите в кръвта. Те експресират ген *Cyclon*. Знае се, че IL-3 стимулира пролиферацията и активацията на микроглията. От друга страна, дисфункция на микроглията е предпоставка за невронно увреждане – невронна дегенерация от възпалителен тип в резултат на продуциране на различни проинфламаторни цитокини и свободни радикали (384).

Именно тук, във връзката моноцити – Т-лимфоцити, микроглия, интерлевкини (IL-3), ген *Cyslcn*, се намира вероятната взаимосвързаност между активността на ген *Cyslcn* в периферията и в ЦНС. За възможната зависимост на процесите е предпоставка нарушената функция на кръвно-мозъчната бариера.

Разстройство в дейността на кръвно-мозъчната бариера се открива при някои типове възпаление. От друга страна *пропускливостта* на кръвно-мозъчната бариера би могла да бъде различна за различните региони на мозъка. Има съобщения за наличие на такава селективна пропускливост в региони от мозъка, приети като съществени в генезата на психотичната продукция (268).

На базата на горепосочените факти допускаме, че съществува паралелност/еднотипност в процесите, протичащи в периферните лимфоцити и в микроглиалните клетки. Това допускане се мотивира и от резултатите от изследване на експресията на ген *Cyslcn* в човешкия мозък. Тя е по-подчертана при психично здрави спрямо боледуващи от шизофрения (фигура 5.21. А,Б), експресията на гена *Cyslcn* в периферна кръв в релапс и ремисия (фигура 6.22). Друго потвърждение на казаното по-горе намираме и в различната на показателите на имунитета – по-висока активност в релапс спрямо ремисия, както и наличието на глиоза, белег на евентуално имуно/автоимунно въздействие в мозъчната тъкан при боледуващи от шизофрения.

Така посочените процеси вероятно обуславят (редом с други фактори) намерените от нас и описани в литературата патологични последици, спрямо невронната тъкан с последица развитие на шизофрения и депресивния „ендогенен“ синдром.

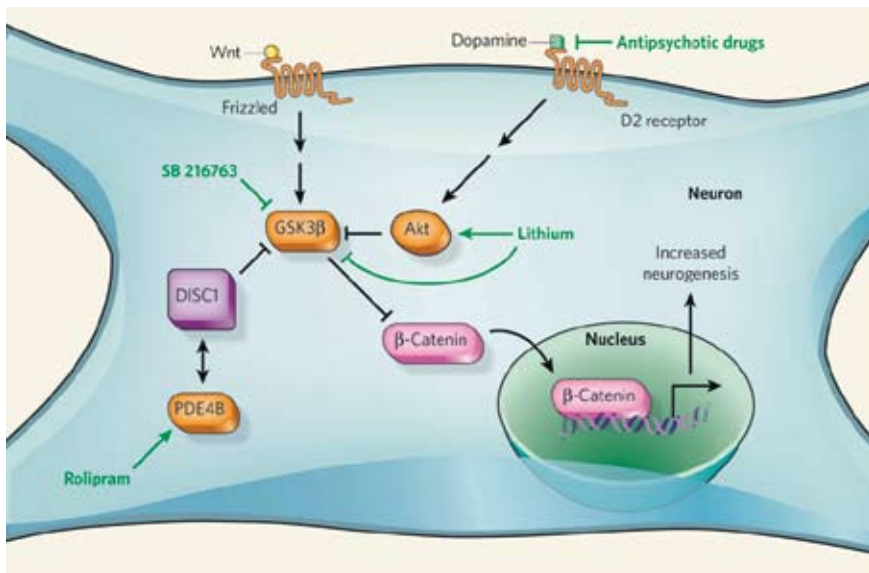
Въпреки многото доказателства за ролята на възпалението в патогенезата на шизофренията, все още не е решен кардиналният въпрос – дали възпалението предхожда отключване на болестта, или е феномен, появил се в хода на заболяването.

Опит за отговор на този въпрос е представеното в литературата твърдение, че патогенезата на шизофренията е свързана с предаване на вируси от майката на плода. Приема се, че тази инфекция е

предпоставка за по-нататъшно отключване на имунни/автоимунни процеси.

В развитието на автоимунен процес, както бе посочено, съществено място има активността на Fas рецептора, чиято активност е свързана с тази на ген *Cytlon* и представя приемливо обяснение за отрицателната корелация между шизофрения и депресивен синдром, и заболявания с автоимунна генеза.

Друг аспект от взаимоотношенията ген *Cytlon* – шизофрения е свързан с неговата локализация. Тя е вътреядрена. Там той е възможно да взаимодейства с β catenin, протеин, свързан с карциногенезата (фигура 5.24). Това би могло да бъде звено, което има връзка с по-различната от обичайната коморбидност на шизофренията с карциномните заболявания.



Фигура 5.24.

Както бе посочено, аспект от патогенезата на шизофренията е генетичният компонент. Предвид преобладаващото становище за

полигенната обусловеност, много вероятно е, че патологичните ефекти на ген *Cyclon* са свързани механизми на генна експресия и взаимоотношение: по-съседство, т.е. скаченост на гените; функционално взаимодействие между гените. Обсъден в обзора бе и един друг механизъм за патологична генна активност – полиморфизмът. Изказва се становище, че той би могъл да се дължи на т. нар. „минимални мутации“.

Всички разгледани дотук елементи от патогенезата на шизофренията, свързани с генетичния компонент, автоимунния механизъм и експресията на ген *Cyclon*, показват, че е малко вероятно експресията на ген *Cyclon* в някоя от неговите полиморфни форми сам да оказва *решаваща* роля в патогенезата на болестта. Това не омаловажава неговата вероятна роля.

Съществуват редица доказателства за взаимодействието на редица гени в неврона. При всеки от тях е описан полиморфизъм и вероятно някоя от полиморфните форми отключва активност при друга група гени, допринасящи за развитие на шизофренията. Такова взаимодействие е представено на фигура 5.24, където се демонстрират връзките между различни, идентифицирани като „важни“ за шизофренията гени.

Както бе посочено, *DISC1* генът е може би с най-голяма популярност като кандидат-ген, свързан с генезата на шизофренията. Той е обсъждан дори като евентуален „самостоятелен ген-причинител“ на болестта. *DISC1* участва в регулацията на развитието при постмитотичните неврони, регулира пролиферацията на прогениторни клетки по време на ембрионалното развитие и тяхната матурация в неврони. Механизмът на действие на *DISC1* е свързан със сигналния път на *GSK3/β-catenin*, който от своя страна се асоциира с етиологията на т.нар. ендогенни психотични състояния. Проучвания *in vivo* показват, че *DISC1* има физиологична експресия не само в ембрионалния, но и във *възрастния* мозък. Той регулира процеси като адълтната неврогенеза, миграцията на невронни прогенитори. Участва в тяхната интеграция с други ембрионално генерирани неврони във функционалните вериги. *DISC1* участва и

при постнаталната неврогенеза в мозъка. Това е още едно потвърждение за вероятната му роля, свързана с теорията за невроналното развитие в патогенезата на шизофренията.

С описаната в литературата свързаност на DISC1 с други гени, отговорни за патогенезата на шизофренията и депресивния синдром, много вероятна е и функционалната връзка между гените *Cyclon* и DISC1. Именно чрез тази връзка би се намерило обяснение за различната експресия на ген *Cyclon* при *предимно негативната* симптоматика и свързаните с DISC1 разстройства в работната памет, когнитивната „гъвкавост“, обема на сивото мозъчно вещество в префронталния кортекс, с абнормности в хипокампусната структура и функция.

Друг ключов ген, който доказано е свързан с DISC1, взаимодейства с β -catenin, вероятно и с ген *Cyclon*, е генът GSK3 β . Той е част от сигналния път на Wnt. Когато GSK3 β се свърже с DISC1, се понижават нивата β -catenin. Това води до цялостна инхибиция на сигналния път, тъй като β -catenin има способността да се транслоцира в ядрото. Там той взаимодейства като транскрипторен фактор и индуцира експресията на група от гени, един от които вероятно е ген *Cyclon*, необходими за неврогенезата. Това очертава вероятния механизъм на взаимодействие между вътреядрните гени, един от които е и ген *Cyclon* и DISC1 (фигура 5.24).

Друг междинен фактор между DISC1 и вътреядренте ензими е фосфодиестераза 4B (PDE4 β) (498). Този ензим регулира наличността на цикличния AMP, важен вторичен посредник при интрацелуларната сигнализация в отговор на екстрацелуларни сигнали като хормони, растежни фактори и невротрансмитери. DISC1 контролира ензимната активност на PDE4 β (Фигура 5.24), която може да модулира функции като настроение и мислене и влияе върху процесите на невропластичността. (498). Има данни, че аберантен PDE4 β се наблюдава при шизофренни фамилии.

Всички гени, посочени на фигура 5.24, които са с доказан ефект при формиране на мозъчните абнормности в конкретни свързани с шизофренията области, както в теоретичен, така и в експеримен-

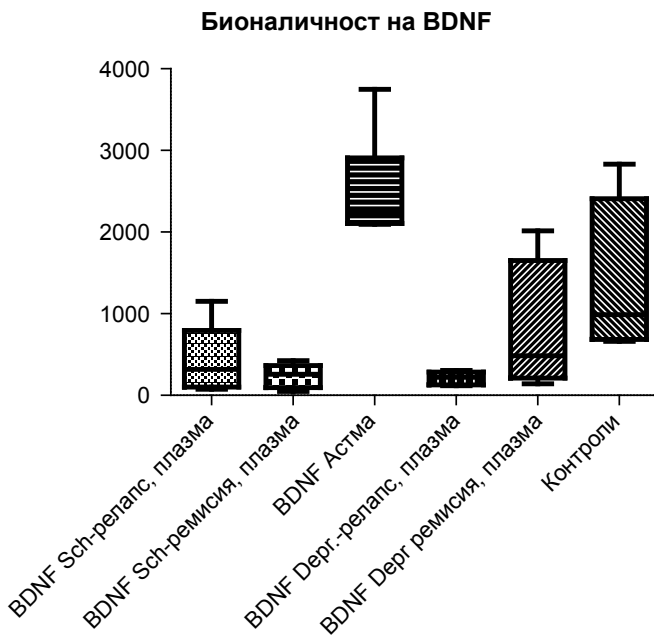
тален аспект, отразен в проучването, както и особеностите в експресията на ген *Cyclon* очертават система, която при определени обстоятелства, фактори от околната среда и вероятно свързан с мутации полиморфизъм в някой/някои от тези гени, би довел до отключване на шизофренното заболяване.

5.4. Експресия и динамика в активността на ген BDNF при шизофрения, депресивен синдром и астма. Зависимост между експресията на ген *Cyclon* и BDNF

Друга посока на изследване, с оглед разкриване елементи от патогенезата на шизофренията, е свързана с ролята на трофичните мозъчни фактори. Съществуват множество изследвания за ролята на редица такива фактори. Може би с най-голяма популярност сред тях е BDNF. Предвид факта, че BDNF е свързан както с мозъчната, така и с астматичната патология, бе проведено изследване на неговата бионаличност при група болни, боледуващи от шизофрения, бронхиална астма и при такива с депресивен синдром. Резултатите показват статистически достоверно различие в нивото на BDNF в релапс и ремисия при боледуващите от шизофрения. Тази констатация е в съгласие с намерената в други проучвания *обратна корелация* между активността на BDNF и апоптозата, която е по-изразена в релапс спрямо ремисия, до понижена в хроничния стадий на болестта. В същото време, при изследването на нивата на BDNF при пациентите, боледуващи от шизофрения с *предимно позитивна* и *предимно негативна* симптоматика в релапс и ремисия, не се установи статистически достоверно различие. И тук, както при експресията на ген *Cyclon*, липсваше статистически достоверна разлика в изследвания параметър между мъже и жени. Подобен е и резултатът от нивото на BDNF на групата в депресия при релапс и ремисия.

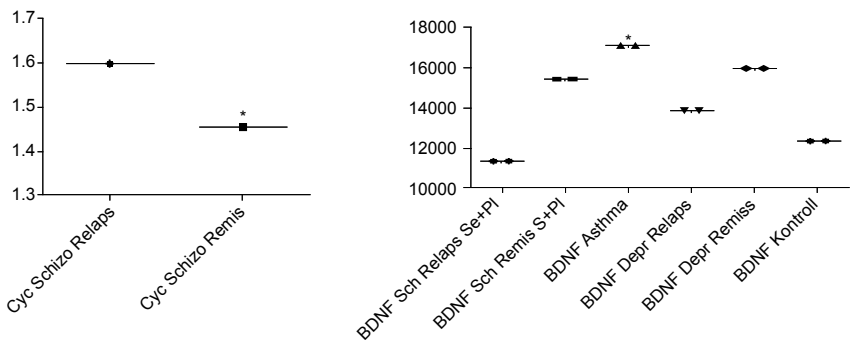
Статистически недостоверно е и различието между експресията на BDNF между депресия и шизофрения, както и между шизофрения в ремисия и контроли. Намереното по отношение на шизофре-

ния и депресия е това, че и при двете заболявания нивото на BDNF е ниско. Между стойностите за релапс и ремисия не се установява статистическа разлика. Нивото при контролите е по-високо, а спрямо групата „астма“ – най-високо – статистически значимо (Фигура 5.25).



Фигура 5.25 Нива на BDNF при различните изследвани групи.
Забелязва се, че най-високи са нивата при **астма**,
като резултатът е статистически значим.

Предвид целите на дисертационния труд, проведохме и изследване относно наличие на зависимост между гена *Cyclon* и нивата на BDNF. Извършеният анализ не показва наличие на корелационна зависимост между двата параметъра, но се прояви известен паралелизъм с обратен знак. Докато експресията на *ген Cyclon* е по-високо в релапс (Фигура 5.26.А), то при BDNF ситуацията е обратна: стойностите в релапс са по-ниски от тези в ремисия (Фигура 5.26.Б).



Фигура 5.26. А – Представени са позициите на средните стойности на ген *Cyclo* в релапс и ремисия. При релапс нивата са сигнификантно по-високи. Б – Представени са позициите на средни стойности на *BDNF* в релапс и ремисия.

Интересът към BDNF като трофичен фактор е свързан с важната роля, която невротрофините играят за нормалното израстване и функциониране на невроните. Съществуват категорични данни, че BDNF участва в процеси, разстройството на които вероятно стои в основата на шизофренната патогенеза. Такива процеси са невронално развитие, миграция и диференциация на прогенитори в хипокампуса и неокортекса, невроналното оцеляване. Други автори (както и ние) описват, че нивото на BDNF в кръвта е високо при боледуващи от астма. Това се свързва с възпалителните процеси в белодробната тъкан, като в същото време констатираме наличие на негативна корелация между астма и шизофрения. В контекста на тази корелация вероятно имат отношение 5HT_{2a/2c} рецептори, ангажирани и при двете заболявания.

Разгледани по този начин, представените факти предполагат, че за негативната корелация между бронхиална астма и шизофрения би могло да допринесе повишеното ниво на BDNF при боледува-

щите от астма. Самостоятелно или наред с други фактори, BDNF би могъл да проявява протективни ефекти по отношение на шизофрения процес при боледуващи от астма, т.е би допринесло за рядко комбиниране на астма/шизофрения при един и същи пациент. По този начин, въпреки наличието на предразполагащи към шизофрени гени, пациенти, боледуващи от астма и следователно имащи високи нива на BDNF, биха били „защитени“ в известна степен от патологично невронално моделиране, поставяно в основата на шизофрени патогенеза. В този смисъл при шизофрени пациенти, където е намерено ниско ниво на BDNF, би се задълбочила генетично съществуваща синаптична и невронна непълноценност.

Тази постановка – ниска бионаличност на BDNF, заедно с наблюденията за силно изразения функционален невронен прунинг, наблюдаван през пубертета, би могъл да бъде тригер за отключване на болестта. Това е едно приемливо обяснение за регистрирания пик на заболяемост от шизофрения около 20-25-30-годишна възраст.

Така представени, фактите дават приемливо обяснение на шизофрението начало както в пубертета, така и в други периоди на възрастта, когато нивото на половите хормони е абнормно.

В заключение, от представеното е видно, че високото ниво на BDNF с неговия трофичен ефект участва в предпазване, а съответно при понижено ниво способства развитието на шизофрението заболяване. Връзката BDNF и експресията на гена *Cyclon* е с противоположен знак при шизофрението и депресивен синдром от една страна и астма, от друга. Тези им взаимоотношения заедно с хормонални разстройства, свързани с кортизол, полови хормони, смутена имунна функция при „подходящ“ генетичен терен са вероятно обуславящи началото и развитието на шизофрението.

5.5. Имулна активност при шизофрения. Връзка между имунологичните показатели и експресия на ген Cyclon

При пациенти, боледуващи от шизофрения, е констатирана имунна дисфункция. Налице са данни, показващи съществуващ инфламаторен отговор. Подобни констатации на съществуващо имунно увреждане е отбелязано и при психотични афективни заболявания.

Тези констатации са в основа на тезата, че „възпалението е верооятен механизъм за функционална и органична мозъчна увреда“, „подготвяща“ или отключваща психична – шизофренната симптоматика. Тя би могла да бъде свързана със специфична инфламаторна активност на имунната система или разстройство в протективната, т.е. увреда в кръвно-мозъчната бариера с последващо нахлуване на увреждащи нервната тъкан клетки, включително антитела срещу собствени невронални антигени.

В тази връзка проследихме динамиката в имунния статус при шизофренно болни в период на релапс и ремисия. Таблица 5.10.

Таблица 5.10. Изследвани лимфоцитни субпопулации при пациенти, боледуващи от шизофрения в пристъп, и след 20-дневно антипсихотично лечение (ремисия).

	Шизофрения в пристъп Median (CI 95%)	Шизофрения в ремисия Median (CI 95%)	Статистиче- ска значимост
T-Ly (CD3+/CD45+%)	75,49 (71,13 – 78,09)%	77,86 (69,78 – 82,03)%	
T-h/i (CD3+CD4+/ CD3+%)	61,85 (58,22 – 63,98)%	62,97 (57,95 – 67,79)%	(P = 0,0547, ns)
T-s/c (CD3+CD8+/ CD3+%)	34,43 (31,29 – 37,73)%	33,09 (28,98 – 37,81)%	P < 0,05 * (P = 0,0273)
B-Ly (CD19+/ CD45+%)	13,90 (11,45 – 17,04)%	9,15 (6,948 – 12,05)%	P < 0,01** (P = 0,0039)
NK-Ly (CD16+56+/ CD45+%)	8,875 (7,07 – 14,42)%	8,94 (7,269 – 19,4)%	

T-h/s (CD4+/CD8+)	1,815 (1,561 – 2,121)	1,900 (1,528 – 2,409)	P < 0,05* (P = 0,0243)
T-Ly (CD3+)	1454 (1372 – 2023) G/l	1664 (1438 – 1899) G/l	
T-h/i (CD3+CD4+)	883,3 (831,1 – 1246) G/l	1092 (889,1 – 1204) G/l	
T-s/c (CD3+CD8+)	530,6 (463,5 – 698,1) G/l	569,1 (453,9 – 660,3) G/l	
B-Ly (CD19+)	262,9 (209,7 – 480,7) G/l	199,6 (145 – 273,3) G/l	(P = 0,0742 ns)
NK-Ly (CD16+56+)	187,3 (136,6 – 406,3) G/l	202,5 (152,2 – 433,1) G/l	

Намерените резултати потвърждават посоченото в литературата за промяна в активността на имунната система при шизофрения. Търсейки динамика, в проследените имунни показатели за периодите на ремисия и релапс намираме значимо повишение на съотношението Th/s в ремисия спрямо релапс; Тенденция за повишение на относителния дял на хелперно-индусерните Т-лимфоцити (T-h/i, CD3+CD4+/CD3+%) в ремисия спрямо релапс; Значимо намаление на относителния дял на супресорно-цитотоксичните Т-лимфоцити (T-s/c, CD3+CD8+/CD3+%) в ремисия спрямо пристъп; Значимо намаление на относителния дял на В-лимфоцитите (CD19+/CD45+%) в ремисия спрямо пристъп.

Регистрираната променена активност на имунната система чрез посочените показатели и отчетената динамика за периодите на релапс и ремисия категорично потвърждават изказаните в литературата становища за разстройства в имунитета при боледуващи от шизофрения. Резултатите показват също, че нейната динамика корелира с активността на заболяването.

Разглеждайки имунната активност и описаните вероятни механизми – автоимунни в патогенезата на шизофренията, би следвало да се обсъди и възможността за автоимунен процес, в контекста на променената имунна активност. Връзка между промяната в имунната активност в периферията и ЦНС би могла да се потърси от

една страна с паралелно активиране на имунните процеси в ЦНС и периферията и/или преминаване на клетки и антитела през хематоенцефалната бариера, която по принцип е непроходима за тях.

Редица експерименти показват, че при наличие на бактериален липополизахарид или реактивни анти-ДНК и анти-NMDAR антитела в комбинация с хиперадреналинемия, кръвно-мозъчната бариера може да бъде преодоляна. По отношение на последните – регистрирани са при шизофренно болни.

Регистрирани са също и анти-фосфолипидни антитела, които могат да причинят мозъчни увреждания, корелиращи с промени на когнитивните функции. Подобни антитела са регистрирани и при пациенти с шизофрения.

За изясняване на механизма, свързан с кръстосана реакция на соматично-индуцирани антитела с мозъчната тъкан е необходимо да се установи начина на преминаване на антитела през кръвно-мозъчната бариера, защо са увредени предимно неврони в специфични мозъчни структури, а не дифузно в целия мозък, както би се очаквало при „пробив“ в кръвно-мозъчната бариера.

В тази връзка е направен експеримент. След индукция с автоантитела е предизвикана бактериална инфекция. Тя индуцира системна експозиция на бактериален липополизахарид. Наблюдава се смърт предимно на хипокампадни неврони и сигнификантен дефицит в паметови задачи (при увреждане на 10-20% от невроните на амигдала настъпва когнитивен и поведенчески дефицит). При това проучване е намерено и увреждане на допаминергичните и серотонинергични неврони, сиво и бяло мозъчно вещество и дегенерация на миелин.

Задълбочавайки изследванията в посока кръстосана реактивност на разглежданите антитела се установява, че анти-ДНК и анти-NMDAR антителата атакуват най-вече рецептори с висока плътност в хипокампуса, амигдала и хипоталамуса.

При наличие на бактериален липополизахарид се получава инфлукс на антитела в мозъка със свързване към хипокампадни неврони.

Освен дифузното увреждане на хематоенцефалната бариера има данни за селективна пропускливост в хематоенцефалната бариера, свързана със зони, за които се знае, че са свързани с патогенезата на болестта.

Разглеждайки в настоящата работа ролята и мястото на ген *Cysl1p* в патогенезата на шизофренията, потърсихме връзка между неговата експресия и промените в имунната функция. Резултатите показаха такава зависимост само при някои от изследваните показатели. Тази находка, въпреки не особено убедителна, е още едно потвърждение за вероятното участие на гена *Cysl1p* в патогенетичния процес на шизофренията.

Друг факт, свързан с участието на ген *Cysl1p* в активността на имунната система, е намерената в проучването по-висока експресия на този ген в периферна кръв. Това вероятно е в пряка връзка с активацията на Т-лимфоцитите и е още едно косвено потвърждение за връзката на имунната система с патогенезата на шизофренията.

Връзката на гена *Cysl1p* и имунния процес би могла да бъде опосредствана и чрез активиране на интерлевкиновата система, която категорично е свързана с процесите на възпаление.

5.6. Шизофрения – циркадност, кортизолов ритъм и фази на съня. Бионаличност на кортизол. Кортизолов ритъм и връзката му с експресията на ген *Cysl1p*

Съществуват множество доказателства, които показват, че разстройството в циркадния ритъм има отношение към етиологията и симптоматологията на психични разстройства. При шизофренията се описва разстройство на цикъла сън/бодърстване през фазите на денонощието и абнормности в денонощната циркадна фазовост. Тези разстройства се отчитат в 30-80% от пациентите, като е намерена и корелация с изразността на психичната симптоматика.

Констатирани са различни промени по отношение на съня при шизофрени пациенти. Те са редуцираната ефикасност на съня

и „тоталното време за сън“, както и нарасналата латентност на съня, потвърдено и от нашето проучване. Тези абнормности се свързват и с патофизиологията на шизофренията. Намерено е също, че някои от параметрите на съня сигнификантно корелират с вариациите на клиничните прояви – с изразността на клиничната симптоматика, наличието на позитивни и негативни симптоми, изхода от болестта, неврокогнитивните увреждания и мозъчната морфология при шизофрения.

Асоциирането на шизофренията с нарушения в цикъла сън/бодърстване или въобще с циркадността е свързано и с предположението, че шизофренната патология и свързаните с ендогенен процес циркадни нарушения се базират на общи мозъчни механизми.

Още едно потвърждение за връзката циркадност-шизофрения се намира в ролята на допаминергичната система в динамиката на циркадността, както и мястото на допамина в регулацията на ритмите сън/бодърстване. Допаминовата активност се свързва и с пролактиновата секреция. При шизофрения тя е трикратно по-голяма от обичайната, а също и с променена имунна активност.

Циркадни нарушения се търсят и при други биологични показатели като телесната температура и десинхронизация на температурата, сърдечния ритъм и кръвното налягане и мелатониновата секреция.

Изхождайки от тези факти – че и при бронхиална астма, също както при шизофрения, има смущение в циркадността и ритъма на кортизоловата секреция, както и разстройство в защитната система (алергия-имунитет), т.е. еднотипни по механизъм патогенетични моменти – потърсихме техния статус при шизофрени пациенти в стадий на релапс и ремисия.

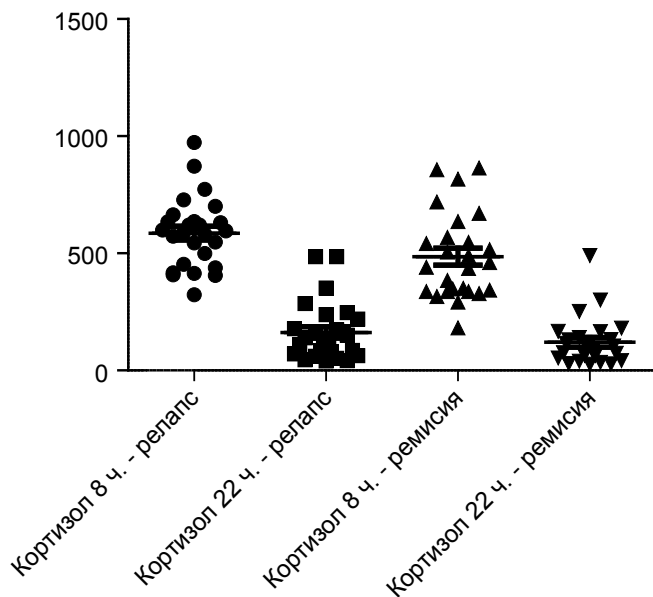
Единият от изследваните показатели е циркадният ритъм. Както бе посочено, позовавайки се на литературните данни за смутен циркаден ритъм при астма и при шизофрения, за която има значително по-малко съобщения, бе проследен 24-часовият кортизолов ритъм в релапс и медикаментозна ремисия при боледуващи

от шизофрения. Резултатите показаха по-изразено разстройство на проследения параметър в периода на релапс и тенденция за „възстановяване“ при настъпване на ремисия. Намерено бе също и по-високо от референтното ниво на кортизол както в релапс, така и в ремисия. С настъпване на ремисия отчетохме тенденция към възстановяване на кортизоловия ритъм, но той не достигна до норма. Отчетохме и редуция в кортизоловата бионаличност, която също се редуцира, но отново не достигна до норма след настъпване на ремисия, т.е. в 20-дневното наблюдение.

Интересно наблюдение от проведеното изследване е това, че с около 50% намаляват случаите със стойности на кортизол „под норма“ за измерванията в ремисия спрямо релапс – 22.00 ч. Интерес представлява фактът, че с настъпване на медикаментозна ремисия намаляват случаите на стойности на „кортизол над норма“ за измерванията в 8.00 ч. и 22.00 ч. също с 50% при ремисия спрямо релапс.

Като цяло, от изследването на нивото и ритъма на кортизол би могло да се каже, че с настъпване на ремисията намалява бионаличността на кортизол спрямо период на релапс и се отчита тенденция за възстановяване на ритъм на кортизола – 8.00 – 22.00 ч. Въпреки описаната динамика, до референтни стойности, както по отношение ритъма, така и на бионаличността не се достига с настъпване на ремисия. (Фигура 5.27)

Кортизолов ритъм - релапс и ремисия



Фигура № 5.27.

Друг проследен показател, свързан с циркадността, бе изследването на фазите и ритъма на съня. Сравнително малкият изследван брой пациенти не дава основание за категорични изводи. Въпреки това, получените еднотипни резултати при всички изследвани, както и синхронът на данни с литературните дава основание да се потвърди тезата за наличие на белези за нарушение на фазите на съня при шизофренно болни, което е индиректен белег за смутена циркадност. Това твърдение се подкрепя и от проведеното изследване за ритъма на съня, т.е. „време за сън в денонощието“ и „моментът на заспиване“. Тези два показателя са проучени за периодите преди и след началото на болестта. Въпреки че методиката на изследване не позволява висока степен на точност (отговорите

са описателни и касаят различни периоди), с категоричност би могло да се каже, че като цяло при изследваните има разстройство в денонощния ритъм на съня. Това разстройство е по-значимо в 80% от случаите, около и след началото на болестта, и по-подчертано във фазите на релапс спрямо ремисия.

Интерпретирайки получените резултати при изследване на разстройствата на циркадността, трябва да се има предвид, че резултатите са направени на фона на психотропно (предимно антипсихотично) лечение. Въпреки това, изхождайки от констатираното и резултатите от други изследвания в този аспект би могло да се каже, че намереното е потвърждение за смутената циркадност при изследваната категория пациенти. Тази констатация подкрепя наличните литературни данни и допълва другите методи на изследване, най-вече тези, свързани с изучаването експресията на гени свързани с циркадността като *CLOCK*, *BMAL1*, *PER*, *CRY* и други от този клас. Перспективността в тези изследвания се мотивира и от полиморфизъм на гена *CLOCK*, регистриран при шизофрения и асоцииран с аберантна допаминова трансмисия. Друг изключително важен момент на връзката циркадност – шизофрения е ролята на гена *DISC1* в сънната хомеостаза при психични заболявания, включително шизофрения.

Така представените факти свързват циркадните нарушения и в частност процеса на съня, с патогенезата на шизофренията. Механизмите са различни, те биха могло да са пряко свързани с шизофрениния процес или косвено, чрез имунната, невротрансмитерната или системата на *CLOCK* гените, но категорично присъстват при клинично изразени прояви на заболяването. От друга страна, смутената кортизолова секреция с нейните ефекти върху неврони, прогениторни клетки и глия оказват категорично влияние върху развитието и функционирането на невроналните мозъчни кръгове.

Предвид изследване мястото на гена *Cyclon* в патогенезата на шизофренията, потърсихме зависимост между неговата експресия и кортизоловия ритъм, както и динамиката му между релапс и ре-

мисия. Намереното показва тенденция на връзка между двата изследвани параметъра предимно за периодите на релапс.

Представеният резултат очертава още една вероятна връзка между процеси вероятно свързани с шизофренната патогенеза. Те подчертават ролята на циркадността и кортизола в патогенетичния процес на шизофренията и винаги в съчетание на други фактори и условия.

5.7. Шизофрения – стресогенни жизнени събития и качество на живот

Друга патогенетична теория за шизофренията, застъпена в литературата, е тази за ролята на социалния стрес и най-вече този имащ хронична експозиция.

От направеното проучване чрез въпросника на Holmes и Rahe, интерпретиран и като „списък на стресогенни събития“, намираме сравнително „добро“ качеството на живот при изследваните. Резултатите показват, че около 70% от пациентите не се чувстват потиснати. При 11% от изследваните жени съзнанието им не е ангажирано с болестта. При мъжете този процент е 33%. Около 84% от мъжете декларират, че са притеснени поради липса на средства. При жените процентът е по-малък. Около 50% от жените споделят за проблеми, свързани с липсата на жилище. При мъжете този процент е около 32%. Около половината от мъжете считат, че се справят с обичайните си дейности. Болшинството от мъжете и жените не считат, че са тежко болни и само около 10% отчитат, че заболяването им е тежко.

В хода на проучването направи впечатление формалността на отговорите от страна на изследваните. Те са с голяма доза емоционална индиферентност по отношение на „тежките“ житейски ситуации, описани в анкетираните събития, към които пациентите са „положителни“, и проявяват неувереност в тяхната преценка по значимост и тежест. Предвид тази констатация и становището, че жизнените събития би следвало да бъдат разглеждани в контекста

на съответната култура, проведохме друго изследване. При него пациентите трябваше спонтанно да посочат по десет значими за тях стресогенни събития и да преценят дали някои от тях имат отношение към релапсите на болестта. Резултатите не показаха висока степен на корелация с отговорите, дадени при изследване с въпросника на Holmes и Rahe. И при двете групи (мъже и жени) при второто изследване, житейските неблагоприятия се свързват с понятието „неприятности“ и „конфликти“. В повечето случаи пациентите не можаха да посочат „какви точно неприятности/конфликти“.

Въпреки привидната еднотипност на резултатите от двете проучвания, те се различават най-вече по това, че при „отвореното интервю“ като значими бяха посочени други събития, а тези, които съвпадаха, бяха различно класирани по тежест. Общото и при двете изследвания бе подчертаната липса на емоционален заряд спрямо посочените като значими стресогенни събития.

От така направеното сравнение между двете изследвания е видно, че отчитане на ефекта от въздействието на стресогенните събития, дори с утвърдени въпросници, води до известна неточност, свързана от една страна с културалните особености, а от друга е свързано с естеството на контингента изследвани. Подобно становище се подкрепя от направената статистическа обработка на намерените „спонтанно посочени“ от пациентите стресогенни събития (второто изследване). Чрез метода на Хи-квадрат намираме статистически значима разлика в броя посочени събития между мъже и жени, като жените показват по-широк набор от значими за тях „неприятни“ събития. Това би могло да се свърже с по-подчертана емоционалност при жените и нужда от подкрепа. Това твърдение се подкрепя и от данните на проведеня дисперсионен анализ, който сочи полова зависимост на получените резултати. Както бе посочено по-горе, и при мъже, и при жени „неприятностите“ са това, което е стресогенно, но в известна степен твърдението е декларативно.

Друг интересен момент от изследването е това, че едва 8% от пациентите посочват социалните неблагоприятия като причина за

обостряне на болестта. Тези два момента не показват категорично доказуема връзка на релапсите на болестта със стресогенни жизнено събития. Считаме, че това е така не защото събития, реално предизвикващи дистресорен ефект не биха обострили болестта, а защото болестната интровертност в поведението и мислите при тези пациенти силно намалява ефекта на дистресогенност на всеобщо възприетите като „стресогенни“ (за българския културен фон) събития. Намираме също, че при изследваните от нас пациенти преживяването на стресогенните събития е „размито“, т.е. фонът на преживявания е нестабилен, флукуиращ. Интензивността му е от лека до умерена. Посочените в други проучвания връзки между стресогенни жизнено събития и релапс биха могли да се свържат с известна „сугестия“, която въпросникът с посочени конкретни житейски ситуации предизвиква.

Едва около 7% от изследваните свързват в някаква степен началото на болестта си със стресогенно събитие.

В заключение, би могло да се каже, че пациентите, вече боледувачи от шизофрения, не реагират с остротата на психично здравите спрямо стресогенните събития от социалната среда. Съответно за тези събития няма данни, че играят голяма или решаваща роля както при отключването, така и при релапсите на шизофрения.

Констелацията от посочените по-горе хормони разстройства, тяхната абнормна секреция при шизофрения, описана в литературата, изцяло съвпада с тази намерена при дистрес. Това налага извода, че независимо от „слабото“ преживяване за дистрес от множество социални събития, при шизофренно болните настъпват увреждания характерни за хроничен стрес. И в допълнение на това, дори и неособено силен дистресор от социалната среда би довел до задълбочаване на хормоналния дисбаланс и съответно свързаните с него биологични последици. Част от тези последици са смутената активност в глутаматергичната, допаминергичната, трофичната мозъчни системи, както и процесите на невронална пластичност, вкл. и клетъчна миграция, както и тези свързани с промяна в имунната активност, най-вече в глиалните клетки.

5.8. Шизофрения и депресивен синдром – общи патогенетични звена

Предвид поставената в настоящото изследване задача (№ 12) да се потърсят сходни или общи звена от патогенезата на шизофренията и депресивния синдром (БАР, РДР и депресивен епизод с психотични симптоми), на база литературни данни и проведените изследвания потърсихме доказателства за еднотипните или подобни патогенетични механизми при шизофренията и обособените в МКБ10 нозологични групи: БАР, РДР, депресивен епизод, умерен и тежък с психотични симптоми (представени в работата като депресивен синдром) и маниен епизод. Депресивният синдром го разглеждаме като синдроми при БАР или РДР, а маниеният – като вероятна част от БАР.

В литературата са представени множество становища и данни за единна патогенетична принадлежност на депресивния синдром и шизофренията. Още Griesinger (1817-1868) изказва становище за „унитарност на психозите“. Тази идея присъства и в съвременната литература, тъй като е подкрепена и от „новите знания“ в резултат на съвременни методи на изследване.

Съвременното виждане за континуум между шизофренията и депресивен синдром се подкрепя от редица епидемиологични данни. Чрез тях се намира известно синдромологично (клинично) и фамилно-генетично припокриване. Тази констатация налага извода, че фамилността в развитието на психичното заболяване не е нососпецифична по отношение на шизофренията и БАР. Това е намерено и в редица проучвания, които констатират, че при наличие в семейството на повече от едно лице, страдащо от БАР, рискът за развитие на шизофренията се повишава около 4 пъти.

Друг аргумент в полза на единството в патогенезата на шизофренията и депресивен синдром е шизоафективната психоза (DSM-IV 295.7). Тя се разглежда на прехода между двете посочени групи. Среца се с еднаква честота във фамилии с пробанди, боледуващи от шизофренията и БАР. В същия смисъл са и проучванията, намиращи че негативни симптоми и ранно начало на шизофренията при

пробанда е предиктор за поява на шизофрения при първа степен родственици, а рискът за заболяване от афективна / шизоафективна психоза е специфично обвързан с история за мания в пробанда.

Като изключително надеждни се считат резултатите от изследвания чрез ЯМР. В тази връзка проведохме изследвания на определени мозъчни структури при шизофрено болни, такива с депресивен синдром и контроли. Намереното показва наличие на еднопосочност в регистрираните структурно-мозъчни абнормности при показателите СМІ, ширина на сулкус централис, ширина на III вентрикул, фронтален кортекс, гирус цингули при шизофрения и депресивен синдром, като промените са по-изразени за групата „шизофрения“. За това, че представените резултати не са „случайни статистически стойности“ говори намерената корелация при групите „шизофрения“ и „депресия“ с показателя „диагноза“.

Представеното по-горе показва конкордантност в мозъчните промени на изследваните структури при депресивен синдром и шизофрения. Корелационното изследване, търсещо връзка между отделните показатели, също показва изразена зависимост между повечето от тях при групата „шизофрения“ и „депресия“.

Категорично изразността на промените са по-подчертани при групата „шизофрения“.

Търсейки различие или сходство в генетичен аспект между БАР, РДР и шизофрения са идентифицирани хромозомни региони, които показват конвергенция или припокриващи се места. Тези констатации в литературата се подкрепят и чрез намерените от нас резултати при изследване експресията на гена *Suclon* в периферна кръв, при боледуващи от депресивен синдром и пациенти с шизофрения. Резултатите показват различие в експресията на гена при „депресивен синдром – релапс“ спрямо групата „контроли“. Подобно съотношение в резултатите е наблюдавано и при групата шизофрения в релапс и ремисия (фигура 5.2).

Съпоставена експресията на ген *Suclon* при астма и шизофрения и астма и депресивен синдром също показват сходство (фигура 5.2).

Сходство съществува и при експресията на BDNF при астма и шизофрения и астма и депресивен синдром (фигура 5.25).

Така намерените взаимоотношения между експресията на гена *Cyclon* и BDNF при шизофрения в релапс и ремисия, и при депресивния синдром спрямо групата „контроли“ и „астма“ подкрепят вижданията за патогенетична близост на шизофренията и депресивния синдром (РДР и БАР).

Вижданията за еднотипност на шизофренията и депресивния синдром се потвърждават и от проведените изследвания на кортизоловият ритъм и разстройствата на съня, т.е. маркери на циркадност. Нашите резултати, както и литературните свързани с шизофренията, са подобни на тези намерени при депресивния синдром.

Друго потвърждение за патогенетична близост на депресивния синдром и шизофрения намираме в проведеното епидемиологично проучване. Резултатите от изследване коморбидността на депресивен синдром и бронхиална астма показваха „отрицателна коморбидност“, подобна на тази при астма и шизофрения, но не така изразена.

Представените резултати от нашето изследване, както и редицата данни в литературата подкрепят идеята на Griesinger за наличие на континуум в патогенезата на шизофрения, БАР, РДР и депресивен епизод.

6. Заключение

На база литературните данни, направените изследвания и изводи би могло да се каже, че шизофренията като комплексен проблем – научен, диагностичен, терапевтичен и социален, е актуална. Актуалността е свързана с неизяснената в достатъчна степен патогенеза. По тази причина все още не е възможно очертаване на нозологичните граници, създаване на категорични обективни диагностични критерии с възможности за лабораторно измерими и повторяеми биохимични, генетични или морфологични маркери, които предоставят доказуеми предиктори и критерии за болестта.

В тази връзка изследванията, фокусирани върху патогенетични аспекти от шизофренията се явяват особено актуални. Те изграждат мост между съществуващите факти и допълват „мозайката“ от познатото до момента.

С най-голяма перспективност вероятно са генетичните изследвания, предвид категорично доказаната наследственост и полигенна зависимост при шизофрения. Паралелно с тях молекулярно-биологичните проучвания разкриват механизми, които обуславят конкретни прояви. На преден план излизат невробиологичните механизми като невронна пролиферация, миграция и диференциация, апоптоза, синаптично ремоделиране и дегенерация. Имунните механизми също са въввлечени в патогенетичния процес. Тяхната роля се свързва не само с присъствието им в ЦНС и най-вече чрез активността на микроглията (аналог на периферните моноцити), но и с периферната им активност. Изследванията показват, че имунната система и мозъкът взаимно си въздействат и регулират. Изграденият „порочен кръг“ между тези две системи вероятно е в основата на поне част от регистрираните мозъчни промени при шизофрения, както и в рецепторната дисфункция, свързана с невротрансмитерните системи. Следователно шизофренията има определена органична компонента в конкретни мозъчни структури и в същото време не е само „мозъчно“ разстройство, а в неговата генеза участват болшинството от основните регулаторни системи в организма.

В нозологичен аспект споменатите методи и патогенетични механизми демонстрират редица общи моменти между шизофрения и БАР и РДР, като от друга страна се появяват и данни за наличие на различни биохимични показатели, които ги разграничават и вероятно биха помогнали за решаване на проблема с нозологичната хомогенност или хетерогенност на шизофренното заболяване не само по клинични, но и по патогенетични критерии.

Относно патогенетичния аспект на шизофренията, интересна е корелацията между прогресиращата мозъчна увреда в хода на болестта, уголеменият трети мозъчен вентрикул и посочената в лите-

ратурата мозъчна дегенерация, особено активна в около 5-годишен период от началото на болестта. В този период се приема, че настъпват най-значими мозъчни увреждания, свързани с апоптозата, клетъчната миграция и синаптичното ремоделиране. Процесът се развива постепенно, на фона на наличните генетични и ситуативни предпоставки и смутена трофична мозъчна функция, предимно свързвана с BDNF, последвана от клетъчна и синаптична дисрегулация. От друга страна, хормоналният дисбаланс, най-вече на половите хормони, кортизола и смутената циркадна активност са вероятна причина или предпоставка за мозъчно увреждане с много вероятна автоимунна генеза. Това схващане се подкрепя и от факта за сравнително високата честота за регистриране на начало на шизофрено заболяване във възраст около 20-25 години, като част от този механизъм е и синаптичният прунинг, настъпващ през пубертета.

Към това, ако бъде добавено наличие на дистрес, се очертава констелация от предпоставки за отключване и/или развитие на шизофрено заболяване. Тази констелация е прекалено вероятен механизъм относно патогенезата на шизофренията.

Описаният сценарий е възможен и за други възрасти със и без промяна в баланса на половите хормони (т.е. участието на пубертета), но с по-изразена активност на някои от посочените компоненти и винаги при генетична предиспозиция.

Така очертаната картина би могла да бъде както тригер, така и „поддържащ“ фактор в патогенезата на шизофренията. Представената патогенетична схема практически е тезата на two hit хипотезата.

Въпреки логичната схематичност на представеното, патогенетичните процеси при шизофрения са твърде сложни и в известна степен противоречиви. Това е така, понеже не е намерен един-единствен ген, отговорен за болестта, и един или няколко конкретни фактора от околната среда.

Генетичната база е разнообразна – полигенна, а и може би свързана с мутации de novo. Трофичната функция – резултат от комплексно въздействие пре и постнатално. Различните „роли“

на трофичните фактори, например IL-3 като проинфламаторен, а в друга ситуация трофичен фактор. Смутена циркадна активност, с последствия нарушена протективна роля на кортикостероидите и паралелно с това наличие на по-високи кортикостероидни нива, които водят при определени условия до дистрофични прояви в нервната тъкан. Често те се съпътстват от глиална активация и/или активация на цялата имунна система с последваща невронална увреда, типична за шизофрениата.

В констатираното понижено ниво на BDNF при шизофрения бе намерена динамика съобразно стадия релапс и ремисия. Тази констатация показва несъмнената роля на BDNF в патогенетичния шизофреничен процес.

Другата направена в проучването констатация, базирана на отрицателната коморбидност на неатопична бронхиална астма и шизофрения, и статистическото различие в бионаличността на BDNF при изследваните групи още веднъж потвърждава предложената по-горе констатация.

Нов аспект, изследван за първи път от нас е този, свързан с експресията на гена *Cyclon*. Имайки предвид „мястото“ му в невроналната, прогениторна и глиална клетка и много вероятните му връзки с доказано свързани с шизофрениата патогенеза гени на *DISC1*, *GSK3 β* , *β -catenin*, *PDEB4* и показаната от нас експресия в хипокампа, както и динамиката в експресията му в периферна кръв при релапс и ремисия го правят изключително вероятен ген, свързан с патогенезата на шизофрениата.

Потвърждение на направените заключения са и литературните данни за ролята на BDNF в невроналната миграция, диференциация и синаптична пластичност. Вероятно и ген *Cyclon* е свързан с тези процеси предвид намереното в настоящото изследване, показващо прогениторната миграция в хипокампа при боледуващи от шизофрения и психично здрави лица.

Друг аспект от изследването ни е активността на имунната система. Както бе посочено, тя е различна в релапс и ремисия. Тази промяна в активността би могла да се свърже с редица фактори, но

и със смутената циркадност, описана при боледуващите от шизофрения, и със смутения кортизолов баланс – като ритъм и ниво.

Активността на имунната система би могла да се свърже и с намерената от нас динамика в експресията на ген *Cyclon* в релапс и ремисия на шизофренията и активността на Fas рецептора при активирани Т-лимфоцити. С Fas рецепторната активност е свързана клетъчната смърт на активираните Т-лимфоцити. При понижена Fas рецепторна активност веднъж активирани имунните клетки „атакуват“ и собствената тъкан, т.е. това е предпоставка за развитие на автоимунно заболяване. Ниското ниво на експресия на ген *Cyclon* е свързано с намалена клетъчна смърт на активираните Т лимфоцити. Това е елемент от Т-клетъчна активност, вероятно е свързана с автоимунните процеси и по-специално тези при шизофрения. За тях се предполага, че са важно патогенетично звено, тъй като автоимунната активност стои в основата на намерената в мозъка на шизофреничен пациент глиоза в субгранулатния слой на гирус дентатус и изцяло „се вписва“ в дегенеративната теория за патогенезата на шизофренията.

Също с променена имунна активност би могло да се свържат морфологичните промени в мозъчни структури, посочени като ключови за шизофренията. Евентуалният механизъм, предложен от някои автори, е „пробив“ на хематоенцефалната бариера относно имунни/автоимунни агенти, активиране на микроглията, промяна в апоптозния процес, увреда на синаптичната свързаност, активиране на ензими, свързани с медиаторно-рецепторната функция.

Към така представеното виждане за патогенезата на шизофреничното заболяване би следвало да се представи и често обсъжданата роля на стреса. Въпреки че в литературата има данни за отключване на болестта след „сериозен дистрес“, такива данни ние не намерихме, но вероятно механизмът на „относителен дистрес“ съществува. При отключване и протичане на болестта при „намалена“ протективна роля на трофните фактори в мозъка, съпътстваща „нетипична мозъчна дегенерация“, водеща до невронално ремоделиране и „обедняване“ на синаптичните връзки, на фона на

активиран възпалителен процес, смутена циркадност и кортизолов дисбаланс, всичко това би отключило или би „поддържало“ протичането на клетъчни процеси, свързани с шизофренната болест.

Освен описаното, като вероятен патогенетичен механизъм при шизофренията и намерено при пациентите боледуващи от БАР и/или РДР е доказателство и в посока „обща или сходна патогенетична платформа“ за шизофренията, и посочените по-горе афективни заболявания. Това подкрепя отдавна обсъжданата в литературата теза за патогенетичен континуум между тях.

Намереното в проучването, свързано с експресията на гена *Cyclon*, *BDNF*, биологичната циркадност, регистрираната глиоза в хипокампа, смутената миграция на прогениторите, разстроена имунна активност и доказаната им свързаност с редица процеси, типични за шизофренията, както и в известен аспект с депресивния синдром, хвърлят нова светлина и мост между редица теории (генетична, на невроналното развитие, дегенеративната, тази свързана с ролята на стреса, рецепторна и пр.), обясняващи различни аспекти от патогенезата на шизофренията.

7. Изводи

Въз основа на поставените цел и задачи биха могли да се направят следните изводи:

1. Болестността от соматични заболявания при пациенти с шизофренията е по-висока спрямо средната за страната, а непосредствената причина за смърт най-често е свързана с боледуване от туберкулоза и съдово-мозъчна болест.
2. Коморбидността между шизофренията, от една страна, и астма от друга, ревматоиден артрит, карцином, както и кръстосаната коморбидност между шизофренията, астма, ревматоиден артрит и карцином е отрицателна. Най-изразена негативна корелация се установява между астма и шизофренията.
3. Коморбидността между астма и депресивен синдром, и астма и маниен епизод е отрицателна.

4. *Болестността от шизофрения, астма, ревматоиден артрит и карцином при родственици на боледуващи от шизофрения е по-висока от средната за страната.
5. Установяват се следните морфологични промени в ЦНС при изследваните пациенти, боледуващи от шизофрения:
 - Уголемен трети вентрикул (установено с ЯМР изследване);
 - Корелация на показателите за „корови промени“ при някои от проучените параметри с показателя *диагноза* (ЯМР изследване);
 - ** Показателят *възраст* не показва статистически достоверно влияние върху изразността на атрофичните мозъчни промени (установено с ЯМР изследване);
 - Наличие на дегенеративни глобули, микроглиална пролиферация и дегенеративни промени в пирамидалните клетки (установено с патологоанатомично изследване);
 - Наличие на глиоза в субгранулатната зона на *gyrus dentatus* (установено с хистохимично изследване).
6. При групата пациенти с депресивен синдром, ЯМР изследването показва промени, аналогични на регистрираните при пациенти с шизофрения, но по-слабо изразени.
7. Експресията на ген *Cyclon/CCD86* в периферна кръв е:
 - Статистически значимо по-висока при релапс спрямо ремисия при пациенти с шизофрения и депресивен синдром;
 - Статистически значимо по-висока при пациенти с шизофрения с „предимно позитивна симптоматика“ спрямо тези с „предимно негативна симптоматика“ в период на релапс;
 - Най-ниска при групата пациенти с астма, следвана от групата пациенти с шизофрения, контролна група (психично здрави лица) и група пациенти с депресивен синдром.

8. Експресията на ген *Cyclon/CCD86* в мозъка на примати и човешки мозък се открива в невронните и глиални клетки.
 - В човешки мозък експресията е по-слабо изразена при пациентите, боледуващи от шизофрения, отколкото при психично здравите лица.
 - В дялящи се клетки (вероятно и прогениторни) не се отчита експресия на ген *Cyclon* (вероятно активацията му настъпва във функционално зрялата клетка).
9. Експресията на *BDNF* в периферна кръв е:
 - Различна между периодите на релапс спрямо ремисия при групите шизофрения и депресивен синдром. Наблюдаваната разлика е статистически недостоверна;
 - Най-висока при групата пациенти с астма, следвана от тази на контролната група (психично здрави лица), депресивен синдром и шизофрения;
 - Показва корелационна зависимост между стойностите на *BDNF* при групите пациенти с шизофрения в период на релапс и ремисия, групите пациенти с шизофрения и с астма, както и групата пациенти с депресивен синдром и контролната група (психично здрави лица).
10. Периферната имунна активност при шизофрения показва различие при някои от изследваните показатели в период на релапс спрямо период на ремисия и контролна група. Налице е статистически значима корелационна зависимост между изследваните показатели на имунитета в ремисия и експресията на ген *Cyclon*.
11. Циркадността при шизофрения показва белези на инверсия, а кортизоловата бионаличност е по-висока от нормата. Установява се корелационна зависимост между стойностите на кортизола и експресията на ген *Cyclon*.
12. Качеството на живот и „отрицателните“ жизнени събития със стресорно действие не оказват значимо влияние в отключването и протичането на шизофренията.

13. Съществуват категорични белези за патогенетична връзка между шизофренното заболяване и депресивния синдром, намерени чрез:
- Еднотипност в експресията на гена *Cyclon*;
 - Еднотипност в експресията на *BDNF*;
 - Сходни ЯМР резултати по отношение на коровите промени;
 - Еднотипност в разстройствата на циркадността (от проведеното изследване и литературните данни);
 - Епидемиологичното изследване показва подобна отрицателна корелация на депресивния синдром и шизофрения с автоимунни заболявания.
14. Чрез анализирани на литературните данни, свързани с шизофренията и резултатите от нашето изследване (експресия на ген *Cyclon*, динамика в бионаличността на *BDNF*, разстроена имунна / автоимунна активност, смутена циркадност, абнормно кортизолово ниво и ритъм, релативна роля на стреса, повлияващ невроналната функция) се представя приемливо обяснение за разстроената невронна пластичност, прогениторна миграция, патологична апоптоза, глиална активност и формираните морфологични мозъчни промени, характерни за шизофренията в типичните за болестта области на ЦНС. Смутеното невронално развитие при посочените условия и наличие на „генетични дадености“ при дисбаланс на половите хормони (през пубертета), активирани на имунната/автоимунна функция повлияват синаптичното моделиране и допринасят и обясняват по-честото „отключване“ във възрастовия интервал 20-25-30 г. Представеното обяснява и редица патогенетични елементи, свързани с началото и развитието на болестта в други възрастови периоди. Наличната пряка връзка между експресията на ген *Cyclon* и активността на *Fas*-рецептора в голяма степен обяснява „взаимоотношенията“ между шизофренията и автоимунните заболявания, като очертава един от вероятните

пътища за патогенезата на тези заболявания. Представеното хвърля мост между редица теории, търсещи патогенетични механизми за отключване и развитие на шизофренното заболяване. Посочените изводи не са категорични поради някои методологични причини, но всички са конкордантни на изследвания, представени в литературата.

** въпреки че е налице статистическа достоверност, изводите не са категорични, тъй като данните за „болестност сред родственици на боледуващи от шизофрения“ са анамнестични (извод № 4).*

*** въпреки че е налице статистическа достоверност, изводът не е категоричен поради малкия брой изследвани с ЯМР от групата „до 16 год.“ (извод № 5).*

8. Справка за очаквани приноси

8.1. Фундаментални приноси

- За първи път е изследвана експресията на ген *Cyclon/ CCD86* при боледуващи от шизофрения пациенти.
- За първи път е доказана връзка между активността на шизофрениния процес и активността на ген *Cyclon/ CCD86*.
- За първи път е посочено наличие на отрицателна корелация между неатоличната бронхиална астма и шизофренията.
- Формулирана и потвърдена в значителна степен е хипотезата за подчертана отрицателна корелация между бронхиална астма и шизофрения.
- За първи път е изследвана експресията на ген *Cyclon/ CCD86* при депресивен епизод, умерено тежък и тежък с психотични симптоми, както и депресивен епизод в рамките на БАР и РДР.
- За първи път е изследвана експресията на ген *Cyclon/ CCD86* при боледуващи от неатолична бронхиална астма.
- За първи път чрез експресията на ген *Cyclon/ CCD86* е намерено потвърждение за еднотипни елементи от патогенетичната верига на депресивен епизод, умерено тежък и тежък с психотични симптоми, както и депресивен епизод в рамките на БАР и РДР.
- Формулирана е хипотеза относно причините за отключване на шизофрениното заболяване във възрастовия диапазон 20-25-30 г., в който се диагностицира най-често.
- За първи път е показана експресията на ген *Cyclon/ CCD86* при депресивен епизод, умерен и тежък с психотични симптоми, депресивен епизод при БАР и РДР.
- За първи път е формулирана хипотеза за патогенезата на шизофренията и депресивен епизод, умерен и тежък с психотични симптоми, депресивен синдром, БАР и РДР при участие на ген *Cyclon/ CCD86* в патогенетичния процес.

- За първи път е изследвана експресията на ген *Cyclon/CCD86* при неатопична бронхиална астма.

8.2. Практически

- Изследване на експресията на ген *Cyclon/CCD86* в кръвта като диагностичен белег за евентуален шизофреничен процес.
- Изследване на експресията на ген *Cyclon/CCD86* като конкордантна на клиничната картина и фазите на шизофренията.
- Представена е констелация от лабораторни и образни изследвания (експресия на ген *Cyclon/CCD86*, BDNF, смутена кортизолова секреция като бионаличност и ритъм, дисбалансирана имунна/ автоимунна активност, ЯМР данни за уголемен III вентрикул и белези на корова атрофия), които биха могли да бъдат както белези, така и предиктори на болестта.
- Представен е списък на стресорните/ дисстресорните жизнени събития при болните с шизофрениа при настоящите социално-икономически условия у нас.
- Намерена е отрицателна кръстосана корелация между боледуващи от шизофрениа, астма, ревматоиден артрит и карцином.

8.3. Потвърдителен характер

- Потвърдена е отрицателната корелация на шизофрениа с ревматоиден артрит и някои видове карцином.
- Потвърдено е наличието на възпалително и свързаните с него дегенеративни процеси и смутено невронално развитие при патогенезата на шизофренията.
- Потвърдено е разстройството на циркадния ритъм при пациенти с шизофрениа и болни с депресивен синдром.

- Потвърдено е наличието на разстройство в кортизоловата секреция по отношение количество и ритъм при пациенти с шизофрения.
- Потвърдено е наличието на мозъчни рентгено-морфологични различия между психично здрави лица и групите пациенти, боледуващи от шизофрения и от депресивен синдром.
- Потвърдена е промяната в активността на някои показатели на имунитета при пациенти, боледуващи от шизофрения, която е функция от фазата на болестта.
- Потвърдена е по-ниската бионаличност на BDNF при шизофрено болни.
- Потвърдена е по-високата бионаличност на BDNF при пациенти с астма.
- Потвърдено е наличието на смутена биологична циркадност при шизофрения.
- Потвърдени са елементи от „възпалителната“ теория, „дегенеративната“ теорията, теорията за „невронално развитие“ и тази за „ролята на стреса“ в генезата на шизофренията.
- Потвърдена е по-високата болестност от соматични заболявания при пациенти, боледуващи от шизофрения спрямо средната за страната.
- Потвърдени са мястото и ролята на показателите „Качество на живот“ и „Стресорни/ дистресорни“ събития в патогенезата на шизофренията.

Публикации по темата: „Някои патогенетични аспекти на параноидната шизофрения“

1. Шишков, Р., Е. Георгиев, К. Чернев. Взаимоотношения между някои психосоматични заболявания и шизофренната психоза. Известия на съюза на учените – Варна, серия „Медицина и екология“, 2002 (2)/ 2003 (1), 16-18.
2. Шишков, Р., Д. Петкова, Д. Хрусаров. Кортизолов ритъм и разстройство на съня при пациенти страдащи от шизофрения. Известия на съюза на учените – Варна, серия „Медицина и екология“, 2009, 14 (2), 58-62.
3. Шишков, Р., А. Георгиева, М. Георгиева. Рядка соматична коморбидност на страдащи от шизофрения. Известия на съюза на учените – Варна, серия „Медицина и екология“, 2009, 14 (2), 55-57.
4. Шишков, Р. Някои психосоматични аспекти в патогенезата на шизофренията. Сп. Психосоматична медицина. 2009, 17(2), 5-9.
5. Шишков, Р., Е. Софтова, М. Георгиева. Соматична болест и причини за смърт при хоспитализирани пациенти с шизофрения. Сп. „Психиатрия“, 2010, 9 (1), 29-32.
6. Шишков, Р., Т. Червенков. Моменти от патогенезата на шизофренната психоза – ролята на IL-3 и ген Cyslone. Рецептор, 2011, 7, (1), 9-14.
7. Шишков, Р., Т. Червенков. BDNF при шизофрения. Folia Psychiatrica. 2011, 2 (4), 22-27.
8. Шишков, Р., Л. Николова. Качество на живот и жизнени събития със стресорно действие при страдащи от шизофрения. Folia Psychiatrica. 2011, 2 (4), 28-34.
9. Shishkov R., T. Chervenkov. BDNF Levels in Blood of Schizophrenia and Bipolar Affective Disorder – Depressive Episode Patients. Archives of the Balkan Medical Union. 2011. 46, (4), 1, 80-84.

10. Chervenkov T., R. Shishkov, D. Dzhenkov, A. B. Tonchev. Expression of Cyclon/CCDC86 in the hippocampus of humans with schizophrenia. Archives of the Balkan Medical Union. 2011, 46, (4), 1, 85-88.
11. Chervenkov T., R. Shishkov. Schizophrenia and Inflammation: A Minireview. Archives of the Balkan Medical Union. 2011, 46, (4), 1, 89-93.
12. Chervenkov T, Shishkov R. Aspects of Cyclon and BDNF Gene Expression in Schizophrenia Patients. J of IMAB. 2012, 18 (3), 276-279.
13. Shishkov R, Georgieva M, Nikolova L. Life events with stressful effect on patients with schizophrenia according to the sex and age. J of IMAB. 2012, 18 (3), 280-283.
14. Шишков Р., Л. Николова, М. Георгиева. Влиянието на възрастта и давността на шизофренното заболяване върху оценката на жизнени събития със стресорно действие. Клинична и консултативна психология. 2012, 2 (12), 2012, 47-51.
15. Shishkov R., T. Chervenkov. BDNF – a Probable Common Pathogenetic Factor for Schizophrenia and Depressive Episode. Scripta Scientifica Medica, 2012, 44 (2) (под печат).

Във връзка с представената дисертационна работа изказвам своята благодарност на д-р Трифон Червенков, доц. д-р Антон Тончев, дмн, доц. д-р Диана Петкова, дм, доц. д-р Екатерина Софтова, доц. д-р Людмила Ангелова, д-р Лилия Николова, д-р Евгени Георгиев, Мила Георгиева за ползотворните дискусии, свързани с обсъждане на намерените резултати, както и в изпълнение на някои от поставените в работата задачи.

Представеният труд изцяло е финансиран от дисертанта.