



**GUVERNUL ROMANIEI
MINISTERUL EDUCATIEI, CERCETARII SI TINERETULUI**

Programul CEEA / VIASAN / Contract nr.64/2005

**Markeri endofenotipici și susceptibilitatea
genetică în schizofrenie (SCHIZOFENOTIP)**

**Bugetul proiectului: 920.000 lei
perioada de derulare: octombrie 2005 - noiembrie 2007**

Coordonator

- Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Director de proiect Prof. Dr. Doina Cosman

Parteneri

- Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, Responsabil de proiect Prof dr. Octavian Popescu
- Institutul de Sanatate Publica „Prof. Dr. Iuliu Moldovan” Cluj-Napoca, Responsabil de proiect CSI dr. Mariana Vlad
- INCDO-INOE 2000, filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică, Cluj-Napoca, Responsabil de proiect Prof.dr. Emil Cordoș

Obiectiv general

Proiectul își propune spre realizare un studiu clinic, bine direcționat, înspre o categorie aparte de pacienți psihiatrici - cei cu shizofrenie, care urmărește caracterizarea completă a unei serii de factorii implicați în etiopatogenia acesteia: profilul homocisteinei plasmatică, în legătură cu activitatea paraoxonazei 1 și stresul oxidativ; completate de explorarea polimorfismelor genetice, toate acestea în contextul urmăririi modului de viață (factori de stres din mediu ambiant, fumatul, alcoolul, sedentarismul, un regim alimentar nesănătos).

Obiective specifice

- studii privind homocisteinemia, paraoxonaza, polimorfismul MTHFR și gena PON1, stresul oxidativ
- elaborare model-formulare (chestionar, protocol de lucru, forma de consimțământ, specificații soft pentru baza de date); evidențierea datelor genomice, rezultate experimentări
- lot de pacienți și lot de control, rezultate - evaluare neuroimagistică, psihologică și biochimică; realizare baza de date
- evaluare lot de pacienți supus tratamentului suplimentar cu folat, rezultate tablou clinic și psihiatric; sistem informatic centralizat al datelor
- evaluare finală a pacienților și realizare studiu clinic cu rezultatele obținute
- diseminare pe scară largă prin comunicare și publicare, organizare masă rotundă, pagina Web, CD de prezentare.

Etapa 1: studii și documente privind:

- ▶ **schizofrenia, markerii endofenotipici și genetici, evaluarea tipului și volumului de date genomice, elaborare formulare în vederea monitorizării pacienților și întocmirea specificației pentru baza de date**
- ▶ **experimente preliminare în vederea evidentierii polimorfismelor genetice (izolarea ADN-lui genomic uman, testarea condițiilor optime pentru amplificarea prin PCR a fragmentelor de gene urmărite MTHFR și PON1).**

Etapa a 2-a:

- ▶ **realizarea lotului de subiecți prin selectarea subiecților (lot de pacienți și lot de control), evaluarea, examinarea, prelevarea și prelucrarea probe biologice, completarea formei de consimțământ**
- ▶ **genotiparea și identificarea mutațiilor genetice prin metode specifice (hărți de restricție, secvențare)**
- ▶ **realizarea bazei de date**
- ▶ **administrarea tratamentului antipsihotic la o jumătate din lotul de pacienții schizofreni și la cealaltă jumătate administrarea suplimentară a cofactorilor enzimatici asociată tratamentului psihiatric.**

Etapa a 3-a:

- ▶ **continuarea tratamentului în cele două variante la pacienții selectați**
- ▶ **evaluarea genetică- genotiparea și identificarea mutațiilor genetice prin metode specifice (hărți de restricție, secvențare)**
- ▶ **realizarea bazei de date evaluarea finală a lotului după tratament, implementarea rezultatelor în baza de date**
- ▶ **centralizarea chestionarelor**
- ▶ **evidențierea factorilor de susceptibilitate genetică**
- ▶ **influența factorilor de mediu asupra markerilor în desfășurarea evolutivă a bolii**

Etapa a 4-a este destinată diseminării informațiilor.

- ▶ **organizare o masă rotundă, în scopul diseminării pe scară largă a informațiilor.**
- ▶ **Pe parcursul întregului proiect este prevăzută publicarea rezultatelor obținute atât în reviste din țară cât și din străinătate precum și participarea la manifestări științifice de profil din țară și din străinătate.**
- ▶ **Se realizează o pagină web dedicată proiectului și CD de prezentare cu rezultatele obținute**

Evaluarea psihopatologică

În evaluarea pacienților s-au folosit scale clinice ce au înregistrat aspectele psihopatologice ale schizofreniei la o manieră analitică precum PANSS și scale clinice ce au cuantificat ansamblul fenomenelor psihopatologice din schizofrenie la modul global precum scalele EGF „Evaluarea Globală a Funcționării” și CGI „Clinical Global Impression”

Fig. 1. Scorurile subscalei negative a PANSS în funcție de forma clinică de schizofrenie

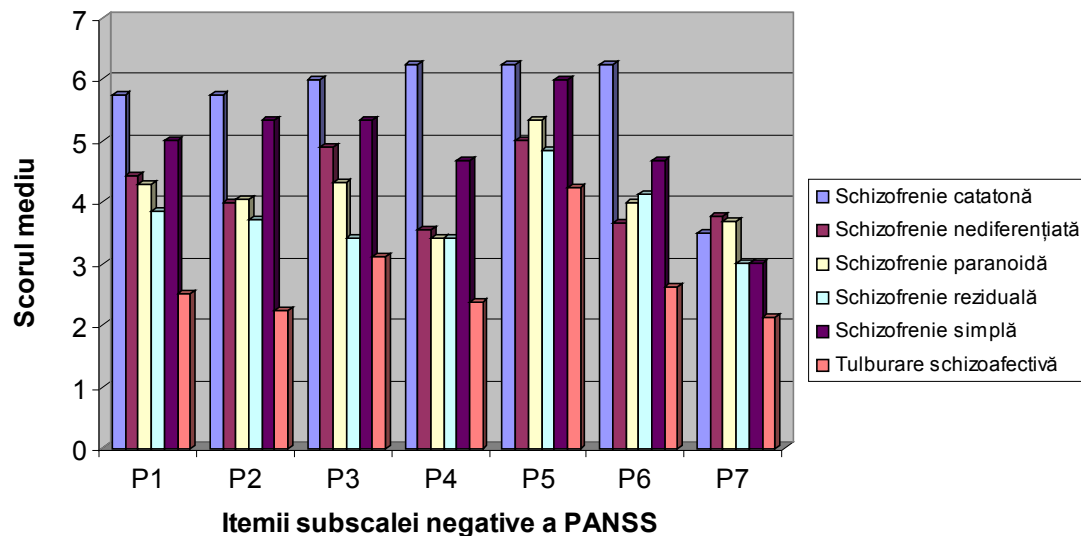
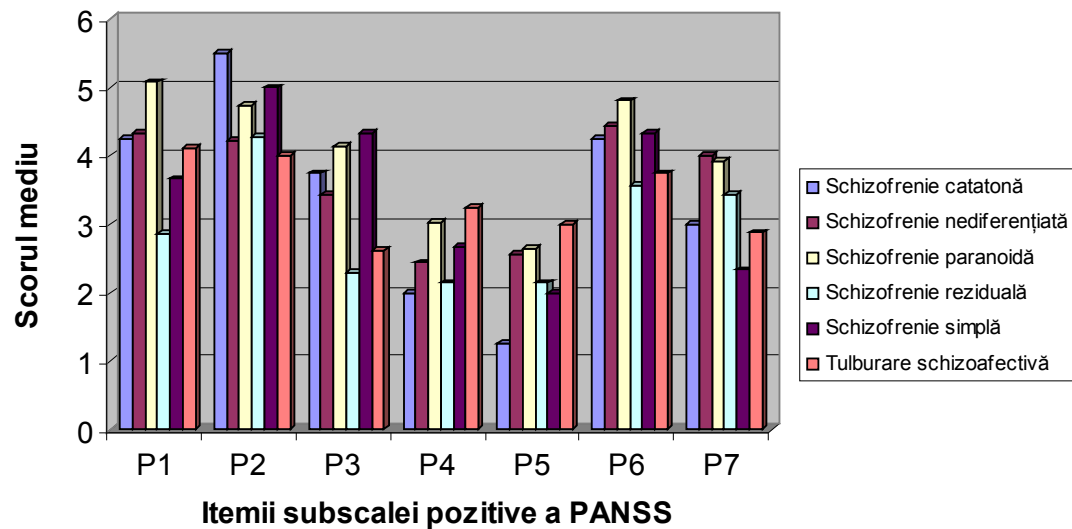
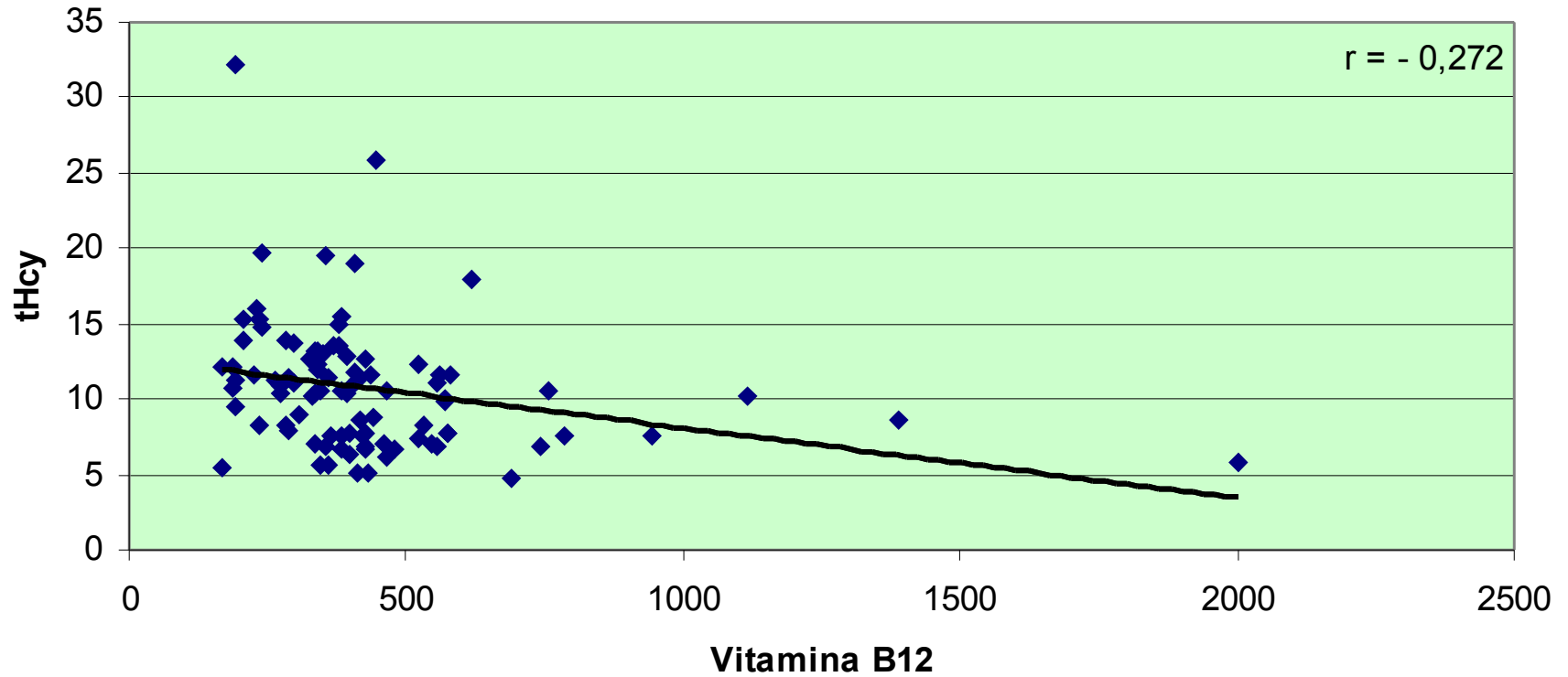


Fig. 2. Scorurile subscalei pozitive a PANSS în funcție de forma clinică de schizofrenie

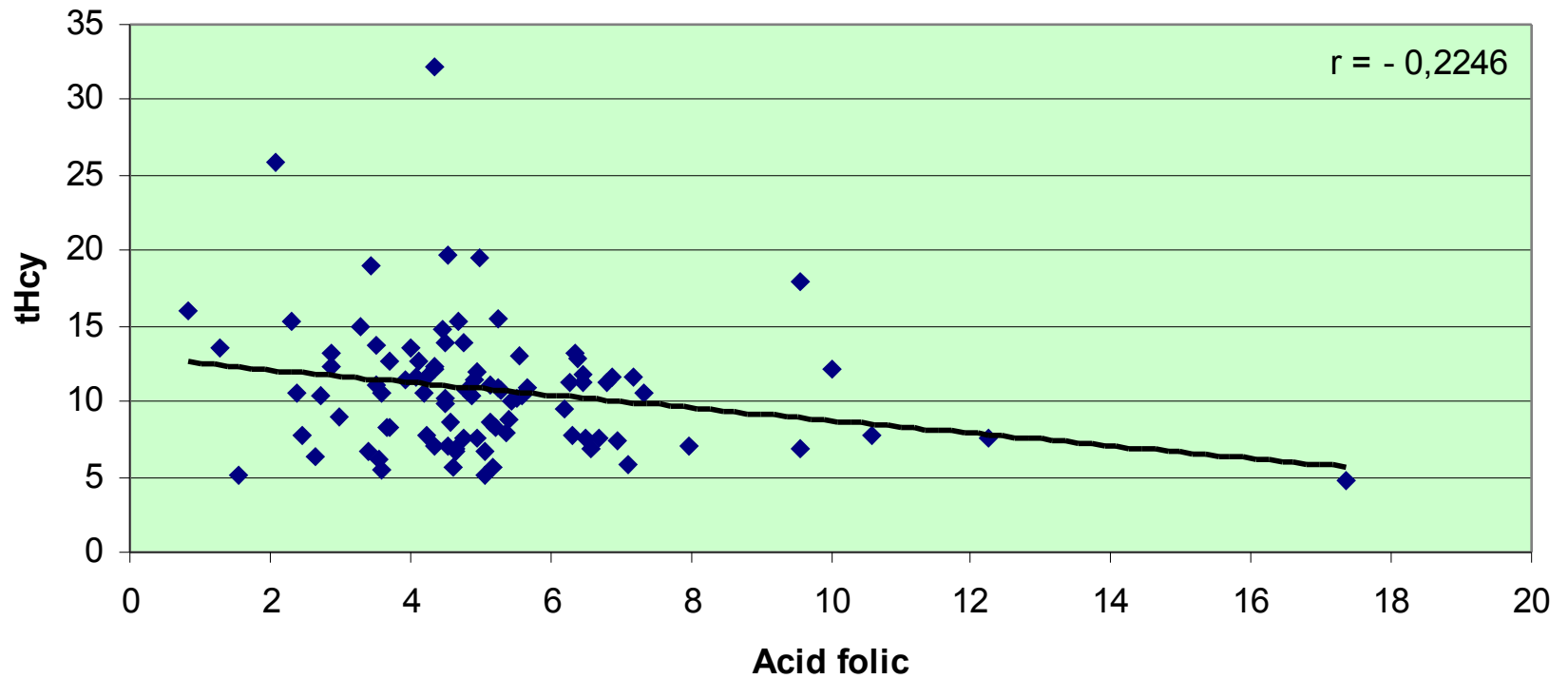


- Prin evaluarea neurocognitivă din schizofrenie, realizată prin bateria de teste interactive din bateria de teste CogTest s-au identificat trăsături neurobiologice specifice schizofreniei care se pot relaționa cu expresia unor gene candidat, ca de exemplu: gena COMT, gena pentru neuropeptidul Y, gena galaninei, etc.
- Studiul de față s-a axat pe evidențierea unor markeri de vulnerabilitate pentru schizofrenie, reprezentați prin anumite endofenotipuri precum: memoria de lucru auditivă, memoria spațială, funcțiile executive (decizia, achiziționarea de noi strategii de rezolvare de probleme), timpul de reacție, controlul și autocontrolul, învățarea implicită.
- Testele, din bateria CogTest care au fost folosite pentru evaluarea funcțiilor cognitive de bază au fost: WLM – Word List Memory, FMT – Face Memory Test, SWM – Spatial Working Memory, STDT – Strategic Target Detection Test, SST – Set Shifting Test și GoNoGo.

Corelatia tHcy – Vitamina B12



Corelatia tHcy – Acid folic



Corelatia tHcy - enzime

r	tHcy
SOD	- 0,0753
GPx	0,0749
PON1 ar.ase	0,1514
PON1 p.ase	0,0354

- Nivelul homocisteinemieii schizofrenicilor nu difera semnificativ de cel al subiectilor sanatosi
- Exista totusi subiecti schizofrenici cu hiperhomocisteinemie asociata cu un nivel scazut al folatului si/sau al vitaminei B12
- Nivelul folatului si vitaminei B12 la schizofrenici nu difera semnificativ de cel al grupului de control, totusi se remarca faptul ca la peste 30% dintre schizofrenici nivelul acestor vitamine este situat la limita inferioara a normalului
- La schizofrenici activitatea GPx este nemodificata dar activitatea SOD este crescuta, acest fapt reprezentand un raspuns adaptativ la cresterea productiei speciilor reactive ale oxigenului

Polimorfismul genei *MTHFR* pentru poziția 677

	LOT CONTROL			LOT PACIENTI		
GENOTIP	Normal	Modificat		Normal	Modificat	
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Numar	23	7	5	13	27	6
%	65,7	20,0	14,3	28,3	58,7	13,0
%	65,7	34,3		28,3	71,7	

Concluzie:

Diferențele între lotul de control și lotul de pacienți sunt semnificative.

Polimorfismul genei *MTHFR* pentru poziția 1298

	LOT CONTROL			LOT PACIENTI		
GENOTIP	Normal	Modificat		Normal	Modificat	
	AA	AC	CC	AA	AC	CC
Numar	17	20	3	24	13	5
%	42,5	50,0	7,5	57,1	31,0	11,9
%	42,5	57,5		57,1	42,9	

Concluzie:

Diferențele între lotul de control și lotul de pacienți sunt nesemnificative.

Polimorfismul genei *PON-1* pentru poziția 575

	LOT CONTROL			LOT PACIENTI		
GENOTIP	Normal	Modificat		Normal	Modificat	
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Numar	9	4	3	5	6	7
%	56,3	25,0	18,7	27,8	33,3	38,9
%	56,3	43,7		27,8	72,2	

Concluzie:

Diferențele între lotul de control și lotul de pacienți sunt semnificative.

Polimorfismul genei *MTHFR* pentru poziția 677

	LOT CONTROL			LOT PACIENTI		
GENOTIP	Normal	Modificat		Normal	Modificat	
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Numar	13	6	0	15	10	2
%	68,4	31,6	0	55,6	37,0	7,4
%	68,4	31,6		55,6	44,4	

Concluzie:

Diferențele între lotul de control și lotul de pacienți sunt nesemnificative.

Macro și micronutrienți implicați în desfășurarea evolutivă a schizofreniei

Fig. 1. Distribuția pacienților cu schizofrenie în raport cu sexul și mediul lor de proveniență (N = 45)

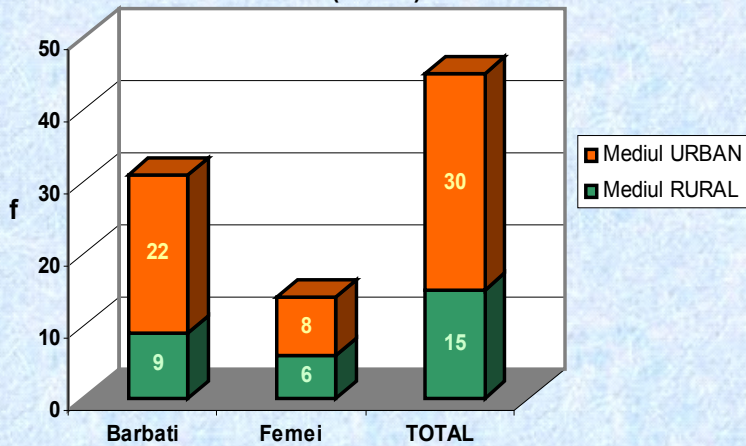
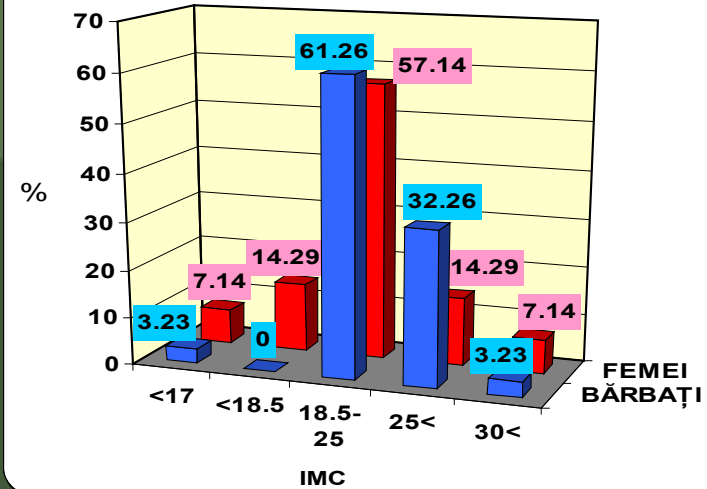
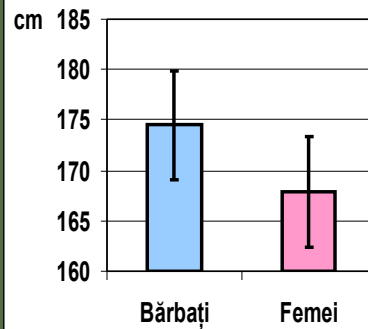


Fig. 3. Distribuția lotului de pacienți cu schizofrenie în raport cu indicele lor de masă corporală (IMC) - în %



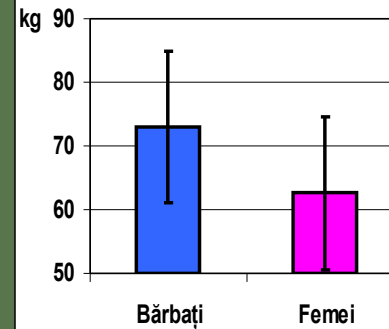
Înălțime

(media ± abaterea standard)



Greutate

(media ± abaterea standard)



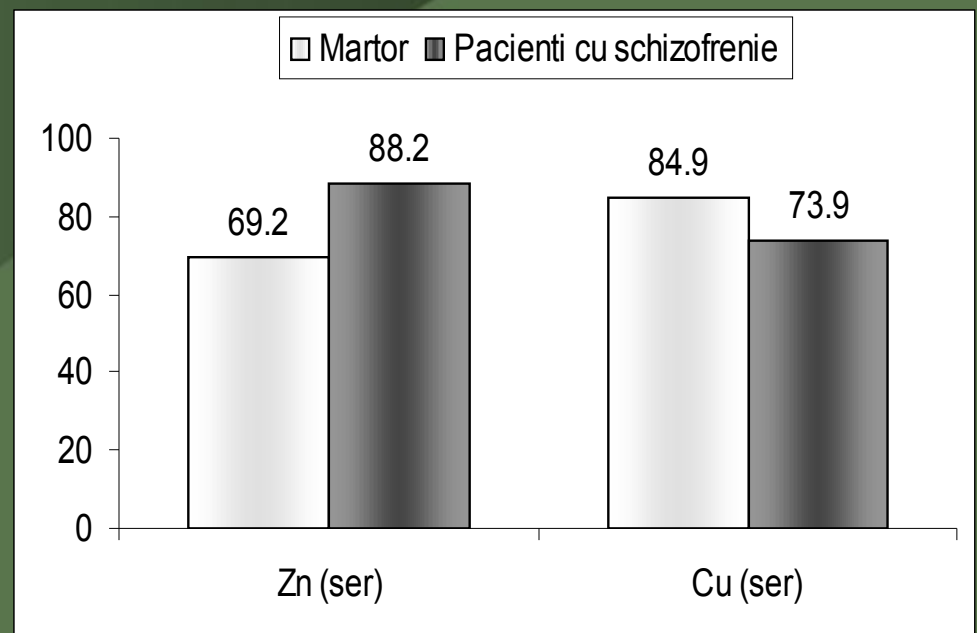
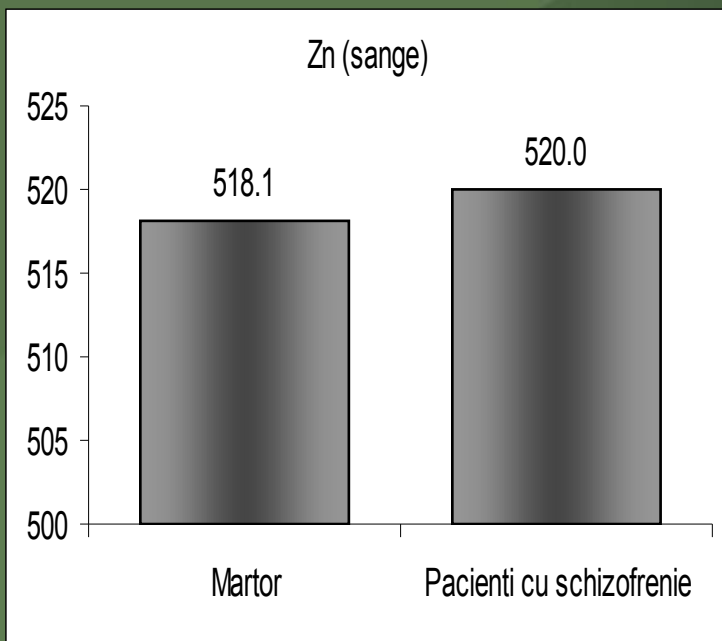
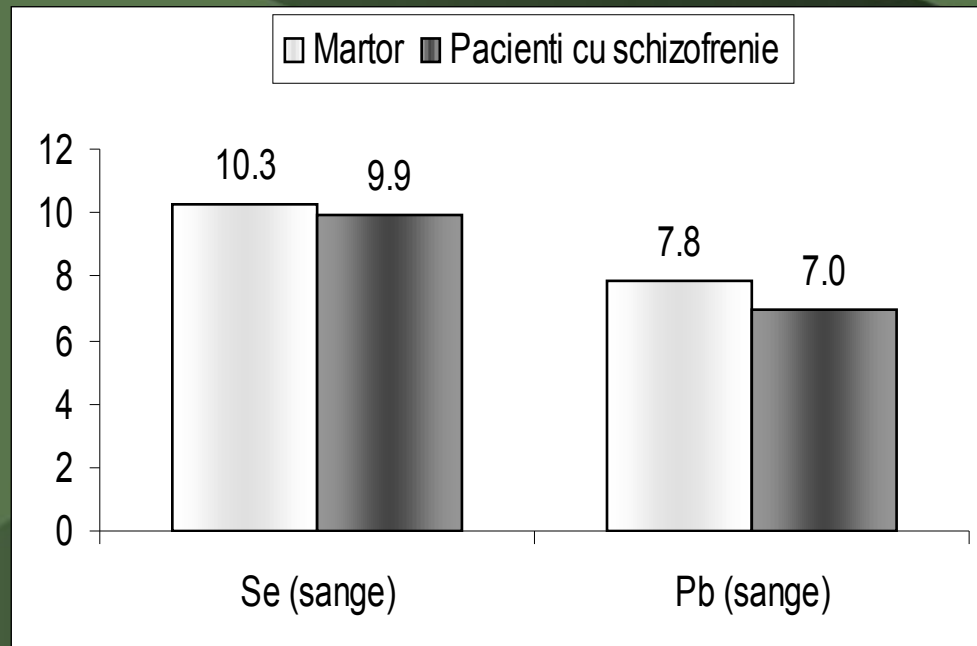
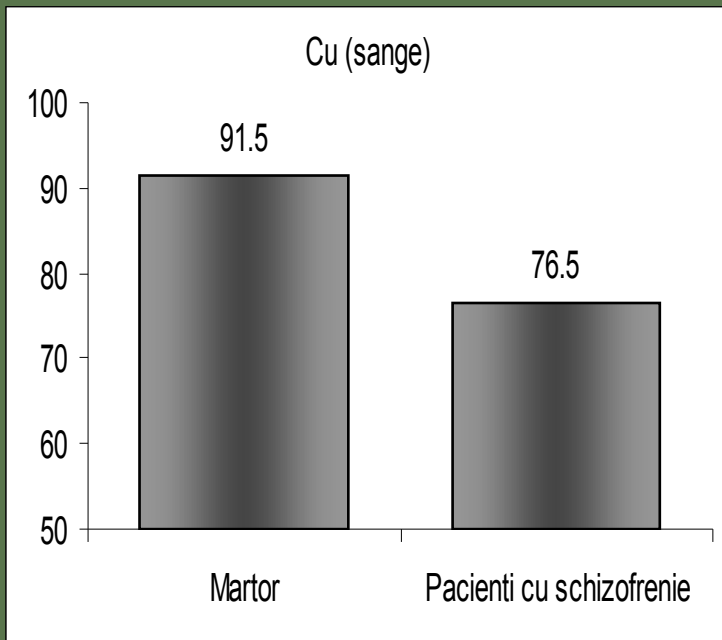


Fig. 9. Consumul de macronutrienți la lotul total de pacienți (în g/24h)

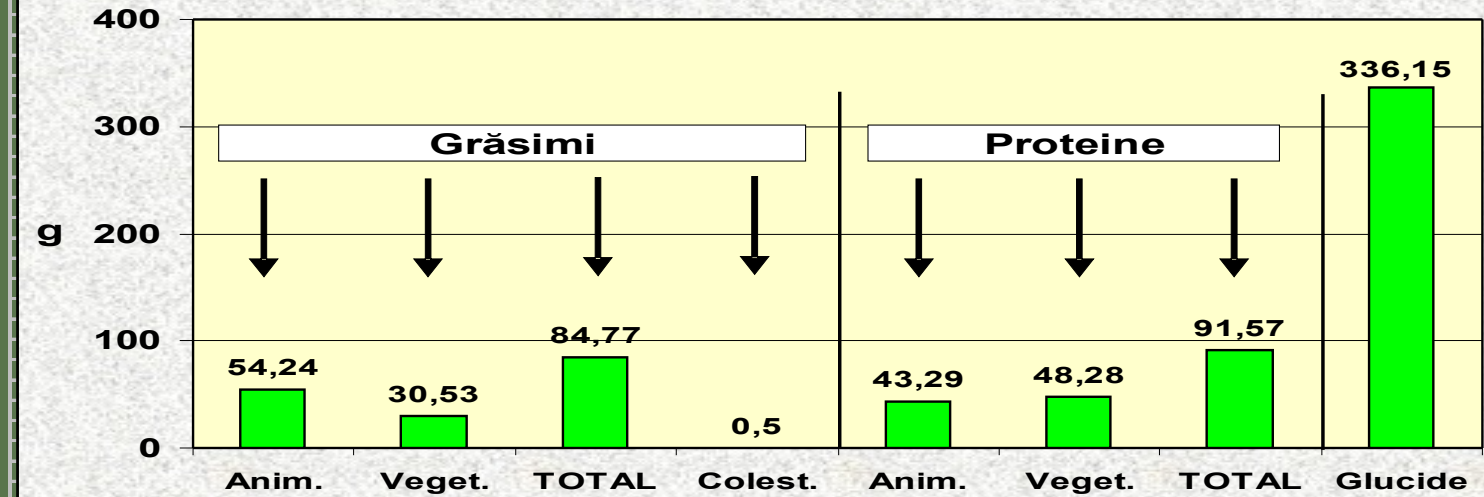


Fig. 19. Aportul mediu de săruri minerale din rația alimentară la lotul de pacienți cu schizofrenie (mg/24 h)

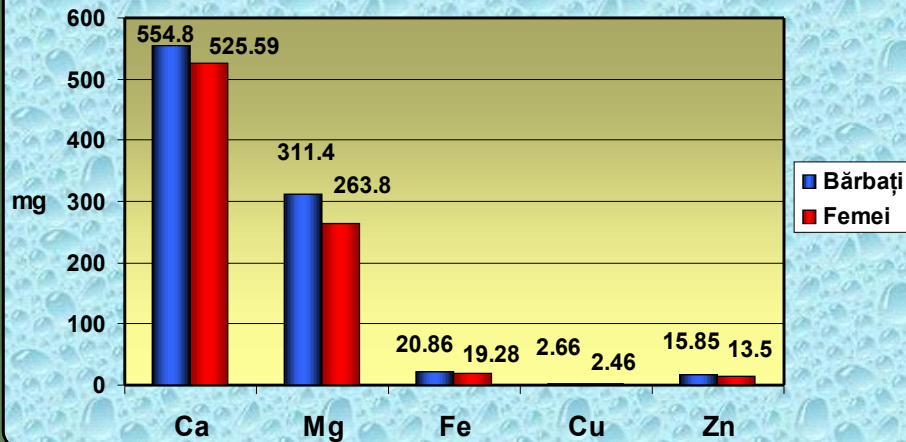
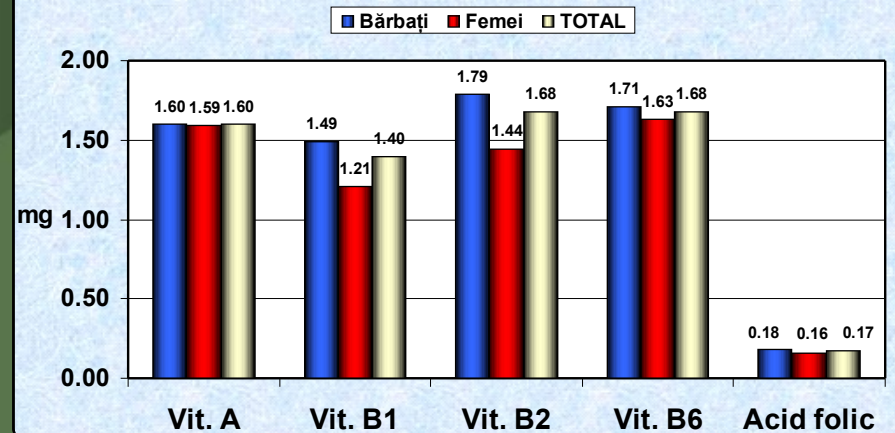


Fig. 23. Aportul mediu de vitamine din rația alimentară a lotului de pacienți cu schizofrenie (mg/24 h)



Factori nongenetici implicați în etiopatogenia schizofreniei

Date socio-demografice

- În lotul experimental mai mult de șase pacienți din zece provin din mediul urban.
- Raportul bărbați/femei a fost de 2,2/1.
- Opt din zece pacienți sunt necăsătoriți.
- Patru din zece pacienți au studii superioare și aproximativ șapte din zece erau pensionați la momentul investigației.

Starea de sănătate a mamei în perioada sarcinii

- ❖ Doi din zece pacienți provin din **sarcini cu disgravidie**.
- ❖ Unul din zece pacienți a avut **complicații la naștere** (asfixie, incompatibilitate Rh, prematuritate severă etc.)
- ❖ Unul din zece pacienți provine din sarcină pe parcursul căreia mama a prezentat **infecții virusale sau anemie hipocromă**.
- ❖ Mai mult de unul din zece mame **au utilizat diuretice** în perioada sarcinii.
- ❖ Mai mult de șapte din zece mame ale pacienților au **fumat peste douăzeci țigări/zi** în perioada sarcinii, iar în lotul martor opt din zece au fumat mai puțin de cinci țigări/ zi în perioada sarcinii.
- ❖ Aproximativ trei din zece pacienți provin din sarcini pe parcursul cărora mamele **au locuit în zone poluate** (în special cu plumb) și mai puțin de unul din zece, în lotul martor.

Starea de sănătate a subiecților investigați în perioada copilăriei (1-3 ani)

- Aproximativ **patru pacienți din zece** au avut frecvente infecții virusale și aproximativ **doi din zece subiecți** în lotul martor.
- Aproximativ **doi din zece pacienți** au avut anemie hipocromă și mai puțin de **unul din zece** subiecți în lotul martor.
- **Mai mult de doi din zece pacienți** au locuit în zone poluate cu plumb și **mai puțin de unul din zece subiecți** din lotul martor; **cinci din zece pacienți** au fost expuși intens la fumul de țigară, (părinții fumau mai mult de douăzeci țigări/ zi).
- Aproximativ **doi din zece pacienți** au fost privați de îngrijirea parentală în perioada 1-3 ani.

Perioada adolescenței

- ❖ Patru din zece pacienți **au fumat** în perioada adolescenței între 10-20 țigări /zi și mai puțin de trei din zece subiecți din lotul martor au fumat aproximativ 5-10 țigări/ zi.
- ❖ Cinci din zece pacienți **au început să fumeze între 12-15 ani**, în timp ce fumătorii din lotul martor au început să fumeze, marea majoritate, după vârsta de cincisprezece ani.
- ❖ Mai mult de patru din zece pacienți **au consumat frecvent alcool** în adolescență și mai puțin de unul din zece subiecți din lotul martor.
- ❖ Trei din zece pacienți s-au confruntat frecvent cu **traume psiho-afective** în perioada adolescenței, frecvența acestora fiind de cinci ori mai redusă în lotul martor.
- ❖ Nouă din zece pacienți au preferat **activitățile sedentare și izolarea la domiciliu**, pentru petrecerea timpului liber.
- ❖ Mai mult de șapte din zece pacienți au avut **relații distorsionate cu părinții**, în lotul martor acest tip de relații a fost de două ori mai redus, iar în structura acestora lipsea agresivitatea fizică.

Statusul subiecților la momentul investigației – calitatea vieții

- Nouă din zece pacienți **nu au copii** și doar doi subiecți din zece în lotul martor.
- Mai mult de doi pacienți din zece fac parte din **familii cu un climat alterat de tensiuni, agresivitate fizică, dezinteres** etc. În lotul martor acest tip de relații sunt foarte rare (la mai puțin de un subiect din zece).
- Aproximativ șase din zece pacienți aveau **venituri economice familiale modeste** sau subliminare, frecvența acestora în lotul martor a fost de două ori mai redusă.
- Aproximativ șapte din zece pacienți **locuiesc în zone poluate chimic și fonice**.
- Mai mult de doi pacienți din zece și mai mult de trei din zece subiecți din lotul martor sunt **fumători**.
- În ambele loturi **consumul de alcool** a fost ocazional.
- Aproape șapte pacienți din zece **vizionează între 1-6 ore/zi emisiuni TV**.
- Mai mult de nouă pacienți din zece **se autodefinesc ca și persoane religioase** atât în lotul de pacienți cât și în lotul martor.
- Aproximativ doi pacienți din zece sunt **îngrijorați de starea lor de sănătate** și aproximativ unul din zece subiecți în lotul martor.
- Unul din zece pacienți este **lipsit de suport în situații de criză economică, medicală sau emoțională** iar frecvența subiecților din lotul martor care în stări de criză nu pot conta pe nici un fel de ajutor, a fost de două ori mai redusă decât aceea înregistrată în lotul de pacienți.

Rezultatele cercetării întreprinse, vizând identificarea factorilor nongenetici, în relație cu frecvența crescută a schizofreniei, sunt în concordanță cu informațiile specifice din literatura de specialitate. Ceea ce aduce nou acest studiu este identificarea etapei de dezvoltare ontogenetică cu risc major pentru eșantionul de pacienți investigat.

- Perioada sarcinii și a adolescenței s-au situat pe același plan din punctul de vedere a numărului factorilor nongenetici agregați/ etapă de dezvoltare ontogenetică, (respectiv opt factori).
- Rangul întâi în ierarhia etapelor de dezvoltare ontogenetică cu risc major a fost atribuit adolescenței a cărei factori de risc nongenetici au înregistrat cote de frecvență net superioare, de aici probabilitatea ridicată de concomitență a acestora la același subiect.
- Se impune o atenție privilegiată adolescenților cu AHC de boli psihice.
- Programele de profilaxie primordială vor viza prevenirea fumatului timpuriu, iar cea primară reducerea numărului de adolescenți care fumează un număr mare de țigări/zi.
- Se recomandă asistență psihologică de specialitate pentru adolescenții la risc (AHC de boli psihice) în contextul unor situații de criză și pentru dezamorsarea relațiilor alterate cu părinții.

Diseminare

Al 2-lea Congres National de Genetica Medicala

- GENETICA IN SCHIZOFRENIE, D. Cozman, M. Manea, O. Dobrescu, B. Nemes
- VITAMINA B12, FOLATUL SI HOMOCISTEINA IN SCHIZOFRENIE, M. Dronca, C. E. Craciun, S. P. Pasca, D. Cozman
- EVALUAREA STATUSULUI ANTIOXIDANT LA SCHIZOFRENI, E. Craciun, M. Dronca, B. Nemes, D. Cozman
- STATUSUL PON1 IN SCHIZOFRENIE, E. Dronca, M. Dronca, B. Nemes, D. Cozman

Al XIII-lea Congres National de Farmacia, 28-30 sept.2006, Cluj-Napoca

- ANTIOXIDANT ENZYMES IN SCHIZOPHRENIA, Elena Cristina Crăciun, Maria Dronca, Bogdan Nemeș, Doina Cosman
- SERUM FOLATE AND VITAMIN B12 LEVELS IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS: PRELIMINARY DATA, Maria Dronca, Elena Cristina Crăciun, Bogdan Nemeș, Doina Cosman
- Study for the determination of Cd, Pb and Zn in biological fluids by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Monica Ursu, Maria Paul, Marin Șenilă, Tiberiu Frențiu, Mircea Chintoanu, Claudiu Tănăsela

Lucrare de diploma: B. Nemeș, RELEVANȚA HIPERHOMOCISTEINEMIEI ÎN SCHIZOFRENIE, Lucrare de diploma, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, Promoția 2006 – Coordonator Conf. Dr. Maria Dronca

Simpozionul Național cu participare internațională: Tulburările schizofrene și de spectru. Abordare comprehensivă și centrată pe persoană, 19 – 22 aprilie 2007, Timișoara, România,

• **Relevanța hiperhomocisteinemiei pentru formele clinice de schizofrenie, volum de rezumate pp. 20,.** Doina Cosman, Maria Dronca, Bogdan Nemeș, Minodora Manea.

• **Schizofrenia și riscul suicidar. Studiu în perspectivă psihopatologică și neuropsihologică, volum de rezumate pp. 4.,** Doina Cosman, Minodora Manea, Sorin Nica, Bogdan Nemeș.

Annals of West University of Timișoara. Series of chemistry 2007, 16(2): 149-154, Evaluation of SOD and GPx activities in schizophrenia, E. C. Crăciun, M. Dronca, B. Nemeș, D. Cozman.

Conferința Internațională Reabilitarea psihosocială în schizofrenie, Cluj-Napoca, 6-7 iulie 2007, ENDOPHENOTYPES AND SCHIZOPHRENIA, D. Cosman, M. Manea, S. Nica, B. Nemeș, H. Coman

XXIV World Congress - IASP, 28th August – 1st September, 2007, Kilarney, Ireland. Abstract book, OR 070, **Neuropsychological assessment of Schizophrenia Patients with Suicidal behaviour**, D. Cosman, M. Manea, S. Nica, H. Coman, B. Nemeş

SFRR Europe 2007 Meeting organizat de Society for Free Radical Research în perioada 10-13 octombrie 2007, Vilamoura , Portugalia.

EVALUATION OF SOD AND GPx ACTIVITIES IN SCHIZOPHRENIA

Elena Cristina Crăciun, Maria Dronca, Bogdan Nemeş, Doina Cozman

Curs postuniversitar de studii avansate “Adaptarea la stres: conditie de supravietuire si/sau factor de biodiversitate”, Institutul de Biologie al Academiei Romane, Bucuresti, 31 octombrie–3 noiembrie 2007, Popescu, O., Aspecte genetice si moleculare ale procesului de imbatranire la eucariote

Curs Postuniversitar de Perfectionare cu Participare Internationala “De la Biologia Celulara si Moleculara la Medicina Secolului XXI”, Editia a 7-a, Institutul de Biologie si Patologie Celulara “Nicolae Simionescu” Centru de Excelenta al Comunitatii Europene, 15-23 octombrie 2007, Popescu, O., Replicarea ADN – abordare interactiva

Masă rotundă *Markeri endofenotipici și susceptibilitate genetică în schizofrenie*, marți, 13 noiembrie 2007