

A szkizofrénia új, purinerg biomarkereinek azonosítása egy reverz translációs vizsgálatban

Doktori tézisek

Kristóf Zsüliet

Semmelweis Egyetem

Mentális Egészségtudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Bitter István, DSc, egyetemi tanár

Dr. Sperlággh Beáta, DSc, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Géczy Anna, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Timár Júlia, Ph.D., szaktanácsadó

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Bereczki Dániel, DSc, egyetemi tanár, igazgató

Tagok: Dr. Jekkel Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Vizin Gabriella, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2022

1. BEVEZETÉS

A szkizofrénia egy komplex idegfejlődési zavar, mely az átlagnépesség 0.5-1%-át érinti. Ezt a gyakran krónikus és a mindennapi funkcionálást megnehezítő betegséget meglehetősen heterogén pozitív és negatív tünetegyüttes jellemezi. A többi pszichiátriai zavarhoz hasonlóan a szkizofrénia is genetikai, környezeti és szociális kockázati tényezők összjátéka nyomán alakul ki, melyek a gén expressziós szinteket és a molekuláris útvonalakat szabályozó epigenetikus mechanizmusokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a gyulladásozó útvonalak, és az immunrendszer anomáliái szerepet játszanak a főbb pszichiátriai rendellenességek patofiziológiájában, melyek ezáltal biomarkerekként is hasznosak lehetnek.

A purinerg jelátvitel fontos szerepet játszik az idegi fejlődésében és az olyan patofiziológiai folyamatokban, mint a sejtproliferáció, a differenciálódás, a neuron-glia kommunikáció és a gyulladás. A purinerg receptorok egyik leggyakrabban vizsgált tagja az ionotróp P2X receptorok családjába tartozó nem-szelektív kation csatorna, a P2X7 receptor, melynek szerepét már több pszichiátriai és neurodegeneratív betegség hátterében azonosították. A periférián a receptor legkiemelkedőbb szerepe a gyulladásra adott citokin-válasz szabályozásában van. Egészséges szövetekben az extracelluláris ATP koncentrációja alacsony, a nanomoláris tartományban mozog, patológiás körülmények között azonban (sejtkárosodás, stressz, trauma) koncentrációja jelentősen megnő, mely patogén

asszociált vagy veszélyhez asszociált molekuláris mintázatként működik, és aktiválja a P2X7 receptort.

A P2X7 receptor és a szkizofrénia patofiziológiájának kapcsolatára vonatkozóan egyelőre viszonylag kevés klinikai adat áll rendelkezésre. Kutatócsoportunk a szkizofrénia akut, PCP-indukálta egérmodelljében kimutatta, hogy a receptor farmakológiai gátlása és genetikai deléciója egyaránt enyhíti a szkizofrénia-szerű magatartásbeli változásokat. Ezek mellett, Hempel és munkatársai kimutatták, hogy két antipszichotikum, a prochlorperazin és a trifluoperazin allosztérikusan és negatívan modulálják a humán P2X7R aktivitását. Ezek alapján feltételezhető, hogy a P2X7 receptor működésének antipszichotikumok által történő gátlása akár hozzá is járulhat a terápiás hatékonysághoz.

Összességében tehát látható, hogy habár még csak részben sikerült feltárni a P2X7R és a szkizofrénia kapcsolatát, de a purinerg rendszer mindenképpen ígéretes kutatási területet jelent a pszichiátriai betegségek molekuláris alapjainak jövőbeli és mélyebb megismerésében, mely végső soron új terápiák kidolgozását teheti lehetővé.

2. CÉLKITŰZÉS

Fő célunkként a szkizofrénia potenciális, a purinerg jelátvitelhez kapcsolható biomarkereinek azonosítását tűztük ki, melynek érdekében egy fordított transzlációs megközelítést alkalmaztunk: először egy szkizofrén beteg –és egészséges kontroll populációt vizsgáltunk meg, majd egereket a szkizofrénia PCP-indukálta állatmodelljével, mely a betegség akut relapszusát volt hivatott modellezni.

Munkánk során megvizsgáltuk:

1.) A P2X7 receptor szerepét a szkizofrénia patomechanizmusában, potenciális purinerg biomarkereken (ATP, ADP, és adenzin) keresztül, valamint 2.) a gyulladáshos markerek szerepét.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Eltér-e a purinok, a citokinek, és a CRP szintje, valamint a szolúbilis P2X7R koncentrációja a szkizofrén beteg és az egészséges kontroll személyek vér szérumában?
- Mutat-e valamilyen összefüggést a purinok és a gyulladáshos markerek szintje a szkizofrénia pozitív, negatív és általános tüneteinek súlyosságával?
- Egereken végzett, PCP-indukálta akut szkizofrénia modell során a humán adatokkal konzisztens eredmények születnek-e?

3. MÓDSZEREK

3.1. Humán vizsgálat

3.1.1. Vizsgálati személyek

Ötvenhárom, 18 és 65 év közötti, BNO-10 szerinti szkizofrénia diagnózissal rendelkező beteg és negyvenhét egészséges, pszichiátriai előzménnyel nem rendelkező önkéntes vett részt a vizsgálatban. A betegek bevonása négy budapesti kórházban történt, míg a nem és életkor szerint illesztett kontroll csoportba kényelmi mintavételi eljárás útján kerültek a résztvevők. A résztvevő betegek akut pszichotikus epizód miatt kerültek kórházba és bekerülésük után maximum 3 nappal bevonásra kerültek. Kizárási kritériumként a pszichoaktív szer

abúzus és/vagy dependencia (a vizsgálatot megelőző 2 éven belül), a kezelőorvos által súlyosnak minősített szomatikus betegség, illetve bármilyen fokú mentális retardáció diagnózisa szolgált. A kontroll csoport esetében kizárási kritérium volt bármilyen, bármikori BNO-10 szerinti pszichiátriai diagnózis, valamint a pszichoaktív szer abúzus és/vagy dependencia az elmúlt 2 év során. Minden beteg antipszichotikus kezelés alatt állt a vizsgálat idején.

3.1.2. Tünetsúlyosság felmérése

Amennyiben minden bevonáshoz szükséges feltétel teljesült, a részletes tájékoztatás és a megfelelő mértékű rapport kialakulása után megkezdődött a beteg tüneteinek felmérése a Pozitív és Negatív Tünetbecslő Skála (PANSS) és a Montgomery-Asberg Depresszióértékelő Skála (MADRS) segítségével.

A PANSS egy széles-körben használt, standardizált félig strukturált klinikai interjú, mely az elmúlt egy hét során megjelenő tünetek meglétét és súlyosságát értékeli szkizofréniában szenvedő betegeknél. A komorbid depressziós tünetek felmérése a MADRS segítségével történt, mely ugyancsak egy jól validált, standardizált 10-tételes skála, melyet az interjú készítője tölt ki.

3.1.3. Mintagyűjtés és előkészítés

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a purinok, citokinek és a P2X7 receptor koncentrációját, a vizsgálati személyektől 3.5 ml vénás vért gyűjtöttünk az adott intézmény ápolóinak segítségével, a kontrollcsoport esetében pedig a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti

Klinika, illetve a Központi Laboratórium munkatársainak közreműködésével. A vér feldolgozását követően a kinyert szérumot 1.5 mL-es Eppendorf-csővekben aliquotolva tároltuk -80°C -on az analízisig.

3.2. Állatkísérlet

3.2.1. Kísérleti állatok

A vizsgálatok során 80-90 napos, korábbi kezelésektől és tesztektől mentes, a P2RX7 gént tekintve homozigóta vad típusú (P2RX7 +/+), C57/BL6 háttérű egértörzs hím egyedeit használtuk. Az állatokat általános állatházi körülmények között tartottuk szabad hozzáféréssel ételhez és vízhez.

3.2.2. Kísérleti elrendezés

Kísérletünk során az akut, PCP-indukált szkizofrénia állatmodelljét alkalmaztuk. A kísérleti állatokat random módon 4 különböző kezelési csoportba soroltuk: PCP+SAL n=20, PCP+RIS n=14, SAL+SAL n=20, SAL+RIS n=8. A fenciklidin [PCP (2 mg/kg)] és annak vehikuluma, a steril fiziológiás sóoldat [SAL (10 ml/kg)] intraperitoneálisan (i.p.) került beadásra. A risperidont szintén steril fiziológiás sóoldatban oldottuk be, és ugyancsak egy egyszeri i.p. kezeléssel adtuk be, 0.3 mg/kg-os dózisban, 30 perccel a PCP/SAL kezelés előtt. 45 perccel a PCP/SAL kezelés után a szkizofrénia-szerű viselkedési mintázatot open-field teszt segítségével mértük le.

3.2.3. Open-field teszt (OFT)

A szkizofrénia-szerű tünetek magatartás vizsgálatát egy sötétszürke, kerek, nyílt térben, a világos periódusban (8:00 és 14:00 között) végeztük egy külön erre a célra fenntartott kísérleti

szobában. A teszt során két egymás számára ismeretlen, ám azonos farmakológiai kezelésben részesült egér került behelyezésre a kamra ellentétes oldalainál, ahol aztán 10 percig szabadon explorálhattak, melyet a nyílt tér felett elhelyezett videokamera rögzített. A szociális interakció az egymás irányába történő szimatolásként került definiálásra. A vonalátlépéseket egész idő alatt egy számítógépes eseményfelvevő számolta. A PCP-indukálta sztereotíp viselkedést manuálisan értékeltük a Nabeshima és Sams-Dodd által leírt protokoll alapján, néhány módosítással.

3.2.4. Mintagyűjtés és előkészítés

A magatartás vizsgálat után ~5 perccel, izoflurános mélyaltatás során történt a vérvétel a caudalis vena cavából. A levételt követően a heparinnal kezelt vért rögtön jégre helyeztük, majd a centrifugálási folyamat után a mintákat -80°C -on tároltuk a vizsgálatokig.

3.3. Biokémiai eljárások

3.3.1. HPLC-analízis

A humán szérum és az egér plazma minták nukleotid (ATP és ADP) és adenzin koncentrációját HPLC-analízis segítségével határoztuk meg. 100 μL minta hideg Eppendorf csőbe lett áthelyezve, melyhez 10 μM teofillint tartalmazó 4 M-os perklórsav oldat (10 μL) került hozzáadásra. A felülúszó savfeleslegének semlegesítése 4 M K_2HPO_4 oldattal (10 μl) történt, majd a kálium-perklorát sót centrifugálással távolítottuk el. A tiszta felülúszót feltöltöttük (300 μl) „A” mozgófázisú oldattal, majd azonnal az automatikus mintavevő tartójába helyeztük. A felülúszó minta 240 μl -jét a dúsító oszlopra

injektáltunk. A minták nukleotid tartalmának kvantifikálására online SPE (szilárd fázisú extrakció) oszlop-váltásos technikát alkalmaztuk. A HPLC szeparációt Shimadzu LC-20 AD Analytical System segítségével végeztük, UV (253 nm-re beállított Agilent 1100 VW) detektálással. A komponensek szeparálása az C-18 (150 x 2,1 mm) analitikai oszlop összekapcsolásával történt. A mozgófázisok áramlási sebessége 350, illetve 450 µl/perc volt egy lépcsős gradiens alkalmazásnál, míg az „A” puffer dúsítási-tisztítási művelete 4 percen át, 300 µl/perc térfogat sebességgel történt, a teljes lefuttatás pedig 55 percet vett igénybe. A koncentrációkat két standardpontos addíciós kalibrációval és belső standard módszerrel számoltuk ki.

3.3.2. A szolubilis P2X7R enzim kapcsolt immunszorbens (ELISA) vizsgálata

A szolubilis P2X7R kvantifikációja mindkét vizsgálat esetében ELISA módszerrel történt (humán: Cusabio, Houston, TX, USA, egér: MyBiosource, San Diego, CA, USA). A minták minden esetben duplikátumban kerültek megmérésre, így tehát a standardek mellett 100-100µl-t juttattunk belőlük a P2X7R-re specifikus antitesttel előzetesen bevont mikroplate-re, ahol 2 óra, 37°C-on történő inkubálás során a jelenlévő P2X7R-t az immobilizált antitest megkötötte. A kötetlen anyagok eltávolítása után egy P2X7R-re specifikus biotinnal konjugált antitestet (100 µl) pipettáztunk a lyukakba, mellyel együtt 1 órán át 37°C-on inkubálódott a plate. Mosás után avidin-konjugált torma-peroxidázzal (HRP) (100 µl) megismételtük az előbbi folyamatot (1h, 37°C), majd a meg nem kötött avidin-enzim reagens eltávolítását követően szubsztrát oldatot (90 µl TMB)

pipettáztunk a plate-re, és 15-30 percig, fénytől óvva 37°C-on ismét inkubáltuk. E lépés hatására színfejlődés kezdődik, mely erőssége a kezdeti lépésben megkötött P2X7R mennyiségével arányosan alakul ki. Ezt a folyamatot 50 µl savas oldattal állítottuk le, és 5 percen belül megmértük a szín intenzitását egy Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek) segítségével.

3.3.3. A citokinek multiplex bead array (CBA) analízise

A humán szérum és az egér plazma mintákban 6 gyulladáshoz kötődő citokin szintje került megmérésre (IL-1β, IL-6, IL-8/IL-17, IL-10, IL-12, TNF-α), azonban mivel a rágcsálók nem expresszálják az IL-8 gént, ehelyett náluk az IL-17 szintjét vizsgáltuk meg (humán: Human Inflammatory Cytokine Kit, BD Biosciences, San Jose, USA; egér: BD Cytometric Bead Array Flex Sets, BD Biosciences, San Jose, USA). Specifikus antitesttel konjugált gyöngyök keverékéből 50 µl-t juttattunk a plate minden lyukába, majd erre 50-50 µl mintát vagy standardot pipettáztunk és 1.5 órán át szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. A meg nem kötött anyagok eltávolítása után hozzáadtuk a megkötött analit mennyiségével arányos fluoreszcens jelet biztosító detektációs reagenst (50 µl), mely fikoeritrin (PE) konjugált antitestek keveréke, és az előbbieket ismét inkubáltuk. Egy újabb mosási procedúra után áramlási citometria segítségével azonosítottuk mind a gyöngy, mind a detektor fluoreszcens jegyekkel rendelkező részecskéit. A gyulladáshoz kötődő mediátorok koncentrációjának mérése BD FACSVerse áramlásos citométerrel történt, a kapott adatokat pedig az FCAP Array v5 Software (Soft Flow, MN, USA) segítségével analizáltuk.

3.4. Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzés a GraphPad Prism 8.0.2.-es verziójával történt (GraphPad Software, San Diego, California USA). A kilógó értékeket ($Q = 1\%$) ROUT módszerrel azonosítottuk, majd a kívülálló adatokat kizártuk a további elemzésből. Két csoport összehasonlításánál páros Mann–Whitney U-teszteket futtattunk, a több csoport közötti különbségek felderítésére pedig két-utas ANOVA-t használtunk, amelyet a Tukey-féle post hoc teszt követett. A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle Rho-val számítottuk ki. A szignifikancia szintet $p < 0.05$ -ben határoztuk meg. ROC (Receiver Operating Characteristic curve) analíziseket végeztünk a vizsgált paraméterek diagnosztikus képességeinek felmérése érdekében, melyhez az optimális cut-off pontot a Youden index segítségével határoztuk meg.

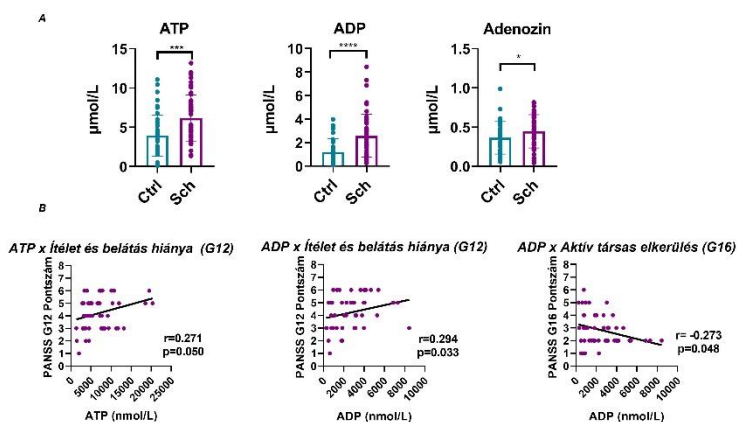
4. EREDMÉNYEK

4.1. Purin szintek és összefüggésük a pszichopatológiával

Az adenin nukleotidok és az adenzin szintjének HPLC-analízise szignifikánsan emelkedett ATP (6.161 ± 2.919 nmol/mL vs. 3.931 ± 2.608 nmol/mL; $p = 0.0002$), ADP (2.593 ± 1.840 nmol/mL vs. 1.204 ± 1.147 nmol/mL; $p < 0.0001$) és adenzin (0.446 ± 0.212 nmol/mL vs. $0.3643.6 \pm 0.208$ nmol/L; $p = 0.0417$) koncentrációt mutatott ki a szkizofrén betegek szérumában, a kontroll személyekkel összehasonlítva (1. ábra A).

Klinikai tünetek vonatkozásában nem sikerült összefüggést azonosítanunk a PANSS pozitív, negatív és

általános skáláinak összpontszáma és purin-szintek között. Ami viszont az egyes tételreket illeti, az exploratív elemzés során azt találtuk, hogy az ‘Ítélet és belátás hiánya’ mind az ATP, mind az ADP szintjeivel pozitív korrelációt mutat. Az ‘Aktív társas elkerülés’ tétel és az ADP között szignifikáns inverz kapcsolatot azonosítottunk. A purinszintek és a MADRS összpontszáma között nincs szignifikáns korreláció (1. ábra B).



1. ábra. A humán szérumban purin-szintjei, és összefüggésük a pszichopatológiával.

4.2. Gyulladásos markerek és összefüggésük a pszichopatológiával

A betegek szérumban az IL-1 β , az IL-6, az IL-10 és az IL-12 szintje szignifikánsan megemelkedett a kontrollokhoz viszonyítva, az IL-8 és a TNF- α szintje azonban nem különbözött a két csoport között.

A korreláció vizsgálat során nem találtunk összefüggést a citokinek szintje és a PANSS három alsókálján elért pontszámok között, azonban az egyes interleukinok több különálló tétellel is jellegzetes mintázatot alkotva korreláltak. A 'Feszültség' és a 'Depresszió' tételeken magasabb pontszámot értek el azon betegek, akiknek IL-1 β , IL-12 és TNF- α szintjei is magasabbak voltak, míg a 'Dezorientáció' és a 'Gyenge figyelem' az IL-6-al és az IL-8-al korrelál pozitívan. Továbbá, az IL-6-al pozitív összefüggésben áll a 'Fogalmi dezorganizáció' is, az IL-10 pedig negatív kapcsolatot mutat a 'Gondolati elmerülés' tétellel. Ezek mellett pozitív korrelációt találtunk az IL-1 β és a MADRS összpontszáma között is.

A CRP szintje ugyancsak jelentősen magasabb volt a szkizofrén betegek szérumában, mint a kontrollszemélyekében, a tünetekkel azonban ez a paraméter nem mutat összefüggést.

4.3. A szolúbilis P2X7R koncentrációja

A szolúbilis P2X7R szintjében nem találtunk különbséget a beteg és a kontroll csoport között. A pszichiátriai diagnózistól mentes egészséges személyeknél az sP2X7R koncentrációja 1.795 és 215.6 pg/mL (85.68 ± 63.88) között mozgott, és ez az érték a betegek esetében is nagyon hasonlóan, 1.795 és 217.2 pg/mL (86.82 ± 54.89) között alakult.

4.4. A gyulladáshoz vezető markerek és a szomatikus betegségek kapcsolata

A vizsgált pszichiátriai betegek körében általánosan nagyobb arányban fordultak elő különböző komorbid szomatikus betegségek, az egészséges kontroll-személyekhez

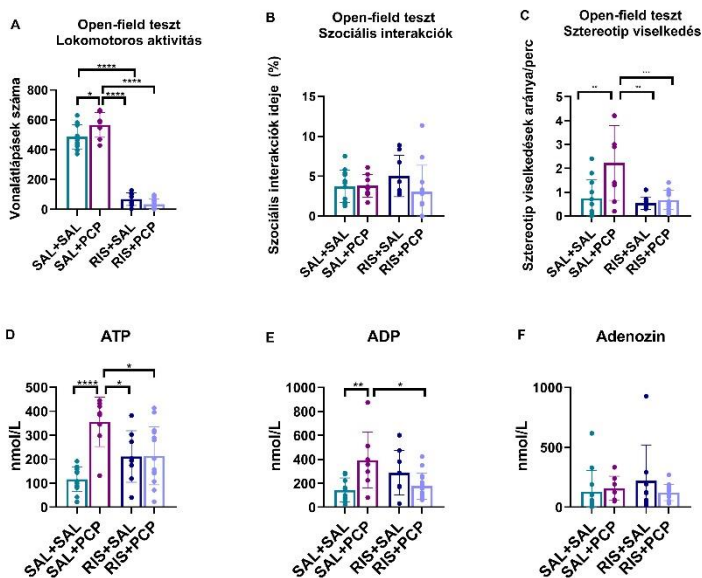
viszonyítva. Amennyiben a vizsgálati személyeknél (csoportoktól függetlenül) valamilyen kardiovaszkuláris betegség is fennállt, a CRP és az IL-6 szintje szignifikáns emelkedést mutatott, azon résztvevőkhöz képest, akik nem szenvedtek ilyen jellegű (társ-) betegségben. Endokrin, táplálkozási- és anyagcsere betegségek esetében az IL-8 koncentrációja emelkedett meg a szérumban.

4.5. A purinok, citokinek és a P2X7R plazmaszintjei a PCP-indukált akut skizofrénia egérmodelljében

Állatkísérletes modellünkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a PCP és a risperidon kezelés milyen hatást gyakorol az egerek magatartására, valamint a projekt humán oldalán is vizsgált biológiai paraméterekre. A magatartásbeli változások tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a PCP kezelés szignifikáns mértékben fokozta a bazális lokomotoros aktivitást és a sztereotip viselkedést, a szociális interakciók mennyiségét viszont nem befolyásolta. A risperidon kezelés (RIS+SAL) jelentős mértékben csökkentette mind a lokomotoros aktivitást, mind a sztereotip viselkedést, a társas interakcióval töltött időre azonban ez sem volt hatással. Mindezekon felül, az antipszichotikum-kezelés teljes mértékben ellensúlyozta a PCP viselkedési mintázatokra gyakorolt hatását (2. ábra A-C).

A humán eredményekhez hasonlóan, a vérplazma-minták purinszintjeinek analízise során szignifikáns különbséget találtunk a SAL+SAL és SAL+PCP csoportok között az ATP ($116,2 \pm 51,93$ nmol/mL vs. $355,9 \pm 102,8$ nmol/mL vs. $355,9 \pm 102,8$ nmol/mL; $p < 0,0001$) és az ADP ($144,1 \pm 100,4$ nmol/mL vs. $392,8 \pm 233,8$ nmol/mL; $p = 0,0055$) tekintetében, azonban

az adenozin szintje közel megegyező volt a két csoportban. A risperidon kezelés jelentős mértékben csökkentette az ATP és ADP szintjét, a kizárólag PCP-kezelésben (SAL+PCP) részesülő csoport eredményeivel összevetve. Az antipszichotikum önmagában (RIS+SAL) nem befolyásolta az extracelluláris purinszinteket (2. ábra D-F).



2. ábra. Viselkedési tünetek a PCP-indukált akut szkizofrénia egérmodelljében és a purinok szintje a rágcsálók vérplazmájában.

Állatmodellünkben hat gyulladáshoz köthető citokint vizsgáltunk (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 és TNF- α). A vehikulum (fiziológiás sóoldat) injekció után PCP-vel kezelt egerek vérplazmájában szignifikánsan megnövekedett IL-6, IL-10 és

IL-17 szinteket találtunk a kétszeri sóoldatot kapott csoport egereihez képest, míg a PCP előtti risperidonos előkezelés normalizálta mindhárom, előző esetben emelkedett citokin szintjét. Az IL-1 β és a TNF- α plazmaszintjében nem figyelhető meg szignifikáns különbség a két sóoldat-kezelést valamint a sóoldat injekció után PCP-t kapó csoport között. Az antipszichotikus és a PCP kezelés kombinációja szignifikánsan megemelte az IL-12 koncentrációját a SAL+SAL és a SAL+PCP csoportokhoz viszonyítva.

A humán eredményekhez hasonlóan a szolúbilis P2X7R plazmaszintje nem különbözött a négy csoport között, a teljes kimutatási tartomány 0,76 ng/mL – 2,02 ng/ml volt.

4.6. ROC-analízis (Vevő Működési Karakterisztika)

Annak érdekében, hogy felmérjük, a vizsgált paraméterek milyen mértékben lehetnek alkalmasak arra, hogy a szkizofrénia diagnosztikai vagy prognosztikai markereiként szolgáljanak, ROC analíziseket végeztünk.

A ROC két működési jellemző, a valódi pozitív találati arány és a negatív pozitív arány összehasonlítása, a kritérium (cut-off pont) változásának mentén. A görbe e két paraméter ábrázolásával jön létre, különböző küszöbbeállítások mellett. A diagnosztikai és prognosztikai hatékonyság (milyen mértékben képes a modell elkülöníteni a szkizofrén betegek és a kontroll személyek adatait) meghatározására a grafikon alatti terület nagyságát használjuk (AUC – Area Under the Curve), melynek értéke 0.5 és 1 között mozog, ahol az első érték a teljesen véletlenszerű csoportba sorolást jelzi, utóbbi pedig a tökéletes pontosságú besorolást mutatja. Az ideális modellben a görbe a

grafikon bal felső sarkához közelít, a szenzitivitás és a specificitás pedig egyaránt a lehető legmagasabb – ekkor a betegek és az egészségesek eredményei nem fednek át, azaz nincsenek tévesen pozitív vagy tévesen negatív eredmények¹⁴⁴.

Modelljeinkben a vér bizonyos purin- és citokin szintjei megfelelő érzékenységgel és specificitással, sikeresen különbséget tettek a kontroll személyek és a szkizofrén betegek, valamint a kizárólag fiziológias sóoldattal és a PCP-vel kezelt egerek között. A humán mintákban az ADP, az IL-6 és az IL-10 diagnosztikai hatékonysága bizonyult a legjobbnak, ezek közül az IL-10 teljesítenye a legjobb (AUC=82%), 80%-os specificitással és 80%-os szenzitivitással. A rágcsáló modellben az ATP, az ADP, az IL-6 és az IL-17 bizonyult a legjobb diagnosztikai hatékonyságúnak, melyek közül kiemelkedik az ATP, mely 244.7 nmol/L-es cut-off pontnál 87.5%-os szenzitivitással és 100%-os specificitással volt képes megkülönböztetni egymástól a kontroll és a PCP-vel kezelt csoportot.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Munkánk egyik legjelentősebb nívuma az adenin nukleotidok és az adenzin szintjének vizsgálata a szkizofrénia vonatkozásában. A szkizofrén betegek vérében egyértelműen megemelkedett mindhárom vizsgált purin (ATP, ADP, ADO) koncentrációja, mely adatokat (az ADO kivételével) állatmodellünkben is reprodukálni tudtunk. Ezen eredmények alapján úgy véljük, e vegyületek akár a pszichiátriai zavarok új, potenciális diagnosztikai, prognosztikai biomarkerei is lehetnek,

valamint jelen adataink hasznos alapot biztosíthatnak a jövőbeli, e területre irányuló vizsgálatoknak.

2. Kutatásunk másik legfontosabb újdonsága, hogy kimutattuk: a purinok szintje összefügg egyes tünetek erősségével. Az ítélet és belátás hiánya számos egyéb dimenziót hordoz magában, a gyengébb mentalizációs készségektől kezdve az együttműködésre való kisebb hajlandóságon át, egészen a többi tünet intenzitásának befolyásolásáig, mely komplex jelenségeket e tüneten keresztül eredményeink szerint az ATP és az ADP szintje reflektálni képes.

3. Pszichiátriai zavarok vonatkozásában elsőként vizsgáltunk meg a P2X7 receptor koncentrációját humán és rágcsáló vérmintákban, azonban eredményeink alapján úgy tűnik, a receptor szintjét nem befolyásolja a mentális státusz, egyik általunk vizsgált populációban sem. Ennek ellenére azonban az, hogy az adenin nukleotidok és az adenzin jelentősen megemelkedett a betegek szérumban, közvetetten, de a purinreceptorok széles körű aktiválódására utal.

4. Demonstráltuk továbbá a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek emelkedett szintjét szkizofrén betegek és PCP-kezelésben részesült egerek vérében. Emellett, a humán oldalon a gyulladás egyik legfontosabb markerének, a CRP-nek a szintjét is jelentős mértékben magasabbnak találtuk a betegpopuláció mintáiban. Ezen eredmények nem csak tovább erősítik a szkizofréniaiban jelen lévő markáns gyulladásra vonatkozó korábbi szakirodalmi adatokat, de még inkább kihangsúlyozzák az IL-1 β , az IL-6, IL-10 és az IL-12 szerepét, így a bennük rejlő esetleges prognosztikai, diagnosztikai lehetőségeket is.

5. A citokinek és a tünetintenzitás korreláció-vizsgálata során sikerült egy jellegzetes mintázatot azonosítanunk,

melyben több citokin emelkedett szintje ugyanazon tünetek intenzívebb jelenlétével társul. Az összes, általunk vizsgált gyulladáshoz kapcsolódó citokin kapcsolatban áll többek között a feszültség és a depresszió, vagy a dezorientáció és a gyenge figyelem domináns fennállásával. Ezek közül az első két tétel a Montgomery-Asberg Depresszió Értékelő Skálában is megjelenik, melynek összpontszáma pozitív korrelációt mutat az IL-1 β szintjeivel. Ezek az eredmények alátámasztják és kibővítik a korábbi kutatások azon feltételeit, miszerint a depresszióra, és a negatív tünetekre jellemző karakterjegyek kapcsolatban állnak a gyulladáshoz kapcsolódó markerekkel.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent publikációk

Kristóf Z, Baranyi M, Tod P, Mut-Arbona P, Demeter K, Bitter I, Sperlág B. Elevated serum purine levels in schizophrenia: a reverse translational study to identify novel inflammatory biomarkers. *Int J Neuropsychopharmacol* (2022). doi: 10.1093/ijnp/pyac026.

Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent publikációk

Gyorik D, Eszlari N, Gal Z, Torok D, Baksa D, **Kristóf Z**, et al. Every Night and Every Morn: Effect of Variation in CLOCK Gene on Depression Depends on Exposure to Early and Recent Stress. *Front Psychiatry* (2021) 12:6874-87. doi: 10.3389/fpsy.2021.687487.

Gyorik D, Eszlari N, Gal Z, Torok D, Baksa D, **Kristóf Z**, et al. P.0422 CLOCK gene variation mediates effect of early

childhood adversities and recent stressors on current depressive symptoms. *European Neuropsychopharmacology* (2021) 53:S306-S7. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.395.

Kristof Z, Eszlari N, Sutori S, Gal Z, Torok D, Baksa D, et al. P2RX7 gene variation mediates the effect of childhood adversity and recent stress on the severity of depressive symptoms. *PLoS One* (2021) 16(6):e0252766. doi: 10.1371/journal.pone.0252766.

Kristof Z, Eszlari N, Sutori S, Gal Z, Torok D, Baksa D, et al. P.0577 Variation in P2RX7 interacts with childhood traumas and negative life events influencing current depressive symptoms but not lifetime depression. *European Neuropsychopharmacology* (2021) 53:S422-S3. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.544.

Kristof Z, Kresznerits S, Olah M, Gyollai A, Lukacs-Miszler K, Halmai T, et al. Patterns of mentalisation and empathy as possible predictors of violence in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology* (2019) 29:S129-S30. doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.11.239.

Kristof Z, Kresznerits S, Olah M, Gyollai A, Lukacs-Miszler K, Halmai T, et al. Mentalization and empathy as predictors of violence in schizophrenic patients: Comparison with nonviolent schizophrenic patients, violent controls and nonviolent controls. *Psychiatry Res* (2018) 268:198-205. doi: 10.1016/j.psychres.2018.07.021.