

Asocjacyjne badania rodzinne polimorfizmu -1562C>T genu MMP-9 w schizofrenii

Family based association study of MMP-9 gene-1562C>T polymorphism in schizophrenia

Agata Groszewska^{1,3}, Paweł Kapelski², Maria Skibińska¹,
Joanna Hauser^{1,2}

¹Zakład Genetyki w Psychiatrii Katedry Psychiatrii UM w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Hauser

²Klinika Psychiatrii Dorosłych UM w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. K. Rybakowski

³Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii
Kierownik: prof. dr. hab. W. Koziara

Summary

Aim. MMP-9 is a candidate gene related to the neurodevelopment hypothesis of schizophrenia. The aim of this research was TDT analysis of polymorphism -1562C>T MMP-9 gene in schizophrenia.

Methods. Research was carried out on 147 trios (patient and his/hers both healthy parents). Genetic material was isolated from leukocytes using the salting out method. Polymorphism was studied with PCR-RFLP, statistic analysis was made using transmission disequilibrium test by Haploview 4.2.

Results. There was no significant association between analyzed polymorphism of MMP-9 (-1562 C>T) and schizophrenia.

Conclusions. Insignificant association doesn't exclude the possible contribution of MMP-9 to pathogenesis of schizophrenia. Further research is needed to be carried out on bigger groups and other populations.

Słowa kluczowe: schizofrenia, TDT, MMP-9

Key words: schizophrenia, TDT, MMP-9

Wstęp

Hipoteza neurorozwojowa schizofrenii przedstawiona została pod koniec lat osiemdziesiątych niezależnie przez dwóch badaczy – Weinbergera [1] oraz Murraya [2].

Praca sfinansowana z projektu MNiSW „Badania asocjacyjne genów kandydujących metodą TDT w schizofrenii” nr NN 402 2825 33.

Wyniki przedstawione w niniejszej publikacji zostały uzyskane w ramach badań realizowanych jako część doświadczenia pracy inżynierskiej na kierunku biotechnologia na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Według niej zachorowanie na schizofrenię związane jest z zaburzeniami w rozwoju mózgu zachodzącymi w czasie ciąży oraz okresie pourodzeniowym, a także podczas pierwszego epizodu choroby.

Zaobserwowano zależność pomiędzy wystąpieniem powikłań położniczych a ryzykiem zachorowania na schizofrenię [3]. Wykazano związek wielu czynników działających na płód w czasie ciąży, jednak w większości ich efektem jest niedotlenienie płodu spowodowane czynnikami środowiskowymi (palenie papierosów, zaburzenia w rozwoju łożyska), co może powodować nieprawidłowości w rozwoju mózgu [4].

Argumentem przemawiającym za hipotezą neurorozwojową jest korelacja schizofrenii ze zmianami w obrębie listewek skórnych. Jest to związane z faktem, iż zarówno układ nerwowy jak i skóra rozwijają się z neuroektodermy. U części chorych oraz u ich krewnych zaobserwowano nieprawidłowe dermatoglify [5]. Ponadto u chorych na schizofrenię stwierdza się niewielkie anomalie fizyczne, które spowodowane są nieznacznymi nieprawidłowościami rozwojowymi w czasie pierwszych dwóch trymestrów ciąży. Są to drobne zmiany w obrębie struktur twarzy (usta, oczy), uszu i stóp [6]. Kolejnym markerem są subtelne zmiany neurologiczne (ang. neurological soft signs – NSS) polegające na zaburzeniach przetwarzania bodźców zmysłowych, koordynacji oraz skomplikowanych czynności motorycznych, które istotnie częściej występują wśród chorych oraz zdrowych członków ich rodzin w zestawieniu z grupą kontrolną [7]. Badania neuroobrazowe i post mortem wykazują także niewielkie zmiany neuroanatomiczne zachodzące zarówno w okresie poprzedzającym wystąpienie pierwszych objawów chorobowych, jak i w pierwszym epizodzie oraz w czasie trwania choroby. Zmiany te cechują się między innymi zaburzeniami w budowie ciała modelowego [8], jądra migdałowego [9], kory mózgowej [10], mózdzka [11], półkul mózgowych [12], hipokampa [13], wzgórza [14], a także w obrębie migracji neuronów, powodującymi nieprawidłowości w budowie istoty szarej mózgu [15].

Zaburzenia plastyczności synaptycznej mogą stanowić przyczynę deficytów poznawczych u chorych na schizofrenię. W badaniach post mortem zauważono u nich nieznacznie zmniejszoną objętość ciała neuronów (4–9%) w korze przedczołowej [16], redukcję wielkości obszaru dendrytów oraz kolców dendrytycznych [17], co mogło powodować zablokowanie fazy długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. long term potentiation – LTP) lub indukować fazę długotrwałego osłabienia synaptycznego (ang. long term depression – LTD) [18].

MMP-9 (ang. matrix metalloproteinase 9) należy do rodziny metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, która stanowi grupę zależnych od cynku enzymów proteolitycznych. Pełni istotną funkcję w proteolizie składników macierzy zewnątrzkomórkowej, znajdującej się wokół synapsy [19]; wydzielane jest głównie przez astrocyty [20]. Badania dowiodły, że MMP-9 odgrywa istotną rolę w rozwoju mózgu noworodków w czasie przebudowy tkankowej oraz w jego długotrwałym procesie dojrzewania [21]. U wcześniaków ze skrajnie niską wagą urodzeniową stwierdzono wyższy poziom ekspresji MMP-9 niż w przypadku noworodków urodzonych w terminie [22]. Stosunek MMP-9 do jego endogennego inhibitora TIMP-1 (ang. tissue inhibitor of metalloproteinase 1) jest skorelowany ze stopniem neurologicznych następstw po ostrej okołoporodowej asfiksji [23]. Ponadto w badaniach na zwierzętach

stwierdzono podwyższoną ekspresję MMP-9 u nowo narodzonych szczurów, u których spowodowano niedotlenienie w czasie życia płodowego [24].

Gen kodujący MMP-9 znajduje się na chromosomie 20q11.2-q.13.1 [25]. Analizowany w tej pracy -1562C>T (rs 3918242) jest funkcjonalnym polimorfizmem mającym wpływ na poziom transkrypcji genu. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism – SNP) w promotorze MMP-9 (-1562 pz) polegający na substytucji C>T wpływa na zmniejszenie wiązania jądrowych białek w tym rejonie, tym samym zwiększając aktywność transkrypcyjną. W zależności od występujących genotypów zmienia ulega aktywność promotora: genotyp C/C cechuje się mniejszą aktywnością w porównaniu z genotypem C/T czy też T/T (najwyższy poziom transkrypcji) [25].

Wykazano, że inhibicja MMP-2 i MMP-9 w hipokampie szczurów w ciągu pierwszych 60 minut nie wpływa na potencjalizację synaptyczną, potem jednak zachodzi gwałtowne obniżenie się poziomu potencjalizacji aż do wartości początkowej. Czas zaniku potencjalizacji w obecności inhibitorów MMP odpowiada przejściu z wczesnej fazy długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. early long term potentiation – E-LTP) w późną fazę długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. late long term potentiation – L-LTP) [26]. Przypuszcza się, że MMP-9 może odgrywać rolę w przekazywaniu sygnałów w synapsach [27]. Wzmożony poziom ekspresji genu MMP-9 stwierdzono podczas stymulacji kainianem w ciałach neuronów i dendrytach kory mózgowej oraz hipokampa (głównie w obrębie zakrętu zębatego) [28].

Badania asocjacyjne powyższego polimorfizmu w chorobach serca i nowotworach wskazały, że allel T podnosi ryzyko ciężkiego postępu w przypadku kilku rodzajów nowotworów [29] i zwiększa nasilenie miażdżycy naczyń wieńcowych [30]. Opisano związek allelu T z chorobą afektywną dwubiegunową [31], natomiast allel C znacząco częściej występuje u osób ze schizofrenią [32].

Powyższe wyniki wskazują na możliwy udział MMP-9 w mechanizmie patogenezy schizofrenii.

Material

Badanie przeprowadzone zostało wśród 147 niespokrewnionych osób chorych na schizofrenię (74 kobiet, 73 mężczyzn) oraz ich obojga rodziców. Pacjenci spełniali kryteria diagnostyczne schizofrenii według DSM-IV [33] oraz ICD-10 [34]. Diagnoza została potwierdzona przez dwóch lekarzy psychiatrów na podstawie ustrukturalizowanego wywiadu SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV) [35] oraz dokumentacji medycznej. U rodziców pacjentów, po przeprowadzeniu wywiadu, nie stwierdzono zaburzeń psychicznych. Ich dane demograficzne przedstawiono w tabeli 1 (*na następnej stronie*). Pacjenci byli rekrutowani z populacji polskiej, w większości z terenów Wielkopolski, i leczeni w Klinice Psychiatrii Dorosłych UM w Poznaniu. Średni wiek pacjentów wynosił 25,03 roku (SD = 6,67), a średni wiek zachorowania 20,31 roku (SD = 4,52).

Tabela 1. Średni wiek chorych i rodziców

	Pacjenci (n = 147)		Rodzice	
	Kobiety (n = 74)	Mężczyźni (n = 73)	Matki (n = 147)	Ojcowie (n = 147)
Średni wiek	26,04 (SD = 6,86)	24,01 (SD = 6,37)	52,34 (SD = 7,84)	55,11 (SD = 9,25)
Wiek początku choroby	20,06 (SD = 5,63)	20,54 (SD = 3,31)	–	–

Osoby biorące udział w badaniu udzieliły pisemnej zgody, a projekt badawczy został zaakceptowany przez terenową Komisję Etyczną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Metoda

Izolacja DNA z leukocytów z krwi obwodowej została przeprowadzona metodą wysalania [36]. Substytucja polimorfizmu SNP-1562C>T (rs 3918242) rozpoznawana jest przez enzym restrykcyjny PaeI (SphI). Analizę przeprowadzono metodą PCR-RFLP, do amplifikacji użyto starterów [31]:

L: 5' CAGCCTGGTCAACGTAGTGA3'

R: 5' TCGGGCAGGGTCTATATTCA3'.

Otrzymano produkt PCR o długości 297 pz, a następnie poddano go trawieniu restrykcyjnemu enzymem PaeI (fermentas). Dokonano elektroforetycznego rozdziału produktów na 2% żelu agarozowym. Uzyskano fragmenty DNA, na podstawie których określono genotypy. Allel C wyznaczono dzięki obecności fragmentów DNA o długości 297 pz (niehydrolizowany produkt PCR), a allel T charakteryzował się obecnością fragmentów DNA o długości 72 pz i 225 pz (hydrolizowany produkt PCR).

Analizę przeprowadzono wykorzystując test nierównowagi transmisji (ang. transmission disequilibrium test – TDT) [37]. Użyto w tym celu program Haploview v.4.2 (dostępnego pod adresem: <http://www.broadinstitute.org/ftp/pub/mpg/haploview/Haploview.jar>).

Wyniki

Badano częstość przekazywania alleli polimorfizmu MMP-9 przez zdrowych rodziców swoim dzieciom z rozpoznaniem schizofrenii, stosując test nierównowagi transmisji alleli. W tabeli 2 (*na następnej stronie*) przedstawiono szczegółowy opis badanych trio (osoby chorej i jej rodziców). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w przekazywaniu poszczególnych alleli. Częściej przekazywanym allelem był allel C (przekazany w 16 przypadkach, nie przekazany w 10 przypadkach, $p = 0,241$). Rozkład częstości genotypów dla całej badanej grupy wykazuje zgodność z prawem Hardy'ego-Weinberga (HWE = 0,828).

Omówienie wyników

W niniejszych badaniach nie stwierdzono związku badanego polimorfizmu ze schizofrenią. Jednak wcześniejsze badania asocjacyjne (typu: case control) polskiej populacji wykazały korelację między allelem C a schizofrenią [31]. Warto zauważyć,

Tabela 2. Częstość przekazywania alleli

	MMP-9
Rzadziej przekazywany allel	T
Częściej przekazywany allel	C
Częstość rzadkiego allelu	0,14
Przekazane/nie przekazane	16/10
Chi ²	1,385
p	0,241
Istotność statystyczna	nieistotne statystycznie

że w takich analizach nie da się wykluczyć efektu stratyfikacji, który mógłby spowodować fałszywie pozytywne wyniki. Dzięki wykorzystaniu metody TDT, która polega na analizowaniu genotypów zarówno osoby chorej, jak i jej obojga zdrowych rodziców (tworzących razem tzw. trio), unika się tego typu błędów. W statystycznej analizie uwzględnia się jedynie trio informatywne, składające się z rodziców, którzy po oznaczeniu genotypów badanego polimorfizmu okazali się osobnikami heterozygotycznymi. Statystycznie każdy z alleli powinien być przekazywany z taką samą częstością (50%). Jeśli tak nie jest, istnieją przesłanki, aby postulować, iż allel częściej przekazywany może być związany z chorobą.

Wykazanie braku asocjacji badanego polimorfizmu ze schizofrenią nie wyklucza faktycznego udziału MMP-9 w patogenezie choroby. W analizie statystycznej wzięto pod uwagę 26 trio informatywnych, co stanowi niewielką grupę w tego typu badaniach. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w większej, bardziej homogennej grupie z wykorzystaniem innych metod statystycznych. Dodatkowo, uzyskanie miarodajnych wyników komplikuje zróżnicowany obraz kliniczny choroby.

Na patogenezę schizofrenii, tak jak i innych chorób złożonych, oprócz czynników genetycznych mają wpływ także czynniki środowiskowe, dlatego postuluje się jako najbardziej prawdopodobny złożony model dziedziczenia (wiele genów, o bardzo małym efekcie genetycznym). Dlatego niezbędne są dalsze badania w celu ustalenia faktycznego udziału metaloproteinaz, a zwłaszcza MMP-9 w patogenezie schizofrenii.

Wnioski

Po przeprowadzeniu badań nad funkcjonalnym polimorfizmem -1562C>T metaloproteiny 9 nie stwierdzono istotnego statystycznie związku z zachorowaniem na schizofrenię.

Семейные ассоциативные исследования полиморфизма -1562C >T гена MMP-9 при шизофрении

Содержание

Задание. Задачей исследования был анализ ТДТ полиморфизма -1562C>T гена MMP-9 при шизофрении. MMP-9 является кандидатским геном, связанным с нейроразвительной гипотезой шизофрении.

Методы. Исследования проведены среди 147-трио (пациент и обои его здоровые родители). Генетический материал был изолирован из лейкоцитов методом высаживания. Полиморфизм исследован методом РЦР-РФЛП.

Статистический анализ проведен с использованием теста ТДТ (Transmission Disequilibrium Test) с использованием программы Халовью в. 4, 2.

Результаты. Не отмечено существенно-статистического различия зависимости между анализированным полиморфизмом MMP-9 (-1562C>T) и шизофренией.

Выводы. Утверждение отсутствия ассоциации не исключает возможного участия MMP-9 в патогенезе шизофрении. Необходимым является проведение последующих исследований на больших группах и иных популяциях.

Assoziationsstudien am -1562C>T-Polymorphismus im MMP-9-Gen in Schizophrenie

Zusammenfassung

Ziel. Das MMP-9-Gen ist Kandidatengen, das mit der neurobiologischer Hypothese der Schizophrenie verbunden ist. Das Ziel der Studie war die TDT-Analyse des -1562C>T-Polymorphismus im MMP-9-Gen in der Schizophrenie.

Methoden. Die Studien wurden auf 147 Trios durchgeführt (Patient und beiden gesunden Eltern). Das genetische Material wurde durch Aussalzen aus Leukozythen isoliert. Der Polymorphismus wurde mit dem RFLP/PCR-Verfahren untersucht, die statistische Analyse wurde mit dem TDT-Test (Transmission Disequilibrium Test) mit Hilfe vom Haploview v.4.2-Programms durchgeführt.

Ergebnisse. Es wurde keine statistisch signifikante Abhängigkeit zwischen dem analysierten MMP-9 – Polymorphismus (-1562C/T) und der Schizophrenie bewiesen.

Schlussfolgerungen. Die Tatsache, dass keine Assoziation gefunden wurde, zeugt davon nicht, dass sich MMP-9 an der Pathogenese der Schizophrenie nicht beteiligt. Es ist notwendig, weitere Studien an größeren Gruppen und anderen Populationen durchzuführen.

L'étude des associations familiales du polymorphisme-1562C>T du gène MMP-9 pendant la schizophrénie

Résumé

Objectif. MMP-9 est un gène candidat lié avec l'hypothèse du neuro développement de la schizophrénie. On essaie d'analyser TDT du polymorphisme-1562C>T du gène MMP9 pendant la schizophrénie.

Méthode. On examine 147 trios (patient et ses deux parents sains). Le matériel génétique est isolé des leucocytes en usant la méthode de salage. Le polymorphisme est analysé avec la méthode PCR-RFLP, l'analyse statistique est faite avec le teste TDT (Transmission Disequilibrium Test) en usant le programme Haploview v.4.2.

Résultats. On ne trouve pas d'association signifiante du polymorphisme examiné MMP-9(-1562C>T) et de la schizophrénie.

Conclusion. Ce manque d'association n'exclut pas la contribution possible du gène MMP-9 dans la pathogénie de la schizophrénie. Donc il est nécessaire de continuer d'autres recherches en question contenant les plus nombreux groupes et d'autres populations.

Piśmiennictwo

1. Weinberger DR. *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia.* Arch. Gen. Psychiatry 1987; 44: 660–669.
2. Murray RM, Lewis SW. *Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?* Brit. Med. J. 1987; 295: 681–682.

3. Bearden CE, Rosso IM, Hollister JM i in. *A prospective cohort study of childhood behavioral deviance and language abnormalities as predictors of adult schizophrenia*. Schizophr. Bull. 2000; 26: 395–410.
4. Kunugi H, Nanko S, Murray RM. *Obstetric complications and schizophrenia: prenatal underdevelopment and subsequent neurodevelopmental impairment*. Brit. J. Psychiatry 2001; 40: 25–29.
5. Rosa A, Cuesta MJ, Peralta V i in. *Dermatoglyphic anomalies and neurocognitive deficits in sibling pairs discordant for schizophrenia spectrum disorders*. Psychiatry Res. 2005; 137: 215–221.
6. Gourion D, Goldberger C, Bourdel MC i in. *Minor physical anomalies in patients with schizophrenia and their parents: prevalence and pattern of craniofacial abnormalities*. Psychiatry Res. 2004; 125: 21–28.
7. Arango C, Kirkpatrick B, Buchanan RW. *Neurological signs and the heterogeneity of schizophrenia*. Am. J. Psychiatry 2000; 157: 560–565.
8. Brambilla P, Cerini R, Gasparini A i in. *Investigation of corpus callosum in schizophrenia with diffusion imaging*. Schizophr. Res. 2005; 79: 201–210.
9. Chance SA, Esiri MM, Crow TJ. *Amygdala volume in schizophrenia: post-mortem study and review of magnetic resonance imaging findings*. Brit. J. Psychiatry 2002; 180: 331–338.
10. Fannon D, Chitnis X, Doku V i in. *Features of structural brain abnormality detected in first-episode psychosis*. Am. J. Psychiatry 2000; 157: 1829–1834.
11. Konarski JZ, McIntyre RS, Grupp LA i in. *Is the cerebellum relevant in the circuitry of neuropsychiatric disorders?* J. Psychiatry Neurosc. 2005; 30: 178–186.
12. Paillere-Martinot M, Caclin A, Artiges E i in. *Cerebral gray and white matter reductions and clinical correlates in patients with early onset schizophrenia*. Schizophr. Res. 2001; 50: 19–26.
13. Geuze E, Vermetten E, Bremner JD. *MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders*. Mol. Psychiatry 2005; 10: 160–184.
14. Clinton SM, Meador-Woodruff JH. *Thalamic dysfunction in schizophrenia: neurochemical, neuropathological, and in vivo imaging abnormalities*. Schizophr. Res. 2004; 69: 237–253.
15. Rioux L, Nissanov J, Lauber K i in. *Distribution of microtubule-associated protein MAP2-immunoreactive interstitial neurons in the parahippocampal white matter in subjects with schizophrenia*. Am. J. Psychiatry 2003; 160: 149–155.
16. Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. *Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease*. Arch. Gen. Psychiatry 1998; 55: 215–224.
17. Breakspear M, Terry JR, Friston KJ i in. *A disturbance of nonlinear interdependence in scalp EEG of subjects with first episode schizophrenia*. Neuroim. 2003; 20: 466–478.
18. Monfils MH, Teskey GC. *Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex*. Synapse 2004; 53: 114–121.
19. Dityatev A, Schachner M. *Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity*. Nat. Rev. Neurosc. 2003; 4: 456–468.
20. Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A i in. *Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum*. J. Neurosc. 1999; 19: 4994–5004.
21. Cockle JV, Gopichandran N, Walker JJ i in. *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications*. Reprod. Sc. 2007; 14: 629–645.
22. Natarajan G, Shankaran S, McDonald SA i in. *Circulating beta chemokine and MMP 9 as markers of oxidative injury in extremely low birth weight infants*. Pediatr. Res. 2010; 67: 77–82.

23. Sunagawa S, Ichiyama T, Honda R i in. *Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia*. Brain Dev. 2009; 31: 588–593.
24. Tong W, Chen W, Ostrowski RP i in. *Maternal hypoxia increases the activity of MMPs and decreases the expression of TIMPs in the brain of neonatal rats*. Dev. Neurobiol. 2010; 70: 182–194.
25. Zhang B, Henney A, Eriksson P i in. *Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1*. Hum. Genet. 1999; 105: 418–423.
26. Nagy V, Bozdagi O, Matynia A i in. *Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory*. J. Neurosci. 2006; 26: 1923–1934.
27. Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. *Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections?* EMBO J. 2002; 21: 6643–6648.
28. Michaluk P, Kaczmarek L, Rylski M. *Proteomika proteaz na przykładzie możliwej roli MMP-9 w plastyczności synaptycznej*. Neuropsychiatr. Neuropsychol. 2008; 3: 95–106.
29. Hughes S, Agbaje O, Bowen RL i in. *Matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes predict breast cancer progression*. Clin. Cancer Res. 2007; 13: 6673–6680.
30. Zhang B, Ye S, Herrmann SM i in. *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis*. Circulat. 1999; 99: 1788–1794.
31. Rybakowski JK, Skibinska M, Leszczynska-Rodziewicz A i in. *Matrix metalloproteinase-9 gene and bipolar mood disorder*. Neuromol. Med. 2009; 11: 128–132.
32. Rybakowski JK, Skibinska M, Kapelski P i in. *Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia*. Schizophr. Res. 2009; 109: 90–93.
33. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Fourth edition. Waszyngton: American Psychiatric Association; 1994.
34. *International classification of disease – ten revision (ICD-10). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Clinical descriptions and diagnostics guidelines*. Genwa: WHO; 1992.
35. First MB, Spitzer RL, Gibbon M i in. *User's guide for the Structured Clinical Interview for Dsm-IV axis I disorders – research version (SCID-1, version 2.0, February 1996, FINAL version)*.
36. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 1215.
37. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. *Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)*. Am. J. Hum. Genet. 1993; 52: 506–516.

Adres: Agata Groszewska
Zakład Genetyki w Psychiatrii
Katedry Psychiatrii UM
60-572 Poznań, ul. Szpitalna 27/33

Otrzymano: 30.10.2010
Zrecenzowano: 28.12.2010
Otrzymano po poprawie: 26.01.2011
Przyjęto do druku: 3.02.2011