

Analiza ekspresji genów apoptozy: *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* w pierwszym epizodzie schizofrenii

Analysis of the expression of *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* apoptosis genes during the first episode of schizophrenia

Kinga Szymona¹, Ewa Dudzińska², Hanna Karakuła-Juchnowicz^{1,3},
Paulina Gil-Kulik⁴, Piotr Chomik⁴, Małgorzata Świstowska⁴,
Joanna Gałaszkiwicz¹, Janusz Kocki⁴

¹ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Klinika Psychiatrii, Psychoterapii i Wczesnej Interwencji

² Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra Zdrowia Publicznego

³ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Neuropsychiatrii Klinicznej

⁴ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra Genetyki Medycznej, Zakład Genetyki Klinicznej

Summary

Aim. The aim of the study was the analysis of (1) the level of *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* apoptosis genes expression in schizophrenic patients and in the control group, and (2) the relationships between the genes expression level and the morphological and biochemical parameters, as well as the severity of psychopathological symptoms.

Method. The study included 21 patients diagnosed with schizophrenia according to ICD-10 and 26 healthy subjects. The following parameters were assessed: genes expression in peripheral blood lymphocytes, laboratory parameters and severity of psychopathological symptoms (using the PANSS).

Results. The expression of the *BCL2* gene and the *CASP3* gene was significantly higher in schizophrenic patients compared to the controls. A significant positive correlation was found between the *BAX* gene expression level and neutrophil, lymphocyte and monocyte counts as well as the severity of negative symptoms (PANSS-N), between *BCL2* and *CASP9* genes expression and the monocyte count, and between the *CASP3* gene expression and the lymphocyte count.

Conclusions. (1) Significantly higher expression of *BCL2* and *CASP3* genes in schizophrenic patients compared to the controls proves the intensification of the apoptosis process, fitting in the theory of increased apoptosis in the pathophysiology of schizophrenia. (2) Significant correlations between the *BAX* gene expression and differential blood count parameters (leucocyte, neutrophil, lymphocyte, monocyte count) in the group of schizophrenic patients suggest a relationship with immune dysregulation and confirm the presence of apoptosis in

peripheral blood lymphocytes. (3) The *BAX* gene expression may be indicative of the severity of negative symptoms in schizophrenia. (4) The analysis of the intercorrelation of studied genes expression indicates that *BAX* and *CASP3* genes were the most active in the apoptosis process in the study group.

Słowa kluczowe: schizofrenia, apoptoza, ekspresja genów

Key words: schizophrenia, apoptosis, gene expression

Wstęp

Schizofrenia jest ciężkim, przewlekłym zaburzeniem psychicznym, dotyczącym przede wszystkim osoby w okresie dojrzewania i wczesnej dorosłości, którego etiologia i patogeneza pozostają wciąż nie do końca wyjaśnione [1]. Wśród wielu teorii dotyczących etiopatogenezy tego zaburzenia znajduje się neurorozwojowa hipoteza schizofrenii, sformułowana w latach osiemdziesiątych XX wieku [2–4], z późniejszymi modyfikacjami i uaktualnieniami [5, 6]. Zakłada ona, że już w okresie rozwoju płodowego i wczesnodziecięcego dochodzi do pewnych nieprawidłowych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym osób dotkniętych tym zaburzeniem [7]. W procesie dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego krytycznym momentem jest przycinanie synaps (*pruning*), które może przebiegać w sposób nadmierny i prowadzić do zmniejszenia plastyczności mózgu [8]. Towarzyszy mu usuwanie części neuronów w procesie apoptozy, który jest zaprogramowaną genetycznie sekwencją przemian biochemicznych indukowanych za pomocą czynników inicjatorowych pochodzących z zewnątrz lub wewnątrz komórki [9].

Istnieją doniesienia, zgodnie z którymi proces ten może być również obserwowany poza OUN, np. w limfocytach krwi obwodowej [10]. W drodze wewnątrzkomórkowej sygnał o programowanej śmierci komórki jest regulowany przez białkowe czynniki anty – (Bcl-2, Bcl-XL) i proapoptotyczne (Bax, Bad, Bid) [11]. Białka proapoptotyczne, wbudowując się w wewnętrzną błonę mitochondrium, upośledzają działanie łańcucha oddechowego, a pod wpływem jonów wapnia z mitochondrium do cytoplazmy uwalniany jest cytochrom C. W końcowym etapie cytochrom C, połączony z białkiem Apaf-1, łączy się z kaspazą-9 (kaspazą inicjatorową), tworząc apoptosom. Kaspazy wykonawcze 3, 6 i 7 powodują rozpad białek i doprowadzają do dezintegracji komórki [12]. Procesem decyzyjnym wewnątrz komórki co do przejścia na drogę apoptozy jest proces aktywacji genów [13], których polimorfizm był przedmiotem wielu badań [14–16]. Dostępna literatura jest także źródłem informacji na temat poziomu białek pro – i antyapoptotycznych u pacjentów chorujących na schizofrenię: o niskim poziomie Bcl-2, zwiększonym wskaźniku Bax/Bcl-2 czy zwiększonej aktywności kaspazy 3 [17–20]. Pomimo to pojawiają się doniesienia, w których zaobserwowano zmniejszoną aktywność genów i białek proapoptotycznych [21, 22]. Białko BIRC 6 (BRUCE) działa antyapoptotycznie, hamując aktywację kaspaz [23]. Istnieje niewiele badań dotyczących aktywności genu *BIRC6* w schizofrenii, a wyniki jednego z nich wskazują na jego nakładanie się (*overlapping genes*) w zaburzeniach ze spektrum autyzmu i schizofrenii [24]. Zwiększona apoptoza wydaje się kluczowym procesem również w teorii neurodegeneracyjnej i stanowi łącznik pomiędzy tą teorią a wyżej opisaną hipotezą neurorozwojową [19].

Cel pracy

Celem pracy było (1) porównanie poziomu ekspresji genów apoptozy *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* u pacjentów ze schizofrenią i w grupie kontrolnej oraz (2) określenie powiązań pomiędzy poziomem ekspresji genów a parametrami morfologicznymi i biochemicznymi krwi obwodowej oraz nasileniem objawów psychopatologicznych.

Material

Do badania włączono 21 pacjentów (18 mężczyzn i 3 kobiety) z rozpoznaniem schizofrenii według kryteriów ICD-10 (F20) w trakcie trwania pierwszego epizodu choroby, w wieku 17–35 lat (średnia wieku = 23 lata; $SD = 4,8$) (grupa SCH). Pacjenci byli hospitalizowani w I Klinice Psychiatrii, Psychoterapii i Wczesnej Interwencji w Lublinie oraz leczeni ambulatoryjnie w PZP przy Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Lublinie.

Grupa kontrolna (K) obejmowała 26 zdrowych osób (20 mężczyzn i 6 kobiet), w wieku 18–32 lat (średnia wieku = 22 lata; $SD = 4,1$) bez obciążeń rodzinnych zaburzeniami psychicznymi. Badani nie różnili się istotnie w zakresie wieku i płci.

Kryteriami włączenia do badań było wyrażenie świadomej, pisemnej zgody na udział w badaniu, brak aktywnych lub przebytych chorób neurologicznych, zapalnych i autoimmunologicznych, brak występowania w przeszłości lub aktualnie zespołu uzależnienia od alkoholu lub innych substancji psychoaktywnych oraz niewystępowanie obniżenia sprawności intelektualnej ocenianego na podstawie badania psychiatrycznego. Nie odnotowano schorzeń somatycznych, które stanowiłyby bezwzględne kryterium wykluczenia. Dodatkowo w grupie kontrolnej kryterium włączenia było niewystępowanie w przeszłości ani aktualnie zaburzeń psychicznych. Oceny stanu psychicznego mającej na celu wykluczenie występowania zaburzeń psychicznych w grupie kontrolnej dokonywał doświadczony psychiatra (KS). Pacjenci otrzymywali atypowe leki przeciwpsychotyczne. Badanie ekspresji genów przeprowadzono po 4 tygodniach farmakoterapii.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (KE-0254/77/2012).

Metody

W przeprowadzonym badaniu zastosowano następujące metody:

Określenie ekspresji genów *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* z limfocytów krwi obwodowej. Całkowity komórkowy RNA izolowano zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi [25]. Następnie przeprowadzono reakcję syntezy cDNA, z użyciem zestawu odczynników High-Capacity cDNA Transcription Kits with RNase inhibitor (Applied Biosystems). Wykorzystano 1 μg RNA rozpuszczonego w 10 μl wody ultraczystej oraz 10 μl mieszaniny odczynników (na którą składały się: 2 μl – 10xRT Buffer; 0,8 μl 10xNTPs (100 mM); 2 μl 10xRT Random Primer; 1 μl RNasin 20 U/ μl ; 1 μl Reverse transcriptase 50 U/ μl oraz 3,2 μl wody ultraczystej). cDNA amplifikowano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, w systemie StepOnePlus (Applied

Biosystems). Reakcję prowadzono z użyciem sondy typu TaqMan specyficznej dla badanego genu: dla genu *BAX* wykorzystano sondę Hs00180269_m1, dla genu *BCL2* sondę Hs00608023_m1, dla genu *BIRC6* sondę Hs00212288_m1, dla genu *CASP3* sondę Hs00234387_m1, dla genu *CASP9* sondę Hs00154261_m1, dla genu *TRPM2* sondę Hs01066071_m1 (Applied Biosystems). Jako gen referencyjny wykorzystano *GAPDH*. Istnieją doniesienia o znaczącej roli tego genu w cytotoksyczności i mechanizmach apoptotycznych [26]. Jego ekspresja w badanych próbach była stabilna. Po zakończeniu reakcji wartość relatywnej ekspresji *RQ* (*Relative Quantification*) genów badanych w komórkach krwi obwodowej pacjentów z grupy badanej względem grupy kontrolnej wyliczano ze wzoru $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ [27].

Jednocześnie wykonano badania laboratoryjne (morfologia).

Z użyciem *Skali Objawów Pozytywnych i Negatywnych w Schizofrenii* (*The Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia – PANSS*) oceniano nasilenie objawów psychopatologicznych schizofrenii [28].

Analizę wyników ekspresji oraz analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania Expression Suit Software Version 1.0.3 (Life Technologies) oraz programu Statistica 10 for Windows. Dane statystyczne pomiędzy grupą badaną i kontrolną porównano z użyciem testu *t*-Studenta. Wartość $p < 0,05$ została uznana za statystycznie istotną. Korelacje między genami a zmiennymi klinicznymi oceniono z zastosowaniem współczynnika rang Spearmana.

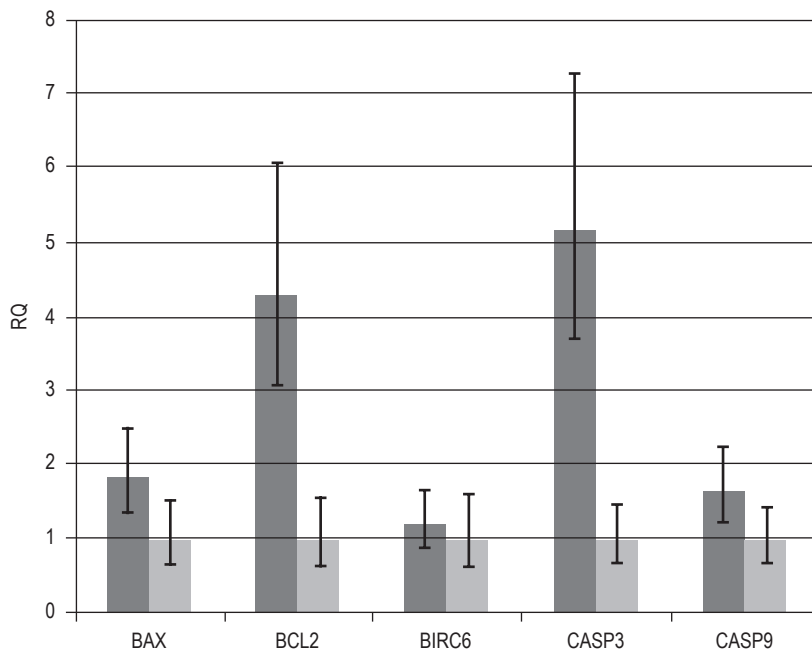
Wyniki

Tabela 1. Demograficzne i kliniczne cechy badanych grup

	SCH (n = 21)	K (n = 26)	p
Wiek (x, SD, lata)	23 (4,8)	22 (4,1)	0,42
Płeć (% , męska)	85,71	76,92	0,93
Długość trwania choroby (x, SD, miesiące)	4,71 (2,17)	-	
Ekwiwalenty chloropromazyny – mg (x, SD)	294 (115)	-	
PANSS total (x, SD)	97,05 (21,62)	-	
PANSS-P (x, SD)	22,23 (7,91)	-	
PANSS-N(x, SD)	26,23 (7,17)	-	
PANSS-G (x, SD)	48,59 (13,18)	-	

p – poziom istotności statystycznej, SD – odchylenie standardowe, PANSS total – Skala Objawów Pozytywnych i Negatywnych w Schizofrenii – wynik całkowity, PANSS – P – Skala Pozytywna, PANSS – N – Skala Negatywna, PANSS G – Skala Ogólnej Psychopatologii

W wyniku przeprowadzonych badań ekspresji genów: *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9* metodą qPCR wykazano, że geny te ulegają zwiększonej ekspresji na poziomie mRNA w limfocytach krwi obwodowej pacjentów ze schizofrenią w porównaniu do osób zdrowych (wykres 1).



Wykres 1. Różnice w średnim poziomie względnej ekspresji $RQ \pm SEM$ genów: BAX, BCL2, BIRC6, CASP3, CASP9 w limfocytach krwi obwodowej pomiędzy grupą SCH i K

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Na podstawie przeprowadzonych badań w limfocytach krwi obwodowej u pacjentów ze schizofrenią stwierdzono ponad 5-krotnie istotnie wyższą ekspresję genu *CASP3* ($p = 0,005$), a także ponad 4-krotnie istotnie wyższą ekspresję genu *BCL2* ($p = 0,000001$) w stosunku do kontroli (wykres 1).

W limfocytach krwi obwodowej u pacjentów ze schizofrenią wykazano istotne statystycznie interkorelacje pomiędzy badanymi genami (tab. 2). Najaktywniejszymi genami w procesie apoptozy w badanej grupie wydają się *BAX* i *CASP3*, których wartość ekspresji korelowała z wartościami ekspresji wszystkich pozostałych genów.

Tabela 2. Korelacje R Spearmana pomiędzy badanymi genami

	logRQ BAX	logRQ BCL2	logRQ BIRC6	logRQ CASP3	logRQ CASP9
logRQ BAX	1,000	0,678*	0,644*	0,856*	0,698*
logRQ BCL2	0,678*	1,000	0,403	0,677*	0,377
logRQ BIRC6	0,644*	0,403	1,000	0,729*	0,621*
logRQ CASP3	0,856*	0,677*	0,729*	1,000	0,565*
logRQ CASP9	0,698*	0,377	0,621*	0,565*	1,000

* $p < 0,05$

Badano zależność poziomu ekspresji genów: *BAX*, *BCL2*, *BIRC6*, *CASP3*, *CASP9*, od wieku, płci, długości choroby i nie wykazano różnic istotnych statystycznie w zależności od tych parametrów.

Średni wynik całkowity w skali PANSS wyniósł $92,0 \pm 21,7$, wynik w podskali objawów pozytywnych to $21,96 \pm 6,57$, negatywnych – $25 \pm 7,3$. Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy nasileniem objawów klinicznych mierzonych skalą PANSS-N a ekspresją genu *BAX* w grupie pacjentów ze schizofrenią (tab. 3).

Tabela 3. Korelacja porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją genów a wynikami w skali PANSS

	PANSS-P	PANSS-N	PANSS-G	PANSS-T
logRQ BAX	-0,122	0,443*	0,064	0,188
logRQ BCL2	-0,184	0,089	-0,107	-0,026
logRQ BIRC6	0,006	0,521	0,075	0,225
logRQ CASP3	-0,058	0,236	0,186	0,209
logRQ CASP9	-0,474	0,334	-0,361	-0,245

* $p < 0,05$, PANSS-P – Skala Pozytywna, PANSS-N – Skala Negatywna, PANSS-G – Skala Ogólnej Psychopatologii, PANSS-T – Wynik całkowity

W grupie pacjentów ze schizofrenią analiza zależności ekspresji genów apoptozy od parametrów morfologicznych krwi wykazała następujące zależności: istotną korelację dodatnią poziomu ekspresji genu *BAX* z liczbą neutrofilii, limfocytów, monocytów, *BCL2* z liczbą monocytów, *CASP3* z liczbą limfocytów, natomiast *CASP9* z liczbą monocytów. Wyniki te przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Korelacja porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją genów a parametrami morfologii krwi i badań biochemicznych

	WBC	NEU	LYM	MON
logRQ BAX	0,350	0,762*	0,810*	0,778*
logRQ BCL2	0,045	0,619	0,595	0,766*
logRQ BIRC6	0,363	0,600	0,771	0,319
logRQ CASP3	0,285	0,690	0,762*	0,467
logRQ CASP9	0,182	0,464	0,500	0,821*

* $p < 0,05$, WBC – wskaźnik liczby leukocytów, NEU – wskaźnik liczby neutrocytów, LYM – wskaźnik liczby limfocytów, MON – wskaźnik liczby monocytów

Omówienie wyników

Wyniki przeprowadzonego badania wykazały istotne zwiększenie ekspresji genów *BCL2* i *CASP3* u pacjentów ze schizofrenią w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Uzyskane wyniki wskazują, że u badanych pacjentów mogą zachodzić

zmiany w realizacji programu genetycznego i zaburzenia systemów kontrolujących programowaną śmierć komórki, które obserwuje się w schizofrenii, wiążące się ze zwiększoną eliminacją synaps, czyli zjawiskiem tzw. pruningu [8, 29]. Ta zwiększona aktywność proapoptotyczna w grupie pacjentów ze schizofrenią może stanowić potwierdzenie teorii nasilonej apoptozy w patofizjologii schizofrenii [8, 18], mającej swoje wykładniki morfotyczne w postaci zmniejszonej objętości struktur mózgowych w schizofrenii [30]. Wyniki naszych badań korespondują z badaniami innych autorów, sugerujących udział białka Bcl-2 w patofizjologii schizofrenii [17, 18, 20]. Jarskog [31] sugeruje, że aktywność apoptotyczna może być zmniejszona w przewlekłej fazie choroby. Nasze wyniki korespondują także z doniesieniami, w których wykazano, że zmieniona ekspresja genów z rodziny *BCL2* spowodowała wzrost podatności na apoptozę [9, 11]. Jarskog i wsp. [17, 18] oraz Tsai i wsp. [20] wykazali istotne związki pomiędzy zastosowanym leczeniem antypsychotycznym a wzrostem białka Bcl-2, podkreślając neuroprotektoryjne i antyapoptotyczne działanie atypowych leków przeciwpsychotycznych. W świetle tych doniesień obserwowaną w naszym badaniu zwiększoną ekspresję jednego z genów inhibitorów apoptozy – genu *BCL2* w grupie pacjentów, tłumaczyć można wpływem leczenia przeciwpsychotycznego. Bai i wsp. [32] wykazali, że stosowanie olanzapiny i klopazyny zwiększa poziom mRNA Bcl-2 w mózgu szczurów o 30–50%.

Następnym interesującym wynikiem naszych badań jest istotnie zwiększona ekspresja genu *CASP3*. Ustalenia te korespondują z wynikami badań innych autorów, wskazujących na zmienioną aktywność kaspazy 3 w schizofrenii [33]. Batalla i wsp. [30] ujawnili istotne statystycznie związki pomiędzy aktywnością kaspazy 3 a neurotransmitami (glutaminian, N-acetyloasparaginian) i objętością struktur mózgu chorujących na schizofrenię. Zwiększona ekspresja *CASP3* i *CASP9* u pacjentów ze schizofrenią może być odpowiedzialna za wytworzenie „środowiska proapoptotycznego”, przez co przyczynia się do zwiększonego ryzyka wystąpienia tej choroby [8]. Istnieją doniesienia dotyczące polimorfizmu genów apoptozy [15, 16], a także *MMP-9* (*Matrix Metalloproteinase 9 gene*), *ANKK1* (*Ankyrin Repeat and Kinase Domain containing 1 gene*), *DRD2* (*Dopamine Receptor 2 gene*) [34, 35]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy nawiązują do tych badań. Wzmógłony poziom ekspresji genów apoptozy w naszym badaniu można tłumaczyć uszkodzeniami okołoprodowymi (niedotlenienia), infekcją prenatalną [36, 37] lub/i predyspozycją genetyczną, obecną od okresu płodowego. W świetle tej interpretacji otrzymane wyniki mogą być potwierdzeniem teorii neurorozwojowej schizofrenii [3, 38].

Interesujące okazały się wyniki dotyczące korelacji pomiędzy ekspresją badanych genów a parametrami układu białokrwinkowego w grupie osób ze schizofrenią. Świadczą one o nasilonej apoptozie w limfocytach krwi obwodowej i zaburzeniach swoistej odpowiedzi immunologicznej, a także sugerują aktywację układu immunologicznego w schizofrenii, wspierając hipotezę neuroimmunologiczną schizofrenii [39]. Wiele badań wskazuje na rolę w patogenezie schizofrenii zaburzonej równowagi pomiędzy układem cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych [40], odpowiedzią komórkową TH1 i humoralną TH2 [41]. Wyniki uzyskane w tej pracy sugerują istotne związki pomiędzy zmienioną ekspresją badanych genów a dysregulacją układu immunologicznego

w badanej grupie pacjentów ze schizofrenią, co potwierdzają także badania Li i wsp. [42], którzy zaobserwowali istotny związek genu *Interferon regulatory factor 3 (IRF3)* ze zwiększoną zachorowalnością na schizofrenię.

Podsumowując, możemy stwierdzić, że wymienione doniesienia dostarczają istotnych informacji dotyczących procesów patofizjologicznych zachodzących w mózgu na podstawie obserwowanych zmian parametrów mierzonych we krwi obwodowej [20, 33, 40–42]. Ograniczeniem naszego badania jest brak danych odnośnie stosowanej diety oraz jej suplementów, spożycia alkoholu, palenia papierosów oraz poziomu hormonów steroidowych, które mogą mieć wpływ na poziom ekspresji badanych genów. W kolejnym planowanym badaniu istotną będzie ocena nasilenia ekspresji genów apoptozy *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP9* także w płynie mózgowo-rdzeniowym w zależności od wyżej wymienionych czynników, długości leczenia, okresu choroby, czynników perinatalnych, obejmująca ocenę wolumetryczną struktur mózgowych w większej populacji pacjentów. Rozważany będzie także wybór innego genu referencyjnego.

Wnioski

1. Zaobserwowano istotnie wyższą ekspresję genów *BCL2* i *CASP3* w limfocytach krwi obwodowej pacjentów ze schizofrenią w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych, co dowodzi zwiększonego nasilenia procesu apoptozy, wpisując się w teorię zwiększonej apoptozy w patofizjologii schizofrenii.
2. Wykazano istnienie istotnych korelacji pomiędzy ekspresją genu *BAX* a parametrami układu białokrwinkowego (liczbą leukocytów, neutrofilii, limfocytów, monocytów) w grupie pacjentów ze schizofrenią, co sugeruje związek z dysregulacją immunologiczną i potwierdza obecność apoptozy w limfocytach krwi obwodowej.
3. Zaobserwowano istotną dodatnią korelację pomiędzy nasileniem objawów negatywnych mierzonych skalą PANSS-N a ekspresją genu *BAX* u pacjentów ze schizofrenią, co sugeruje możliwość wykorzystania oznaczania poziomu *BAX* i ekspresji genu *BAX* we krwi obwodowej jako predyktora skuteczności leczenia w schizofrenii w zakresie redukcji objawów negatywnych.
4. Z analizy korelacji ekspresji badanych genów wynika, że najaktywniejszymi genami w procesie apoptozy w badanej grupie były *BAX* i *CASP3*, których wartość ekspresji koreluje z wartościami ekspresji wszystkich pozostałych genów.

Piśmiennictwo

1. Kos MZ, Carless MA, Peralta J, Curran JE, Quillen EE, Almeida M i wsp. *Exome sequences of multiplex, multigenerational families reveal schizophrenia risk loci with potential implications for neurocognitive performance*. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2017; 174(8): 817–827.
2. Feinberg I. *Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence?* J. Psychiatr. Res. 1982; 17(4): 319–334.

3. Weinberger DR. *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia*. Arch. Gen. Psychiatry. 1987; 44(7): 660–669.
4. Murray RM, Lewis SW. *Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?* Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). 1987; 295(6600): 681–682.
5. Murray RM, Bhavsar V, Tripoli G, Howes O. *30 years on: How the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia morphed into the developmental risk factor model of psychosis*. Schizophr. Bull. 2017; 43(6): 1190–1196.
6. Weinberger DR. *Future of days past: Neurodevelopment and schizophrenia*. Schizophr. Bull. 2017; 43(6): 1164–1168.
7. Debnath M, Venkatasubramanian G, Berk M. *Fetal programming of schizophrenia: Select mechanisms*. Neurosci. Biobehav. Rev. 2015; 49: 90–104.
8. Sekar A, Bialas AR, Rivera de H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N i wsp. *Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4*. Nature. 2016; 530(7589): 177–183.
9. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P i wsp. *Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell. Death Differ. 2018; 25(3): 486–541.
10. Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV, Porokhovnik LN, Izevskaya VL, Kutsev SI i wsp. *Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients*. J. Psychiatr. Res. 2017; 87: 15–22.
11. Wang X. *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes. Dev. 2001; 15(22): 2922–2933.
12. Elmore S. *Apoptosis: A review of programmed cell death*. Toxicol. Pathol. 2007; 35(4): 495–516.
13. Kerns D, Vong GS, Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P i wsp. *Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia*. Schizophr. Res. 2010; 120(1–3): 150–158.
14. Yang Y, Xiao Z, Chen W, Sang H, Guan Y, Peng Y i wsp. *Tumor suppressor gene TP53 is genetically associated with schizophrenia in the Chinese population*. Neurosci. Lett. 2004; 369(2): 126–131.
15. Chen X, Sun C, Chen Q, O’Neill FA, Walsh D, Fanous AH i wsp. *Apoptotic engulfment pathway and schizophrenia*. PLoS One. 2009; 4(9): e6875.
16. Benedetti F, Poletti S, Radaelli D, Bernasconi A, Cavallaro R, Falini A i wsp. *Temporal lobe grey matter volume in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism influencing glycogen synthase kinase 3- β activity*. Genes Brain Behav. 2010; 9(4): 365–371.
17. Jarskog LF, Gilmore JH, Selinger ES, Lieberman JA. *Cortical bcl-2 protein expression and apoptotic regulation in schizophrenia*. Biol. Psychiatry. 2000; 48(7): 641–650.
18. Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH. *Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: High Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation*. Am. J. Psychiatry. 2004; 161(1): 109–115.
19. Gassó P, Mas S, Molina O, Lafuente A, Bernardo M, Parellada E. *Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients*. J. Psychiatr. Res. 2014; 48(1): 94–101.
20. Tsai MC, Liou CW, Lin TK, Lin IM, Huang TL. *Bcl-2 associated with positive symptoms of schizophrenic patients in an acute phase*. Psychiatry Res. 2013; 210(3): 735–738.
21. Benes FM, Matzilevich D, Burke RE, Walsh J. *The expression of proapoptosis genes is increased in bipolar disorder, but not in schizophrenia*. Mol. Psychiatry. 2006; 11(3): 241–251.

22. Catts VS, Catts SV, McGrath JJ, Féron F, McLean D, Coulson EJ i wsp. *Apoptosis and schizophrenia: A pilot study based on dermal fibroblast cell lines*. Schizophr. Res. 2006; 84(1): 20–28.
23. Rupniewska Z, Bojarska-Junak A. [*Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization and the role played by Bcl-2 family proteins*]. Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). 2004; 58: 538–547.
24. Habela CW, Song H, Ming GL. *Modeling synaptogenesis in schizophrenia and autism using human iPSC derived neurons*. Mol. Cell Neurosci. 2016; 73: 52–62.
25. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 1987; 162(1): 156–159.
26. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y i wsp. *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat. Cell Biol. 2005; 7(7): 665–674.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods. 2001; 25(4): 402–408.
28. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. *The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia*. Schizophr. Bull. 1987; 13(2): 261–276.
29. Gabrylska MM, Szymański M, Barciszewski J. [*DNA: From Miescher to Venter and beyond*]. Postepy Biochem. 2009; 55(3): 342–354.
30. Batalla A, Bargalló N, Gassó P, Molina O, Pareto D, Mas S i wsp. *Apoptotic markers in cultured fibroblasts correlate with brain metabolites and regional brain volume in antipsychotic-naive first-episode schizophrenia and healthy controls*. Transl. Psychiatry. 2015; 5: e626.
31. Jarskog LF. *Apoptosis in schizophrenia: Pathophysiologic and therapeutic considerations*. Curr. Opin. Psychiatry. 2006; 19(3): 307–312.
32. Bai O, Zhang H, Li XM. *Antipsychotic drugs clozapine and olanzapine upregulate bcl-2 mRNA and protein in rat frontal cortex and hippocampus*. Brain Res. 2004; 1010(1–2): 81–6.
33. Djordjević VV, Ristić T, Lazarević D, Cosić V, Vlahović P, Djordjević VB. *Schizophrenia is associated with increased levels of serum Fas and FasL*. Clin. Chem. Lab. Med. 2012; 50(6): 1049–1054.
34. Natarajan G, Shankaran S, McDonald SA, DAS A, Stoll BJ, Higgins RD i wsp. *Circulating beta chemokine and MMP 9 as markers of oxidative injury in extremely low birth weight infants*. Pediatr. Res. 2010; 67(1): 77–82.
35. Chen SF, Shen YC, Chen CH. *Effects of the DRD3 Ser9Gly polymorphism on aripiprazole efficacy in schizophrenic patients as modified by clinical factors*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2009; 33(3): 470–474.
36. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. *The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia*. Mol. Psychiatry. 2006; 11(1): 47–55.
37. Pedersen MG, Stevens H, Pedersen CB, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen PB. *Toxoplasma infection and later development of schizophrenia in mothers*. Am. J. Psychiatry. 2011; 168(8): 814–821.
38. Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S i wsp. *A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis*. Neurosci. Biobehav. Rev. 2016; 65: 185–194.
39. García-Bueno B, Bioque M, Mac-Dowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L i wsp. *Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: Toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia*. Schizophr. Bull. 2014; 40(2): 376–387.

40. Szymona K, Zdzińska B, Karakuła-Juchnowicz H, Kocki T, Kandefier-Szerszeń M, Flis M i wsp. *Correlations of kynurenic acid, 3-hydroxykynurenine, sIL-2R, IFN- α , and IL-4 with clinical symptoms during acute relapse of schizophrenia*. *Neurotox. Res.* 2017; 32(1): 17–26.
41. Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. *The role of inflammation in schizophrenia*. *Front. Neurosci.* 2015; 9: 372.
42. Li X, Zhang W, Lencz T, Darvasi A, Alkelai A, Lerer B i wsp. *Common variants of IRF3 conferring risk of schizophrenia*. *J. Psychiatr. Res.* 2015; 64: 67–73.

Adres: Joanna Gałaszkiwicz
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
I Klinika Psychiatrii, Psychoterapii i Wczesnej Interwencji
20-439 Lublin, ul. Głuska 1
e-mail: a.galaszkiwicz@interia.pl

Otrzymano: 30.05.2018

Zrecenzowano: 16.07.2018

Otrzymano po poprawie: 15.08.2018

Przyjęto do druku: 25.11.2018