



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Παράγοντες φλεγμονής σε ασθενείς με σχιζοφρένεια»

Ορφέας Ιωάννης Υφαντίδης

Λάρισα
Σεπτέμβριος 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

«Inflammatory factors in patients with schizophrenia»

Orfeas Ioannis Yfantidis

Larissa
September 2025

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Σταματία Παπουτσοπούλου

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καλλιόπη Λιαδάκη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημική Φαρμακολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευτυχία Ασπροδίνη

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
Τμήμα Ιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ - ΓΛΩΣΣΑΡΙ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Σχιζοφρένεια.....	10
Συμπτώματα	11
1.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου	12
1.3 Η σύνδεση του ανοσοποιητικού συστήματος και των λοιμώξεων με την ψύχωση	15
1.4 Κυτοκίνες και Ψύχωση	16
1.5 Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)	17
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Δειγματοληψία και ψυχομετρικές εκτιμήσεις.....	20
Ψυχομετρική αποτύπωση	20
Τεστ SCL-90.....	21
2.2 Απομόνωση των PBMCs και αποθήκευση σε βαθειά κατάψυξη	23
2.3 Απόψυξη κυττάρων - Κυτταροκαλλιέργειες.....	25
Απόψυξη	25
Καταμέτρηση κυττάρων.....	25
Καλλιέργειες και <i>in vitro</i> ενεργοποίηση	26
2.4 Κυτταρομετρία ροής.....	27
2.5 Elisa	29

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη	31
3.2 Ανάλυση ευρημάτων ψυχομετρικών εκτιμήσεων	31
3.3 Ανίχνευση ενδοκυττάριας IL-6 σε καλλιέργειες μακροφάγων	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την Καθηγήτριά μου Ματούλα Παπουτσοπούλου,
τον Michel, την Θάλεια,
τους γονείς μου

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ - ΓΛΩΣΣΑΡΙ

ALSPAC= Avon Longitudinal Study of Parents and Children, Διαχρονική Μελέτη

Γονέων και Παιδιών Avon

BNST=bed nucleus for stria terminalis

CEA=central amygdala

CP=choroid plexus, χοριοειδές πλέγμα

CRP= C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

CVO= circumventricular organ, περικοιλιακά όργανα

FEP=πρώτο επεισόδιο ψύχωσης

IL-1β= ιντερλευκίνη-1β

IL-6= ιντερλευκίνη-6

IFN-γ= ιντερφερόνη-γ

LPS= λιποπολυσακχαρίτης

NTS=nucleus tractus solitarius

PAG=periaqueductal grey

PAMP=pathogen-associated molecular patterns, μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα

PB=parabrachial nucleus

PBMCs= μονοπύρνηνα κύτταρα περιφερικού αίματος

PRRs= Pattern recognition receptors, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

PVM=peri-vascular macrophage

PVN=periventricular nucleus

SON=supraoptic nucleus

TLR=Toll-like receptor

TNF-α= παράγοντας νέκρωσης όγκων-α

VLM=ventrolateral medulla

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σχιζοφρένεια αποτελεί μια χρόνια και πολυπαραγοντική ψυχική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από θετικά, αρνητικά και γνωστικά ελλείμματα, με σημαντική επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η εμπλοκή φλεγμονωδών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της νόσου, με ιδιαίτερη έμφαση στην ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Η ιντερλευκίνη-6 είναι μια κυτοκίνη με καίριο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και στην επικοινωνία με το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, έγινε λήψη δείγματος ορού αίματος και δείγμα περιφερικού αίματος από όπου απομονώθηκαν μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς δότες και ασθενείς με σχιζοφρένεια. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Έπειτα, στα κύτταρα των καλλιεργειών έγινε διέγερση με τη χρήση λιποπολυσακχαρίτη (LPS), για να επιτευχθεί η *in vitro* παραγωγή της IL-6. Η έκφραση της IL-6 αξιολογήθηκε τόσο με τη μέθοδο ELISA στο υπερκείμενο των καλλιεργειών όσο και με κυτταρομετρία ροής μέσω ενδοκυττάριας χρώσης με αντίσωμα συζευγμένο με φθορογόνο Phycoerythrin (PE, anti-IL-6-PE). Παράλληλα, μετρήθηκε η ποσότητα IL-6 στον ορό μέσω της μεθόδου ELISA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν παραγωγή IL-6 μετά από διέγερση μακροφάγων με LPS με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών και των ασθενών. Παράλληλα, οι μετρήσεις στον ορό, ανέδειξαν τάση για υψηλότερα επίπεδα IL-6 στους ασθενείς, χωρίς ωστόσο να επιτυγχάνεται στατιστική σημαντικότητα, πιθανόν λόγω του περιορισμένου μεγέθους δείγματος. Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται με διεθνείς μελέτες που καταδεικνύουν δυσλειτουργία της ανοσολογικής απόκρισης και αυξημένη φλεγμονώδη δραστηριότητα στη σχιζοφρένεια, αναδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο της IL-6 ως βιοδείκτη της νόσου.

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic and multifactorial psychiatric disorder characterized by positive, negative, and cognitive symptoms, leading to significant impairment in patients' quality of life. In recent years, the involvement of inflammatory mediators in the pathophysiology of the disorder has been highlighted, with particular emphasis on interleukin-6 (IL-6). IL-6 is a cytokine that plays a pivotal role in the regulation of the immune system as well as communication with the central nervous system.

For the present study, both serum samples and peripheral blood samples were collected, from which peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, obtained from healthy donors and patients with schizophrenia. The cells were cultured under specific conditions and subsequently stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to induce in vitro IL-6 production. IL-6 expression was assessed both by ELISA in the culture supernatants and by flow cytometry using intracellular staining with a PE-conjugated antibody (anti-IL-6-PE). Additionally, IL-6 concentration was measured in serum samples using ELISA.

The results showed increased IL-6 production after LPS stimulation, with statistically significant differences between healthy individuals and patients. IL-6 serum measurements revealed a tendency toward higher IL-6 levels in patients, although statistical significance was not achieved. These findings are consistent with international studies demonstrating immune dysregulation and increased inflammatory activity in schizophrenia, highlighting the potential role of IL-6 as a biomarker of the disorder.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σχιζοφρένεια είναι μια χρόνια ψυχιατρική διαταραχή με σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργικότητα και ποιότητα ζωής των ασθενών. Αποτελεί διαταραχή πολυπαραγοντικής αιτιολογίας καθώς σχετίζεται με πολλαπλά γενετικά επιτόπια αλλά και με αναπτυξιακούς και μεταγεννητικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Khandaker et al 2014). Πράγματι, παρότι η αιτιολογία της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, σύγχρονες θεωρίες υποστηρίζουν ότι η διαταραχή προκύπτει από τη σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικών, νευροαναπτυξιακών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον των αιτιολογικών παραγόντων της σχιζοφρένειας έχει στραφεί στο ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα των φλεγμονωδών παραγόντων που ενέχονται στην εμφάνιση της νόσου. Μια πιθανή σύνδεση μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και της σχιζοφρένειας είχε ήδη προταθεί πάνω από έναν αιώνα πριν και η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται σήμερα από επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες καταδεικνύουν συσχετίσεις με λοιμώξεις και συστηματική φλεγμονή (Brown & Derkits, 2010); (Khandaker et al., 2013). Κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν καταδείξει αυξημένα επίπεδα κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, υποστηρίζοντας την υπόθεση μιας φλεγμονώδους παθοφυσιολογίας (Khandaker et al., 2015) (Mondelli & Howes, 2014) (B. J. Miller et al., 2011).

1.1 Σχιζοφρένεια

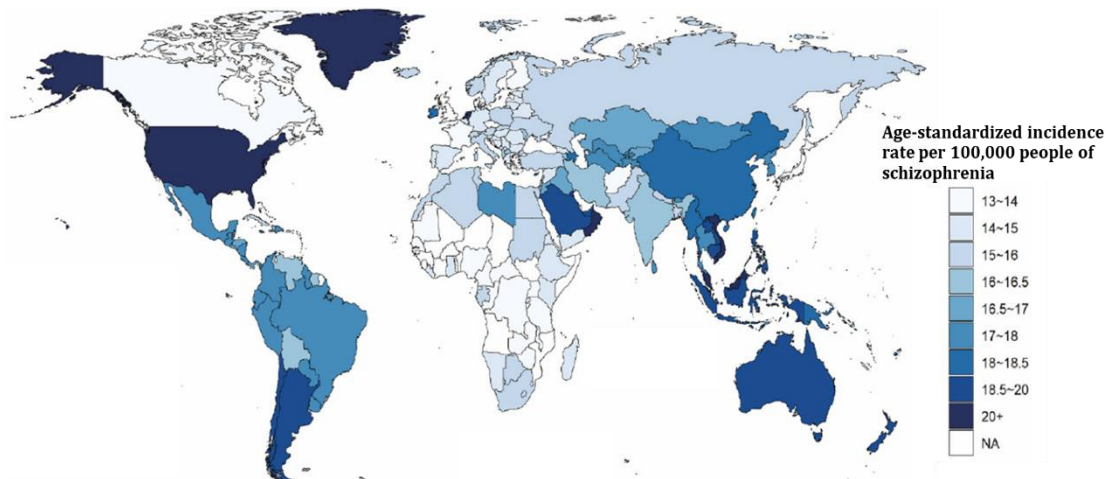
Η σχιζοφρένεια επηρεάζει περίπου 24 εκατομμύρια ανθρώπους ή 1 στους 300 ανθρώπους (0,32%) παγκοσμίως. Αυτό το ποσοστό είναι 1 στους 222 (0,45%) για τους ενηλίκους (Solmi et al., 2023). Δεν εμφανίζεται τόσο συχνά όσο πολλές άλλες ψυχικές διαταραχές. Η έναρξη είναι συχνότερα κατά την περίοδο της εγκεφαλικής ωρίμανσης που ακολουθεί την εφηβεία και συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της τρίτης δεκαετίας της ζωής, και η έναρξη τείνει να συμβαίνει νωρίτερα στους άνδρες παρά στις γυναίκες. Η σχιζοφρένεια είναι είδος ψύχωσης που συνδέεται με σημαντική αναπηρία και μπορεί να επηρεάσει όλους τους

τομείς της ζωής, συμπεριλαμβανομένης της προσωπικής, οικογενειακής, κοινωνικής, εκπαιδευτικής και επαγγελματικής λειτουργίας.

Συμπτώματα

Η σχιζοφρένεια χαρακτηρίζεται από σημαντικές διαταραχές στον τρόπο που αντιλαμβάνεται η πραγματικότητα και αλλαγές στη συμπεριφορά που σχετίζονται με παραληρητικές ιδέες όπου το άτομο έχει παγιωμένες πεποιθήσεις ότι κάτι είναι αληθινό, παρά τα στοιχεία που αποδεικνύουν το αντίθετο. Επίσης το άτομο μπορεί να βιώσει επίμονες ψευδαισθήσεις όπου ακούει, μυρίζει, βλέπει, αγγίζει ή αισθάνεται πράγματα που δεν υπάρχουν. Αρκετά συχνό σύμπτωμα αποτελούν οι εμπειρίες επιρροής, ελέγχου ή παθητικότητας. Περιλαμβάνεται η εμπειρία ότι τα συναισθήματα, οι παρορμήσεις, οι ενέργειες ή οι σκέψεις κάποιου δεν παράγονται από τον ίδιο, τοποθετούνται στο μυαλό του ή αποσύρονται από αυτό από άλλα άτομα ή ότι οι σκέψεις του μεταδίδονται σε άλλους. Παρατηρείται ακόμα αποδιοργανωμένη σκέψη, η οποία συχνά εμφανίζεται ως μπερδεμένη ή άσχετη ομιλία αλλά και εξαιρετικά αποδιοργανωμένη συμπεριφορά, καθώς το άτομο κάνει πράγματα που φαίνονται παράξενα ή άσκοπα ή έχει απρόβλεπτες ή ακατάλληλες συναισθηματικές αντιδράσεις που επηρεάζουν την ικανότητά του να οργανώνει τη συμπεριφορά του. Τέτοιου είδους «αρνητικά συμπτώματα» είναι η πολύ περιορισμένη ομιλία, περιορισμένη εμπειρία και έκφραση συναισθημάτων, αδυναμία να βιώσει ενδιαφέρον ή ευχαρίστηση και κοινωνική απόσυρση και/ή ακραία διέγερση ή επιβράδυνση των κινήσεων, διατήρηση ασυνήθιστων στάσεων. Τα άτομα με σχιζοφρένεια συχνά αντιμετωπίζουν επίσης εμμένουσες δυσκολίες με τις γνωστικές ή νοητικές τους δεξιότητες, όπως η μνήμη, η προσοχή και η επίλυση προβλημάτων. Τουλάχιστον το ένα τρίτο των ατόμων με σχιζοφρένεια βιώνουν πλήρη ύφεση των συμπτωμάτων (G. Harrison et al., 2001). Ωστόσο, υπάρχουν και άτομα όπου τα συμπτώματα χειροτερεύουν περιοδικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα άτομα με σχιζοφρένεια έχουν 2 έως 3 φορές περισσότερες πιθανότητες να πεθάνουν πρόωρα σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Laurson et al., 2014). Αυτό οφείλεται συχνά σε σωματικές ασθένειες, όπως καρδιαγγειακές, μεταβολικές και μολυσματικές ασθένειες.

Προς το παρόν, η συντριπτική πλειοψηφία των ατόμων με σχιζοφρένεια σε όλο τον κόσμο δεν λαμβάνει φροντίδα ψυχικής υγείας (**Εικόνα 1**). Περίπου το 50% των ατόμων που νοσηλεύονται σε ψυχιατρικά νοσοκομεία έχουν διάγνωση σχιζοφρένειας (*Schizophrenia*, n.d.). Μόνο το 31,3% των ατόμων με ψύχωση λαμβάνουν εξειδικευμένη φροντίδα ψυχικής υγείας (Jaeschke et al., 2021). Οι περισσότεροι πόροι για υπηρεσίες ψυχικής υγείας δαπανώνται αναποτελεσματικά για φροντίδα εντός των ψυχιατρικών **Εικόνα 1: Παγκόσμια**



συχνότητα εμφάνισης της σχιζοφρένειας σε 204 χώρες και περιοχές (κανονικοποιημένες τιμές για ηλικία) (Li et al., 2023).

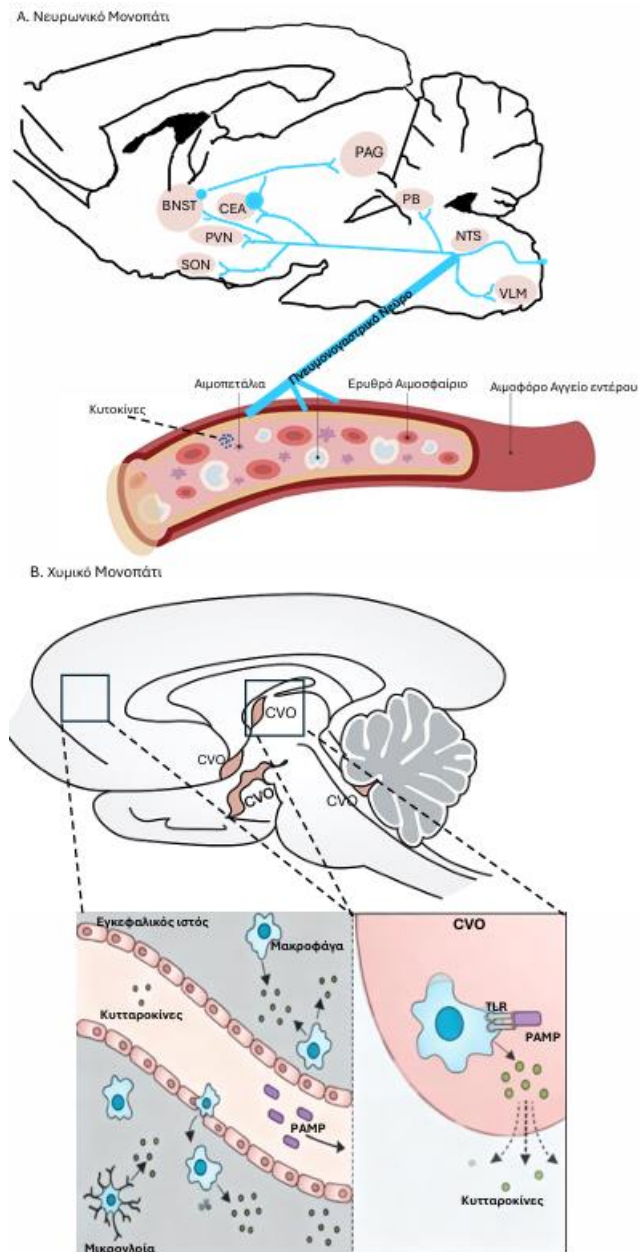
νοσοκομείων.

1.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου

Πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου μπορούν να επηρεάσουν τη ανάπτυξη, την επιβίωση και τη λειτουργία του εγκεφάλου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πολλές φορές έχουν αιτιολογική σύνδεση με πολλές διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) συμπεριλαμβανομένων των ψυχιατρικών παθήσεων. Στην αιτιολογική αυτή σύνδεση βασίζεται και η εξεύρεση θεραπευτικής αντιμετώπισης για τις νόσους αυτές (Dantzer, 2004; Dantzer et al., 2008; Khandaker, Pearson, et al., 2014; McFarland & Martin, 2007; A. H. Miller et al., 2009). Για παράδειγμα, η *Σκλήρυνση κατά πλάκας* η οποία για πολλά χρόνια θεωρούνταν αποκλειστικά

νευρολογική νόσος, σήμερα θεωρείται ότι συνδέεται αιτιολογικά με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (McFarland & Martin, 2007).

Το ανοσοποιητικό σύστημα και ο εγκέφαλος παρουσιάζουν κοινά θεμελιώδη χαρακτηριστικά. Και τα δύο αποτελούν υψηλά ενοποιημένα και πολύπλοκα συστήματα με ικανότητα μνήμης, τα οποία αναπτύσσονται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το εξωτερικό περιβάλλον, διαθέτουν την ικανότητα διάκρισης μεταξύ “εαυτού” και “μη εαυτού”, και μπορούν να αποκρίνονται προσαρμοστικά (Khandaker et al., 2015). Ιστορικά, ο εγκέφαλος θεωρείται ανοσολογικά προνομιούχος ιστός, όντας απομονωμένος εξαιτίας της ύπαρξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Carson et al., 2006). Ωστόσο, έχουν βρεθεί ανοσολογικά συστατικά στον χώρο του εγκεφάλου, όπως είναι η μικρογλοία. Η μικρογλοία αποτελεί τον κύριο πληθυσμό ενδημικών ανοσολογικών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και αντιπροσωπεύει περίπου το 10% της κυτταρικής μάζας του εγκεφάλου, ποσοστό συγκρίσιμο με εκείνο των νευρώνων (Hanisch & Kettenmann, 2007). Αν και ιστολογικά ανήκει στα γλοιακά κύτταρα, η καταγωγή της είναι μυελοειδής, προερχόμενη από εμβρυϊκούς πρόδρομους του λεκιθικού σάκου, και όχι από το νευροεξωδέρμιο όπως τα αστροκύτταρα ή τα ολιγοδενδροκύτταρα (Santambrogio et al., 2001). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η μικρογλοία διατηρεί μια απενεργοποιημένη ‘εν ηρεμία’ μορφολογία και δρα ως αισθητήρας του μικροπεριβάλλοντος, συμμετέχοντας την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων, στη ρύθμιση των συνάψεων, στην νευρογένεση και στην πλαστικότητα του εγκεφάλου (Ransohoff & Perry, 2009). Ωστόσο, σε περιπτώσεις συστηματικής φλεγμονής ή τραύματος, η μικρογλοία μετατρέπεται σε ενεργοποιημένο φαινότυπο, εκφράζοντας υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων (Pattern recognition receptors, PRRs), αυξάνοντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-1 β , ο TNF- α και η IL-6, επηρεάζοντας τη λειτουργία των νευρώνων μέσω της σύνδεσης με εξειδικευμένους υποδοχείς (Khandaker et al., 2015; V. H. Perry et al., 2010). Η παρατεταμένη ενεργοποίηση της μικρογλοίας έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές διεργασίες και με απώλεια φαιάς ουσίας, τόσο σε νευρολογικές νόσους, όπως η νόσος Alzheimer, όσο και σε ψυχιατρικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια (V. H. Perry et al., 2010).



Εικόνα 2: Τρόπος με τον οποίο σήματα του ανοσοποιητικού φθάνοντας από την περιφέρεια στον εγκέφαλο συμβάλλουν σε νευροψυχιατρικά συμπτώματα. **(Α)** Νευρωνικό μονοπάτι: Κυτοκίνες στην περιφέρεια ενεργοποιούν το πνευμονογαστρικό και το σήμα φθάνει σε πυρήνες του εγκεφάλου με ανάδρομη μεταφορά μέσω του άξονα. **(Β)** Χυμικό μονοπάτι: κάτω δεξιά απεικονίζεται κύτταρο τύπου μακροφάγου το οποίο εντοπίζεται στο περικολιακό όργανο και στο χοριοειδές πλέγμα. Το κύτταρο αυτό ανταποκρίνεται στα μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) με την παραγωγή κυτοκινών οι οποίες εισέρχονται στον εγκέφαλο με διάχυση. Κάτω αριστερά απεικονίζεται η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείων του εγκεφάλου μετά από φλεγμονή οδηγώντας στη μεταφορά μονοκυττάρων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των

περιαγγειακών μακροφάγων. Όλα αυτά τα κύτταρα εκλύουν κυτοκίνες στον εγκέφαλο. Προσαρμοσμένο από (Khandaker et al., 2015). NTS=nucleus tractus solitarius, VLM=ventrolateral medulla, CEA=central amygdala, PVN=periventricular nucleus, SON=supraoptic nucleus, PB=parabrachial nucleus, PAG=periaqueductal grey, BNST=bed nucleus for stria terminalis, CP=choroid plexus, CVO= circumventricular organ, PAMP=pathogen-associated molecular patterns.

1.3 Η σύνδεση του ανοσοποιητικού συστήματος και των λοιμώξεων με την ψύχωση

Η υπόθεση ότι το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλει αιτιολογικά στην εμφάνιση της σχιζοφρένειας έχει ιστορικές ρίζες ήδη από τον 19ο αιώνα και σήμερα υποστηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα επιδημιολογικών δεδομένων, τα οποία καταδεικνύουν συσχετίσεις με λοιμώδεις παράγοντες και συστηματική φλεγμονή (Brown & Derkits, 2010; Khandaker et al., 2012, 2013). Συγκεκριμένα, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η λοίμωξη κατά την κύηση, είτε από ιούς (όπως η γρίπη, ο ιός του έρπητα τύπου 2 ή ο κυτταρομεγαλοϊός) είτε από *Toxoplasma gondii*, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ψυχωτικών διαταραχών στους απογόνους, ιδίως όταν συνοδεύεται από αυξημένους δείκτες φλεγμονής όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) (Brown & Derkits, 2010; Canetta et al., 2014; Gardner et al., 2013). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι το ενδομήτριο ανοσολογικό περιβάλλον επηρεάζει κρίσιμα την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Επιπλέον, οι παιδικές ιογενείς λοιμώξεις του ΚΝΣ έχουν συσχετιστεί με διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης σχιζοφρένειας στην ενήλικη ζωή (Khandaker, Stochl, et al., 2014), ενώ η έκθεση σε λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης υποκλινικών ψυχωτικών εμπειριών στην εφηβεία (Torrey et al., 2012). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η ανοσολογική επιβάρυνση δεν περιορίζεται στην εμβρυϊκή περίοδο, αλλά μπορεί να επεκτείνεται και στα πρώτα χρόνια ζωής ως κρίσιμο παράθυρο ευαλωτότητας για το ΚΝΣ. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η συσχέτιση αυτοάνοσων νοσημάτων με την εμφάνιση ψυχώσεων. Παιδιά με ιστορικό αυτοάνοσης νόσου φαίνεται να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης τόσο υποκλινικών ψυχωτικών συμπτωμάτων όσο και πλήρους σχιζοφρενικού φάσματος (Khandaker, Zammit, et al., 2014). Μάλιστα, αυτοάνοσα νοσήματα

είναι συχνότερα όχι μόνο στους ασθενείς με σχιζοφρένεια, αλλά και στους συγγενείς τους, στοιχείο που ενισχύει την πιθανότητα κοινού γενετικού ή ανοσοβιολογικού υποβάθρου (Benros et al., 2011). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η συνύπαρξη σοβαρών λοιμώξεων και αυτοάνοσων νοσημάτων αυξάνει περαιτέρω τον κίνδυνο εμφάνισης σχιζοφρένειας, με σωρευτικό φλεγμονώδες φορτίο να λειτουργεί ενδεχομένως ως εκλυτικός παράγοντας (Eaton et al., 2006). Πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη διαταραχή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, την είσοδο φλεγμονωδών μορίων στο ΚΝΣ και τη χρόνια ενεργοποίηση της μικρογλοίας, με ενδεχόμενες νευροτοξικές συνέπειες.

1.4 Κυτοκίνες και Ψύχωση

Η φλεγμονώδης δραστηριότητα φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο στοιχείο στη παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας, με τις κυτοκίνες να βρίσκονται στο επίκεντρο αυτής της διερεύνησης. Συστηματικές ανασκοπήσεις πολλών μελετών έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφανίζουν διαταραχές στο κυτοκινικό προφίλ, ειδικότερα στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο TNF- α , η ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β) και η ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) (B. J. Miller et al., 2011; Potvin et al., 2008; Upthegrove et al., 2014). Μια σημαντική προοπτική μελέτη (ALSPAC) διαπίστωσε ότι αυξημένα επίπεδα IL-6 στον ορό σε ηλικία 9 ετών σχετίζονταν με διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης ψυχωτικής διαταραχής στην ηλικία των 18 ετών, καθώς και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υποκλινικών ψυχωτικών εμπειριών, συσχέτιση που παρέμεινε σημαντική και μετά τον έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες όπως το φύλο, ο Δείκτης Μάζας Σώματος και προϋπάρχουσες ψυχολογικές δυσκολίες (Khandaker, Pearson, et al., 2014). Σε ασθενείς με πρώτα επεισόδια ψύχωσης (FEP), αλλά και σε άτομα χωρίς προηγούμενη αντιψυχωτική θεραπεία, παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση IL-6, TNF- α , IL-1 β και IFN- γ , παράλληλα με μειωμένα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 (B. J. Miller et al., 2011; Upthegrove et al., 2014). Τα επίπεδα αυτά τείνουν να ομαλοποιούνται μετά τη θεραπευτική ύφεση με αντιψυχωσικά φάρμακα, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι τα επίπεδα κυτοκινών αντανακλούν την ενεργό φλεγμονή κατά την οξεία φάση της νόσου. Παρότι κάποτε θεωρούνταν ότι η μειωμένη παραγωγή

ιντερλευκίνης-2 (IL-2) από T-λεμφοκύτταρα ήταν χαρακτηριστική της σχιζοφρένειας, σήμερα γνωρίζουμε ότι τα επίπεδα IL-2 στον ορό δεν παρουσιάζουν αξιόλογες μεταβολές κατά την οξεία ψύχωση. Αντίθετα, έχει καταγραφεί αύξηση της διαλυτής μορφής του υποδοχέα της IL-2, πιθανόν ως αντισταθμιστικός μηχανισμός αναστολής της IL-2 (Ganguli et al., 1993; B. J. Miller et al., 2011; Uptegrove et al., 2014). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι κυτοκίνες επηρεάζουν τη γνωστική λειτουργία, κάτι που έχει τεκμηριωθεί σε προκλινικές μελέτες και σε ανθρώπους. Η συστηματική ήπια φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει γνωστικές δυσκολίες και διαταραχές στη μνήμη, ενδεχομένως μέσω της επίδρασής της στον μεταβολισμό της γλυκόζης στον έσω κροταφικό λοβό (N. A. Harrison et al., 2014). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε προκλινικά μοντέλα, η περιφερική IL-6 μπορεί να ενεργοποιήσει μικρογλοιακά κύτταρα μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου και του στελέχους του εγκεφάλου, οδηγώντας σε παραγωγή κυτοκινών, ενεργοποίηση της ινδολεαμίνης-2,3-διοξυγενάσης (IDO1) και αύξηση των κινολινικών μεταβολιτών της τρυπτοφάνης, όπως το κινολινικό και κυνολινικό οξύ, τα οποία επηρεάζουν τη γλουταματεργική μετάδοση (Dantzer, 2004; Dantzer et al., 2008; Walker et al., 2013). Τέλος, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αύξηση των κυτοκινών κατά την παιδική ηλικία, ενδεχομένως λόγω στρεσογόνων εμπειριών, μπορεί να λειτουργεί ως μεσολαβητικός παράγοντας ανάμεσα στην πρόωπη ψυχοκοινωνική αντιξοότητα και στην ανάπτυξη ψυχιατρικών διαταραχών κατά την ενήλικη ζωή (Danese et al., 2008; Eraly et al., 2014; Khandaker, Pearson, et al., 2014).

1.5 Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι μια πολυλειτουργική φλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται από ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των T-κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων της γλοίας ως απάντηση σε μολύνσεις ή ιστική βλάβη (Kishimoto, 2005). Η IL-6 λειτουργεί ως κρίσιμος μεσολαβητής που συνδέει την έμφυτη με την επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Αυτό συμβαίνει καθώς διεγείρει τη διαφοροποίηση B-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα και την έκκριση αντισωμάτων, προάγει την ωρίμανση των T-κυττάρων και συμμετέχει στην επαγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ.

(Tanaka et al., 2014; Zhou et al., 2021). Επιπρόσθετα, η IL-6 έχει σημαντικές επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Εκκρίνεται από μικρογλοία και αστροκύτταρα, συμμετέχει στη ρύθμιση της νευροφλεγμονής, επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα και μπορεί να τροποποιεί την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Οι δράσεις αυτές συνδέονται με αλλαγές στη γνωστική λειτουργία και στη συναισθηματική ρύθμιση (Chaves et al., 2024; Momtazmanesh et al., 2019). Στο πλαίσιο της νευροαναπτυξιακής υπόθεσης της σχιζοφρένειας, η IL-6 προτείνεται ως δυνητικός μεσολαβητής (mediator) μέσω του οποίου τα ανοσολογικά ερεθίσματα (όπως μητρικές ή πρώιμες λοιμώξεις, χρόνια συστηματική φλεγμονή, ή πρώιμη ψυχοκοινωνική αντιξοότητα) επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου και αυξάνουν μακροπρόθεσμα την πιθανότητα εμφάνισης ψυχιατρικών νοσημάτων (Khandaker, Pearson, et al., 2014; Williams et al., 2022).

Συνολικά, η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι τα επίπεδα IL-6 είναι συχνά αυξημένα τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε φάσεις πρώτου επεισοδίου ψύχωσης (FEP) και σε οξείες υποτροπές. Ορισμένες μετα-αναλύσεις καταδεικνύουν επαναλαμβανόμενη αύξηση της IL-6 σε ασθενείς με σχιζοφρένεια σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, ενώ κάποια ευρήματα δείχνουν μερική ομαλοποίηση των επιπέδων μετά από αντιψυχωσική αγωγή (Gómez-Rubio & Trapero, 2019; Zhou et al., 2021). Παρά την ισχυρή αθροιστική τεκμηρίωση, παραμένουν ανοιχτά ερωτήματα σχετικά με την αιτιότητα (εάν δηλαδή η IL-6 είναι αιτία ή δευτερογενής δείκτης φλεγμονής σε υποομάδες ασθενών), την πιθανή ύπαρξη επιμέρους «φλεγμονωδών υποτύπων» σχιζοφρένειας που ανταποκρίνονται σε ανοσοθεραπείες, καθώς και τις χρονικές δυναμικές όπως για παράδειγμα ενδομήτρια, βρεφικά ή εφηβικά χρόνια όπου η έκθεση στην IL-6 είναι πιο κρίσιμη. Τρέχουσες κλινικές δοκιμές που στοχεύουν την οδό IL-6 ή τον υποδοχέα της έχουν δώσει μικτά αποτελέσματα, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για διαστρωμάτωση των ασθενών βάσει βιοδεικτών και για καλύτερα σχεδιασμένα επιδημιολογικά και πειραματικά πρωτόκολλα. (Chaves et al., 2024; B. I. Perry et al., 2021).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των φλεγμονωδών παραγόντων, και ειδικότερα της κυτοκίνης ιντερλευκίνη-6 (IL-6), με την εμφάνιση της σχιζοφρένειας με τους εξής επιμέρους στόχους:

1. διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των επιπέδων της IL-6 με το ψυχιατρικό νόσημα
2. διερεύνηση του ρόλου των μακροφάγων ως πιθανή πηγή IL-6 στη σχιζοφρένεια.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος 1 έγινε μέτρηση της ελεύθερης IL-6 στον ορό και σύγκριση των επιπέδων της μεταξύ υγιών εθελοντών και ασθενών με σχιζοφρένεια εφαρμόζοντας τη μέθοδο ELISA.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος 2 χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με σχιζοφρένεια στα οποία έγινε απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) και στη συνέχεια *in vitro* καλλιέργειά τους με στόχο τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια παρουσία της κυτταροκίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής σε *in vitro* καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs). Επιπλέον, τα PBMCs εξετάσθηκαν υπό δύο πειραματικές συνθήκες, με ή χωρίς διέγερση από λιποπολυσακχαρίτη (LPS), προκειμένου να αξιολογηθούν πιθανές διαφορές στην έκκριση ή την έκφραση της IL-6. Με αυτήν την προσέγγιση επιδιώκεται η αποτύπωση τυχόν διαφορών στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των ασθενών με σχιζοφρένεια και των υγιών ατόμων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες διέγερσης κυττάρων του ανοσοποιητικού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία και ψυχομετρικές εκτιμήσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συμμετείχαν ασθενείς με σχιζοφρένεια καθώς και υγείες εθελοντές.

Συγκεκριμένα, τα κριτήρια ένταξης των ασθενών στη μελέτη αποτελούσαν η διάγνωση της σχιζοφρένειας, η ηλικία από 18 έως και τα 65 έτη, η απουσία φλεγμονής ή αυτοάνοσων διαταραχών καθώς και η εγκυμοσύνη. Όλοι οι ασθενείς νοσηλεύονταν στην Ψυχιατρική κλινική του ΠΓΝΛ είτε λόγω πρώτου επεισοδίου ψύχωσης (First episode psychosis, FEP) είτε λόγω υποτροπής της νόσου. Στη συνέχεια διενεργήθηκε ψυχιατρική συνέντευξη κατά την ελληνικά σταθμισμένη κλίμακα PANSS (Positive and Negative Symptom Scale) καθώς και αιμοληψία για την διενέργεια αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων στο αιματολογικό και βιοχημικό εργαστήριο του ΠΓΝΛ, αντίστοιχα. Επίσης, λήφθηκε και επιπλέον δείγμα ορού και ολικού αίματος τα οποία αποθηκεύτηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Οι οροί διατηρήθηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -80°C , ενώ τα δείγματα ολικού αίματος χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και στη συνέχεια καλλιέργεια των κυττάρων PBMC.

Στους υγείες εθελοντές, τα κριτήρια ένταξης τους στην μελέτη αποτελούσαν η ηλικία από 18 έως και τα 65 έτη, η απουσία φλεγμονής ή αυτοάνοσων διαταραχών καθώς και η απουσία μείζονος ψυχοπαθολογίας. Για την επιβεβαίωση του τελευταίου χρησιμοποιήθηκε η ελληνικά σταθμισμένη κλίμακα SCL-90 (Symptom Checklist – 90). Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε αιμοληψία για την διενέργεια αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων στο αιματολογικό και βιοχημικό εργαστήριο του ΠΓΝΛ, αντίστοιχα. Λήφθηκε και ένα επιπλέον δείγμα ορού και ολικού αίματος, τα οποία αποθηκεύτηκαν για περεταίρω ανάλυση όπως και τα δείγματα των ασθενών. Οι οροί διατηρήθηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -80°C , ενώ τα δείγματα ολικού αίματος χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και στη συνέχεια καλλιέργεια των κυττάρων PBMC.

Ψυχομετρική αποτύπωση

Η Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ψυχομετρικά εργαλεία για την αξιολόγηση της βαρύτητας και του φάσματος των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας. Η κλίμακα αυτή,

αναπτύχθηκε από τους Kay, Fiszbein και Opler το 1987 (Kay et al., 1987), και βασίζεται σε μια συνέντευξη διάρκειας περίπου 30-40 λεπτών. Η PANSS περιλαμβάνει 30 επιμέρους στοιχεία, τα οποία οργανώνονται σε τέσσερις υποκλίμακες τα θετικά συμπτώματα (7 στοιχεία): αξιολογούν τυπικές ψυχωτικές εκδηλώσεις, όπως παραληρητικές ιδέες, ψευδαισθήσεις και αποδιοργανωμένη σκέψη. Αρνητικά συμπτώματα (7 στοιχεία): αναφέρονται σε μειωμένη συναισθηματική έκφραση, κοινωνική απόσυρση, αλογία και απάθεια. Γενική ψυχοπαθολογία (16 στοιχεία): καλύπτουν ευρύτερες διαστάσεις, όπως άγχος, κατάθλιψη, έλλειψη κριτικής ικανότητας, δυσκολίες συγκέντρωσης και ενοχή (Geck et al., 2025). Η Ελληνικά σταθμισμένη κλίμακα PANSS περιλαμβάνει και μια επιπλέον υποκλίμακα η οποία αξιολογεί το προφίλ επικινδυνότητάς του ασθενούς. Αυτή αποτελείται από το θυμό, την δυσανεξία στην αναβολή ικανοποίησης και την συναισθηματική ευμεταβλητότητα (Lykouras et al., 1994). Κάθε στοιχείο βαθμολογείται σε επταβάθμια κλίμακα (1-7), όπου το 1 αντιστοιχεί στην απουσία συμπτώματος και το 7 σε εξαιρετικά σοβαρή εκδήλωση. Το συνολικό σκορ κυμαίνεται από 33 έως 231, με υψηλότερες βαθμολογίες να υποδηλώνουν μεγαλύτερη βαρύτητα ψυχοπαθολογίας (Kay et al., 1987). Η PANSS παρέχει έτσι μια ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση των συμπτωμάτων, προσφέροντας τη δυνατότητα αξιολόγησης τόσο της συνολικής ψυχοπαθολογίας όσο και του προφίλ συμπτωμάτων κάθε ασθενούς (π.χ. κυριαρχία θετικών ή αρνητικών εκδηλώσεων). Χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές μελέτες και φαρμακευτικές δοκιμές, αλλά και στην κλινική πράξη για την παρακολούθηση της πορείας και της ανταπόκρισης στη θεραπεία (Dal Santo et al., 2024).

Τεστ SCL-90

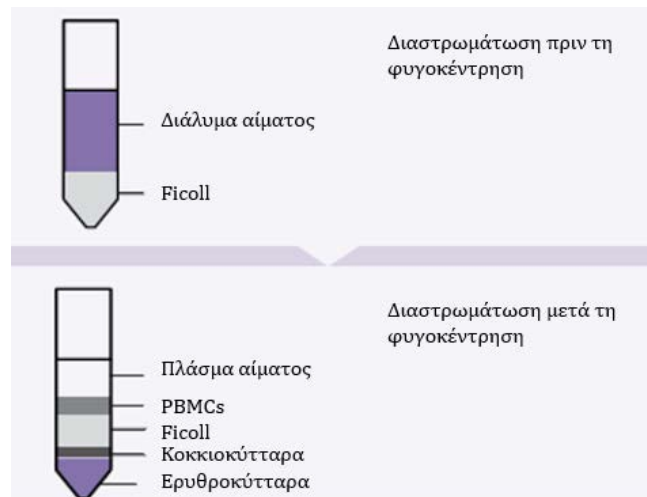
Το Symptom Checklist-90 (SCL-90) είναι ένα πολυδιάστατο ερωτηματολόγιο αυτοαναφοράς, το οποίο δημιουργήθηκε από τον Derogatis και συνεργάτες το 1973 με στόχο να προσφέρει μια συστηματική μέθοδο καταγραφής της ευρύτητας και της έντασης της ψυχολογικής δυσφορίας σε άτομα που βρίσκονται σε ψυχιατρική παρακολούθηση (SCL-90: An Outpatient Psychiatric Rating Scale--Preliminary Report - PubMed, n.d.). Η ανάπτυξή του βασίστηκε στην ανάγκη για ένα εργαλείο που να συνδυάζει κλινική χρησιμότητα και ερευνητική

εγκυρότητα, επιτρέποντας την αποτύπωση τόσο ειδικών κατηγοριών συμπτωμάτων όσο και ενός συνολικού δείκτη ψυχοπαθολογίας. Το SCL-90 αποτελείται από 90 ερωτήσεις, οι οποίες διαρθρώνονται σε εννέα υποκλίμακες συμπτωμάτων: σωματοποίηση, καταναγκαστικότητα, διαπροσωπική ευαισθησία, κατάθλιψη, άγχος, εχθρότητα, φοβικό άγχος, παρανοειδή ιδεασμό και ψυχωτικότητα. Οι υποκλίμακες αυτές αντικατοπτρίζουν τις κυριότερες διαστάσεις της ψυχοπαθολογίας, προσφέροντας μια σφαιρική εικόνα της ψυχικής κατάστασης του ατόμου (Derogatis & Cleary, 1977; *SCL-90: An Outpatient Psychiatric Rating Scale--Preliminary Report* - PubMed, n.d.). Η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου γίνεται μέσω πενταβάθμιας κλίμακας Likert (0-4), με την οποία εκτιμάται η ένταση κάθε συμπτώματος κατά την τελευταία εβδομάδα. Πέρα από τις επιμέρους κλινικές διαστάσεις, το SCL-90 παρέχει τρεις σύνθετους δείκτες ψυχοπαθολογίας: τον Global Severity Index (GSI), που εκφράζει το συνολικό επίπεδο ψυχοπαθολογικής επιβάρυνσης, τον Positive Symptom Distress Index (PSDI), που αποτυπώνει τη μέση ένταση των αναφερόμενων συμπτωμάτων, και τον Positive Symptom Total (PST), ο οποίος αναφέρεται στον συνολικό αριθμό θετικών συμπτωμάτων που αναφέρει ο εξεταζόμενος (*SCL-90: An Outpatient Psychiatric Rating Scale--Preliminary Report* - PubMed, n.d.). Οι δείκτες αυτοί επιτρέπουν την ποσοτική εκτίμηση της ψυχοπαθολογίας και διευκολύνουν τη διαχρονική παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας. Η αξιοπιστία και εγκυρότητα του SCL-90 έχει επιβεβαιωθεί σε πληθώρα μελετών (Derogatis & Cleary, 1977), και το εργαλείο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τόσο στην κλινική πράξη όσο και στην έρευνα. Ιδιαίτερα, στη μελέτη της σχιζοφρένειας, το SCL-90 αξιοποιείται ως συμπληρωματικό μέσο αξιολόγησης δίπλα σε πιο εξειδικευμένες κλίμακες, όπως η PANSS, προσφέροντας μια πιο ολιστική αποτύπωση της ψυχολογικής δυσφορίας πέραν των τυπικών ψυχωτικών συμπτωμάτων. Έτσι, συνεισφέρει όχι μόνο στην αρχική εκτίμηση των ασθενών, αλλά και στη διερεύνηση συννοσηροτήτων (π.χ. άγχους ή καταθλιπτικών στοιχείων), οι οποίες συχνά επηρεάζουν την πορεία και την έκβαση της νόσου.

2.2 Απομόνωση των PBMCs και αποθήκευση σε βαθειά κατάψυξη

Όλες οι πειραματικές διεργασίες εκτελέστηκαν σε άσηπτες συνθήκες, με τη χρήση θαλάμου κάθετης νηματικής ροής για να αποφευχθούν οι όποιες πιθανές μολύνσεις. Για την απομόνωση PBMCs από δείγμα περιφερικού αίματος, αρχικά έγινε προσθήκη 2mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου Millipore Sigma Dulbecco's PBS (137 mM Χλωριούχο Νάτριο (NaCl), 2,7 mM Χλωριούχο Κάλιο (KCl), 8,1 mM Διβασικό Φωσφορικό Νάτριο (Na_2HPO_4), 1,5 mM Μονοβασικό Φωσφορικό Κάλιο (KH_2PO_4), και 10 mg/L Ερυθρό της Φαινόλης, σε συγκέντρωση 1x) στο δείγμα ολικού αίματος που περιέχει αντιπηκτικό EDTA. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και χρήση Falcon φυγοκέντρησης όγκου 15ml όπου προστέθηκαν 5ml του σκευάσματος Ficoll-Paque™ (Cytiva). Η προσθήκη του διαλύματος αίματος με PBS έγινε με πουάρ πολύ αργά, προσέχοντας να μην αναμειχθεί το δείγμα με τη φικόλη. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε 400 RCF με αργή επιτάχυνση και επιβράδυνση. Μετά τη φυγοκέντρωση προέκυψε διαστρωμάτωση όπου τα PBMCs βρίσκονταν υπό τη μορφή δακτυλίου όπως φαίνονται στην **Εικόνα 3**.

Με τη χρήση πουάρ απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό πλάσματος και το εναιώρημα των PBMC κυττάρων που έχει τη μορφή νεφελώδους στρώσης μεταφέρθηκε εκ νέου σε falcon φυγοκέντρησης. Στο νέο σωληνάριο αραιώθηκε το εναιώρημα των κυττάρων σε 10mL PBS. Το νέο διάλυμα κυττάρων PBMC φυγοκεντρήθηκε με ταχεία επιτάχυνση για 10 λεπτά σε RCF 400. Στο φυγοκεντρημένο falcon τα κύτταρα παρατηρήθηκαν ως ίζημα προσκολλημένα στο κάτω μέρος του σωλήνα, ενώ το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε με προσοχή να μην διαταραχθούν τα κύτταρα και επαναδιαλυθούν. Προστέθηκαν 900μL FBS μέσου και έγινε ήπια ανάδευση χρησιμοποιώντας πιπέτα έτσι ώστε τα κύτταρα να επαναιωρηθούν χωρίς να τους προκληθεί βλάβη.



Εικόνα 3: Απεικόνιση διαστρωμάτωσης πριν και μετά την φυγοκέντρωση αλλά και τα περιεχόμενα του κάθε στρώματος.

Η διατήρηση των κυττάρων διασφαλίσθηκε με την κατάψυξή τους σε θερμοκρασία -80°C . Προκειμένου να διασφαλιστεί η ομαλή και ασφαλής ψύξη των κυττάρων είναι αναγκαία η προσθήκη κρυοπροστατευτικού παράγοντα DMSO. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα cryovials όγκου 2ml με βιδωτό καπάκι για την σωστή διατήρηση των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Προστέθηκαν 100μL DMSO (Sigma-Aldrich Dimethyl sulfoxide, CAS 67-68-5, $\geq 99.5\%$ GC) για το κάθε δείγμα στο αντίστοιχο cryovial αλλά και τα 900μL των επαναιωρημένων κυττάρων υπό ήπια ανάδευση. Το DMSO, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες εμφανίζει κρυοπροστατευτικές ιδιότητες, σε θερμοκρασία δωματίου μπορεί να καταστρέψει τα κύτταρα και αποτελεί επιτακτική ανάγκη η άμεση πτώση της θερμοκρασίας των διαλυμάτων. Αυτό γίνεται δυνατό με τη χρήση του αποθηκευτικού δοχείου Mr. Frosty™ το οποίο έχει διατηρηθεί για κάποιες ώρες στην επιθυμητή θερμοκρασία. Το δοχείο αυτό περιέχει ειδικές θέσεις για εύκολη αποθήκευση των cryovials και μια ποσότητα 100% ισοπροπυλικής αλκοόλης η οποία βοηθά στην επιτάχυνση της ψύξης των δειγμάτων. Οι οροί που ελήφθησαν για το κάθε άτομο αποθηκεύονται στις ίδιες συνθήκες (-80°C) χωρίς όμως κάποια περαιτέρω επεξεργασία. Το κάθε cryovial όπως και το αντίστοιχο δείγμα ορού ονοματίζονται με κατάλληλους κωδικούς για πιο εύκολη ταυτοποίηση αλλά και την προστασία των δεδομένων του κάθε ατόμου.

2.3 Απόψυξη κυττάρων - Κυτταροκαλλιέργειες

Απόψυξη

Η ασφαλής απόψυξη των δειγμάτων που περιέχουν τα κύτταρα PBMC είναι σημαντικό στάδιο το οποίο προηγείται της καλλιέργειας. Για την σταδιακή και ασφαλέστερη αύξηση της θερμοκρασίας όλα τα cryovials τοποθετήθηκαν σε ένα δοχείο με πάγο φτάνοντας τη θερμοκρασία στους 4°C. Για την αραιώση και καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) στο οποίο προστέθηκε L-γλουταμίνη 2mM, εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS) 10% v/v και 1% v/v ενός συνδυασμού αντιβιοτικών και συγκεκριμένα Πενικιλίνη με Στρεπτομυκίνη (Pen/Strep) σε 10 mL του μέσου RPMI και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 400 RCF. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και τα κύτταρα επανααιωρήθηκαν σε 2mL μέσου καλλιέργειας και το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε στον πάγο.

Καταμέτρηση κυττάρων

Στο κυτταρικό εναιώρημα έγινε εκτίμηση για την παρουσία αλλά και την ποσότητα των κυττάρων PBMC για το κάθε δείγμα μέσω του αιμοκυτταρόμετρου ή αλλιώς πλάκα Neubauer. Το εναιώρημα αραιώθηκε 1:1 με Trypan Blue (50μL από κάθε υγρό, αραιώση 1:1), επιτυγχάνοντας συντελεστή αραιώσης 2. Χρησιμοποιήθηκαν 8-10 μL από το μείγμα κυττάρων-Trypan Blue στην άκρη της καλυπτρίδας, επιτρέποντας στο δείγμα να εισέλθει στον θάλαμο μέσω τριχοειδικής δράσης χωρίς δημιουργία φυσαλίδων και χωρίς υπερχειλίση στα όρια του πλέγματος. Το δείγμα αφέθηκε να ηρεμήσει για περίπου 30 δευτερόλεπτα ώστε να σταθεροποιηθεί η κίνηση των κυττάρων. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε υπό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου με αντικειμενικό φακό 10x. Το πλέγμα της πλάκας Neubauer αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα 1x1 mm, με το κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρούμενο σε 25 μεσαία τετράγωνα και αντίστοιχα σε 400 μικρά τετράγωνα. Για τις καλλιέργειες κυττάρων καταμετρήθηκαν τα τέσσερα γωνιακά μεγάλα τετράγωνα και το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο (σύνολο 5 μεγάλα τετράγωνα), αποφεύγοντας τετράγωνα με συσσωματώματα. Εφαρμόστηκε επίσης ο τυποποιημένος κανόνας ορίων: κύτταρα που εφάπτονται στις επάνω και αριστερές γραμμές του τετραγώνου περιλήφθηκαν στην καταμέτρηση, ενώ όσα εφάπτονται στις κάτω και δεξιές

εξαιρέθηκαν, για να αποφευχθεί διπλή καταμέτρηση. Διακρίθηκαν τα βιώσιμα κύτταρα (διαυγή, μη χρωματισμένα) από τα μη βιώσιμα (κυανόχρωμα λόγω πρόσληψης Trypan Blue) και καταγράφηκε ο αριθμός των μη χρωματισμένων. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων ανά mL βασίστηκε στη γεωμετρία του θαλάμου. Αυτό ισχύει καθώς κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1 mm^2 και το βάθος είναι $0,1 \text{ mm}$, ο όγκος ανά μεγάλο τετράγωνο είναι $0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$, που αντιστοιχεί σε συντελεστή μετατροπής 10^4 . Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση προέκυψε από τη σχέση:

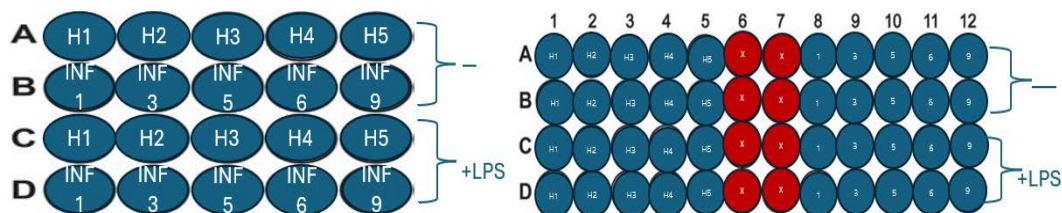
$$\text{Κύτταρα/mL} = (\text{Μέσος όρος κυττάρων ανά μεγάλο τετράγωνο}) \times (10^4) \times (\text{συντελεστής αραιώσης}).$$

Ειδικότερα, όταν μετρήθηκαν πέντε μεγάλα τετράγωνα, υπολογίσθηκε ο μέσος όρος διαιρώντας το συνολικό πλήθος δια των πέντε και πολλαπλασιάσθηκε με 10^4 και με τον συντελεστή αραιώσης 2 (λόγω του 1:1 με Trypan Blue).

Καλλιέργειες και *in vitro* ενεργοποίηση

Τα PBMCs καλλιεργήθηκαν σε 6-well plates (Nunc) σε θρεπτικό υλικό που περιείχε τον Macrophage Colony-Stimulating Factor ή αλλιώς MCSF. Πρόκειται για έναν παράγοντα ανάπτυξης που ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που προάγει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων του αίματος σε μακροφάγα. Η καλλιέργεια προς διαφοροποίηση των PBMC κυττάρων σε μακροφάγα διήρκησε 7 ημέρες όπου 24 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας απορρίφθηκε το αρχικό μέσο της καλλιέργειας, αντικαταστάθηκε από νέο μέσο και στην τέταρτη μέρα έγινε προσθήκη επιπλέον μέσου. Μετά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα ακολούθησε πειραματική διαδικασία πρόκλησης της σύνθεσης IL-6. Για τη διέγερση των μακροφάγων τόσο στην κυτταρομετρία όσο και στην Elisa είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS). Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα πιάτα κυτταρομετρίας ροής 20 πηγαδιών (wells) με χωρητικότητα έως 2 mL , αλλά και πιάτα 96 πηγαδιών, για το πρωτόκολλο Elisa, από πολυπροπυλένιο με κυκλικό πάτωμα. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις στα πιάτα που προορίζονται για την κυτταρομετρία ροής ενώ 4 επαναλήψεις για τα πιάτα που προορίζονται για Elisa. Σε κάθε πηγάδι του πιάτου της κυτταρομετρίας ροής προστέθηκαν $600 \mu\text{L}$ του

διαλύματος DMEM-MCSF, ενώ στα πηγάδια του πιάτου για την Elisa προστέθηκαν 300μL (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4: Απεικόνιση διάταξης πιάτων από καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένων των κωδικών ταυτοποίησης του κάθε δείγματος. Αριστερά: πιάτο κυτταρομετρίας ροής, δεξιά: πιάτο Elisa.

Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C έχοντας σταθερή παροχή αέρα με περιεκτικότητα 5% CO₂. Μία ημέρα αργότερα έγινε απόρριψη του μέσου καλλιέργειας καθώς τα ζωντανά κύτταρα έχουν ξεκινήσει τη διαφοροποίησή τους και έχουν προσκολληθεί στο πιάτο της καλλιέργειας. Αντίθετα, τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν και συνεπώς εξακολουθούν να αιωρούνται στο μέσο καλλιέργειας, για αυτό είναι απαραίτητη η ανανέωση του μέσου καλλιέργειας (DMEM+MCSF) και επομένως προστέθηκαν εκ νέου 600 μL στα wells της κυτταρομετρίας ροής και 200 μL στα wells για την Elisa.

Την τρίτη ημέρα μετά την αρχική καλλιέργεια των κυττάρων, είναι αναγκαία η προσθήκη επιπλέον μέσου καλλιέργειας το οποίο θα περιέχει τον μεταγραφικό παράγοντα MCSF για να μπορέσουν να αναπτυχθούν και να παραμείνουν ζωντανά τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 200 μL ανά well για τις καλλιέργειες που προορίζονται για κυτταρομετρία ροής και 50 μL ανά well για το πείραμα ELISA.

2.4 Κυτταρομετρία ροής

Στα πιάτα που προορίζονται τόσο για την κυτταρομετρία ροής όσο και για αυτά της Elisa είναι αναγκαία η απόρριψη του προηγούμενου μέσου καλλιέργειας και επώση των κυττάρων σε νέο μέσο DMEM χωρίς την παρουσία του παράγοντα MCSF για τουλάχιστον τρεις ώρες. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκε επίσης υγρό

LPS με σκοπό τη διέγερση της παραγωγής της IL-6 από τα μακροφάγα αλλά και Brefeldin A (*Brefeldin A Solution 1,000X*, n.d.). Η Brefeldin A (BFA) είναι ένας αναστολέας της ενδοκυττάριας μεταφοράς πρωτεϊνών, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικά πρωτόκολλα για την ενίσχυση της ανίχνευσης κυτοκινών με ενδοκυττάρια χρώση. Η δράση της βασίζεται στην παρεμπόδιση της εκκριτικής οδού με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μεταφορά των πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύμπλεγμα Golgi και στη συνέχεια προς το εξωκυττάριο περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο, οι κυτοκίνες που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας την εντονότερη και αξιόπιστη ανίχνευσή τους μέσω κυτταρομετρίας ροής ή ανοσοφθορισμού. Για να γίνουν οι προσθήκες LPS και BFA γίνεται αραίωση σε δύο στάδια, προς αποφυγή πειραματικού σφάλματος με τελική συγκέντρωση LPS 100ng/mL και BFA με συγκέντρωση 1μg/mL. Στα πιάτα της κυτταρομετρίας ροής προστέθηκε το εμπλουτισμένο μέσο DMEM με LPS και BFA 500 μL ανά well. Παρασκευάστηκε εκ νέου μέσο μόνο με προσθήκη LPS σε συγκέντρωση 100 ng/mL το οποίο προοριζόταν για προσθήκη στα πιάτα της Elisa όπου συμπληρώθηκαν 200μL ανά well. Ο σκοπός αυτής της διαφοροποίησης ήταν να μην εγκλωβιστεί η IL-6 στο κυτταρόπλασμα αλλά να απελευθερωθεί στο μέσο της καλλιέργειας. Όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν εκ νέου σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C έχοντας σταθερή παροχή αέρα περιεκτικότητας 5% CO₂. Έπειτα από αυτό το στάδιο προετοιμασίας του πειράματος και επώαση των κυττάρων, τα πιάτα της κυτταρομετρίας ροής ήταν έτοιμα για να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία.

Αρχικά αφαιρέθηκε το μέσο καλλιέργειας, ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS (1X) και έγινε επώαση σε διάλυμα 2% παραφορμαλδεϋδης (PFA), 100μL ανά well, το οποίο εξυπηρετεί λειτουργεί ως μονιμοποιητικό (fixative.) Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στο ψυγείο (4°C) και 2 ακόμη πλύσεις με την προσθήκη 200 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης-νερού 75% v/v, (-20° C). Η επώαση αυτή διήρκεσε 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και αντίστοιχα μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκαν πλύσεις. Για την ανίχνευση της ενδοκυττάριας IL-6 χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα R-Phycoerythrin (PE). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε 50 μL διαλύματος PBS/αντισώματος anti-IL-6-PE (1:200 αραίωση) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου, προστατευμένα από το φως. Το PE επιλέχθηκε λόγω του υψηλού του φθορισμού αλλά και την ικανότητα χρώσης ενδοκυττάρων δομών, χαρακτηριστικά που το καθιστούν κατάλληλο για την ανίχνευση της ιντερλευκίνης-6 στα μακροφάγα. Ακολούθησαν δύο τελευταίες πλύσεις με PBS και τελική επαναιώρηση των κυττάρων σε 300 μ L PBS. Ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση κυτταρομέτρου Cytomics FC 500 Beckman Coulter. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.5 Elisa

Η μέτρηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης της IL-6 πραγματοποιήθηκε με μεταφορά του μέσου καλλιέργειας σε νέα πιάτα Elisa τα οποία τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη σε θερμοκρασία -80°C προκειμένου να διατηρηθεί ακέραια η ποσότητα της IL-6 που θα έχει απελευθερωθεί στο μέσο της καλλιέργειας. Τα δείγματα αποψύχθηκαν μια μέρα πριν την ανάλυση στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C . Χρησιμοποιήθηκε το kit Human IL-6 Uncoated ELISA, (Thermo Fisher, Cat. No. 88-7066) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το PBS (10X) αραιώθηκε με απιονισμένο νερό για να παρασκευασθεί το διάλυμα επίστρωσης (Coating Buffer). Το capture antibody αραιώθηκε σε αναλογία 1:250. Παράλληλα, το ELISA/ELISPOT Diluent Concentrate (5X) αραιώθηκε σε απιονισμένο νερό (1:5) ώστε να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα αποκλεισμού και αραιώσης των αντισωμάτων. Το πρότυπο (standard) της ανθρώπινης IL-6 αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 200 pg/mL, και από αυτό πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Τέλος, έγινε αραιώση του detection antibody (1:250) και του Streptavidin-HRP (1:100) στο 1X Diluent. Για την επίστρωση των πιάτων προστέθηκαν 100 μ L ανά πηγάδι (well) από το αραιωμένο capture antibody και η πλάκα επώασθηκε όλη τη νύχτα στους 4°C . Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα αντιδραστήρια και πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με Wash Buffer (PBS με 0,05% Tween-20), αφήνοντας το διάλυμα για περίπου ένα λεπτό σε κάθε πλύση και στεγνώνοντας την πλάκα με απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε ο αποκλεισμός (blocking) των μη ειδικών θέσεων δέσμησης προσθέτοντας 200 μ L από το 1X Diluent σε κάθε φρεάτιο και αφήνοντας τις πλάκες για μία ώρα σε

θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, έγινε η προετοιμασία για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές διπλές αραιώσεις (2-fold serial dilutions) του standard, από 200 pg/mL έως 0 pg/mL, και την προσθήκη 100 µL από κάθε standard, ενώ στα φρεάτια του blank προστέθηκε μόνο 1X Diluent. Έπειτα προστέθηκε το κάθε δείγμα ορού με αριθμητική σειρά εκτελώντας αραιώση 1:1 και 1:10. Αντίστοιχα προστέθηκαν τα δείγματα από το μέσο της καλλιέργειας κυττάρων που μελετήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής με 2 ή 3 επαναλήψεις ανά δείγμα. Η πλάκα επωάστηκε για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις έως πέντε πλύσεις και προστέθηκαν 100 µL από το detection antibody σε κάθε φρεάτιο, με επώαση μίας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν νέες πλύσεις (3–5 φορές) και η προσθήκη 100 µL Streptavidin-HRP, με επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλάκα πλύθηκε πέντε έως επτά φορές, με παραμονή του διαλύματος πλύσης για 1–2 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα μη ειδικά συστατικά.

Για την ανάπτυξη του σήματος προστέθηκαν 100 µL από το υπόστρωμα TMB σε κάθε φρεάτιο και έγινε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατεύοντας την πλάκα από το φως. Στη συνέχεια, η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 100 µL διαλύματος τερματισμού (Stop Solution, HCL 2N). Η ανάγνωση πραγματοποιήθηκε σε ειδικό αναγνώστη για Elisa plate, ρυθμίζοντας το μήκος κύματος στα 450 nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με τη διενέργεια των κάτωθι πειραματικών διεργασιών, σκοπεύσαμε στην παρουσίαση των βασικών ερευνητικών δεδομένων που τεκμηριώνουν τη σύνδεση μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και της σχιζοφρένειας μέσω της έκκρισης της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6. Οι *in vitro* καλλιέργειες μακροφάγων που προήλθαν από διαφοροποίηση των μονοκυττάρων ενεργοποιήθηκαν παρουσία λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) και έγινε μέτρηση της ενδοκυττάριας IL-6 με τη μέθοδο της κυτταρομετρία ροής, καθώς και της εκκρινόμενης IL-6 στο μέσο καλλιέργειας με τη μέθοδο ELISA. Επίσης, μετρήθηκε η παρουσία της IL-6 στον ορό αίματος, τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους υγιείς εθελοντές.

3.1 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη

Στη παρούσα μελέτη συμμετείχαν 21 άτομα (Πίνακας 1) από τα οποία οι 7 ήταν υγιείς εθελοντές και 14 ασθενείς με σχιζοφρένεια οι οποίοι νοσηλεύονταν στην Ψυχιατρική κλινική του ΠΓΝΑ λόγω υποτροπής της νόσου ή πρώτου ψυχωσικού επεισοδίου. Οι συμμετέχοντες στις δύο ομάδες εμφάνιζαν μεγάλη ετερογένεια στην ηλικία και για να αποφευχθεί η αλλοίωση της ανάλυσης λόγω ηλικιακών διαφορών επιλέχθηκε η εύρεση υγιών εθελοντών που να βρίσκονται σε παρόμοια ηλικία με τους ασθενείς (age matching).

Πίνακας 1: Δημογραφικά δεδομένα των συμμετεχόντων στη μελέτη.

Συμμετέχοντες	Άνδρες/Γυναίκες	Μέση ηλικία (έτη $\pm$ SD)	Μέση Ηλικία Έναρξης (έτη $\pm$ SD)	BMI (kg/m ² $\pm$ SD)
Υγιείς Εθελοντές	6/1	38 $\pm$ 15	---	
Ασθενείς	11/3	43 $\pm$ 15	25 $\pm$ 9	25.2 $\pm$ 5.5

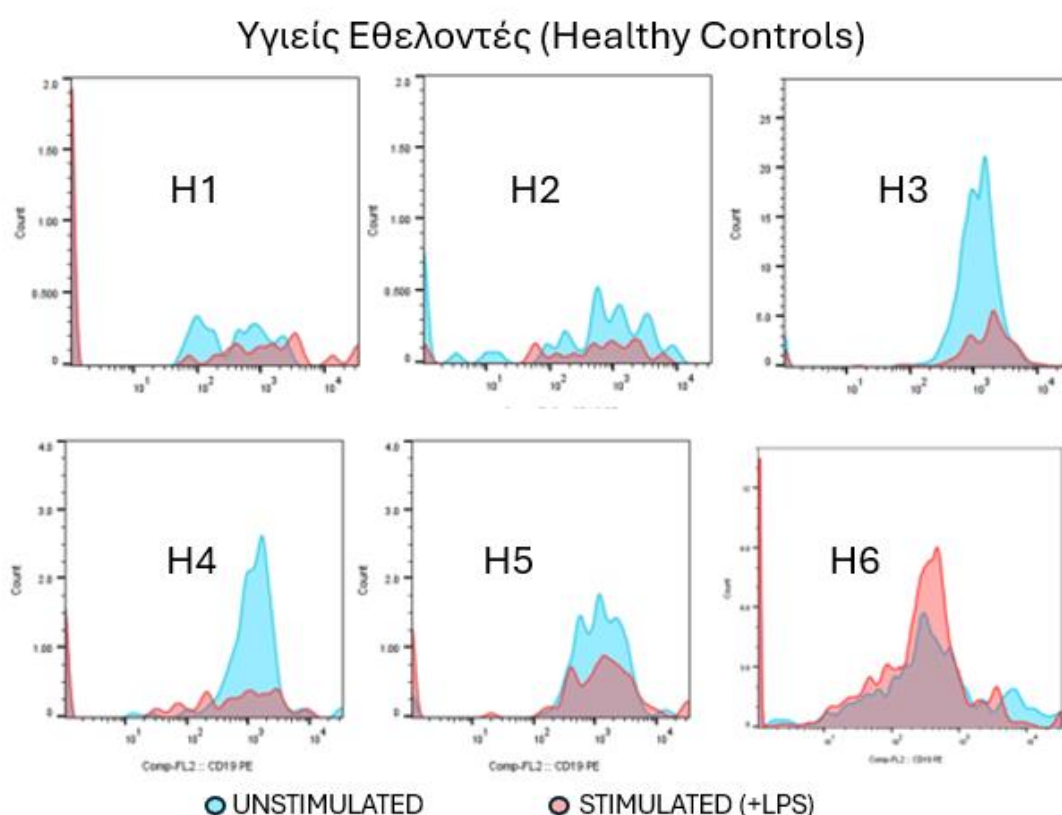
3.2 Ανάλυση ευρημάτων ψυχομετρικών εκτιμήσεων

Τα ευρήματα για την ψυχομετρική εκτίμηση τόσο των ασθενών όσο και των υγιών εθελοντών αποτυπώνονται μέσω σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ των ερωτηματολογίων PANSS και SCL-90. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων

απαιτεί ειδική επεξεργασία από ιατρό και επειδή δεν έχει ολοκληρωθεί δε θα παρουσιαστεί στην παρούσα εργασία.

3.3 Ανίχνευση ενδοκυττάριας IL-6 σε καλλιέργειες μακροφάγων

Η ανίχνευση της ενδοκυττάριας IL-6 έγινε με χρήση ειδικού αντισώματος το οποίο ήταν συζευγμένο με το φθορογόνο PE και ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Αρχικά έγινε απεικόνιση των δεδομένων σε μορφή ιστογράμματος για τα δείγματα των υγιών εθελοντών. Έπειτα έγινε σύγκριση των δεδομένων για τις συνθήκες διέγερσης και μη διέγερσης στις καλλιέργειες κυττάρων του καθενός από τους εθελοντές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**.



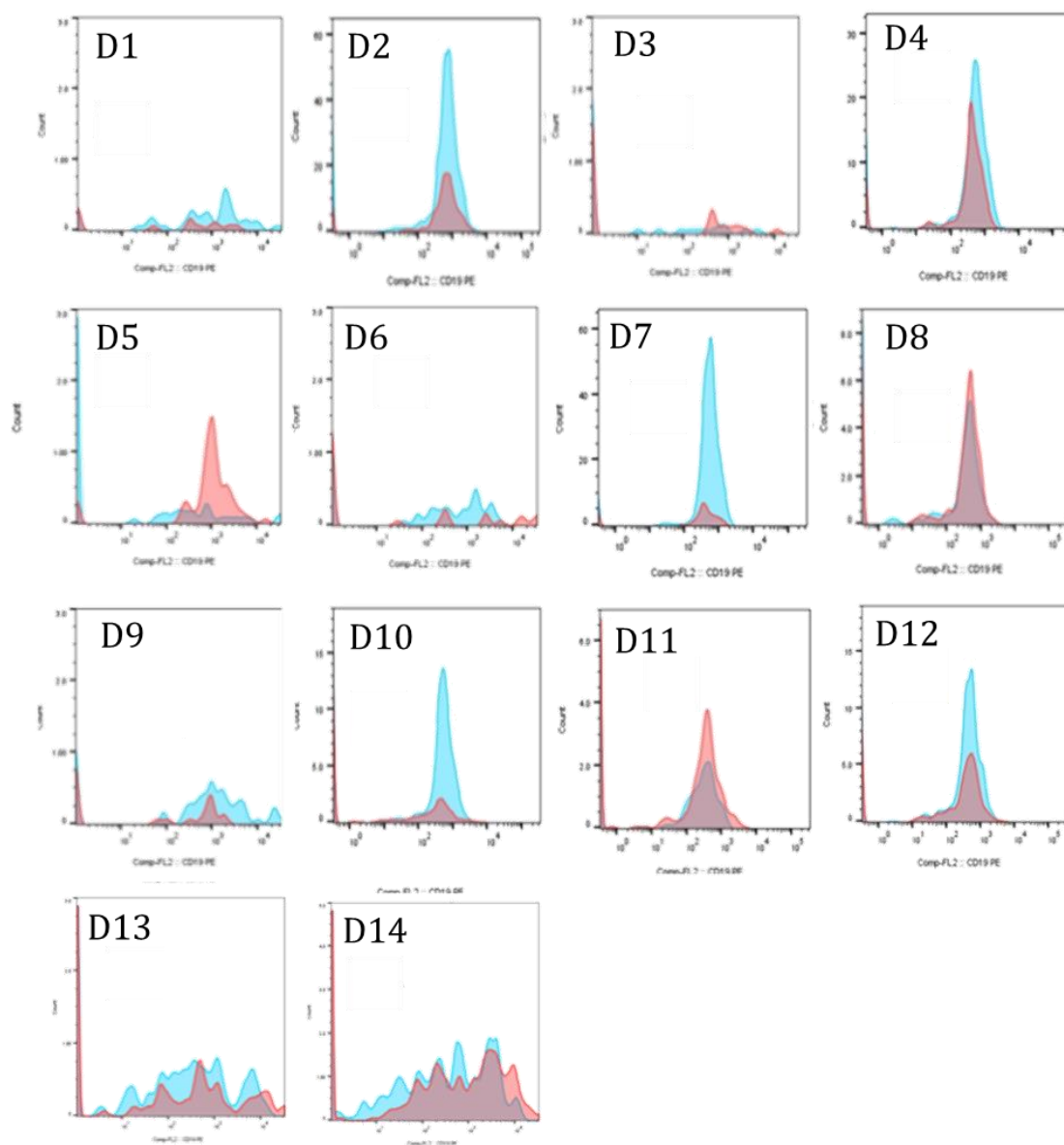
Εικόνα 5: Απεικόνιση ιστογραμμάτων προερχόμενα από ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής για τα δείγματα των υγιών δοτών. Στα ιστογράμματα απεικονίζεται για κάθε δότη η κατανομή της έντασης φθορισμού PE υπό δύο πειραματικές συνθήκες: χωρίς διέγερση (Unstimulated, γαλάζιο) και μετά από διέγερση με LPS (Stimulated, κόκκινο).

Το PE αντανακλά την ενδοκυττάρια δέσμευση αντισώματος anti-IL-6, επομένως η μετατόπιση της κατανομής προς τα δεξιά και/ή η αύξηση της επιφάνειας κάτω από την κορυφή υποδηλώνει αυξημένη παρουσία IL-6 εντός των μακροφάγων.

Στα περισσότερα δείγματα παρατηρείται αύξηση της έντασης φθορισμού μετά τη διέγερση με LPS, γεγονός που αντανακλά αυξημένη ενδοκυττάρια παραγωγή IL-6. Ειδικότερα, τα ιστογράμματα 3, 4 και 6 εμφανίζουν σαφή μετατόπιση της κορυφής της κατανομής προς υψηλότερες τιμές φθορισμού στην κόκκινη καμπύλη, υποδεικνύοντας ισχυρή παραγωγή της κυτοκίνης. Στα ιστογράμματα 1, 2 και 5 οι καμπύλες δείχνουν μικρότερη διαφοροποίηση, με σημαντικό βαθμό επικάλυψης, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε ορισμένους δότες η διέγερση δεν οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση της IL-6. Συνολικά, τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι στα μακροφάγα των υγιών δοτών η διέγερση με LPS προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας IL-6, αν και η ένταση της απόκρισης παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ των ατόμων. Η παρατηρούμενη ετερογένεια πιθανόν να αντανακλά φυσιολογικές ατομικές διαφορές στην ικανότητα του έμφυτου ανοσοποιητικού να ανταποκρίνεται σε φλεγμονώδη ερεθίσματα.

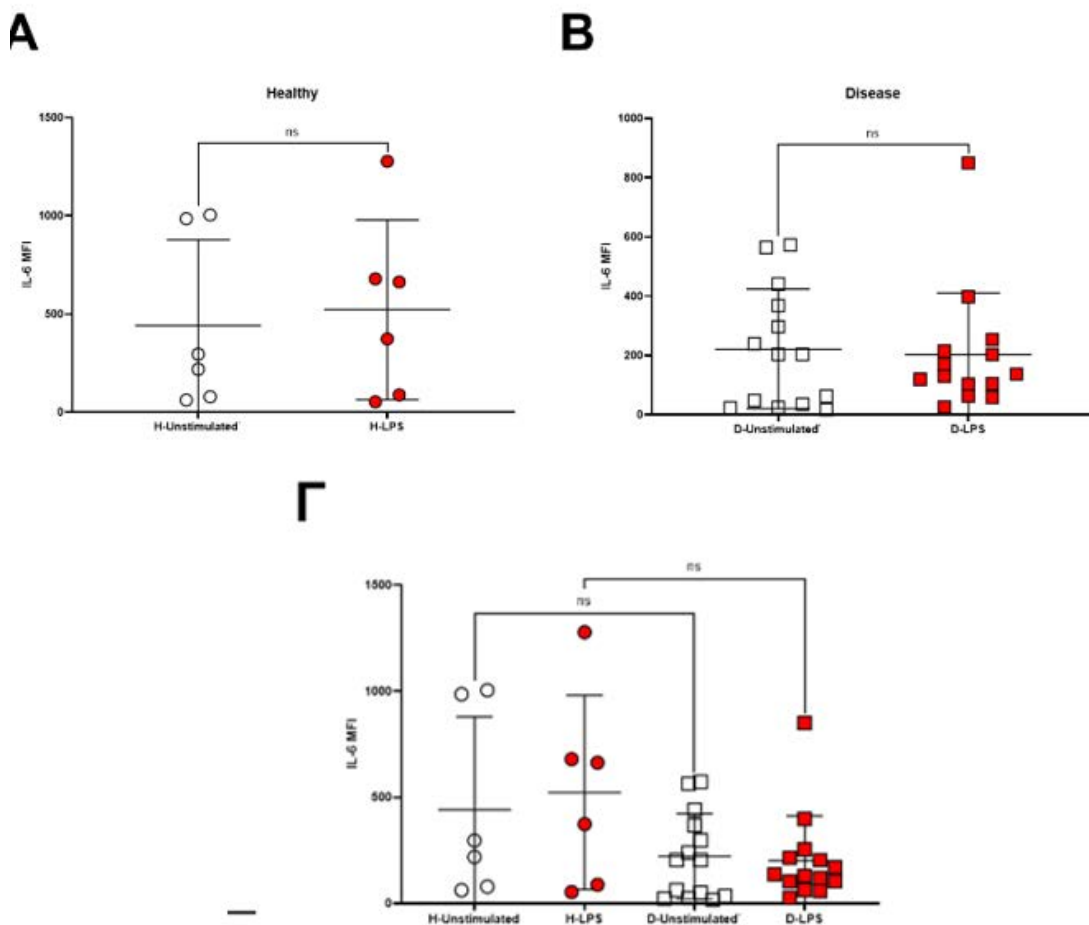
Παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για το κάθε δείγμα των ασθενών με σχιζοφρένεια και έγινε σύγκριση των δεδομένων για τις συνθήκες διέγερσης και μη διέγερσης στις καλλιέργειες κυττάρων του κάθε ασθενούς, όπως φαίνεται στις **Εικόνα 6**.

Ασθενείς με σχιζοφρένεια



Εικόνα 6: Απεικόνιση ιστογραμμάτων προερχόμενα από ανάλυση αποτελεσμάτων των κυτταρομετρίας για τα δείγματα των ασθενών με σχιζοφρένεια.

Η συνολική εικόνα διαφοροποιείται από εκείνη των υγιών δοτών. Σε αρκετά δείγματα (π.χ. ιστογράμματα ασθενών 2, 4, 5, 8, 10) παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής προς υψηλότερες τιμές φθορισμού μετά από διέγερση, γεγονός που υποδεικνύει αυξημένη παραγωγή IL-6. Ωστόσο, σε άλλα δείγματα (π.χ. 1, 3, 6, 7, 9, 11–13) η επικάλυψη μεταξύ μη διεγερμένων και διεγερμένων κυττάρων είναι εκτεταμένη, με μικρή ή ανύπαρκτη διαφοροποίηση στις τιμές φθορισμού. Σε σύγκριση με τους υγιείς, οι ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερη ετερογένεια στην απόκριση στο LPS. Ορισμένα δείγματα δείχνουν ισχυρή αύξηση της IL-6, ενώ άλλα δεν εμφανίζουν ουσιαστική μεταβολή. Ποσοτική ανάλυση των ιστογραμμάτων έγινε με βάση τη μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) (**Εικόνα 7**). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7Α** δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενδοκυττάριας IL6 σε υγιείς δότες μετά από ενεργοποίηση με LPS. Παρόμοιο αποτέλεσμα έδωσαν και οι καλλιέργειες των ασθενών (**Εικόνα 7Β**). Η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο στις μη διεγερμένες όσο και στις διεγερμένες με LPS συνθήκες δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (**Εικόνα 7Γ**).



Εικόνα 7: Ποσοτική ανάλυση και απεικόνιση ιστογραμμάτων της κυτταρομετρίας για ανίχνευση ενδοκυττάριας IL6 σε καλλιέργειες μακροφάγων από όλους τους δότες. Μη ενεργοποιημένα κύτταρα υγιών (άσπροι κύκλοι), ενεργοποιημένα κύτταρα υγιών (κόκκινοι κύκλοι), μη ενεργοποιημένα κύτταρα ασθενών (άσπρα τετράγωνα), ενεργοποιημένα κύτταρα ασθενών (κόκκινα τετράγωνα).

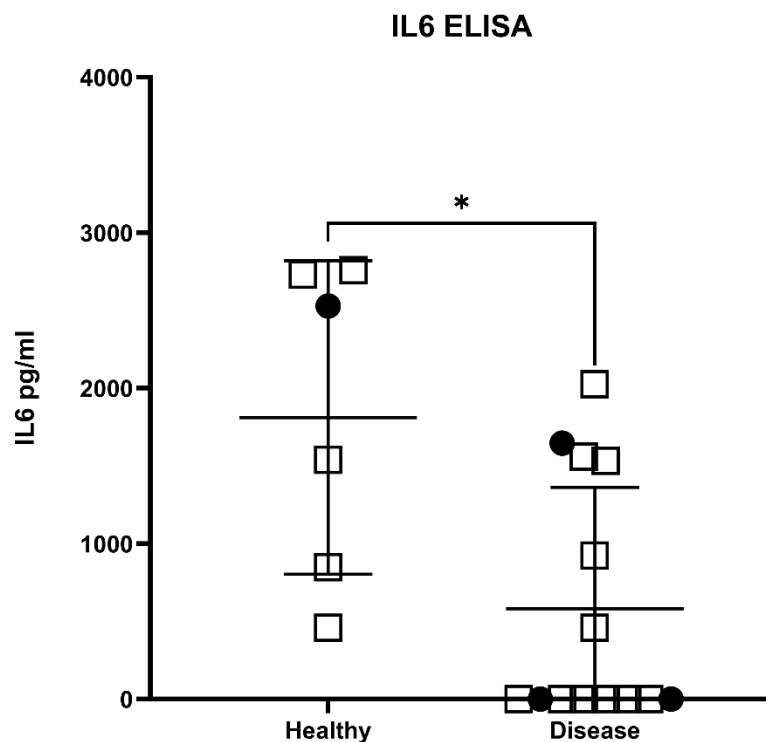
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός εκκρινόμενης IL6 με ELISA

Καλλιέργειες μακροφάγων σε 96-well plates είτε αφέθηκαν σε ηρεμία, είτε ενεργοποιήθηκαν με 100 ng/ml LPS για 24 ώρες. Το θρεπτικό υλικό των καλλιεργειών μεταφέρθηκε και φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα της ELISA αναλύθηκαν με χρήση πρότυπης καμπύλης (standard curve) για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της IL-6. Η εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη είναι η

$$y = 5E-05x.$$

όπου **y** είναι η μετρούμενη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 450 nm και **x** είναι η συγκέντρωση της IL-6 σε pg/mL.

Όλες οι καλλιέργειες που δεν είχαν ενεργοποιηθεί με LPS δεν παρουσίασαν ανιχνεύσιμη IL6 στο θρεπτικό μέσο. Τα επίπεδα της IL6 στις *in vitro* καλλιέργειες παρουσιάζονται στην **Εικόνα 8** όπου φαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της σύνθεσης IL6 στις καλλιέργειες μακροφάγων από ασθενείς με σχιζοφρένεια.



Εικόνα 8: Ποσοτικός προσδιορισμός εκκρινόμενης IL6 σε *in vitro* καλλιέργειες μακροφάγων μετά από διέγερση με LPS σε υγιείς και ασθενείς με σχιζοφρένεια. Οι τιμές που αντιστοιχούν σε άντρες παρουσιάζονται ως τετράγωνα (□) και οι τιμές που αντιστοιχούν σε γυναίκες παρουσιάζονται ως μαύροι κύκλοι (●). Η στατιστική ανάλυση έγινε με Mann-Whitney test (* $p \leq 0.05$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου μπορούν να επηρεάσουν τη ανάπτυξη και τη λειτουργία του εγκεφάλου και πολλές φορές έχουν αιτιολογική σύνδεση με διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος συμπεριλαμβανομένων των ψυχιατρικών παθήσεων. Στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή σχέση ανάμεσα στη σχιζοφρένεια και στα επίπεδα της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 που προέρχεται από κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όπως τα μακροφάγα. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με σχιζοφρένεια, από το οποίο απομονώθηκαν λευκοκύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν *in vitro*, ώστε τα μονοκύτταρα να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα. Για την πρόκληση της σύνθεσης IL6, στις καλλιέργειες των μακροφάγων προστέθηκε LPS, που αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα Toll-like receptor 4 (TLR4) και ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF-kappa B, κύριο ρυθμιστή της σύνθεσης της IL6 (Patlola et al., 2023). Εφαρμόστηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής προκειμένου να ανιχνευθούν τα ενδοκυττάρια επίπεδα της ιντερλευκίνης μετά από 4 ώρες ενεργοποίησης. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IL6 και αυτό μπορεί να οφείλεται στη χρονική διάρκεια της ενεργοποίησης. Μελλοντικά πειράματα κινητικής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, έως και 24 ώρες, θα δώσουν πιο σαφή απάντηση, δεδομένου ότι άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι η παραγωγή IL6 από μακροφάγα μπορεί να χρειάζεται πολύωρη επώαση (Hughes et al., 2022a). Αντιθέτως, όταν τα μακροφάγα ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα της εκκρινόμενης IL6 στο θρεπτικό μέσο, φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της IL6 ήταν μειωμένα σε καλλιέργειες κυττάρων από ασθενείς με σχιζοφρένεια.

Πρόσφατα, πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στην IL-6 ως βιοδείκτη φλεγμονής σε σχιζοφρένεια, τόσο στον ορό όσο και σε κυτταρικές καλλιέργειες μονοκυττάρων με διέγερση. Μία από τις πιο πρόσφατες, με μεγάλο δείγμα, ήρθε από το BMC Psychiatry (He et al., 2023), όπου μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις IL-6 στον ορό σε ασθενείς με σχιζοφρένεια που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη θεραπεία (treatment-resistant schizophrenia, TRS) και συγκρίθηκαν με ασθενείς

με μερική ανταπόκριση (PRS). Χρησιμοποιήθηκε ELISA, και βρέθηκε ότι οι ασθενείς με TRS είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 συγκριτικά με τους PRS, ιδιαίτερα στις γυναίκες. Σε άλλη μελέτη (Delaney et al., 2019), όπου περιλάμβανε ομάδες νεαρών ατόμων με ψύχωση και ομάδες υψηλού κινδύνου εμφάνισης της νόσου (clinical high risk), μετρήθηκαν στον ορό IL-6, CRP μέσω ELISA. Οι ασθενείς είχαν συνολικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 σε σύγκριση με δείγματα υγιών ατόμων. Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η IL-6 αυξάνει πολύ νωρίς στη νόσο, ακόμα και πριν την πλήρη εκδήλωση ψύχωσης. Η πιο ολοκληρωμένη σύνοψη είναι μία μετα-ανάλυση που επιβεβαίωσε ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν αυξημένα επίπεδα IL-6 στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, και ότι οι θεραπείες φαίνεται να μειώνουν τα επίπεδα IL-6 αλλά και του υποδοχέα της, IL-6R, υπό ορισμένες συνθήκες (González-Castro et al., 2024). Σε μία μελέτη από τους (Hughes et al., 2022b) απομονώθηκαν PBMCs από ασθενείς με πρώτο επεισόδιο ψύχωσης και διεγέρθηκαν με διάφορα ερεθίσματα, μεταξύ των οποίων LPS και μετρήθηκε η παραγωγή κυτοκινών στο θρεπτικό μέσο. Τα ευρήματα έδειξαν ότι τα κύτταρα PBMCs ασθενών, ιδίως των αμιγώς συμπτωματικών ή των με σχηματική συνοσηρότητα, παράγουν υψηλότερα επίπεδα IL-6 μετά από διέγερση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Επίσης, οι διαφορές αυτές συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα των αρνητικών συμπτωμάτων που μετρήθηκαν μέσω PANSS. Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκε τόσο τη σοβαρότητα της νόσου όσο και τα γνωστικά ελλείμματα, (Zhilyaeva et al., 2023). Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 στον ορό, και ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ IL-6 και γνωστικής επίδοσης (π.χ. μνήμη εργασίας, λεκτική ευχέρεια), καθώς και θετική συσχέτιση με τη γενική και θετική συμπτωματολογία του PANSS.

Πέρα από τις μετρήσεις ορού αίματος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων αίματος (PBMCs) ύστερα από διέγερση με LPS, που προσδένεται στον υποδοχέα TLR4 (Patlola et al., 2023). Οι ερευνητές (Ormel et al., 2017) χρησιμοποίησαν μονοκύτταρα που διαφοροποιήθηκαν *in vitro* σε μακροφάγα από ασθενείς με σχιζοφρένεια και υγιείς μάρτυρες, τα οποία διεγέρθηκαν με LPS. Η ανάλυση έδειξε ότι τα κύτταρα των ασθενών παρουσίαζαν διαφοροποιημένη φλεγμονώδη απόκριση, με μεταβολές στα επίπεδα της IL-6 και άλλων κυτοκινών, σε σχέση με

τους υγιείς (Ormel et al., 2017). Αντίστοιχα, άλλοι ερευνητές (Reale et al., 2011a) απομόνωσαν PBMCs από ασθενείς και τα διεγέρθηκαν με LPS καταγράφοντας αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών ανάμεσα στις οποίες και η IL-6. Η μελέτη ανέδειξε ότι οι ασθενείς παρουσίαζαν πιο έντονη ή ετερογενή απόκριση σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της δυσλειτουργίας της ανοσολογικής ρύθμισης στη σχιζοφρένεια (Reale et al., 2011b).

Συνολικά, οι μελέτες αυτές συγκλίνουν στο ότι η IL-6 αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού στη σχιζοφρένεια. Τα ευρήματα από τον ορό υποδεικνύουν μια χρόνια κατάσταση ήπιας φλεγμονής στους ασθενείς, ενώ τα πειράματα σε PBMCs με LPS αποκαλύπτουν διαφοροποιημένη δυναμική ανταπόκρισης σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. Σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα, όπου καταγράφηκε ετερογένεια στην παραγωγή IL-6 στα μακροφάγα των ασθενών και τάση αύξησης μετά από LPS στους υγιείς χωρίς στατιστική σημαντικότητα λόγω περιορισμένου δείγματος, τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας ενισχύουν την ερμηνεία ότι η IL-6 αποτελεί σημαντικό αλλά όχι μοναδικό στοιχείο της φλεγμονώδους δυσλειτουργίας στη σχιζοφρένεια. Η σύγκριση υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω μελετών με μεγαλύτερα δείγματα και συνδυασμό μεθόδων (ορολογικές και κυτταρικές), ώστε να αποσαφηνιστεί η ακριβής συμβολή της IL-6 στην παθογένεση και την κλινική έκφραση της σχιζοφρένειας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Benros, M. E., Nielsen, P. R., Nordentoft, M., Eaton, W. W., Dalton, S. O., & Mortensen, P. B. (2011). Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: A 30-year population-based register study. *The American Journal of Psychiatry*, 168(12), 1303–1310. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.11030516>
- Brefeldin A Solution 1,000X. (n.d.). Retrieved September 22, 2025, from <https://www.biolegend.com/nl-nl/products/brefeldin-a-solution-1-000x-1499?GroupID=BLG2181>
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030361>
- Canetta, S., Sourander, A., Surcel, H.-M., Hinkka-Yli-Salomäki, S., Leiviskä, J., Kellendonk, C., McKeague, I. W., & Brown, A. S. (2014). Elevated maternal C-reactive protein and increased risk of schizophrenia in a national birth cohort. *The American Journal of Psychiatry*, 171(9), 960–968. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13121579>
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213, 48–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x>
- Chaves, C., Dursun, S. M., Tusconi, M., & Hallak, J. E. C. (2024). Neuroinflammation and schizophrenia – is there a link? *Frontiers in Psychiatry*, 15, 1356975. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2024.1356975>
- Dal Santo, F., García-Portilla, M. P., Fernández-Egea, E., González-Blanco, L., Sáiz, P. A., Giordano, G. M., Galderisi, S., & Bobes, J. (2024). The dimensional structure of the Positive and Negative Syndrome Scale in first-episode schizophrenia spectrum disorders: An Exploratory Graph Analysis from the OPTiMiSE trial. *Schizophrenia*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.1038/s41537-024-00499-5>
- Danese, A., Moffitt, T. E., Pariante, C. M., Ambler, A., Poulton, R., & Caspi, A. (2008). Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. *Archives of General Psychiatry*, 65(4), 409–415. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.4.409>

- Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3), 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.040>
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- Delaney, S., Fallon, B., Alaedini, A., Yolken, R., Indart, A., Feng, T., Wang, Y., & Javitt, D. (2019). Inflammatory biomarkers in psychosis and clinical high risk populations. *Schizophrenia Research*, 206, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.10.017>
- Derogatis, L. R., & Cleary, P. A. (1977). Confirmation of the dimensional structure of the SCL-90: A study in construct validation. *Journal of Clinical Psychology*, 33(4), 981–989. [https://doi.org/10.1002/1097-4679\(197710\)33:4%253C981::AID-JCLP2270330412%253E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-4679(197710)33:4%253C981::AID-JCLP2270330412%253E3.0.CO;2-0)
- Eaton, W. W., Byrne, M., Ewald, H., Mors, O., Chen, C.-Y., Agerbo, E., & Mortensen, P. B. (2006). Association of schizophrenia and autoimmune diseases: Linkage of Danish national registers. *The American Journal of Psychiatry*, 163(3), 521–528. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.3.521>
- Eraly, S. A., Nievergelt, C. M., Maihofer, A. X., Barkauskas, D. A., Biswas, N., Agorastos, A., O'Connor, D. T., Baker, D. G., & Marine Resiliency Study Team. (2014). Assessment of plasma C-reactive protein as a biomarker of posttraumatic stress disorder risk. *JAMA Psychiatry*, 71(4), 423–431. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.4374>
- Ganguli, R., Brar, J. S., Chengappa, K. N., Yang, Z. W., Nimgaonkar, V. L., & Rabin, B. S. (1993). Autoimmunity in schizophrenia: A review of recent findings. *Annals of Medicine*, 25(5), 489–496. <https://doi.org/10.3109/07853899309147317>
- Gardner, R. M., Dalman, C., Wicks, S., Lee, B. K., & Karlsson, H. (2013). Neonatal levels of acute phase proteins and later risk of non-affective psychosis. *Translational Psychiatry*, 3(2), e228. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.5>
- Geck, S., Roithmeier, M., Bühner, M., Wehr, S., Weigel, L., Priller, J., Davis, J. M., & Leucht, S. (2025). COSMIN systematic review and meta-analysis of the measurement properties of the PANSS-6. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 94, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2025.02.008>

- Gómez-Rubio, P., & Trapero, I. (2019). The Effects of Exercise on IL-6 Levels and Cognitive Performance in Patients with Schizophrenia. *Diseases*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.3390/diseases7010011>
- González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C. A., Juárez-Rojop, I. E., Hernández-Díaz, Y., López-Narváez, M. L., & Ortiz-Ojeda, R. F. (2024). Effects of IL-6/IL-6R axis alterations in serum, plasma and cerebrospinal fluid with the schizophrenia: An updated review and meta-analysis of 58 studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 479(3), 525–537. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04747-7>
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Harrison, G., Hopper, K., Craig, T., Laska, E., Siegel, C., Wanderling, J., Dube, K. C., Ganey, K., Giel, R., an der Heiden, W., Holmberg, S. K., Janca, A., Lee, P. W., León, C. A., Malhotra, S., Marsella, A. J., Nakane, Y., Sartorius, N., Shen, Y., ... Wiersma, D. (2001). Recovery from psychotic illness: A 15- and 25-year international follow-up study. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 178, 506–517. <https://doi.org/10.1192/bjp.178.6.506>
- Harrison, N. A., Doeller, C. F., Voon, V., Burgess, N., & Critchley, H. D. (2014). Peripheral inflammation acutely impairs human spatial memory via actions on medial temporal lobe glucose metabolism. *Biological Psychiatry*, 76(7), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.01.005>
- He, J., Wei, Y., Li, J., Tang, Y., Liu, J., He, Z., Zhou, R., He, X., Ren, H., Liao, Y., Gu, L., Yuan, N., Chen, X., & Tang, J. (2023). Sex differences in the association of treatment-resistant schizophrenia and serum interleukin-6 levels. *BMC Psychiatry*, 23(1), 470. <https://doi.org/10.1186/s12888-023-04952-0>
- Hughes, H. K., Yang, H., Lesh, T. A., Carter, C. S., & Ashwood, P. (2022a). Evidence of innate immune dysfunction in first-episode psychosis patients with accompanying mood disorder. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02648-y>
- Hughes, H. K., Yang, H., Lesh, T. A., Carter, C. S., & Ashwood, P. (2022b). Evidence of innate immune dysfunction in first-episode psychosis patients with accompanying mood disorder. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02648-y>
- Jaeschke, K., Hanna, F., Ali, S., Chowdhary, N., Dua, T., & Charlson, F. (2021). Global estimates of service coverage for severe mental disorders: Findings from the

- WHO Mental Health Atlas 2017. *Global Mental Health (Cambridge, England)*, 8, e27. <https://doi.org/10.1017/gmh.2021.19>
- Kay, S. R., Fiszbein, A., & Opler, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 13(2), 261–276. <https://doi.org/10.1093/schbul/13.2.261>
- Khandaker, G. M., Cousins, L., Deakin, J., Lennox, B. R., Yolken, R., & Jones, P. B. (2015). Inflammation and immunity in schizophrenia: Implications for pathophysiology and treatment. *The Lancet. Psychiatry*, 2(3), 258–270. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)00122-9)
- Khandaker, G. M., Pearson, R. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: A population-based longitudinal study. *JAMA Psychiatry*, 71(10), 1121–1128. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1332>
- Khandaker, G. M., Stochl, J., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Childhood Epstein-Barr Virus infection and subsequent risk of psychotic experiences in adolescence: A population-based prospective serological study. *Schizophrenia Research*, 158(1–3), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.05.019>
- Khandaker, G. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). A population-based study of atopic disorders and inflammatory markers in childhood before psychotic experiences in adolescence. *Schizophrenia Research*, 152(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.09.021>
- Khandaker, G. M., Zimbron, J., Dalman, C., Lewis, G., & Jones, P. B. (2012). Childhood infection and adult schizophrenia: A meta-analysis of population-based studies. *Schizophrenia Research*, 139(1–3), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.05.023>
- Khandaker, G. M., Zimbron, J., Lewis, G., & Jones, P. B. (2013). Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: A systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine*, 43(2), 239–257. <https://doi.org/10.1017/S0033291712000736>
- Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: From basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual Review of Immunology*, 23, 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806>
- Laursen, T. M., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, 10, 425–448. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153657>

- Li, X., Wei, N., Song, J., Liu, J., Yuan, J., Song, R., Liu, L., Mei, L., Yan, S., Wu, Y., Pan, R., Yi, W., Jin, X., Li, Y., Liang, Y., Sun, X., Cheng, J., & Su, H. (2023). The global burden of schizophrenia and the impact of urbanization during 1990–2019: An analysis of the global burden of disease study 2019. *Environmental Research*, 232, 116305. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116305>
- Lykouras, E., Botsis, A., & Oulis, P. (1994). The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) [in Greek]. *Tsiveriotis Ed.*
- McFarland, H. F., & Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), 913–919. <https://doi.org/10.1038/ni1507>
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological Psychiatry*, 65(9), 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>
- Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., & Kirkpatrick, B. (2011). Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry*, 70(7), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.013>
- Momtazmanesh, S., Zare-Shahabadi, A., & Rezaei, N. (2019). Cytokine Alterations in Schizophrenia: An Updated Review. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 892. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00892>
- Mondelli, V., & Howes, O. (2014). Inflammation: Its role in schizophrenia and the potential anti-inflammatory effects of antipsychotics. *Psychopharmacology*, 231(2), 317–318. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3383-3>
- Ormel, P. R., van Mierlo, H. C., Litjens, M., Strien, M. E. van, Hol, E. M., Kahn, R. S., & de Witte, L. D. (2017). Characterization of macrophages from schizophrenia patients. *Npj Schizophrenia*, 3(1), 41. <https://doi.org/10.1038/s41537-017-0042-4>
- Patlola, S. R., Donohoe, G., & McKernan, D. P. (2023). Counting the Toll of Inflammation on Schizophrenia—A Potential Role for Toll-like Receptors. *Biomolecules*, 13(8), 1188. <https://doi.org/10.3390/biom13081188>
- Perry, B. I., Zammit, S., Jones, P. B., & Khandaker, G. M. (2021). Childhood inflammatory markers and risks for psychosis and depression at age 24: Examination of temporality and specificity of association in a population-based prospective birth cohort. *Schizophrenia Research*, 230, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2021.02.008>

- Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 6(4), 193–201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: A systematic quantitative review. *Biological Psychiatry*, 63(8), 801–808. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.024>
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, 27, 119–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Reale, M., Patruno, A., De Lutiis, M. A., Pesce, M., Felaco, M., Di Giannantonio, M., Di Nicola, M., & Grilli, A. (2011a). Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neuroscience*, 12, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-13>
- Reale, M., Patruno, A., De Lutiis, M. A., Pesce, M., Felaco, M., Di Giannantonio, M., Di Nicola, M., & Grilli, A. (2011b). Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neuroscience*, 12(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-13>
- Santambrogio, L., Belyanskaya, S. L., Fischer, F. R., Cipriani, B., Brosnan, C. F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L. J., Strominger, J. L., & Riese, R. (2001). Developmental plasticity of CNS microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6295–6300. <https://doi.org/10.1073/pnas.111152498>
- Schizophrenia*. (n.d.). Retrieved September 22, 2025, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
- SCL-90: An outpatient psychiatric rating scale—Preliminary report—PubMed*. (n.d.). Retrieved September 22, 2025, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4682398/>
- Solmi, M., Seitidis, G., Mavridis, D., Correll, C. U., Dragioti, E., Guimond, S., Tuominen, L., Dargél, A., Carvalho, A. F., Fornaro, M., Maes, M., Monaco, F., Song, M., Il Shin, J., & Cortese, S. (2023). Incidence, prevalence, and global burden of schizophrenia—Data, with critical appraisal, from the Global Burden of Disease (GBD) 2019. *Molecular Psychiatry*, 28(12), 5319–5327. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02138-4>

- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Torrey, E. F., Bartko, J. J., & Yolken, R. H. (2012). Toxoplasma gondii and other risk factors for schizophrenia: An update. *Schizophrenia Bulletin*, 38(3), 642–647. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs043>
- Upthegrove, R., Manzanares-Teson, N., & Barnes, N. M. (2014). Cytokine function in medication-naïve first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, 155(1–3), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.03.005>
- Walker, A. K., Budac, D. P., Bisulco, S., Lee, A. W., Smith, R. A., Beenders, B., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2013). NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(9), 1609–1616. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.71>
- Williams, J. A., Burgess, S., Suckling, J., Lalousis, P. A., Batool, F., Griffiths, S. L., Palmer, E., Karwath, A., Barsky, A., Gkoutos, G. V., Wood, S., Barnes, N. M., David, A. S., Donohoe, G., Neill, J. C., Deakin, B., Khandaker, G. M., Upthegrove, R., & PIMS Collaboration. (2022). Inflammation and Brain Structure in Schizophrenia and Other Neuropsychiatric Disorders: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Psychiatry*, 79(5), 498–507. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2022.0407>
- Zhilyaeva, T. V., Rukavishnikov, G. V., Manakova, E. A., & Mazo, G. E. (2023). Serum Interleukin-6 in Schizophrenia: Associations with Clinical and Sociodemographic Characteristics. *Consortium Psychiatricum*, 4(4), 5–16. <https://doi.org/10.17816/CP11067>
- Zhou, X., Tian, B., & Han, H.-B. (2021). Serum interleukin-6 in schizophrenia: A system review and meta-analysis. *Cytokine*, 141, 155441. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155441>