

ΕΚΦΡΑΣΗ
ΤΩΝ D₃ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΣΤΑ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ
ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΛΑΜΠΡΟΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ, ΜΑΙΟΣ 2003

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
Πρωτ. ... 05/05/2003
Αριθ. Πρωτ. ... 2523



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2852/1

Ημερ. Εισ.: 17-06-2009

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΛΑΜ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083613

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Προλογος	2
Περίληψη στα Ελληνικά	3
Περίληψη στα Αγγλικά	4
Εισαγωγή	5
Μέθοδος	14
Αποτελέσματα	25
Συζήτηση	39
Βιβλιογραφικές Παραπομπές	41

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή μου εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αισθάνομαι εδώ έντονα την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλλαν στην διεξαγωγή της.

- Τον κύριο Μολυβδά Πασχάλη, Καθηγητή της φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διευθυντή των εργαστηρίων, Πρόεδρο του τμήματος Ιατρική Βιοχημεία και Πρόεδρο του τμήματος της Ιατρικής, που ευχαρίστως με φιλοξένησε στα εργαστήρια φυσιολογίας.
- Την κυρία Μπονάνου Τζεδάκη Σοφία, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πρώην Πρόεδρο του Τμήματος Ιατρικής Βιοχημείας, για τη συμπαράσταση και τις γνώσεις που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.
- Τον κύριο Αγγελόπουλο Νικηφόρο Αν. Καθηγητή και Διευθυντή του τμήματος της Ψυχιατρικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας, για την συγκατάθεσή του για τη λήψη των δειγμάτων απο την ψυχιατρική πτέρυγα του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας, καθώς και για τις αξιόλογες παρατηρήσεις του, για τη βελτίωση της εργασίας αυτής.
- Τον κύριο Σίμο Γεώργιο Επίκουρο της Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που βοήθησε κατά πολύ τη βελτίωση της έργασίας αυτής, με τις επίσης πολύ σημαντικές παρατηρήσεις του.
- Την κυρία Παρασκευά Ευφροσύνη, Λέκτορα της Φυσιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύ σημαντική βοήθεια που μου προσέφερα με τις σημαντικές παρατηρήσεις της, την συνολική παρακολούθηση των πειραμάτων, και τη διόρθωση των λαθών μου. Χωρίς τη συμβολή της η διεξαγωγή των πειραμάτων θα ήταν αδύνατη.
- Την κυρία Νούσιου Ευαγγελία και τον κύριο Βαλιάκο Ηλία Γραμματείς του τμήματος Ιατρική Βιοχημεία, που με μεγάλη ευχαρίστηση με κατατόπισαν για τα διαδικαστικά θέματα που αφορούσαν την εργασία.
- Τέλος θέλω να εκφράσω την ευλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην κυρία Χατζηευθυμίου Αποστολία, Λέκτορα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κάτω από τη συνεχή καθοδήγηση και την ακούραστη υποστήριξη της οποίας εργάστηκα όλο αυτό το διάστημα. Την ευχαριστώ θερμά για την υπομονή της που ανέχθηκε και διόρθωνε τα λάθη μου, που ακούραστα με συμβούλευε, καθοδηγούσε και κατεύθυνε αποτελεσματικά την προσπάθεια αυτή. Χωρίς την καθοριστική συμβολή της δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βασιζόμενοι στη πρόσφατη βιβλιογραφία από την οποία έχω προταθεί ότι τα επίπεδα του mRNA του υποδοχέα της ντοπαμίνης στα λεμφοκύτταρα του αίματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένας εύκολος και προσβάσιμος δείκτης για τη σχιζοφρένεια. Για να εκτιμηθεί η χρησιμότητα αυτού του δείκτη, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του δείκτη αυτού απ λεμφοκύτταρα αίματος περιθαλπτόμενων ασθενών με σχιζοφρένεια σε σχέση με δείγματα ελέγχου από υγιής. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η ομάδα Α περιλάμβανε 3 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας 33 έτη, (από 31-35), και την ομάδα Β με 4 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας 50 (από 44-57). Οι έντεκα υγιής ομαδοποιήθηκαν ανάλογα [N=6 με μέσο όρο ηλικίας 31,5 (από 27-36) και N=5, μέσος όρος ηλικίας 44,5 (από 42-48)].

Ολικό RNA απομονώθηκε από λεμφοκύτταρα αίματος και αντιγράφηκε αντίστροφα. Το cDNA ενισχύθηκε από PCR και αναλύθηκε σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τα προγράμματα : Quantity One και Scion Image.

Η διαφορά του μέσου όρου του mRNA των υποδοχέων της ντοπαμίνης D₃ προς την ακτίνη, ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,016$) αυξανόμενη στους ασθενείς της ομάδας Α σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα σε ηλικία των υγείων. ($0,949\pm 0,050$) και ($0,647\pm 0,061$) αντίστοιχα. Δεν υπήρξε αντίστοιχη διαφορά στην ομάδα Β.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής προτείνουν ότι η έκφραση των D₃ υποδοχέων στα λεμφοκύτταρα του αίματος μεταβάλλονται ανάλογα με την ηλικία των ασθενών. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξαρτάται από τη διαφορετική εξέλιξη της νόσου σε σχέση με την ηλικία , και τη διάρκεια της θεραπείας των ασθενών.

ABSTRACT

Based on recent studies it has been proposed that the levels of dopamine receptor mRNA on blood lymphocytes can be used as an easily accessible marker for schizophrenia. To evaluate the usefulness of this marker for relative levels of D₃ dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes of medicated schizophrenics. Patients were divided in two age groups. Group A comprised three patients with mean age 33 years (range 31-35) and group B four patients with mean age 50 (range 44-57). Eleven healthy subjects, grouped accordingly [N=6, mean age 31,5 (range 27-36) and N=5, mean age 44,5 (range 41-48)] were used as control. Total RNA was isolated from blood lymphocytes and was reverse transcribed. The cDNA was amplified by PCR products were resolved by electrophoresis and quantified using the Quantity One and the Scion image software. The mean ratio of D₃ dopamine receptor mRNA to that of B-actin was significantly ($p=0,016$) increased in schizophrenics of group A relative to age matched controls ($0,949+_{-}0,050$ and $0,647+ 0,061$ respectively). Similar increased was observed when patients of group A and group B are compared ($0,949+0,050$ and $0,661+0,112$ respectively). There was no difference between schizophrenics of group B and age matched controls ($0,661+0,112$ and $0,647+0,017$ respectively). Our results suggest that the expression of D₃ dopamine receptor in blood lymphocytes is altered depending on patient age. This variation may depend on the evolution of the disease with age, and/or the duration of the medication treatment of the patients.

Εισαγωγή.

Ο όρος σχιζοφρένεια προτάθηκε από τον Eugene Bleuler το 1911 για να περιγράψει το σύνδρομο που προτύτερα είχε ονομαστεί ως «πρώιμη άνοια», γρήγορα όμως διαπιστώθηκε ότι δεν επρόκειτο για άνοια που ξεκίναγε νωρίς αλλά για βαρεία ψυχωτική διαταραχή “σχίσσιμο του μυαλού” εξ’ αυτού κι ο όρος σχιζοφρένεια.

Σήμερα η σχιζοφρένεια θεωρείται ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από έντονη αλλοίωση της εσωτερικής κι εξωτερικής πραγματικότητας. Προσβάλλει πολλές νοητικές λειτουργίες, και το άτομο απαντά με τρόπους επιβλαβής για τη ζωή του. Η αλλοίωση της πραγματικότητας, εκφράζεται με διαταραχές στην αντίληψη, στη σκέψη, στο συναίσθημα, στην ομιλία και στη ψυχοκινητικότητα.

Από πολλούς η σχιζοφρένεια δεν θεωρείται μία συγκεκριμένη νόσος, αλλά μία ομάδα διαταραχών που πιθανό να προέρχονται από διαφορετικές αιτιολογίες, και για το λόγο αυτό προτείνεται ο όρος σχιζοφρενικές διαταραχές.

Η σχιζοφρένεια είναι μία από της σημαντικότερες ασθένειες γιατί μπορεί να οδηγήσει το άτομο σε πράξεις βίας (ακόμα κι εγκληματικές) με αποτέλεσμα να προκαλεί πολλά κοινωνικά προβλήματα. Συχνές είναι επίσης οι τάσεις αυτοκαταστροφής και η αυτοκτονία. Ένα ποσοστό 20% σχιζοφρενών ασθενών προβαίνουν σε απόπειρα αυτοκτονίας κατά τη διάρκεια της ασθένειας, με αποτέλεσμα το 2-3% των ασθενών αυτών να καταλήγουν στο θάνατο.

Ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται στο 1% του πληθυσμού, κι ανευρίσκεται σε όλους τους λαούς και τους πολιτισμούς, προσβάλλει άντρες και γυναίκες στο ίδιο ποσοστό, και βρίσκεται συχνότερα σε χαμηλές κοινωνικοοικονομικές ομάδες. Οι λόγοι για το τελευταίο δεν έχουν διευκρινιστεί. Πιθανές αιτίες έχουν προταθεί, όπως η κοινωνική πτώση και η έλλειψη κοινωνικοοικονομικής κινητικότητας, αφού οι ασθενείς με σχιζοφρένεια δεν μπορούν ν’ αποδώσουν επαγγελματικά, και γι’ αυτό υποβιβάζονται η παραμένουν στα χαμηλά κοινωνικοοικονομικά επίπεδα της κοινωνίας. (Μάνος Νίκος 1988) Μελέτες που έγιναν σε συγγενείς ασθενών έδειξαν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου. Έτσι υιοθετημένα παιδιά με βιολογικούς συγγενείς που πάσχουν από σχιζοφρένεια παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, παρόλο που τα παιδιά

αυτά ανατράφησαν σε διαφορετικό περιβάλλον. Μελέτες διδύμων έδειξαν πως όταν ο ένας αδερφός έπασχε από τη νόσο ο άλλος είχε πιθανότητες να την αναπτύξει από 35% - 58% σε μονοζυγωτές διδύμους, και από 6% - 36% σε διζυγώτες διδύμους. Ενώ η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι 1% στο γενικό πληθυσμό. Οι συγγενείς των ασθενών εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, οι ετεροθαλείς αδερφοί να έχουν 7,1% πιθανότητες να νοσήσουν, οι κανονικοί αδερφοί 14,2%, οι διζυγώτες δίδυμοι 16,4%, οι γονείς 7,1%. Τα παιδιά ασθενών έχουν πιθανότητα εμφάνισης της νόσου 14,2% όταν ο ένας γονέας είναι σχιζοφρενής και 39,2% όταν και οι δύο γονείς είναι σχιζοφρενείς. Τα παραπάνω στοιχεία υποστηρίζουν τον γενετικό παράγοντα στην εμφάνιση της νόσου.

Η νόσος συνήθως αναπτύσσεται στην όψιμη εφηβεία ή στα πρώτα χρόνια της τρίτης δεκαετίας της ζωής, υπάρχει όμως έναρξη της νόσου ακόμα και σε πιο όψιμα χρόνια η και μετά τα 45, ενώ στις γυναίκες φαίνεται να αρχίζει αργότερα.

Διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία. Η ακριβής διάγνωση της νόσου είναι πολύ σημαντική για την πρόγνωση και θεραπεία της. Παρ' όλα αυτά όμως είναι μία πολυπλοκή και όχι τόσο ακριβής διαδικασία, αφού δεν υπάρχει γνωστή παθογένεια, καθορισμένοι βιολογικοί δείκτες ή καθορισμένα συμπτώματα που να πιστοποιούν τη νόσο. Η διάγνωση βασίζεται κυρίως στις παρατηρήσεις της συμπεριφοράς του ασθενή μέσα σε ορισμένα χρονικά όρια που περιλαμβάνουν τουλάχιστον 12 μήνες. Η διάγνωση γίνεται ακόμη πιο πολύπλοκη λόγω της άγνωστης έκβασης της νόσου και των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων μέσα στα οποία μπορεί να εμφανιστούν νέα ψυχωτικά επεισόδια. Αποτέλεσμα της δυσκολίας της διάγνωσης είναι να θέτει μεγάλους προβληματισμούς στο αν πρέπει να δοθεί θεραπεία, ποια θα είναι αυτή και σε τι βαθμό.

Συνήθως η ασθένεια αρχίζει ξαφνικά με την εμφάνιση του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, εμφανίζοντας δηλαδή μία πρώτη ψυχωτική διάσπαση. Σε αυτή την ενεργό φάση ο ασθενής εμφανίζει ψυχωτικά συμπτώματα όπως παραληρητικές ιδέες, ψευδαισθήσεις (που μπορεί να είναι κι επικίνδυνες), χάλαση των συνειρμών, ασυναρτησία, παράλογη σκέψη και συμπεριφορά που είναι έντονα αποδιοργανωμένη η μπορεί να είναι κατατονική. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει για απροσδιόριστο χρόνο από λίγες μέρες έως κι εβδομάδες. Πρίν τη φάση αυτή σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει μία πρόδρομη φάση η οποία μπορεί να διαρκέσει απο μέρες μέχρι μήνες, στην οποία σιγά σιγά το άτομο εμφανίζει παράξενη συμπεριφορά. Μετα το πρώτο περιστατικό ο ασθενής παρακολουθείται και εάν ξαναπαρουσιάσει

ενεργό φάση μέσα σε ένα χρονικό διάστημα ενός έτους, η εμφανίζει στο διάστημα αυτό υπολειμματική φάση τότε χαρακτηρίζεται ως σχιζοφρενής. Το πρόβλημα εδώ ως αναφορά τη διάγνωση είναι ότι ο ασθενής μπορεί να παρουσιάσει πλήρη υποχώρηση των συμπτωμάτων η ακόμα και ίαση, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να χορηγηθεί άμεσα θεραπεία.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα στη διάγνωση είναι η κοινή συμπτωματολογία της νόσου με άλλες ψυχικές διαταραχές.

Η πρόγνωση της νόσου για εκείνους που απλά εμφάνισαν ένα ψυχωτικό περιστατικό παραμένει τελείως άγνωστη και ποικίλει όπως προαναφέρθηκε, από την πλήρη ίαση, έως την χρόνια κατάσταση της νόσου, ενώ για εκείνους που έχουν χαρακτηριστεί ως σχιζοφρενείς δεν είναι συνήθως αισιόδοξη. Η πρόγνωση μπορεί να γίνει καλύτερη με τη σωστή και έγκαιρη θεραπεία. Συνήθως άτομα που εμφάνισαν περιστατικό χωρίς προηγούμενη συμπτωματολογία και σε μεγάλη ηλικία έχουν καλύτερη πρόγνωση, από άτομα μικρής ηλικίας με σταδιακή εμφάνιση συμπτωμάτων.

Δεν υπάρχει μόνιμη θεραπεία της νόσου. Η θεραπευτική αντιμετώπιση απευθύνεται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και τη ψυχοκοινωνική αποκατάσταση του ασθενή.

Η θεραπευτική αγωγή περιλαμβάνει κυρίως τη χορήγηση αντιψυχωτικών φάρμακων, τα οποία καταστέλλουν τη διέγερση και θεραπεύουν τα ψυχωτικά συμπτώματα. Η θεραπεία όμως αυτή δεν είναι μόνιμη. Για να επιτευχθεί η πλήρης δράση των φαρμάκων πρέπει να περάσει διάστημα τουλάχιστον 6 εβδομάδων.

Τα αντιψυχωτικά φάρμακα παρουσιάζουν και σοβαρές παρενέργειες, που αφορούν κυρίως τη λειτουργία του εξωπυραμιδικού συστήματος, και ο ασθενής μπορεί να εμφανίσει συμπτώματα όμοια με αυτά της νόσου του Parkinson, όπως ακαμψία, δυσκολία στην αρχή των κινήσεων και τρόμο. Επίσης μπορεί να εμφανίσουν δυστονίες, να προκαλέσουν μία ενοχλητική διαταραχή ανησυχίας την ακαθησία, η να προκαλέσουν μακροχρόνιες και ορισμένες φορές μόνιμες βλάβες, όπως όψιμη δυσκινησία στην οποία παρατηρούνται ακούσιες κινήσεις των μυών του προσώπου, της γλώσσας, του διαφράγματος και μερικές φορές των άκρων. Από τους ασθενείς που παίρνουν νευροληπτικά για μεγάλο χρονικό το 45% θα παρουσιάσει ακαθησία, ενώ το 25% θα παρουσιάσει όψιμη δυσκινησία.

Τα νευροληπτικά δρουν επίσης στον υποθάλαμο και είναι πιθανό να προκαλέσουν γαλακτόρροια λόγω υπερέκκρισης προλακτίνης. Τα συνήθη

νευροληπτικά είναι η αλλοπεριδόλη, η θειοθιζίνη, η σουλπριδία, η φλουφενανζίνη, η μολυνδόνη και η θειοριδαζίνη. Ένα πιο ειδικό αντιψυχωτικό χωρίς κινητικές παρενέργειες αφού δεν έχει δράση στο εξωπυραμιδικό είναι η κλοζαπίνη.

Παθογένεια. Η αιτία της σχιζοφρένειας παραμένει βασικά άγνωστη. Αρκετές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν τη παθογένεια της νόσου τα τελευταία χρόνια. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η νόσος είναι πολυπαραγοντική, και στην εκδήλωση της συμβάλλει η αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων, βιολογικών, ψυχολογικών και κοινωνικών.

Η επικρατέστερη θεωρία για τη παθογένεια από άποψη νευροδιαβιβαστικών συστημάτων είναι η υπόθεση της ντοπαμίνης, κατά την οποία η σχιζοφρένεια προκαλείται από την αύξηση της νευροδιαβίβασης της ντοπαμίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι η χορήγηση αμφεταμίνης σε φυσιολογικά άτομα προκαλεί ψυχωτική διαταραχή αρκετά όμοια με τη σχιζοφρένεια, και πως η χορήγηση μικρών ποσοτήτων της ίδιας ουσίας μπορεί να ενεργοποιήσει τα ψυχωτικά συμπτώματα στους ήδη ψυχωτικούς ασθενείς. Η αμφεταμίνη δρα παρεμποδίζοντας την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης από τους προσυναπτικούς νευρώνες με αποτέλεσμα να αυξάνει τη διάρκεια της δράσης της ντοπαμίνης. Μία παρατήρηση που ενισχύει την θεωρία αυτή είναι ότι τα αντιψυχωτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της σχιζοφρένειας είναι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ντοπαμίνης.

Μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με σχιζοφρένεια έδειξαν ότι οι διαταραχές της συμπεριφοράς που είχαν προέρθει από τη λήψη αγωνιστών της ντοπαμίνης αντιστράφησαν με τη λήψη ανταγωνιστών αυτής με ανάλογη κλινική αποτελεσματικότητα.

Σε μία άλλη μελέτη----- για την αποτελεσματική αντιψυχωτικής δράση του ανταγωνισμού της ντοπαμίνης, χορηγήθηκε σε ασθενείς με οξύ ψυχωτικό επεισόδιο φλουπενθιζόλη. Στους μισούς δόθηκε το Α ισομερές της ένωσης το οποίο είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων της ντοπαμίνης και στους άλλους μισούς χορηγήθηκε το Β ισομερές το οποίο δεν έχει καμία ανταγωνιστική δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι ασθενείς που πήραν το Α ισομερές παρουσίασαν βελτίωση της κλινικής τους εικόνας, ενώ οι άλλοι ασθενείς που πήραν το Β ισομερές δεν έδειξαν καμία μεταβολή.

Επίσης έρευνες που έγιναν με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων σε ασθενείς με σχιζοφρένεια έδειξαν αυξημένα επίπεδα των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στο

κεντρικό νευρικό σύστημα. Η μέθοδος όμως αυτή παρουσιάζει μειονεκτήματα ν' απεικονίσει τον πρόσθιο εγκέφαλο και το φλοιό, περιοχές οι οποίες κατά πάσα πιθανότητα ενέχονται στη νόσο.

Μελέτες που έγιναν σε νεκροτομικό υλικό έδειξαν αύξηση των υποδοχέων της ντοπαμίνης στο πρόσθιο εγκέφαλο ασθενών που έπασχαν από σχιζοφρένεια. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών ενισχύουν την υπόθεση της ντοπαμίνης.

Δεν υπάρχει όμως καμία μέθοδος που να πιστοποιεί αυτές της μεταβολές αυτές *in vivo*, και για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα αυτά αντιμετωπίζονται από αρκετούς ερευνητές με επιφυλακτικότητα.

Μελέτες ωστόσο των μεταβολιών της ντοπαμίνης σε σχιζοφρενείς δεν έχουν δείξει διαφορές σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, ο αποκλεισμός των ντοπαμινεργικών υποδοχέων φαίνεται να συμπίπτει με την αποτελεσματικότητα των αντιψυχωτικών φαρμάκων, δεν έχειδειχθεί όμως ότι αυτός είναι και ο μηχανισμός με τον οποίο βελτιώνεται η ψύχωση.

Μία άλλη ομάδα μελετών που έγιναν αφορά την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του D₃ υποδοχέα της ντοπαμίνης, ο οποίος ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην παθογένεση της σχιζοφρένειας. Μελέτες που έγιναν στο πολυμορφισμό του γονιδίου αυτού σε ομοζυγωτές ως προς το μεταλλαγμένο, έδειξαν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου.

Με βάση τ' αποτελέσματα άλλων ερευνών σχετικά με τη παθογένεια της νόσου, μερικοί ερευνητές πρότειναν ότι ο τρόπος επικοινωνίας μεταξύ των μελών της οικογένειας μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση της νόσου. Περιγράφουν λοιπόν παθολογικούς τρόπους επικοινωνίας όπως παράλογη, ασυνεπής, και διπλού δεσμού επικοινωνία. Άλλοι ερευνητές επίσης προτείνουν πως «ειδικές προσωπικότητες» (πχ σχιζοειδής) μπορεί να είναι πιο ευάλωτες στη νόσο.

Καμία όμως μέχρι τώρα υπόθεση δεν έχει καταφέρει να ερμηνεύσει με επιτυχία της παθογένεια της νόσου. Τελικά φαίνεται πως γενετικοί και βιολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου. Κατά πάσα πιθανότητα βιολογικοί και γενετικοί παράγοντες κάνουν το άτομο «ευάλωτο» για την εμφάνιση της νόσου, αλλά οι περιβαλλοντογικοί παράγοντες συμβάλλουν τελικά στην εκδήλωση της.

Η λειτουργία της ντοπαμίνης. Η ακριβής λειτουργία της ντοπαμίνης δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι συμμετέχει στις γνωστικές λειτουργίες και πολλοί υποστηρίζουν ότι η ανθρώπινη νοημοσύνη οφείλεται στην

επέκταση του ντοπαμινεργικού συστήματος και ρυθμίζει το σχεδιασμό της κίνησης, τη λειτουργική μνήμη, τη γνωστική ευελιξία, τον αφηρημένο συλλογισμό, τη χρονική ανάλυση καθώς και τη generativity. Πολλοί ερευνητές προτείνουν πως κατά την ανάπτυξη η ντοπαμίνη σε συνεργασία με άλλες ουσίες, συμβάλλει στη δημιουργία των πτυχώσεων και των αυλάκων του εγκεφάλου με αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας του, και της ποσότητας της φαιάς ουσίας.

Μία σημαντική ακόμα ένδειξη για το ρόλο της ντοπαμίνης στις γνωστικές λειτουργίες είναι η παρατήρηση ότι η ντοπαμίνη μαζί με την ακετυλοχολίνη επικρατούν στο αριστερό ημισφαίριο, το οποίο θεωρείται το αναλυτικό ημισφαίριο του εγκεφάλου.

Η συμβολή της ντοπαμίνης στις γνωστικές λειτουργίες φαίνεται και από τις πλούσιες ντοπαμινεργικές συνδέσεις του ραβδωτού σώματος με το μετωπιαίο λοβό. Η καταστροφή των συνδέσεων αυτών, μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητα του μετωπιαίου λοβού.

Τα ντοπαμινεργικά συστήματα του μετωπιαίου λοβού ενέχονται στο σχεδιασμό της κίνησης. Η λειτουργία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί σχετίζεται με τον προγραμματισμό των κινήσεων της ομιλίας, που είναι η πιο πολύπλοκη και πιο εξελιγμένη λειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου. Η λειτουργία αυτή υποβιβάζεται σε περιπτώσεις καταστροφής περιοχών του αριστερού ημισφαιρίου όπου επικρατεί η ντοπαμίνη, ενώ δεν παρατηρείται κατι ανάλογο σε αντίστοιχες περιπτώσεις σε βλάβης στο δεξί ημισφαίριο.

Η ντοπαμίνη φαίνεται να ενέχεται και στη λειτουργική μνήμη η οποία χρησιμοποιείται στη βραχύχρονη αποθήκευση και στο χειρισμό των νέων πληροφοριών. Η λειτουργία αυτή φαίνεται ότι εδρεύει στον πλούσιο από ντοπαμίνη κερκοφόρο πυρήνα, και εκπίπτει σε περιπτώσεις που επέρχεται μείωση της ντοπαμίνης σε αυτόν, όπως στη συμβαίνει στη νόσο του Parkinson. Η λειτουργική μνήμη παίζει καθοριστικό ρόλο και στην ομιλία στην οποία είναι απαραίτητος ένας τέτοιος μηχανισμός για τη διαρκή ανανέωση φράσεων και προτάσεων ώστε να γίνεται κατανοητός ο λόγος.

Στη γνωστική ευελιξία επίσης ο ρόλος της ντοπαμίνης φαίνεται να είναι πολύ σημαντικός. Σε περιπτώσεις υπολειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος ιδίως στο μεταιχμιακό σύστημα όπως συμβαίνει στη σχιζοφρένεια η λειτουργία αυτή περιορίζεται. Είναι επίσης πολύ σημαντική για τη πολύπλοκη λειτουργία του λόγου αφού η γλωσσική κατανόηση απαιτεί τη σταθερή ενημέρωση βασισμένη στην

προηγούμενη έκφραση, και η λεκτική παραγωγή απαιτεί μία συνεχή αλλαγή του σχεδιασμού των κινήσεων.

Η αφηρημένη αντιπροσώπευση είναι ένα εξελικτικό χάρισμα που ανήκει αποκλειστικά στον άνθρωπο. Έτσι είναι εφικτός ο συμβολισμός αφηρημένων εννοιών όπως ο χρόνος. Σε περιπτώσεις υπερδραστηριότητας του ντοπαμινεργικού συστήματος μπορεί να προκληθούν ψευδαισθήσεις όπως θρησκευτικές αυταπάτες που είναι πολύπλοκες αφηρημένες έννοιες.

Τέλος η εφευρετικότητα του ανθρώπινου εγκεφάλου, η οποία θεωρείται λειτουργία που οφείλεται στην δράση της ντοπαμίνης, είναι μία από τις πιο αξιόλογες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν την μεγάλη ευφυΐα του ανθρώπου. Χαρακτηριστικό αυτής της ιδιότητας είναι πως με τα λίγα σύμβολα του αλφάβητου ο ανθρώπινος εγκέφαλος μπορεί να δημιουργήσει άπειρες λέξεις και να δομεί το γλωσσικό του κώδικα.

Μια ξεχωριστή λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος είναι η θερμορύθμιση. Μελέτες που έγιναν έδειξαν πως σε αυξημένη δραστηριότητα του εγκεφάλου αυξήθηκε η παραγωγή της ντοπαμίνης η οποία με τη σειρά της μείωσε την υψηλή θερμοκρασία στον εγκέφαλο δρώντας έτσι προστατευτικά.

Μελέτες που έγιναν σε εγκεφάλους δελφινίων των οποίων η ευφυΐα σε σχέση με όλα τα άλλα έμβια όντα είναι η μεγαλύτερη μετά τον άνθρωπο, έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος. Επίσης αν και ο εγκέφαλος των δελφινίων κυτταροαρχιτεκτονικά διαφέρει πολύ σε σχέση με του ανθρώπου, το κοινό στοιχείο μεταξύ τους είναι το ανεπτυγμένο ντοπαμινεργικό σύστημα. Αυτή η έρευνα ενισχύει την υπόθεση πως η δράση της ντοπαμίνης αλλά και γενικότερα των νευροδιαβιβαστών είναι καθοριστική για τις γνωστικές λειτουργίες.

Ντοπαμινεργικό σύστημα. Το ντοπαμινεργικό σύστημα αποτελείται από νευρώνες οι οποίοι χρησιμοποιούν ως κύρια νευροδιαβιβαστική ουσία τη ντοπαμίνη. Αυτοί οι νευρώνες ξεκινούν από το στέλεχος και δίνουν ντοπαμινεργικούς νευρώνες στο ραβδωτό σύστημα, στα βασικά γάγγλια και στη μέλαινα ουσία, στους μεσοδιαφραγματικούς πυρήνες στον υποθάλαμο και στο μεταιχμιακό σύστημα. Επίσης ντοπαμινεργικοί νευρώνες βρίσκονται στο μετωπιαίο φλοιό. Ντοπαμινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται επίσης στο νωτιαίο μυελό και στον αμφιβληστροειδή. Η ντοπαμίνη στους νευρώνες βρίσκεται αποθηκευμένη σε κοκκία και απελευθερώνεται μετά την ενδοκυττάρια αύξηση ασβεστίου. Η ντοπαμίνη που εκκρίνεται από τους νευρώνες αυτούς δεσμεύεται από ειδικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς της ντοπαμίνης κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την αρνητική ή θετική επιλεκτικότητα

υποστρωματος που είναι η αδενυλική κυκλάση διακρίνονται στους D₁ και D₂ υποδοχείς. Με τη χρήση μεθόδων της μοριακής βιολογίας οι υποδοχείς αυτοί διακρίνονται σε υποκατηγορίες. Οι D₁ διακρίνονται σε D₁ και D₅, ενώ οι D₂ σε D₂, D₃ και D₄. Από αυτούς τους υποδοχείς φαίνεται πιθανό οι D₃ να ενέχονται περισσότερο στη παθογένεια της σχιζοφρένειας. Η κατανομή των D₃ υποδοχέων είναι περιορισμένη. Βρίσκονται κατά κύριο λόγο στις μταιχμιακές περιοχές του εγκεφάλου και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τα αντιψυχωτικά φάρμακα.

Από αυτούς οι D₂ ομοειδής συνδέονται αρνητικά με το AMP καθώς επίσης και με άλλα συστήματα μεταγωγής σημάτων όπως με ένα κανάλι καλίου και με το καταρράκτη της φωσφωνοσιτόλης.

Ο D₃ υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη 35 έως 37 kDa αποτελείται από 446 αμινοξέα και υφίσταται μεταμεταφραστική γλυκοσυλίωση. Αν και η δευτεροταγής δομή του δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστή, οι υδροφοβικές αναλύσεις δείχνουν ότι συγγενεύει με την οικογένεια των G πρωτεϊνών και είναι ετεροτριμερής, με 7 διαμεμβρανικές έλικες. Οι διαμεμβρανικές έλικες του D₃ υποδοχέα έχουν ακέραια δομή α – έλικας με εξαίρεση την τέταρτη στην οποία αναπτύσσεται ένας δεσμός μεταξύ της Cys (166) – Pro (167) δίνοντας μία κάμψη στην α – έλικα, αυτή η απόκλιση που δημιουργείται από την προλίνη φαίνεται να παίζει ρόλο στις αλλαγές της διαμόρφωσης όταν αυτός συνδέεται με τον αγωνιστή. Κι άλλες αποκλίσεις φαίνεται να έχουν λειτουργικό σκοπό, όπως η Cys (103) και Cys (181) δίνοντας ένα εξωκυτταρικό δεσμό δισουλφιδίου.

Πρόσφατες μελέτες προσδιορισμό του mRNA η με χρήση ραδιενεργών αγωνιστών των υποδοχέων έδειξαν την ύπαρξη ντοπαμινεργικών υποδοχέων εκτός του κεντρικού νευρικού συστήματος, στα λευκά αιμοσφαίρια. Από τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς οι D₁ και D₂, υποδοχείς εκφράζονται σε μεγάλο ποσοστό στα λευκα αιμοσφαίρια σε μικρότερο οι D₃ και D₅ και λιγότερο από όλους οι D₄.

Ο ρόλος των υποδοχέων της ντοπαμίνης στα λεμφοκύτταρα δεν είναι γνωστός. Προτείνεται ότι αλληλεπιδρούν με το νευρικό σύστημα και ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση, αφού παρατηρήθηκε ότι φάρμακα αγωνιστές της ντοπαμίνης μειώνουν την ανοσολογική απάντηση η ακόμα και την αποτρέπουν σε μερικές περιπτώσεις.

Επίσης άλλες μελέτες έδειξαν ότι άλλοι αγωνιστές της ντοπαμίνης προκαλούν ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και άλλοι την καταστέλλουν. Πρότειναν ότι οι υποδοχείς της ντοπαμίνης παίζουν ρυθμιστικό ρόλο, ανάλογα με το ποιοί υποδοχείς

ενεργοποιούνται, αφού χρησιμοποίησαν διαφορετικούς αγωνιστές υποδοχέων ντοπαμίνης με διαφορετική συγγένεια για το κάθε είδος υποδοχέα.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει ώστε να αποδείξουν αν μπορεί να υπάρξει ποσοτική σχέση ανάμεσα στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς του κεντρικού νευρικού συστήματος και των λευκών αιμοσφαιρίων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιφερικοί δέκτες για τη διάγνωση των νόσων οι οποίες σχετίζονται με το ντοπαμινεργικό σύστημα.

Συγκρίσεις που έγιναν από νεκροτομικό υλικό εγκεφάλου σχιζοφρενών ασθενών και των υποδοχέων περιφερικά έδειξαν να υπάρχει ποσοτική σχέση μεταξύ τους. Επίσης άλλες μελέτες που έγιναν σε αρουραίους στο στάδιο της ανάπτυξης έδειξαν να υπάρχει ποσοτική σχέση ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης για τους D₂ υποδοχείς αλλά όχι για τους D₁.

Μια άλλη πολύ ενδιαφέρουσα έρευνα σε ασθενείς με Parkinson έδειξε μείωση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα λευκά αιμοσφαίρια.

Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ασθενών με σχιζοφρένεια εκ των οποίων η πρώτη αποτελούταν από ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν αντιψυχωτικά φάρμακα, και η δεύτερη από ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν πάρει ποτέ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των υποδοχέων της ντοπαμίνης στα λευκά αιμοσφαίρια μεταξύ των δύο ομάδων. Η δεύτερη ομάδα έδειξε αρχικά μία μικρή άνοδο στα επίπεδα των υποδοχέων της ντοπαμίνης, στην οποία όμως τα επίπεδα αυτά έπεσαν σε γρήγορο χρονικό διάστημα. Οι περισσότερες τέτοιες μελέτες έδωσαν θετικά αποτελέσματα, και η λήψη φαρμάκων δεν έδειξε να επηρεάζει τα επίπεδα των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα λευκά αιμοσφαίρια.

Η πραγματική εύρεση τέτοιων περιφερικών δεικτών για νοσήματα που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι πολύ ενδιαφέρουσα, λόγω της τεράστιας δυσκολίας μελέτης του νευρικού ιστού, αφού δεν επιτρέπει τη λήψη βιολογικού υλικού. Κάτι τέτοιο θα ήταν ασύμβατο με τη νοητική ή κινητική λειτουργική ακεραιότητα του ατόμου απ' το οποίο θα συλλεγόταν το δείγμα. Κατά συνέπεια δεν μπορούν να γίνουν μελέτες με νευρικό ιστό παρά μόνο σε νεκροτομικό υλικό. Λόγω αυτού η διάγνωση των νόσων του νευρικού συστήματος είναι δύσκολη και μπορεί να γίνει μόνο έμμεσα.

Τα αισιόδοξα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών παρεκίνησαν τη διεξαγωγή μίας τέτοιας έρευνας σε ασθενείς με σχιζοφρένεια με τη μέθοδο της PCR και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με αποτελέσματα από δείγματα ασθενών, ώστε να πιστοποιηθεί

αν πράγματι ασθενείς με σχιζοφρένεια παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ντοπαμίνης στα λευκά αιμοσφαίρια όπως θα αναμενόταν σε τέτοιους ασθενείς αν πραγματικά τα επίπεδα των ντοπαμινεργικών υποδοχέων είναι ανάλογα αυξημένα με αυτά του κεντρικού νευρικού συστήματος.

ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΣΧΕΔΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.

Αίμα ελήφθει από 8 ασθενείς που παρακολουθούνται στα Ε.Ι. της Πανεπιστημιακής ψυχιατρικής κλινικής του νοσοκομείου και 11 άτομα χωρίς ιστορικό ψυχιατρικής ή άλλης νόσου και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Οι ηλικίες το φύλο καθώς η διάγνωση και θεραπεία φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Κωδ	Φύλο	Ηλικία	διάγνωση
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (ΥΓΙΕΙΣ)			
Control 1	Female	29 χρ	-
Control 2	Female	27 χρ	-
Control 3	Female	41 χρ	-
Control 4	Female	35 χρ	-
Control 5	Male	27 χρ	-
Control 6	Male	35 χρ	-
Control 7	Male	48 χρ	-
Control 8	Male	46 χρ	-
Control 9	Male	43 χρ	-
Control 10	Male	36 χρ	-
Control 11	Male	40 χρ	-
Mean		37 ⁺ .2,20	
ΑΣΘΕΝΕΙΣ			
PTS 1	Male	35 χρ	Κατάθλιψη με ψυχωτικά στοιχεία
PTS 2	Male	32 χρ	Χρόνια ψύχωση
PTS 3	Male	49 χρ	Χρόνια ψύχωση (ακλοολισμός)
PTS 4	Male	57 χρ	Χρόνια ψύχωση
PTS 5	Female	31 χρ	Χρόνια ψύχωση
PTS 6* Δεν έδειξε	Male	24 χρ	Μανιακό επεισόδιο
PTS 7	Male	51 χρ	Χρόνια ψύχωση
PTS 8	Male	44 χρ	Χρόνια ψύχωση
Mean		40,37 ⁺ .4,07	

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αιμοληψία.

Η λήψη του αίματος έγινε από την βραχιόνια φλέβα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες σύριγγες των 20 ml, αφού αυτές νωρίτερα είχαν εμβραχεί με ηπαρίνη 5000 μονάδων, προκειμένου να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και η δημιουργία θρόμβων. Επίσης τα άλατα της ηπαρίνης (Na, NH₄,Li) δεν επηρεάζουν τα συστατικά του αίματος. Το δείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα (Falcon 50 ml) με ηπαρίνη και ακολουθεί η απομόνωση των λεμφοκυττάρων όπως περιγράφεται παρακάτω μέσα σε διάστημα μικρότερο της μίας ώρας.

2. Απομόνωση λεμφοκυττάρων

Στο στάδιο αυτό γίνεται απομόνωση των λεμφοκυττάρων, με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας σε συνδυασμό με διαφορική φυγοκέντρηση, σε παρασκευαστική φυγόκεντρο χαμηλής ταχύτητας Eppendorf Centrifuge 54178. Στην φυγοκέντρηση αυτή χρησιμοποιείται για την δημιουργία της διαφοράς της πυκνότητας διάλυμα φυκόλης της Lymphoprep το οποίο περιέχει polysaccharide και Sodium diatrizoate. Μετά την απομόνωση των λεμφοκυττάρων ακολουθεί πλύσιμο τους με διάλυμα PBS που περιέχει άλατα φωσφορικού νατρίου με Ph 7,4 που του προσδίδει ρυθμιστικές ιδιότητες και χλωριούχο νάτριο σε συγκέντρωση 0,9% ώστε να είναι ισοτονικό, και να παρέχει προστασία στα λευκά αιμοσφαίρια τόσο από πιθανή μεταβολή του Ph, όσο και από λύση της μεμβράνης.

Αναλυτικά η απομόνωση των λεμφοκυττάρων έγινε με την εξής διαδικασία.

- 1) Σε κάθε δείγμα αίματος των 20 ml προστίθεται ίση ποσότητα ισοτονικού διαλύματος NaCl 0,9% και ακολουθεί ανάδευση.
- 2) Σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon (50 ml), τοποθετούνται (30 ml) διαλύματος Lymphoprep, στη συνέχεια με πιπέτα Pasteur και με προσοχή, τοποθετούντε από πάνω 20 ml αίματος, ώστε να μην ανακατευτεί με το Lymphoprep.
- 3) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 1800 στροφές, και η φυγόκεντρος αφήνεται να σταματήσει ελεύθερα, χωρίς φρένο για να μη αναταραχτεί ο σωλήνας και χαθεί η στοιβάδα των λεμφοκυττάρων.

- 4) Με πιπέττα Pasteur αφαιρείται προσεκτικά η στοιβάδα των λεμφοκυττάρων, που σχηματίζεται μεταξύ του Lymphorger και του πλάσματος.
- 5) Ακολουθεί πλύσιμο των λεμφοκυττάρων και το διάλυμα φυγοκεντρείται, για 10 λεπτά στις 2200 στροφές, χωρίς τη χρήση φρένου.
- 6) Αφαιρείται το ίζημα και στο υπερκείμενο προστίθεται διάλυμα PBS. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 2200 στροφές.
- 7) Τα στάδια 5 κι 6 επαναλαμβάνονται ακόμα δύο φορές.

3. Απομόνωση ολικού RNA.

Για την απομόνωση του RNA, χρησιμοποιήθηκε το Rneasy kit της Qiagen σύμφωνα πάντα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή, με ειδικά αποστειρωμένα υλικά και με τη χρήση γαντιών για προστασία, λόγω του υψηλού κινδύνου της διάσπασης του RNA από τυχόν Rνάσες.

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τις ιδιότητες της επιλεκτικής δέσμευσης μιας silica-gel στήλης (διοξείδιο του πυριτίου) η οποία δεσμεύει το RNA, και της ταχύτητας της τεχνολογίας της μικροφυγοκέντρισης που με τη διαδοχική διαβίβαση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, με το συνδυασμό αυτό επιτυγχάνεται λύση των κυτταρικών μεμβρανών, μετουσίωση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Με τη δημιουργία κατάλληλων συνθηκών στη στήλη επιτυγχάνεται η δέσμευση του ολικού RNA, και γίνεται το πλύσιμο από όλα τα άλλα μόρια. Τέλος γίνεται εκχύλιση του καθαρού RNA από τη στήλη.

Με τη μέθοδο αυτή απομονώνονται μόρια RNA μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων. Παίρνουμε κυρίως μόρια mRNA εφόσον τα περισσότερα μόρια RNA που είναι μικρότερα των 200 νουκλεοτιδίων (όπως το 5,8S rRNA, το 5S rRNA και το tRNA που όλα αυτά μαζί αποτελούν το 15-20% του ολικού RNA) απομακρύνονται.

Αναλυτικότερα τα ακριβή στάδια της διαδικασίας είναι :

- 1) τα δείγματα ξεπαγώνουν (από τους -80°C που φυλάσσονται)φυγοκεντρούνται με μικροφυγόκεντρο Eppendorf Centrifuge 5810 R για 5 λεπτά σε 1.700 rpm, κι αφαιρείται με σύριγγα το υπερκείμενο διάλυμα.
- 2) Στη συνέχεια το ίζημα ομογενοποιείται με σύριγγα διαμέτρου 0,0 mm ομογενοποίηση του ιζήματος και προστίθοντε 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος RTL, το οποίο περιέχει θειοκυανικό γουανιδίνιο που μαζί με την

ομογενοποίηση, πετυχαίνει τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών, την αναστολή Rnaσών, τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, και το κόψιμο του μεγαλομοριακού DNA.

- 3) Στη συνέχεια προστίθενται 600 μl αιθανόλης 70% και το μίγμα αναδεύεται με πιπέτα. Η αιθανόλη δημιουργεί της κατάλληλες συνθήκες δέσμησης της στήλης.
- 4) Λαμβάνονται 600 μl του ομογενοποιητήματος και μεταφέρονται σε RNA-easy mini column (στήλη που περιέχεται στο kit για τη δέσμηση του RNA) η οποία τοποθετείται μέσα σε Eppendorf (1,5ml) το οποίο χρησιμοποιείται ως αποχέτευση).
- 5) Το σύστημα διάλυμα - στήλη - eppendorf, φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε μεγαλύτερο των 10.000 rpm, έτσι ώστε το διάλυμα να διαβιβαστεί μέσω της στήλης. Αποχύνεται από το Eppendorf το υγρό που συλλέχθηκε.
- 6) Μεταφέρεται το υπόλοιπο ομογενοποίημα στην στήλη και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία φυγοκέντρισης όπως περιγράφονται στα στάδια 4 και 5.
- 7) Στη στήλη προστίθενται 700 μl RW1 wash buffer και φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε μεγαλύτερο των 10.000 rpm. Το RW1 περιέχει αιθανόλη και χρησιμοποιείται σα διάλυμα πλύσης.
- 8) Η αποχέτευση αλλάζει και προστίθενται στη στήλη 500 μl RPE wash buffer. διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε μεγαλύτερο των 10.000 rpm. Το διάλυμα RPE χρησιμοποιείται σαν διάλυμα πλύσης και έχει αραιωθεί προηγουμένος με αιθανόλη.
- 9) Προστίθενται 500 μl RPE wash buffer και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε μεγαλύτερο των 10.000 rpm.
- 10) Η αποχέτευση αλλάζει και φυγοκεντρείται η στήλη για 1 λεπτό σε μεγαλύτερο των 10.000 rpm. Η φυγοκέντριση αυτή γίνεται για τη ξήρανση της στήλης από τα προηγούμενα διαλύματα και τη μεγιστοποίηση της απόδοσης στο επόμενο στάδιο.
- 11) Η στήλη μεταφέρεται σε αποχέτευση Eppendorf του 1,5 ml. Στη συνέχεια προστίθενται 30 μl απεσταγμένου ύδατος (dH₂O) και η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε περισσότερο των 10.000 rpm. Το νερό στο στάδιο αυτό εκχυλίζει το RNA από τη στήλη, και συλλέγεται στο Eppendorf

4. Ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού RNA.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA γίνεται για να επιλεγεί ο κατάλληλος όγκος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο της RT-PCR.

Η εύρεση της συγκέντρωσης του RNA έγινε με τη φωτομέτρηση 5 μ l δείγματος, αραιωμένο σε 1 ml H₂O και σε κυβέττα με πλάτος 1 cm, στα 260 και στα 280 nm, η ποσότητα του RNA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση $OD_{260(1)}=1=40\mu\text{g/ml}$, εφαρμόζοντας την αναλογική μέθοδο, αφού είναι γνωστό ότι οπτική πυκνότητα διαλύματος RNA, σε μήκος διαδρομής της φωτεινής δέσμης μέσα στο διάλυμα 1 cm, όταν είναι 1 ισούται με 40 $\mu\text{g/ml}$.

Με το λόγο της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm μπορούμε να ελέγξουμε την καθαρότητα του RNA, αφού καθαρά δείγματα RNA έχουν τιμή $OD_{260}/OD_{280} = 2$. Αν υπάρχει πρωτεϊνική επιμόλυνση τότε αυτός ο λόγος θα είναι σημαντικά μικρότερος, και δε θα μπορεί να γίνει ακριβής ποσοτικοποίηση.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στα επόμενα στάδια 5A αντιγραφή του total RNA σε cDNA και 5B αντιγραφή του τμήματος του RNA σε DNA για τους D₃ υποδοχείς ντοπαμίνης και 5Γ RNA για τη β -ακτίνη που περιγράφεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η RT-PCR. Οι γενικές αρχές της μεθόδου έχουν ως εξής:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction), είναι μία μέθοδος η οποία εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής των νουκλεϊνικών οξέων, με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη δράση των ειδικών ενζύμων DNA Tag polymerase η reverse transcriptase, τα οποία επιλέγουμε ανάλογα με το είδος της PCR που θέλουμε αντιγραφή RNA σε DNA (RT-PCR), είτε DNA σε DNA (PCR). Το κλειδί για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι τα ένζυμα. τα ένζυμα αυτά οποία λαμβάνονται από μικροοργανισμούς που έχουν ιδιαιτερότητες, όπως τη δυνατότητα διαβίωσης (ορισμένων από αυτούς) σε θερμό περιβάλλον, με αποτέλεσμα να έχουν ιδιαίτερα θερμοανθεκτικές πολυμεράσες. Για την RT-PCR η ιδέα προέρχεται από τους ρετροϊούς, οι οποίοι έχουν γενετικό υλικό RNA και πολλαπλασιάζονται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου DNA, χρησιμοποιώντας ένα

εξαιρετικά ιδιόμορφο ένζυμο την αντίστροφη μεταγραφάση που είναι μία RNA – κατευθυνόμενη – DNA – πολυμεράση.

Κατά την PCR αυτή αναμιγνύονται όλα τα απαραίτητα συστατικά που χρειάζονται για την αντιγραφή κι επιλέγονται οι κατάλληλες θερμοκρασίες. Η αντιγραφή των νουκλεϊνικών οξέων η οποία γίνεται *in vitro*, μέσα σε ειδικούς αποστειρωμένους σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε, καθώς και τα απαραίτητα συστατικά, το δείγμα τοποθετείται σε ειδική συσκευή PCR η οποία δημιουργεί της συνθήκες θερμοκρασίας στους χρόνους που χρειάζονται. Τα στάδια της PCR περιλαμβάνουν:

I) Αποδιάταξη. Η διαδικασία ξεκινάει με την πρώτη θέρμανση περίπου στους 95° C για 5 min και έχει σκοπό την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA ώστε να προκύψουν μονόκλινα μόρια τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για εκμαγεία.

II) Υβριδοποίηση. Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές που έχουμε χρησιμοποιήσει να υβριδιστούν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πάνω στα μόρια DNA. Η θερμοκρασία επιλέγεται ανάλογα με τη φύση του εκκινητή. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα DNA (~20 bp) τα οποία έχουμε επιλέξει να ταιριάζουν σε παρακείμενες αλληλουχίες των τμημάτων DNA και για τις δύο αλυσίδες. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα της ειδικής αντιγραφής των τμημάτων του DNA που θέλουμε. Δημιουργεί μικρές περιοχές δικλώνου DNA πάνω στις αλυσίδες DNA που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία των ειδικών ενζύμων πολυμερισμού. Στην RT-PCR σαν εκκινητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ολιγο-dT που υβριδοποιείται με την αλληλουχία πολυA στο 3' άκρο των περισσότερων ευκαριωτικών μορίων mRNA, η μπορεί να είναι ένας τυχαίος, όταν θέλουμε να δημιουργήσουμε cDNA βιβλιοθήκη. Μπορεί επίσης να είναι καθορισμένος για την αντιγραφή συγκεκριμένου mRNA.

III) Προέκταση. Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται ώστε να ενεργοποιηθεί το ένζυμο και να αρχίσει ο πολυμερισμός. Η θερμοκρασία που επιλέγεται εξαρτάται απ το ένζυμο και δίνεται από την κατασκευαστική εταιρεία. Βασική προϋπόθεση είναι να υπάρχουν τα δομικά συστατικά για το DNA όπως dATP, dTTP, dGTP, dCTP, καθώς και δισθενή ιόντα Mg⁺². Η ενέργεια που χρειάζεται το ένζυμο για τη σύνθεση παρέχεται απ' τα dNTP.

Στο τέλος η θερμοκρασία αυξάνεται στους 95° C ώστε να αποχωριστούν οι εκκινητές και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA και ολοκληρώνεται ένας πλήρης κύκλος. Η διαδικασία ξεκινάει από την αρχή και οι εκκινητές υβριδοποιούνται ξανά

και ξεκινάει ένας νέος κύκλος. Στον τελικό κύκλο δίνεται μεγαλύτερος χρόνος θερμοκρασίας προέκτασης στο ένζυμο ώστε να δοθεί χρόνος σε αυτό να ολοκληρώσει την προέκταση όλων των προϊόντων.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία που τις προσφέρουν οι ειδικοί εκκινητές, και η εκθετική αύξηση των κλώνων DNA, αφού κάθε κλώνος στο τέλος κάθε κύκλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν νέο εκμαγείο.

Όλη η διαδικασία γίνεται μέσα σε ρυθμιστικά διαλύματα που δρουν προστατευτικά διατηρώντας σταθερό pH, και μιμούνται τις συνθήκες του κυττάρου.

5A . Σύνθεση cDNA (RT-PCR).

Μετά τη ποσοτικοποίηση του ολικού RNA στα δείγματα που περιγράφονται στην ενότητα 4 της μεθόδου, γίνεται σύνθεση ολικού cDNA με τη μέθοδο RT-PCR. Το cDNA που λαμβάνεται εμπεριέχει και το cDNA της β-ακτίνης και του υποδοχέα D₃ ντοπαμίνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Για την σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε το 1st Strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (Roche). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PCR της Techne.

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 2 και οι θερμοκρασίες στον πίνακα 3 σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πίνακας 2: αντιδραστήρια και οι όγκοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 20 ml .

αντιδραστήρια	Όγκοι (V)
Total RNA 1 μg	Μεταβλητή *
Reaction Buffer	2 μl
MgCl ₂ 25 mM	4 μl
Deoxynucleotid mix	2 μl
OligoDT primer	2 μl
RNAse inhibitor	1 μl
AMV Reverse transcriptase	0,8 μl
dH ₂ O	Μεταβλητή **
Τελικός όγκος 20 μl	

Πιν.1 * Η ποσότητα του διαλύματος του ολικούRNA (total RNA) που χρησιμοποιείται υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης όπως περιγράφεται στην ενότητα 4

** Ο όγκος του dH₂O που προστίθεται δίνει στο διάλυμα τελικό όγκο 20 μl. Το αντιδραστήριο deoxynucleotid mix περιέχει τα ολιγονουκλεοτιδία (dNTP). Το RNase inhibitor περιέχει ένζυμο που αναστέλλει τυχόν RNAσες που μπορεί να υπάρξουν στο δείγμα (προστασία του δείγματος), το αντιδραστήριο AMV reverse transcriptase περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση, και αντιδραστήριο. Reaction Buffer είναι φυσιολογικό και ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει κατάλληλο και προστατευτικό περιβάλλον για τη διαδικασία της PCR με pH 8,3, Περιέχει επίσης και KCl το οποίο βοηθά στην υβριδοποίηση του ενζύμου.

Πίνακας 3: στάδια της μεθόδου σύνθεσης cDNA από ολικό RNA.

Χρόνοι	Θερμοκρασίες	Κύκλοι	Στάδια
10 min	25 °C		Υβριδοποίηση
60 min	42 °C		Προέκταση
5 min	99 °C		αποδιάταξη
4 min	5 °C		

Στο τέλος το cDNA μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία στους -20 °C.

5 Β Σύνθεση cDNA ακτίνης.

Έγινε με τη μέθοδο PCR

Για τις PCR χρησιμοποιήθηκε ειδικό kit της Qiagen. Το ένζυμο DNA Qiagen Tag polymerase που χρησιμοποιεί αυτή η εταιρία είναι μία ανασυνδιαζόμενη DNA πολυμεράση 94 kD, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Aquaticus thermus* και εκφράστηκε σε *E. Coli*. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει και δράση ενδονουκλεάσης με αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας λάθους στη διαδοχική τοποθέτηση νουκλεοτιδίων.

Με το ολικό cDNA μπορούμε πλέον να προχωρήσουμε στη σύνθεση του cDNA της β-ακτίνης. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) Σοι οποίοι ήταν ειδικοί και παραγγέλθηκαν από το ίδρυμα Κρήτης. Συγκεκριμένα τα ζεύγη οι αλληλουχίες των ζευγών εκκινητών για την β-ακτίνη είναι:

TGAAGTGTGACGTGGACATCCG (nucleotides 96 - 117, 22 bp)

GCTGTCACCTTCACCGTCCAG (nucleotides 543 - 522, 22 bp).

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη φύση των εκκινητών, αναγράφονται στον πίνακα 4 και οι θερμοκρασίες στις οποίες επιλέχθηκαν στον πίνακα 5.

Πίνακας 4: Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση β-ακτίνης από cDNA για τη μεταβολή στη γραμμικότητα χρησιμοποιήθηκαν τα 7 μl.

Αντιδραστήρια	Όγκοι (V)
cDNA	7 μl *
Buffer dNTPs Tag	12,5 μl
Sense – antisense (ενδιάμεσο για β-ακτίνη)	2 μl
dH ₂ O	3,5 μl *
Τελικός όγκος 25 μl	

Το Buffer dNTPs Tag είναι το φυσιολογικό και ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο λαμβάνει χώρα η PCR με pH 8,7 το οποίο προσφέρει προστασία στα αντιδραστήρια κι εξασφαλίζει σταθερό περιβάλλον, Περιέχει επίσης KCl και (NH₄)₂SO₄ τα οποία βοηθούν στη υβριδοποίηση των primers στην αλυσίδα εκμαγείο. Το MgCl₂ το οποίο εμπεριέχεται δίνει τα δισθενή ιόντα Mg⁺² που είναι απαραίτητα για το πολυμερισμό, το dNTPs που είναι τα βασικά δομικά μόρια και δίνουν κι ενέργεια στο ένζυμο. Το sense – antisense εμπεριέχει τα ζεύγη των primers.

Πίνακας 5 στάδια PCR για τη σύνθεση β-ακτίνης από cDNA. *επιλέχθησαν οι 23 κύκλοι για τη μεταβολή της γραμμικότητας.

Χρόνοι	Θερμοκρασίες	Κύκλοι	Στάδια
1 min	94 °C	-	Αρχική ενεργοποίηση
45 min	93 °C	23*	Υβριδοποίηση
30 min	60 °C		Προέκταση
1 min	72 °C		αποδιάταξη
5 min	72 °C	-	Τελικός πολυμερισμός

Στο τέλος του σταδίου αυτού τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

5Γ. Σύνθεση cDNA υποδοχέα D₃ ντοπαμίνης, PCR.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCR.

Το ολικό cDNA που το οποίο παρασκευάστηκε στην RT-PCR χρησιμοποιείται και για την σύνθεση του cDNA του υποδοχέα D₃ της ντοπαμίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικοί και παραγγέλθηκαν από το ίδρυμα ερευνών της Κρήτης, και χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit για PCR της Qiagen.

Τα ζεύγη των εκκινητών για τον υποδοχέα D₃ της ντοπαμίνης πιο αναλυτικά φαίνονται παρακάτω:

GGAGACGGAAAAGGATCCTCACTCG (nucleotides 655 – 680, 25 bp)

TCAGCAAGACAGGATCTTGAGGAAGG (nucleotides 1203 – 1177, 26 bp)

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 6, ενώ οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν στον πίνακα 7, σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες της εταιρίας κατασκευαστή και τη φύση των εκκινητών.

Πίνακας 6 *Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση υποδοχέα D₃ ντοπαμίνης από cDNA για τη μεταβολή στη γραμμικότητα χρησιμοποιήθηκαν τα 7 μl

Αντιδραστήρια	Όγκοι (V)
cDNA	7 μl *
Buffer dNTPs Tag	12,5 μl
Sense – antisense (ενδιάμεσο για υποδοχέα D ₃)	2 μl
dH ₂ O	3,5 μl
Τελικός όγκος 25 μl	

Πιν.5 Το Buffer dNTPs Tag είναι το φυσιολογικό και ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο λαμβάνει χώρα η PCR με pH 8,7 το οποίο προσφέρει προστασία στα αντιδραστήρια κι εξασφαλίζει σταθερό περιβάλλον, Περιέχει επίσης KCl και (NH₄)₂SO₄ τα οποία βοηθούν στη υβριδοποίηση των primers στην αλυσίδα εκμαγείου, το MgCl₂ το οποίο εμπεριέχεται δίνει τα δισθενή ιόντα Mg⁺² που είναι απαραίτητα για το πολυμερισμό, καθώς και dNTPs που είναι τα βασικά δομικά μόρια και δίνουν κι ενέργεια στο ένζυμο. Το sense – antisense εμπεριέχει τα ζεύγη των primers. Το dH₂O είναι κεκαθαρμένο και στείρο.

Πίνακας 7 Στάδια PCR για τη σύνθεση υποδοχέα D₃ ντοπαμίνης από cDNA για τη μεταβολή στη γραμμικότητα χρησιμοποιήθηκαν οι 46 κύκλοι.

Χρόνοι	Θερμοκρασίες	Κύκλοι	Στάδια
1 min	94 °C	-	Αρχική ενεργοποίηση
45 min	93 °C	46*	Υβριδοποίηση
30 min	60 °C		Προέκταση
45 min	72 °C		αποδιάταξη
5 min	72 °C	-	Τελικός πολυμερισμός

Στο τέλος του σταδίου αυτού τα δείγματα φυλάσσονται σε ψύξη στους -20 °C.

*Οι κύκλοι μεταβλήθηκαν κατά τα προκαταρκτικά πειράματα για τον καθορισμό γραμμικότητας της μεθόδου.

6. Ανάλυση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την β-ακτίνη και υποδοχέα D₃ ντοπαμίνης.

Ακολούθησε ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Στη διαδικασία αυτή παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης 0,8 w/v μέσα στην οποία είχαν διαλυθεί 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο είναι χρωστική που φθορίζει και επιτρέπει έτσι την ανίχνευση του DNA καθώς και την ποσοτικοποίηση εφόσον το DNA δεν απορροφά στο ορατό φάος και είναι αδύνατη η παρατήρηση του χωρίς τη χρήση ανιχνευτή. Το βρωμιούχο αιθίδιο βρίσκει θέσεις σύνδεσης μέσα στη διπλή έλικα, και οι θέσεις αυτές είναι ανάλογες με την ποσότητα του DNA, γι' αυτό το λόγο κι επιτρέπει την ποσοτικοποίηση. Το gel παρασκευάστηκε μέσα στην ειδική μήτρα της συσκευής, κι έτρεξε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTAE (Tris acetate EDTA) και σε συσκευή της Amersham pharmacia biotech, EPS 301. Ο όγκος του δείγματος που επιλέχθηκε για την ηλεκτροφορηση ήταν 10μl μέσα στα οποία είχαν διαλυθεί 2μl διαλύματος γλυκερόλης και χρωστικής, γιατί η γλυκερόλη δίνει βάρος στο διάλυμα και διευκολύνει τη φόρτωση ενώ η χρωστική χρησιμεύει ως οδηγός για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Δίπλα στα δείγματα σε κάθε γέλη, έτρεξε ως μάρτυρας DNA το οποίο είχε υποστεί τη δράση ενδονουκλεασών, με αποτέλεσμα να εμπεριέχει θραύσματα DNA με γνωστό MB, έτσι ώστε με βάση το μάρτυρα να μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση του cDNA των δειγμάτων από το μοριακό βάρος. Ο μάρτυρας ήταν ο GeneRuler™ DNA Ladder Mix, και η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε 5μl. Η επιλογή της πυκνότητας της πηκτής αγαρόζης έγινε με βάση το μέγεθος των μορίων DNA της β-ακτίνης και του D₃ υποδοχέα, ώστε το μέγεθος των πόρων του gel να είναι τέτοιο που να επιτρέπει την διέλευση των μορίων, αλλά και να περιορίζει την ταχύτητα σε βαθμό που να μπορούν να διαχωριστούν.

7) Ποσοτικοποίηση.

Η εμφάνιση του DNA έγινε σε τράπεζα υπεριώδη ακτινοβολίας (UV) και το gel φωτογραφήθηκε με μηχανή Polaroid MP4⁺ ειδική για φωτογραφήσεις ηλεκτροφόρησης γέλης.

Η ποσοτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα Scion image σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα διαγράμματα γραμμικότητας εκτίμήθηκαν με το πρόγραμμα Excel Office XP και γραμμικά θεωρήθηκαν τα διαγράμματα.

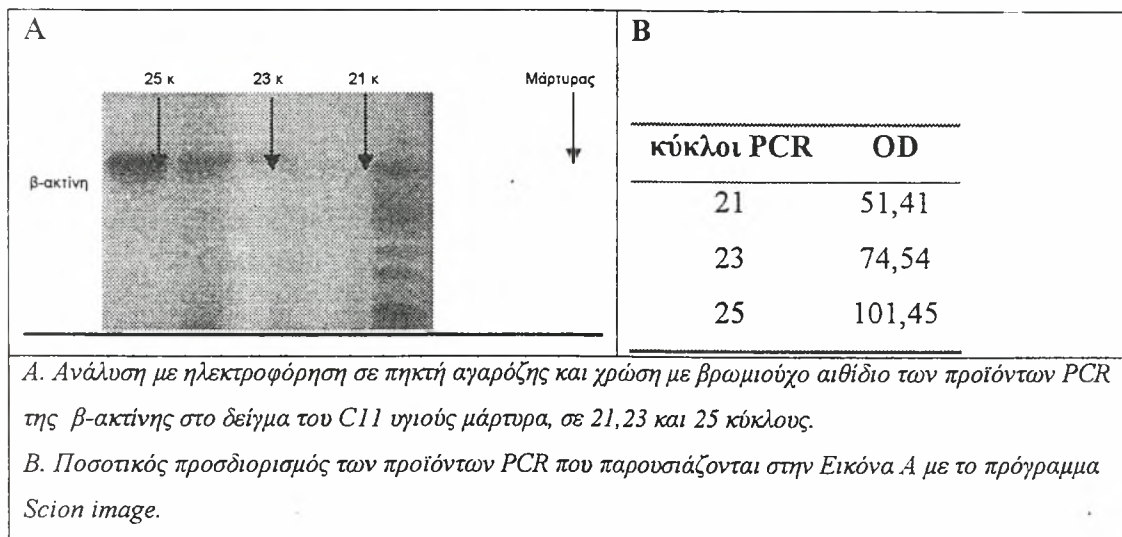
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS 8,0 και Anova. Στατιστικά σημαντικές θεωρούνται οι τιμές p μεγαλύτερο 0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

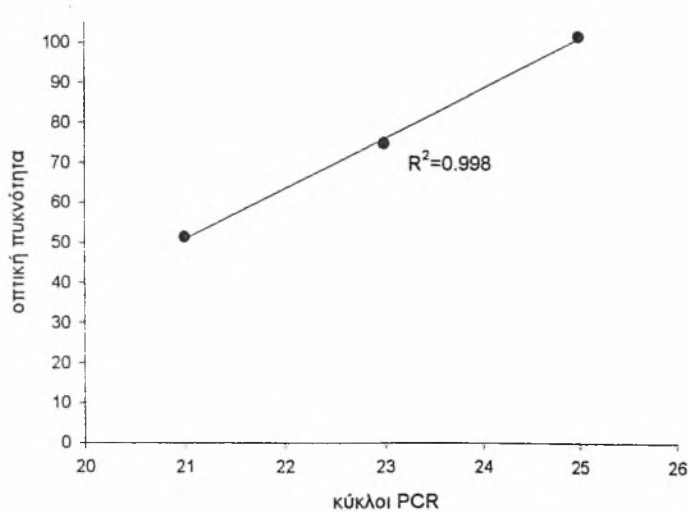
A. Προσδιορισμός συνθηκών αντίδρασης PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA της β-ακτίνης

1. Κύκλοι μεθόδου

Εικόνα 1

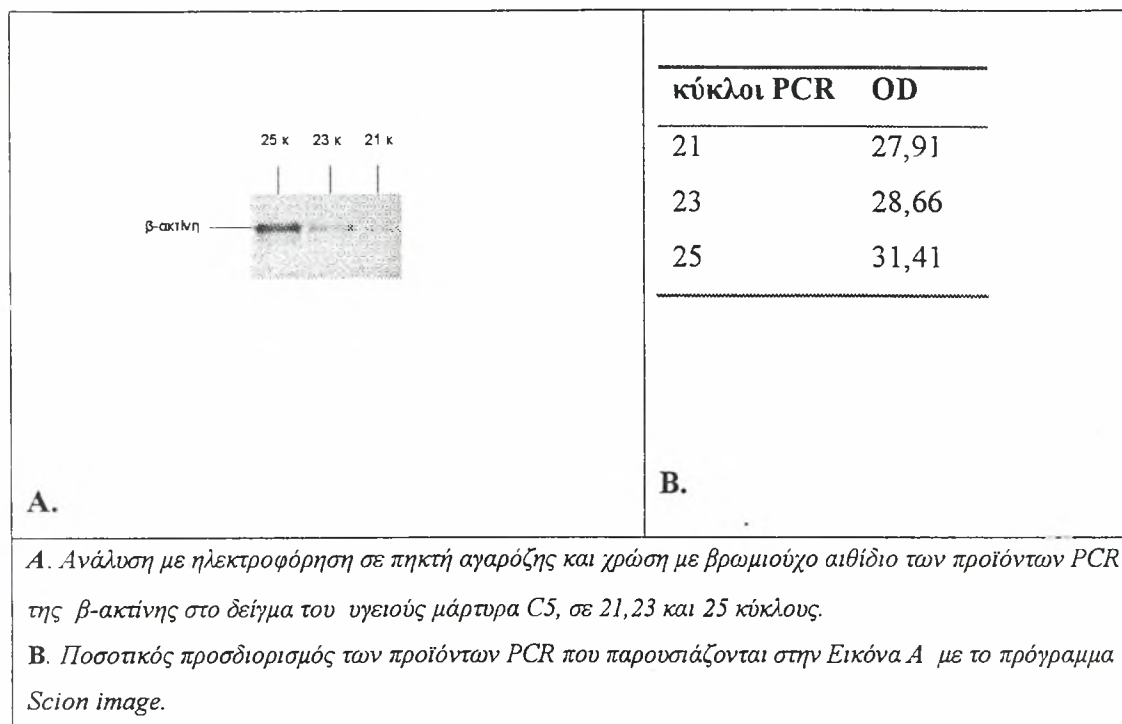


Διάγραμμα 1A.
Συσχέτιση οπτικής πυκνότητας - κύκλων αντίδρασης PCR
(Δείγμα C11)



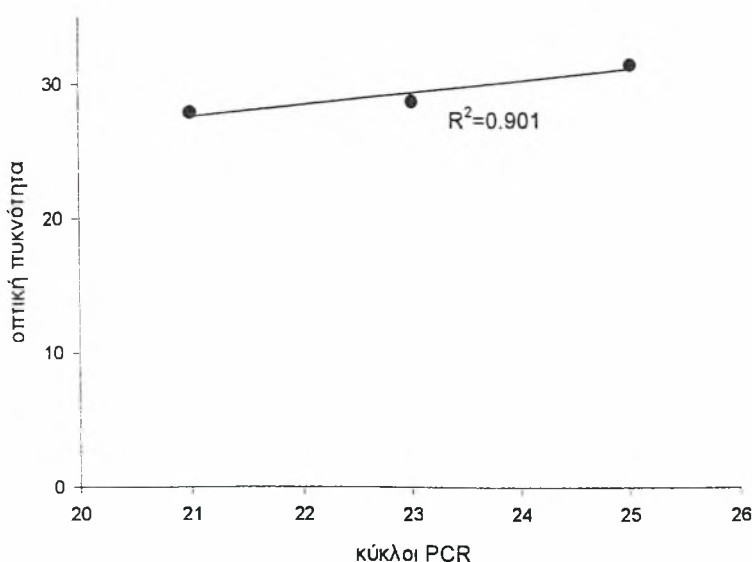
Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1A, η σχέση οπτικής πυκνότητας-κύκλοι ακτίνης για το m-RNA της β-ακτίνης στο δείγμα C11 είναι γραμμική με $R^2=0.998$.

Εικόνα 2



Διάγραμμα 1B.

Συσχέτιση οπτικής πυκνότητας - κύκλων αντίδρασης PCR (Δείγμα C5)

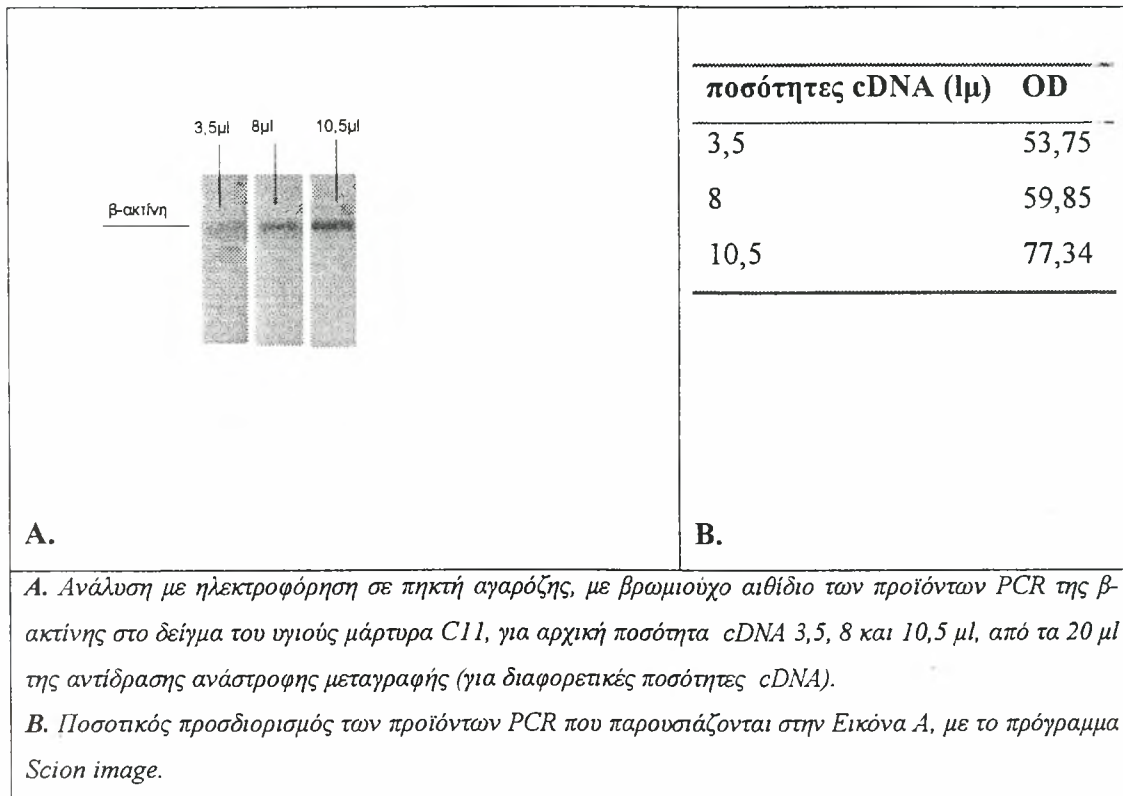


Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1B, η σχέση οπτικής πυκνότητας-κύκλοι ακτίνης για το m-RNA της β-ακτίνης στο δείγμα C5 είναι γραμμική με $R^2=0.901$.

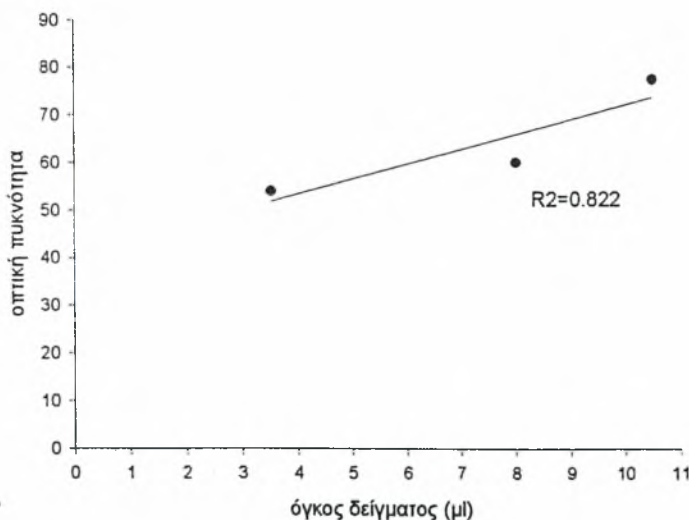
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά οι 23 κύκλοι της μεθόδου βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης και επιλέχθηκαν για τα περαιτέρω πειράματα προσδιορισμού του mRNA της β-ακτίνης.

2. Επιλογή του ποσού cDNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του mRNA της β-ακτίνης

Εικόνα 3

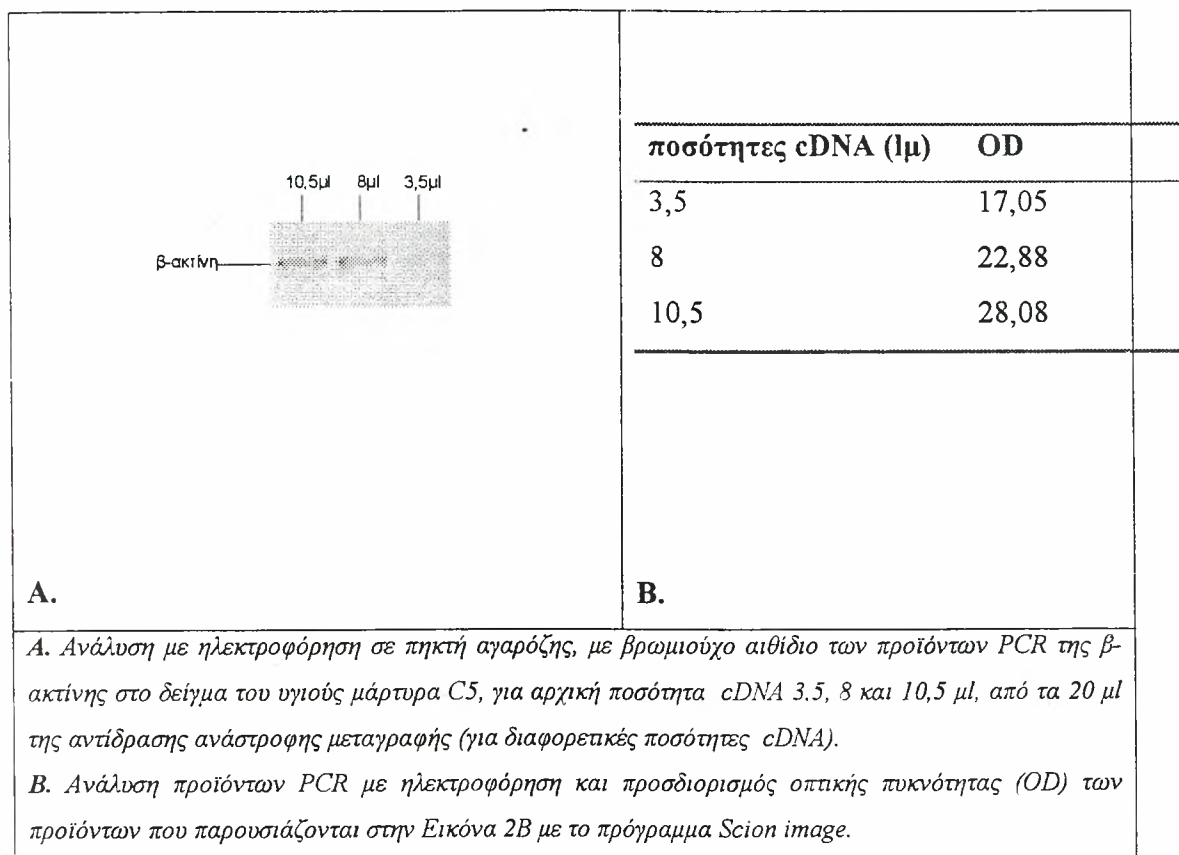


Διάγραμμα 2A.
Συσχέτιση όγκου δείγματος cDNA - οπτικής πυκνότητας (Δείγμα C11)



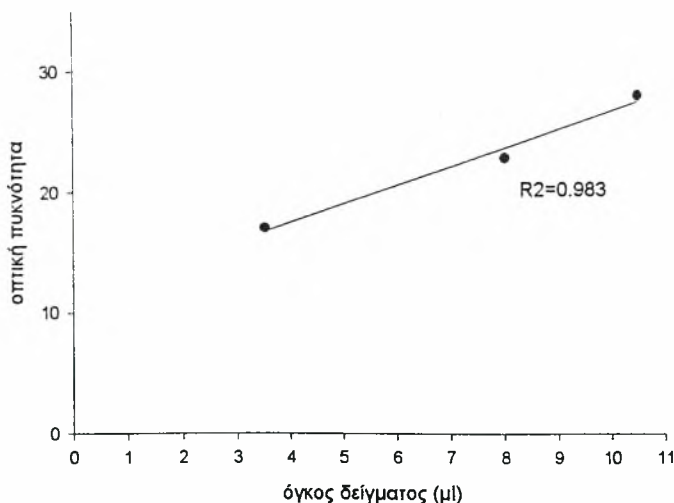
Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2A, η σχέση οπτικής πυκνότητας-ποσότητας cDNA για το m-RNA της β-ακτίνης στο δείγμα C11 είναι γραμμική με $R^2=0.822$.

Εικόνα 4



Διάγραμμα 2B.

Συσχέτιση όγκου δείγματος cDNA - οπτικής πυκνότητας (Δείγμα C5)



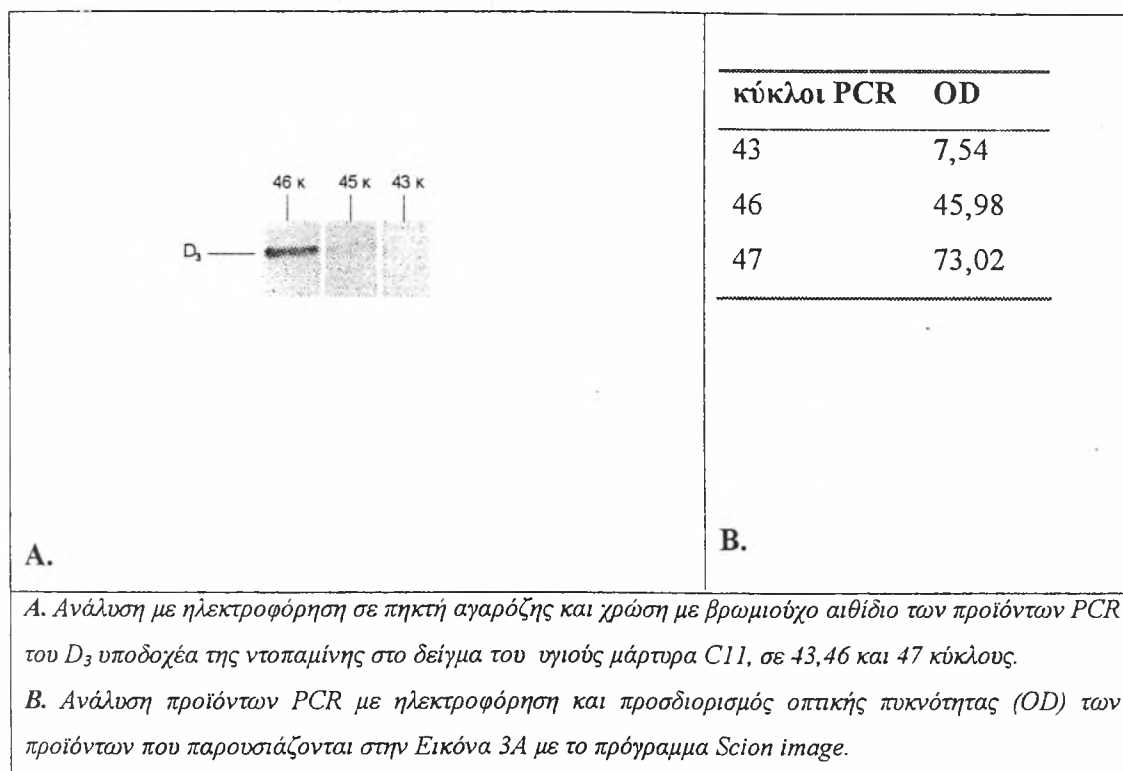
Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1B, η σχέση οπτικής πυκνότητας-κύκλοι ακτίνης για το m-RNA της β-ακτίνης στο δείγμα C5 είναι γραμμική με $R^2=0.983$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η ποσότητα 6.5 μl cDNA βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης και επιλέχθηκε για τα περαιτέρω πειράματα προσδιορισμού του mRNA της β-ακτίνης.

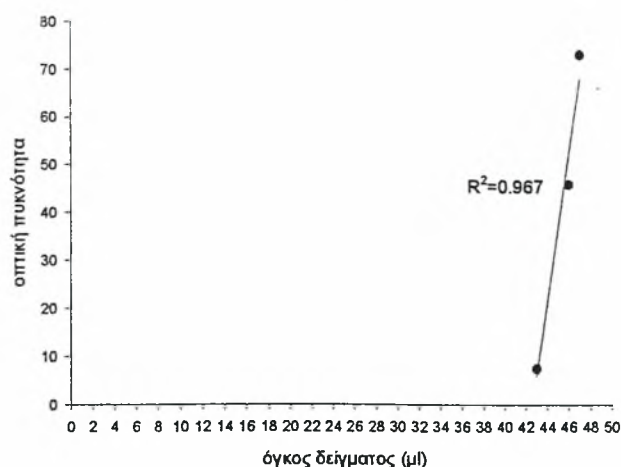
B. Προσδιορισμός συνθηκών μεθόδου PCR για τον προσδιορισμό του mRNA των D₃ υποδοχέων ντοπαμίνης

A. Κύκλοι μεθόδου

Εικόνα 5



Διάγραμμα 3A.
Συσχέτιση οπτικής πυκνότητας-κύκλων μεθόδου PCR (Δείγμα C11)

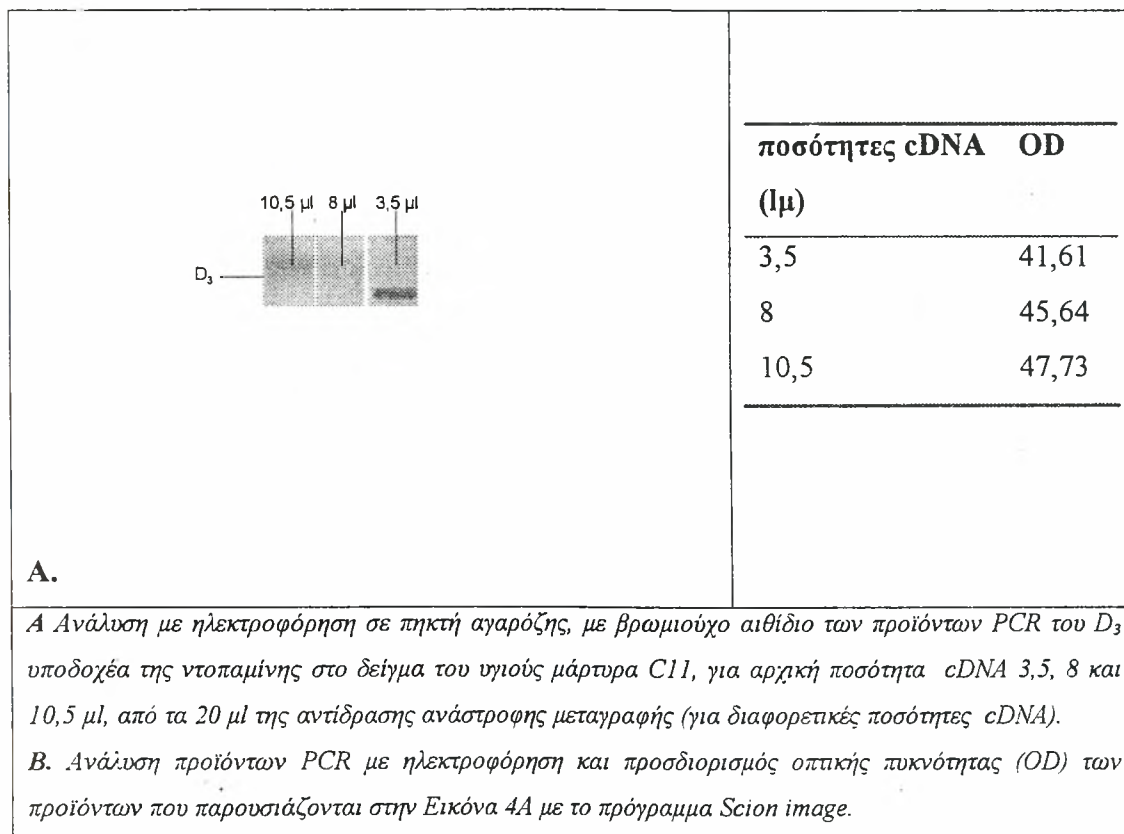


Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3A, η σχέση οπτικής πυκνότητας-κύκλοι για το mRNA των D3 υποδοχέων στο δείγμα C11 είναι γραμμική με $R^2=0.967$.

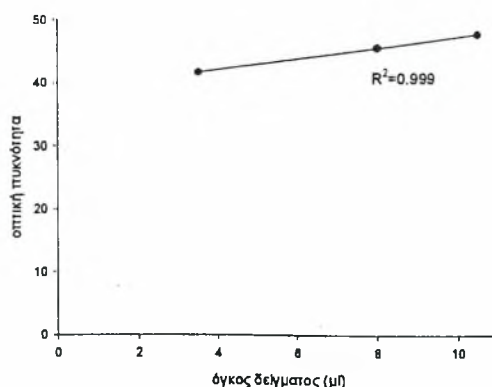
Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό οι 46 κύκλοι της μεθόδου βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης και επιλέχθηκαν για τα περαιτέρω πειράματα προσδιορισμού του mRNA των D₃ υποδοχέων.

2. Επιλογή ποσότητας δείγματος cDNA για τον προσδιορισμό του mRNA των υποδοχέων D₃ ντοπαμίνης

Εικόνα 6



Διάγραμμα 4A.
Συσχέτιση όγκου δείγματος cDNA - οπτικής πυκνότητας (Δείγμα C11)



Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4A, η σχέση οπτικής πυκνότητας-ποσότητας cDNA για το m-RNA των υποδοχέων στο δείγμα C11 είναι γραμμική με $R^2=0.999$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η ποσότητα 6.5 μl cDNA βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης και επιλέχθηκε για τα περαιτέρω πειράματα προσδιορισμού του mRNA των υποδοχέων ντοπαμίνης

1. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3) / β -ακτίνη σε δείγμα υγιών ατόμων

Πίνακας 1. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη σε δείγματα υγιών ατόμων, και στατιστική ανάλυση του μέσου όρου και του τυπικού σφάλματος αυτού, από τις μετρήσεις που έγιναν με δύο διαφορετικά προγράμματα προσδιορισμού οπτικής πυκνότητας (Quantity one, Scion image) από γέλη με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

QUANTITY ONE				SCION IMAGE		
Κωδικός	β -ακτίνη	D_3	D_3/β ακτίνη	β -ακτίνη	D_3	D_3/β ακτίνη
C1	235	135	0,574	178,57	138,98	0,778
C2	240	143	0,595	195,69	125,7	0,642
C3	255	162	0,635	211,12	160,5	0,760
C4	255	242	0,949	227,21	210,11	0,924
C5	251	141	0,561	204,79	150,14	0,733
C6	189	115	0,608	166,58	123,49	0,741
C7	172	116	0,674	171,94	80,95	0,470
C8	200	120	0,600	176,91	128,35	0,725
C9	204	137	0,671	174,57	123,41	0,706
C10	203	126	0,620	177,09	120,99	0,683
C11	-	-	-	27,97	21,97	0,785
Mean+SE			0,648±0,035	Mean+SE		0,722±0,033

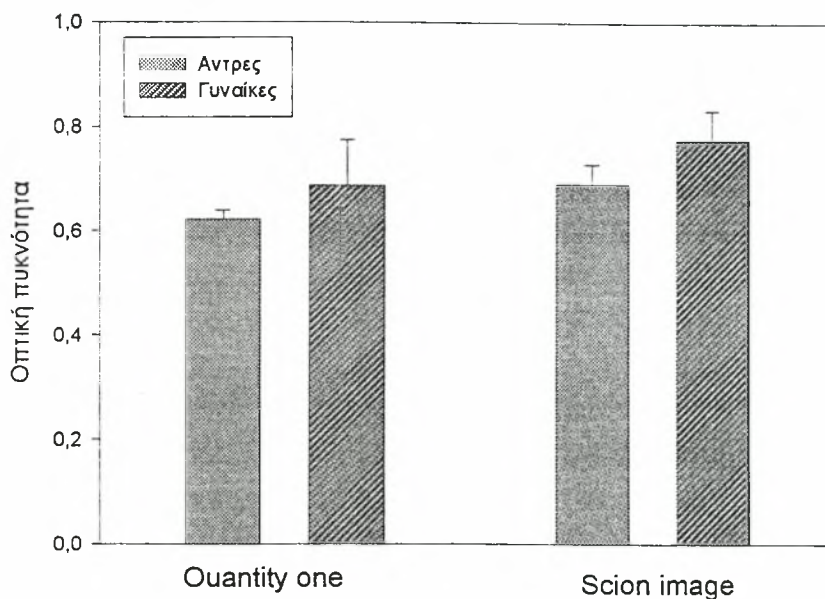
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 1, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D_3 / β ακτίνη με τους δύο τρόπους μέτρησης, με το πρόγραμμα Quantity one και το πρόγραμμα Scion image.

2. Σύγκριση του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, στα δύο φύλα σε υγιείς μάρτυρες.

Πίνακας 2. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, στα δύο φύλα.

QUANTITY ONE				SCION IMAGE		
Κωδικός	β -ακτίνη	D_3	β ακτίνη/ D_3	β -ακτίνη	D_3	β ακτίνη/ D_3
A. Γυναίκες						
C1	235	135	0,574	178,57	138,98	0,778
C2	240	143	0,595	195,69	125,7	0,642
C3	255	162	0,635	211,12	160,5	0,760
C4	255	242	0,949	227,21	210,11	0,924
Mean+SE			0,688±0,087	Mean+SE		0,776±0,057
B. Άνδρες						
C5	251	141	0,561	204,79	150,14	0,733
C6	189	115	0,608	166,58	123,49	0,741
C7	172	116	0,674	171,94	80,95	0,470
C8	200	120	0,600	176,91	128,35	0,725
C9	204	137	0,671	174,57	123,41	0,706
C10	203	126	0,620	177,09	120,99	0,683
C11	-	-	-	27,97	21,97	0,785
Mean+SE			0,6223±0,017	Mean+SE		0,691±0,038

Διάγραμμα 1. Ιστογράμματα μέσω των όρων του λόγου της οπτικής πυκνότητας (D_3)/β-ακτίνη, στα δύο φύλα.



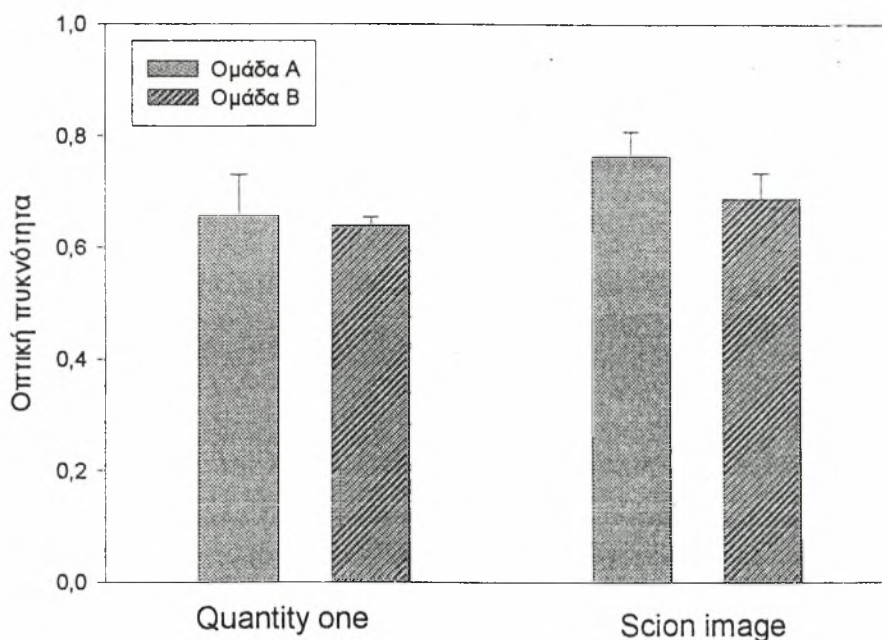
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2 και στο διάγραμμα 1, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους λόγους οπτικής πυκνότητας D_3 /β-ακτίνη ανάμεσα στα δύο φύλα σε υγιείς μάρτυρες και με τους δύο τρόπους μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (με το πρόγραμμα Quantity one και το πρόγραμμα Scion image).

3. Σύγκριση του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/β-ακτίνη, σε δύο ηλικίες μέχρι 36 ετών και πάνω από 36 ετών, σε δείγματα που ελήφθησαν από υγιή άτομα.

Πίνακας 3. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/β-ακτίνη στην ομάδα Α (< 35 ετών) και ομάδα Β (>35 ετών) υγιών ατόμων

Κωδικός	ηλικία	QUANTITY ONE			SCION IMAGE		
		β-ακτίνη	D_3	D_3 /β- ακτίνη	β-ακτίνη	D_3	β ακτίνη/ D_3
ΟΜΑΔΑ Α							
C1	29	235	135	0,574	178,57	138,98	0,778
C2	27	240	143	0,595	195,69	125,7	0,642
C4	35	255	242	0,949	227,21	210,11	0,924
C5	27	251	141	0,561	204,79	150,14	0,733
C6	35	189	115	0,608	166,58	123,49	0,741
Mean+SE				0,657±0,073	Mean+SE		0,763±0,045
ΟΜΑΔΑ Β							
C3	41	255	162	0,635	211,12	160,5	0,760
C7	48	172	116	0,674	171,94	80,95	0,470
C8	46	200	120	0,600	176,91	128,35	0,725
C9	43	204	137	0,671	174,57	123,41	0,706
C10	36	203	126	0,620	177,09	120,99	0,683
C11	40	-	-	-	27,97	21,97	0,785
Mean+SE				0,640±0,014	Mean+SE		0,688±0,046

Διάγραμμα 2. Ιστογράμματα μέσω των όρων του λόγου της οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, στην ομάδα Α (> 35 ετών) και ομάδα Β (>35 ετών) υγιών ατόμων. Στατιστικά δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στις δύο ηλικίες και με τους δύο τρόπους μέτρησης.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 3 και στο διάγραμμα 2, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους λόγους οπτικής πυκνότητας D_3 / β -ακτίνη ανάμεσα στην ομάδα Α (<35 ετών) και ομάδα Β (>35 ετών) υγιών ατόμων και με τους δύο τρόπους μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (με το πρόγραμμα Quantity one και το πρόγραμμα Scion image).

4. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη σε δείγματα ασθενών

Πίνακας 4. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη σε δείγματα ασθενών.

Κωδικός	QUANTITY ONE			SCION IMAGE		
	β -ακτίνη	D_3	D_3 / β -ακτίνη	β -ακτίνη	D_3	D_3 / β -ακτίνη
P1	255	255	1	216,38	223,34	1,032166
P2	255	255	1	208,66	217,23	1,041072
P3	243	139	0,572	180,36	143,3	0,794522
P4	255	254	0,996	197,55	205,28	1,039129
P5	236	200	0,847	184,37	177,06	0,960351
P6	-	-	-	-	-	-
P7	214	121	0,565	180,32	104,99	0,582243
P8	222	113	0,509	191,66	104,76	0,546593
Mean+SE			0,784±0,086	Mean+SE		0,856±0,082

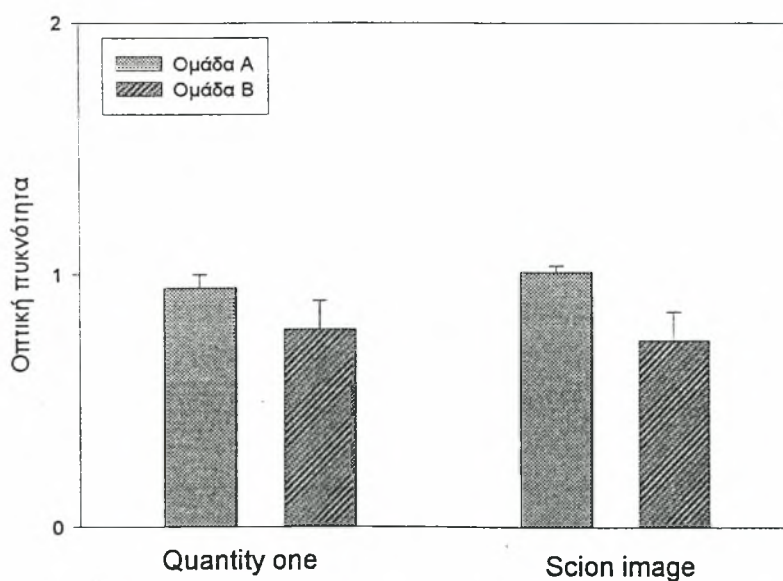
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 4 δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D_3/β -ακτίνη σε ασθενείς με σχιζοφρένεια και με τους δύο τρόπους μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (με το πρόγραμμα Quantity one και το πρόγραμμα Scion image).

5. Σύγκριση του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, σε δύο ηλικίες μέχρι 36 ετών και πάνω από 36 ετών, σε δείγματα που λήφθηκαν από ασθενείς.

Πίνακας 5. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη στην ομάδα A (<35 ετών) και ομάδα B (>35 ετών) ασθενών.

QUANTITY ONE				SCION IMAGE			
Κωδ	Ηλικία	β -ακτίνη	D_3	D_3/β -ακτίνη	β -ακτίνη	D_3	D_3/β -ακτίνη
ΟΜΑΔΑ Α							
P1	35	255	255	1	216,38	223,34	1,032166
P2	32	255	255	1	208,66	217,23	1,041072
P5	31	236	200	0,847	184,37	177,06	0,960351
Mean+SE				0,949±0,051	Mean+SE		1,011±0,025
ΟΜΑΔΑ Β							
P3	49	243	139	0,572	180,36	143,3	0,794522
P4	57	255	254	0,996	197,55	205,28	1,039129
P7	51	214	121	0,565	180,32	104,99	0,582243
P8	44	222	113	0,509	191,66	104,76	0,546593
Mean+SE				0,784±0,112	Mean+SE		0,740±0,113

Διάγραμμα 3. Ιστογράμματα μέσω των όρων του λόγου της οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, στην ομάδα A (> 35 ετών) και ομάδα B (>35 ετών) ασθενών



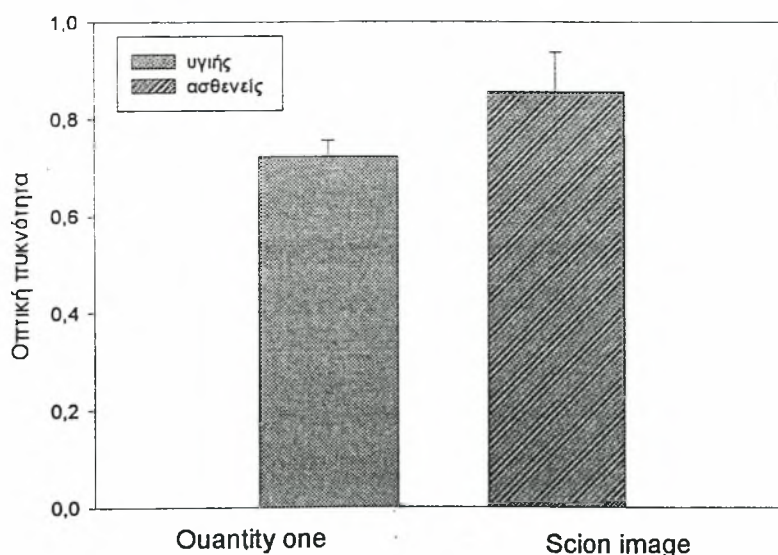
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 5 και στο διάγραμμα 3, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D_3/β -ακτίνη στην ομάδα A (<35 ετών) και ομάδα B (>35 ετών) ασθενών με σχιζοφρένεια και με τους δύο τρόπους μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (με το πρόγραμμα Quantity one και το πρόγραμμα Scion image).

6. Σύγκριση λόγων οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη μεταξύ υγιών-ασθενών

Πίνακας 6. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα των ασθενών με το πρόγραμμα ανάλυσης SCION IMAGE.

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ				ΑΣΘΕΝΕΙΣ			
Κωδικός	β -ακτίνη	D_3	D_3/β -ακτίνη	Κωδικός	β -ακτίνη	D_3	D_3/β -ακτίνη
C1	178,57	138,98	0,778	P1	216,38	223,34	1,032166
C2	195,69	125,7	0,642	P2	208,66	217,23	1,041072
C3	211,12	160,5	0,760	P3	180,36	143,3	0,794522
C4	227,21	210,11	0,924	P4	197,55	205,28	1,039129
C5	204,79	150,14	0,733	P5	184,37	177,06	0,960351
C6	166,58	123,49	0,741	P6	-	-	-
C7	171,94	80,95	0,470	P7	180,32	104,99	0,582243
C8	176,91	128,35	0,725	P8	191,66	104,76	0,546593
C9	174,57	123,41	0,706				
C10	177,09	120,99	0,683				
C11	27,97	21,97	0,785				
Mean+SE			0,722±0,033	Mean+SE			0,856±0,082

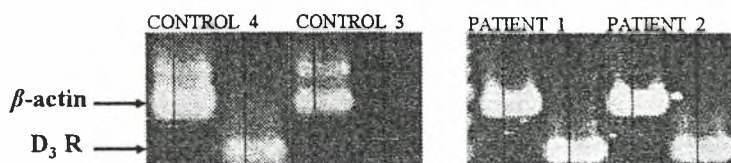
Διάγραμμα 4. Ιστογράμματα μέσω των όρων του λόγου της οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα ασθενών



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6 και το διάγραμμα 4, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D₃/β-ακτίνη μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με σχιζοφρένεια.

7. Σύγκριση λόγων υγιών-ασθενών κατά ομάδες

Εικόνα 1. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο των προϊόντων PCR της β-ακτίνης και του RNA των D₃ υποδοχέων ντοπαμίνης σε υγιείς μάρτυρες (C3 & C4) και ασθενείς (P1 & P2) της ομάδας A (<35 ετών)



Πίνακας 7. Προσδιορισμός του λόγου οπτικής πυκνότητας (D₃)/β-ακτίνη στην ομάδα A (<35 ετών) και ομάδα B (>35 ετών) υγιών ατόμων και ασθενών με το πρόγραμμα ανάλυσης SCION IMAGE

ΟΜΑΔΑ Α

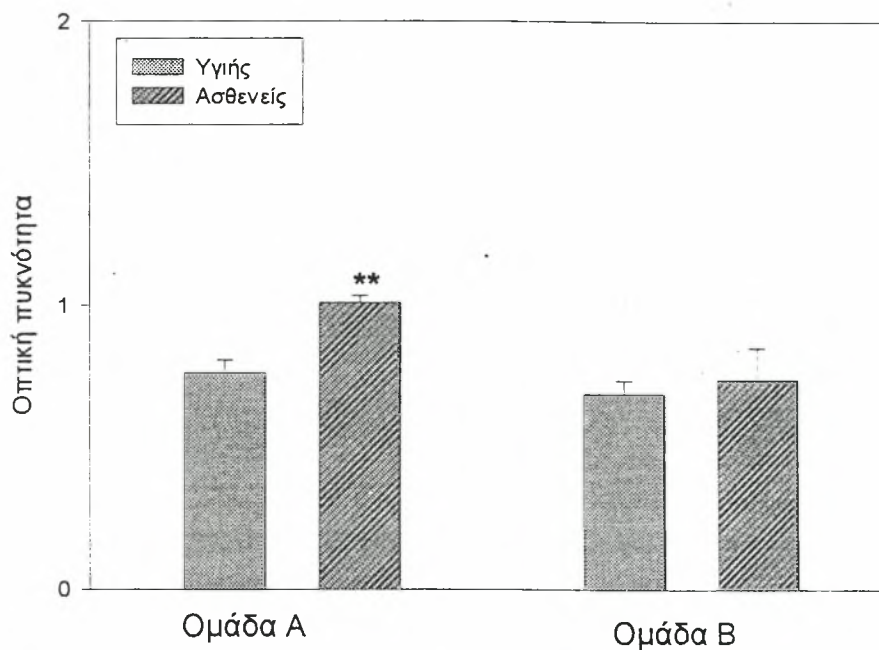
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ					ΑΣΘΕΝΕΙΣ				
Κωδ	ηλ	β-ακτίνη	D ₃	D ₃ /β-ακτίνη	Κ	ηλ	β-ακτίνη	D ₃	D ₃ /β-ακτίνη
C1	29	178,57	138,98	0,778	P1	35	216,38	223,34	1,032
C2	27	195,69	125,7	0,642	P2	32	208,66	217,23	1,041
C4	35	227,21	210,11	0,924	P5	31	184,37	177,06	0,960
C5	27	204,79	150,14	0,733	-	-	-	-	-
C6	35	166,58	123,49	0,741	-	-	-	-	-
Mean+SE				0,763±0,045	-	-	Mean+SE		1,01±0,025

ΟΜΑΔΑ Β

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ					ΑΣΘΕΝΕΙΣ				
Κω	ηλ	β-ακτίνη	D ₃	D ₃ /β-ακτίνη	Κ	ΗΛ	β-ακτίνη	D ₃	D ₃ /β-ακτίνη
ΟΜΑΔΑ Β									
C3	41	211,12	160,5	0,760	P3		180,36	143,3	0,794
C7	48	171,94	80,95	0,470	P4		197,55	205,28	1,039
C8	46	176,91	128,35	0,725	P7		180,32	104,99	0,582
C9	43	174,57	123,41	0,706	P8		191,66	104,76	0,546
C10	36	177,09	120,99	0,683			-	-	-
C11	40	27,97	21,97	0,785			-	-	-
Mean+SE				0,688±0,046			Mean+SE		0,740±0,113

Διάγραμμα 5. Ιστογράμματα μέσω των όρων του λόγου της οπτικής πυκνότητας (D_3)/ β -ακτίνη, ομάδα Α (<35 ετών) και ομάδα Β (>35 ετών) υγιών ατόμων και ασθενών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6 και το διάγραμμα 4, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D_3 / β -ακτίνη μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με σχιζοφρένεια.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7 και το διάγραμμα 5, δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των λόγων της οπτικής πυκνότητας D_3 / β -ακτίνη μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με σχιζοφρένεια στην ομάδα Β με ηλικία μεγαλύτερη των 35 ετών. Αντιθέτως στην ομάδα Α των ατόμων με ηλικία μικρότερη των 35 ετών οι ασθενείς με σχιζοφρένεια παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά ($p=0.008$, t-test) αυξημένο μέσο όρο του λόγου της οπτικής πυκνότητας D_3 / β -ακτίνη σε σύγκριση με τους υγιείς (Εικόνα 1, Πίνακας 7 και διάγραμμα 5).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μια τέτοια μέθοδος αν πραγματικά είναι αντιπροσωπευτική ως ένδειξη για τη νόσο της σχιζοφρένειας, μπορεί να έχει μεγάλη κλινική σημασία, γιατί η νόσος της σχιζοφρένειας αφορά το κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο εμφανίζει από τη φύση του μεγάλες δυσκολίες στη μελέτη, λόγω του ότι δεν επιτρέπει τη λήψη ιστού και τη παρακολούθηση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα σε αυτό *in vivo*.

Πιο ειδικά στη περίπτωση της σχιζοφρένειας θα ήταν ένα ισχυρό όπλο στα χέρια του κλινικού γιατρού, εφόσον η νόσος παρουσιάζει μεγάλες δυσκολίες στη διαγνωσή της, λόγω της ομοιότητάς της με άλλες ψυχιατρικές ασθένειες αφ' ενός και λόγω της ιδιαιτερότητας που παρουσιάζει ως προς το χρόνο αφού για να γίνει οριστική διάγνωση της νόσου χρειάζεται ένα μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο να βρούσκειται ο ασθενής σε νοσηρή κατάσταση.

Επίσης η διάγνωση της μη ασθένειας σε άλλα περιστατικά σε περίπτωση που αυτά δεν οφείλονται σε σχιζοφρένεια και πρόκειται να ιαθούν ολοκληρωτικά, θα ήταν πολύ σημαντική, ενώ σε εκείνες τις περιπτώσεις που η νόσος ανιχνευτεί σε προνοσηρή κατάσταση η ακόμα και στο πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο, θα προσέφερε μεγάλο όφελος με την έγκυρη διάγνωση βοηθώντας έτσι τον κλινικό γιατρό να επιλέξει τη κατάλληλη θεραπεία, βελτιώνοντας έτσι τη πρόγνωση της νόσου σε τέτοια περιστατικά η ακόμα και σε περιπτώσεις με την την οικογενή μορφή της νόσου.

Η υπαρκτή σχετικότητα των επιπέδων των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα λευκά αιμοσφαίρια σε σχέση με το κεντρικό νευρικό σύστημα θα προσέφερε γνώσεις για τη παθογένεια της νόσου.

Όλα αυτά προϋποθέτουν τη πραγματική συσχέτιση των επιπέδων των ντοπαμινεργικών υποδοχέων του κεντρικού νευρικού συστήματος με αυτά των λευκών αιμοσφαιρίων.

Από τη μελέτη που κάναμε είδαμε να υπάρχει μία τέτοια σχέση η οποία όμως εξαρτάται από την ηλικία. Ωστόσο κι άλλες παρόμοιες μελέτες που έχουν γίνει έδειξαν την ύπαρξη συσχετισμού, τόσο από τη μέτρηση των υποδοχέων σε νεκροτομικό υλικό (εγκέφαλο ασθενών με σχιζοφρένεια) και τη σύγκριση με αυτά των λευκών αιμοσφαιρίων, όσο και σε αντίστοιχες έρευνες που έγιναν σε πειραματόζωα (αρουραίους) με τη ταυτόχρονη μελέτη στις διάφορες ηλικίες ανάπτυξης.

Άλλες έρευνες που έγιναν, παρόμοιες με τη δική μας, χωρίς τη σύγκριση από νευρικό ιστό εγκεφάλου έδειξαν επίσης αυξημένα τα ποσά της έκφρασης των υποδοχέων της ντοπαμίνης στα λευκά αιμοσφαίρια.

Όλες αυτές οι έρευνες είναι ενθαρρυντικές για τη συνέχιση της μερελέτης κι από άλλους ερευνητές.

Ο ρόλος όμως των ντοπαμινεργικών υποδοχέων και του D₃ που μελετήσαμε εμείς είναι άγνωστος και μόνο κάποιες υποθέσεις ενέχονται.

Έτσι έρευνες που έγιναν για να ανακαλύψουν τη σημασία αυτών των υποδοχέων εκεί, έδειξαν ότι κατά πάσα πιθανότητα παίζουν ρυθμιστικό της ανοσίας ρόλο στα λεμφοκύτταρα, εφόσον σε αυτούς επιδρούν τα νευροληπτικά φάρμακα, προκαλώντας αλλαγές στις απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέτοιες παρατηρήσεις επιτεύχθηκαν στα Τα λεμφοκύτταρα και ανάλογα με τη δράση του αγωνιστή και σε ποιόν υποδοχέα άλλοτε η δράση ήταν η αντίδραση του ανοσιακού συστήματος κι άλλοτε κατασταλτική.

Η μέτρηση του υποδοχέα της ντοπαμίνης δε ξέρουμε αν είναι ειδική μέθοδος για τη διάγνωση της σχιζοφρένειας. Οι ενδείξεις όμως που υπάρχουν δείχνουν να είναι αφού ο D₃ συγκεκριμένος υποδοχέας είναι αυτός στον οποίο επιδρούν τα άτυπα νευροληπτικά των οποίων οι παρενέργειες είναι περιορισμένες και δείχνουν να είναι ειδικότερα αντιψυχωτικά φάρμακα, και κατά συνέπεια ο υποδοχέας αυτός ενέχεται σε μεγαλύτερο βαθμό στη νόσο σε σχέση με τους άλλους.

Η παθογένεια της νόσου είναι όπως αναφέρθηκε στην αρχή άγνωστη, έτσι ο μόνος τρόπος για να πιστωποιήσει και να βεβαιωθεί αν αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει περιφεριακό βιολογικό δείκτη για τη νόσο της σχιζοφρένειας είναι η συνεχόμενη επανάληψη του πειράματος σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε τυχαία αποτελέσματα να αποκλειστούν και να αποδειχτεί έτσι αν η μέθοδος αυτή μπορεί να έχει σημασία στη διάγνωση της νόσου. Επίσης ο συνδιασμός κι άλλων τεχνικών για τη μέτρηση των υποδοχέων ντοπαμίνης στα λευκά αιμοσφαίρια με κάποια καλύτερα χαρακτηριστικά θα βοηθήσει πολύ. Οπώς πχ η σύνδεση του υποδοχέα με ειδικό αντίσωμα γι αυτόν και φθορίζει είναι από τη μία πλευρά καλύτερη αφού είναι μία καθαρά ποσοτική μέθοδος και με μεγάλη επαναληψιμότητα. Απρό την άλλη όμως η μέθοδος της PCR πλεονεκτεί σε σχέση με τις ψανοσολογικές μεθόδους στην πολύ υψηλή ευαισθησία, κάτι που είναι απαραίτητο στη συγκεκριμένη περίπτωση, αφού οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς εμφανίζονται πολύ χαμηλές ποσότητες και μία μέθοδος με χαμηλή ευαισθησία θα μπορούσε να μην είναι η κατάλληλη. Γι αυτούς τους λόγους επιλέχτηκε η PCR, η οποία όμως παρουσιάζει σε αντιδιαστολή χαμηλή επαναληψιμότητα. Μια άλλη εναλλακτική μέθοδος θα μπορούσε να είναι με τη χρήση ραδιοσημασμένων μορίων που συνδέονται με μεγάλη συγγενεια με τον υποδοχέα της ντοπαμίνης. Δε πλεονεκτεί όμως σε σχέση με τη πρώτη.

Το πιο σημαντικό πάντως ανεξαρτήτα με ποια μέθοδο τα προσδιοριστεί είναι να γίνει σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων και με της ηλικίας και το φύλο τοποθετημένα σε ομόλογες ομάδες εφόσον τα επίπεδα των υποδοχέων εξαρτώνται και από την ηλικία.

Η διάγνωση πάντως τέτοιων περιφερικών υποδοχέων αν αποβεί επιτυχής θα είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα για την εκτίμηση και τη διάγνωση ψυχιατρικών νόσων από βιολογικούς δείκτες.

References

Books

Μάνος Νίκος, 1988. «Βασικά στοιχεία κλινικής ψυχιατρικής». University Studio Press, Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων & Περιοδικών, Θεσσαλονίκη.

Michael R. Trimble, 1996. "Biological psychiatry". Copyright by John Willey & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester. West Sussex PO19 1UD, England.

Articles

Daniele Tomassoni, Elena Bronzetti, Franco Cantalamessa, Fiorenzo Mignini, Alberto Ricci, Maurizio Sabbatini, Seyed K. Tayebati, Damiano Zaccheo. 2001. Postnatal development of dopamine receptor expression in rat peripheral blood lymphocytes.

Fred H. Previc. 1999. Dopamine and the Origins of Human Intelligence.

John M. Vile, Philip G. Strange. 1995. High affinity binding sites for neuroleptic drugs, in human peripheral blood lymphocytes and their relation to dopamine receptors.

Yong T. Kwak, Min-Seong Koo, Chul-Hee Choi and Sunwoo. 2001. Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients.

Jean-Charles Schwartz, Jorge Diaz, Catherine Pilon, Pierre Sokoloff. 2000. possible implications of the dopamine D₃ receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions.

Alberto Ricci, Elena Bronzetti, Fiorenzo Mignini, Seyed Khosrow Tayebati, Damiano Zaccheo, Francesco Amenta. 1999. Dopamine D₁-like receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes.

Jorge Diaz, Catherine Pilon, Bernard Le Foll, Claude Gros, Antoine Triller, Jean-Charles Schwartz and Pierre Sokoloff. 2000. Dopamine D₃ receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons.

Tal ilani, Dorit Ben-Shachar, Rael D. Strous, Marina Mazor, Ala Sheinkman, Moshe Kotler and Sara Fuchs. 2000. A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D₃ dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes.

B. Caronti, G. Antonini, C. Calderaro, S. Ruggieri, G. Palladini, F. E. Pontieri, and C. Colosimo. 2001. Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease.

Brunella Caronti, Caterina Calderaro, Francesca Passarelli, Guido Palladini and Francesco E. Pontieri. 1998. Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes.

Shitij Kapur and Gary Remington. 2001. dopamine D₂ receptors and their role in atypical antipsychotic action: Still necessary and may even be sufficient.

Jeffrey N. Joyce. 2001. Dopamine D₃ receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs.

Stuart C. Sealfon and C. Warren Olanow. 2000. Dopamine receptors: From structure to behavior.

Judith R. Walters, David N. Ruskin, Kelly A. Allers and Debra A. Bergstrom. 2000. Pre- and postsynaptic aspects of dopamine-mediated transmission.

Beth Levant. 1997. The D₃ dopamine receptor: Neurobiology and potential clinical relevance.

Frederic Calon, Abdallah Hadj Tahar, Pierre J. Blanchet, Marc Morissette, Richard Grondin, Martin Goulet, Jean-Pierre Doucet, George S. Robertson, Eric Nestler, Therese Di Paolo and Paul J. Bedard. 2000. Dopamine-receptor stimulation: Biobehavioral and biochemical consequences.

Levite M, Chowers Y, Ganor Y, Besser M, HersHKovits R, Cahalon L. 2001. Dopamine interacts directly with its D₃ and D₂ receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function.