Usporedba izraženosti NLRP1 inflamasoma u čeonom režnju zdravih odraslih osoba i bolesnika sa shizofrenijom

Vogrinc, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:470803

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Vogrinc

Usporedba izraženosti NLRP1 inflamasoma u čeonom režnju zdravih odraslih osoba i bolesnika sa shizofrenijom

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za neuroznanost, Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HIIM), pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

A1T – α-1 antitripsin

A2M – α-2 makroglobulin

AIM2 – engl.absent in melanoma 2 protein

APA – Američka psihijatrijska udruga (engl.American Psychiatric Association)

ASC – engl. apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

BDP – bruto domaći proizvod

CARD – domena koja aktivira kaspazu (engl. caspase recruitment domain)

CRP – C-reaktivni protein

CSF – cerebrospinalna tekućina

DALY – godine života prilagođene za nesposobnost (engl.disability-adjusted life years)

DAMP – molekulski obrasci povezani s oštećenjem stanica (engl.danger-associated molecular patterns)

DSM-5 – Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje, peto izdanje (engl.Diagnostic and statistical manual of mental disorders)

dsRNA – dvostruko uvijena ribonukleinska kiselina (engl.double stranded ribonucleid acid)

FIIND – domena s funkcijom pronalaženja (engl.function to find domain)

GWAS – cjelogenomska asocijacijska studija (engl.genome-wide association studies)

HIN200 – engl. hematopoietic IFN-inducible nuclear protein with 200-amino acids

HMGB-1 – engl. high mobility group box 1

HP – haptoglobin

HZJH – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IL – interleukin

LPS – lipopolisaharid

LRR – leucinom bogata ponavljanja (engl.leucin rich repeat)

MHC – molekula tkivne podudarnosti (engl.major histocompatibility complex)

MKB-11 – Međunarodna klasifikacija bolesti, jedanaesto izdanje

NLRP – receptor koji sadržava NOD, LRR i PYD

NMDA – N-metil-D-aspartat receptor

NOD – domena za vezanje i oligomerizaciju nukleotida (engl.nucleotide-binding oligomerization domain)

NRG1 – neuregulin-1

NTP – enzim nukleozidna trifosfataza

PAMP – molekulski obrasci povezani s patogenim uzročnicima (engl.pathogen-associated molecular patterns)

poli (I:C) – poliriboinozinska: poliribocitidilična kiselina

PRR – receptori koji prepoznaju obrasce (engl.pattern recognition receptors)

PYD – domena bogata pirinom (engl.pyrin domain)

qPCR – kvantitativna polimerazna lančana reakcija (engl. quantitative polymerase chain reaction)

RIG-I – engl.retinoic acid-inducible gene I

SNP – polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. single-nucleotide polymorphisms)

SŽS – središnji živčani sustav

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

ZNF804 – protein cinkovi prsti 804 (engl. zinc finger protein 804)

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD 1
   1.1. Shizofrenija 1
      1.1.1. Definicija i klasifikacija 2
      1.1.2. Terapijski pristup shizofreniji 4
      1.1.3. Etiopatogeneza 6
         1.1.3.1. Genetska podloga shizofrenije 6
         1.1.3.2. Okolišni čimbenici 8
      1.1.4. Neuroinflamacija u shizofreniji 9
   1.2. Inflamasomi 12
      1.2.1. NLRP1 inflamasom 14
2. HIPOTEZA 16
3. CILJ RADA 16
4. MATERIJALI I METODE 17
   4.1. Materijali 17
      4.1.1. Uzorci moždanog tkiva 17
      4.1.2. Imunohistokemijski biljeg 18
   4.2. Metode 18
      4.2.1. Imunohistokemijska vizualizacija 18
      4.2.2. Snimanje mikrofotografija 20
5. REZULTATI 21
6. RASPRAVA 24
7. ZAKLJUČAK 26
8. ZAHVALE 27
9. LITERATURA 28
10. ŽIVOTOPIS 35

SAŽETAK

Usporedba izraženosti NLRP1 inflamasoma u čeonom režnju zdravih odraslih osoba i bolesnika sa shizofrenijom

Dora Vogrinc

Shizofrenija predstavlja jedno od najtežih psihičkih oboljenja koje značajno narušava kvalitetu života pogođene osobe. Ona utječe na sposobnost razmišljanja te iskrivljuje percepciju stvarnosti i subjektivnih iskustava. Etiopatogeneza shizofrenije nije u potpunosti objašnjena te ne postoji općeprihvaćena teorija, no većina dokaza ukazuje na kroničnu neuroinflamaciju kao glavnog faktora koji mijenja funkcioniranje živčanog sustava i uzrokuje psihotične simptome. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi postoji li razlika u izražaju upalnih kompleksa NLRP1 inflamasoma u postmortalnim uzorcima mozga osoba koje boluju od shizofrenije i zdravih kontrola. Analizirani su postmortalni uzorci orbifrontalnog dijela frontalnog režnja mozga sedam osoba oboljelih od shizofrenije (SCH) i pet zdravih kontrola (HC) putem imunohistokemijskog bojenja preparata za NLRP1 protein. Signali u piramidalnim neuronima na obojenim pripravcima manualno su brojani, a zatim su se dijelili s površinom analiziranog područja kako bi se dobila gustoća signala. Usporedbom gustoće, utvrđeno je da je izražaj NLRP1 proteina značajno veći u SCH uzorcima u usporedbi s HC uzorcima. Ovo promatranje dodatno podržava ulogu upale kao ključnog procesa u patogenezi shizofrenije te implicira NLRP1 inflamasom kao potencijalnog medijatora, otvarajući mogućnost istraživanja posebne uloge ovog proteinskog kompleksa u upalnoj patogenezi shizofrenije.

Ključne riječi: shizofrenija, NLRP1 inflamasom, neuroinflamacija

SUMMARY

Comparison of NLRP1 inflammasome expression in the frontal lobe of healthy adults and patients with schizophrenia

Dora Vogrinc

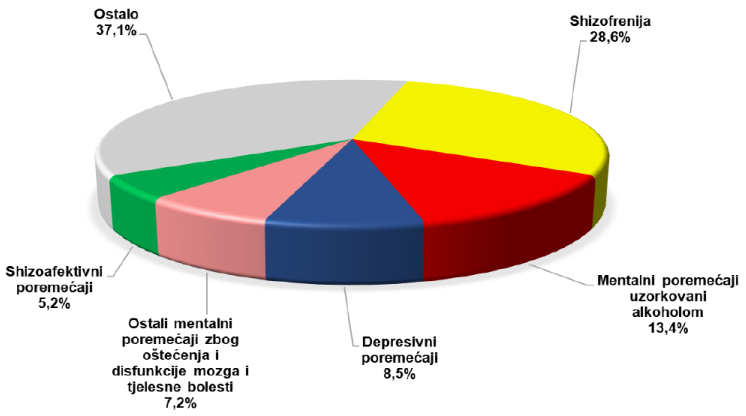
Schizophrenia represents one of the most profound psychiatric disorders that greatly compromises the affected individual's overall quality of life. It profoundly impacts cognitive abilities while distorting the perception of reality and subjective experiences. Although a comprehensive understanding of the etiopathogenesis of schizophrenia remains elusive, a prevailing body of evidence indicates a strong association with chronic neuroinflammation, which disrupts the normal functioning of the nervous system and gives rise to psychotic symptoms. Therefore, the primary objective of this investigation was to ascertain whether discrepancies exist in the expression of NLRP1 inflammasome in post-mortem brain specimens obtained from individuals afflicted with schizophrenia, as compared to neurologically healthy controls. Through immunohistochemical staining of the NLRP1 protein, postmortem samples of the orbitofrontal region of the frontal lobe from seven schizophrenia patients (SCH) and five individuals serving as normal controls (HC) were meticulously analysed. Subsequently, the signals within the pyramidal neurons were manually enumerated on the stained preparations and their number was divided by the area of the analysed region, yielding the signal density. By comparing the density measurements, it was established that NLRP1 expression levels were significantly elevated in the samples from individuals with schizophrenia in contrast to those from the healthy control group. This observation provides further support for the involvement of inflammation as a crucial process in the pathogenesis of schizophrenia, thereby implicating the NLRP1 inflammasome as a potential mediator. Consequently, this finding warrants further investigation into the distinct role played by this protein complex in the inflammatory pathogenesis of schizophrenia.

Key words: schizophrenia, NLRP1 inflammasome, neuroinflammation

1. UVOD

1.1. Shizofrenija

Shizofrenija je jedna od najtežih duševnih bolesti kroničnog karaktera koja pogađa sposobnost razmišljanja osobe i mijenja njezinu percepciju stvarnosti, što utječe na njezino ispoljavanje emocija te međuodnose s ljudima (1). Prema studiji iz 2022. godine o globalnoj opterećenosti mentalnim poremećajima (2), shizofrenija skupa s depresivnim i anksioznim poremećajima zauzima najveći udio godina života prilagođenih za nesposobnost (*disability-adjusted life years*, DALY) vezanih uz duševne poremećaje u 2019. godini. U toj su studiji analizirani podaci o prevalenciji i globalnoj opterećenosti mentalnim bolestima (3) od 1990. do 2019. te je revidirana epidemiološka statistika mentalnih poremećaja u nekoliko baza podataka. U 2019. godini globalna je prevalencija duševnih poremećaja iznosila 907,1 milijuna, od kojih su 23,6 milijuna bili bolesnici sa shizofrenijom (2). Unatoč relativno niske prevalencije naspram drugih duševnih poremećaja, shizofrenija se zbog složenog i izazovnog tijeka bolesti smatra jednim od vodećih zdravstvenih problema u svijetu sa značajnim globalnim ekonomskim opterećenjem koje se kreće od 0,02% do 1,65% BDP-a (4). U Hrvatskoj je 2021. godine shizofrenija bila jedna od vodećih dijagnostičkih kategorija u ukupnom broju hospitalizacija zbog mentalnih poremećaja. Osim po broju hospitalizacija prednjačila je i prema broju korištenih dana bolničkog liječenja zbog mentalnih poremećaja s udjelom od 28,5% što potvrđuje važnost shizofrenije kao opterećujuće bolesti za zdravstveni sustav (Slika 1.) (5).



Slika 1. Vodeće dijagnostičke kategorije po udjelu u bolničkom pobolu zbog mentalnih poremećaja u Hrvatskoj 2020. godine prema trajanju hospitalizacija. Preuzeto iz HZJZ (2022) (5).

1.1.1. Defincija i klasifikacija

Kriteriji kojima se pokušava definirati ova skupina poremećaja mijenjali su se više puta u zadnjih nekoliko desetljeća. Najuvriježeniji kriteriji korišteni za klasifikaciju shizofrenije jesu Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje (*Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders*, *Fifth Edition*, DSM-5) (6) od strane Američke psihijatrijske udruge (*American Psychiatric Association*, APA) te Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema (MKB-11, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-11*) (7) koju izdaje Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*, WHO). Oba priručnika sadrže smjernice za postavljanje dijagnoze, praćenje bolesti te terapijskih mogućnosti.

Unatoč pojedinim razlikama među izdanjima, svi su priručnici proizašli iz zajedničkih temeljnih teorija. To su prije svega Kraepelinovo definiranje stanja *dementia praecox* (ondašnjeg, danas zastarjelog izraza za shizofreniju) kao progredirajućeg psihotičnog poremećaja karakteriziranog kognitivnim propadanjem i avolicijom (nesposobnosti započinjanja i održavanja k cilju usmjerenog ponašanja [*goal-directed behavior*] što dovodi do smanjene učinkovitosti ponašanja i brige za samoga sebe)(8). Bleuler demenciji *praecox* pridužuje novi naziv shizofrenija opisujući ju kao sindrom sa

zajedničkom karakteristikom rascjepa između afektivnog i misaonog života (9,10). On kao fundamentalne i vodeće simptome naglašava one negativne (poremećaji afekta, autizam, ambivalencija) dok Schneider naglašava pozitivne simptome kao simptome prvog reda uz naglasak da nemaju jasan organski uzrok (11). Pritom se pod negativnim simptomima podrazumijeva izostanak sposobnosti ili načina ponašanja koji su tipično prisutni u osoba koje nemaju shizofreniju (npr. smanjena emocionalna izražajnost [emocionalna zaravnjenost], gubitak volje i motivacije, anhedonija, socijalno povlačenje, nemogućnost uživanja u vlastitim aktivnostima, itd.), dok se pod pozitivnim simptomima misli na prisutnost mišljenja i načina ponašanja koji se inače ne vide u osoba koje nemaju shizofreniju (npr. halucijacija, deluzija, dezorganiziranog govora, mišljenja i motorike, posebice izraženog poremećaj logičkog održavanja koherentnog tijeka misli i njihovog prenošenja drugima).

Kad su izašla prva izdanja DSM i MKB priručnika, došlo je do razdvajanja u konceptualizaciji shizofrenije ovisno o tome na čije su se ranije opisano viđenje bolesti pojedini autori oslanjali (12). Najnovija izdanja (MKB-11 i DSM-5) uskladila su kriterije i klasifikaciju radi lakše međusobne usporedbe i bolje kliničke upotrebljivosti (13). Jedna od značajnijih izmjena u posljednjim izdanjima priručnika jest uklanjanje podjele shizofrenije na podtipove. Naime, pokazalo se da takva podjela umanjuje raznovrsnost različitih oblika shizofrenije (14), otežava svrstavanje pacijenata u te kategorije, a također nije pokazala dovoljnu prognostičku važnost s obzirom na daljnji tijek bolesti (15,16).

Umjesto toga MKB-11 predlaže svrstavanje simptoma u 6 kategorija (pozitivne, negativne, depresivne, manične, psihomotoričke i kognitivne deficite) od kojih barem dva simptoma moraju biti prisutna tokom mjesec dana te jedan od tih simptoma mora biti iz skupine tzv. temeljnih simptoma (deluzije, halucinacije, poremećaj mišljenja, iskrivljena percepcija stvarnosti) (7,17).

Slično tome DSM-5 definira pet karakterističnih simptoma (deluzije, halucinacije, dezorganizirani govor, katatonično/neprimjereno ponašanje, negativni simptomi) od kojih također barem dva moraju perzistirati tijekom mjesec dana s time da jedan od njih spada u deluzije, halucinacije ili dezorganizirani govor (6,18). Dodatni kriteriji koji se ovdje navode jesu trajanje prodromalnog razdoblja s blažim znakovima poremećaja

barem 6 mjeseci te smanjena funkcija u barem jednom značajnijem području života (npr. posao, obrazovni uspjeh, međuljudski odnosi) (18).

Ovisno o simptomima koji prevladavaju te njihovoj težini tijek shizofrenije može se značajno razlikovati između pojedinih bolesnika. Da bi se jasnije pratio razvoj bolesti i samim time propisala primjerena terapija, u sklopu DSM-5 je uvedena nova ljestvica za procjenu težine psihoze, Klinički procijenjene dimenzije težine simptoma psihoze (*Clinician-Rated Dimensions of Psychosis Symptom Severity,* C-RDPSS). Ovom ljestvicom se procjenjuje 8 skupina simptoma (deluzije, halucinacije, dezorganizirani govor, neprimjereno ponašanje, negativni simptomi, oštećenje kognicije, depresija, manija) na skali od 0 (nije prisutno) do 5 (simptom je prisutan u teškom obliku ili u značajnoj mjeri) i na taj način prati uspješnost liječenja (19).

1.1.2. Terapijski pristup shizofreniji

U liječenju shizofrenije koriste se farmakoterapija i nefarmakološki oblici liječenja. U farmakološkoj terapiji poglavito se koriste lijekovi iz skupine antipsihotika. To su lijekovi koji dovode do povlačenja psihotičnih simptoma blokirajući receptore različitih neurotransmitera (20). Prema afinitetu za pojedine receptore svrstavaju se u prvu ili drugu generaciju antipsihotika. Lijekovi prve generacije su tzv. *tipični antipsihotici* (npr. klorpromazin, haloperidol, flufenazin), a koriste se prije svega zbog svog jakog antagonističkog djelovanje na D2 dopaminske receptore. Druga generacija tzv. *atipičnih antipsihotika* (npr. klozapin, olanzapin, kvetiapin, risperidon, aripiprazol) uz D2 receptore pokazuje i veći afinitet za serotoninske 5-HT2A receptore. Osim glavnog učinka preko D2 i 5-HT2A receptora, antipsihotici mogu imati i različit stupanj afiniteta i za druge neurotransmiterske receptore (histaminske, muskarinske, α- i β-adrenergičke) što može djelovati povoljno na neke simptome shizofrenije, ali može biti i uzrok nuspojava (21).

Kao prva linija farmakoterapije kod psihotične se epizode koristi bilo koji od antipsihotika (osim klozapina), s time da se prednost daje atipičnima ukoliko kliničkom slikom prevladavaju negativni simptomi. Kod izostanka učinkovitog terapijskog odgovora na prvi lijek, preporuča se izmijeniti nekoliko vrsta antipsihotika (u slučaju tipičnih najviše dva) te ako niti oni ne poluče uspijeh primijeniti klozapin. Klozapin u većini slučajeva uspješno djeluje na terapijski rezistentne oblike shizofrenije no njegova je upotreba ograničena zbog visokog rizika od razvoja agranulocitoze. Zato je

preporučljivo koristiti što niže terapijske doze i postepeno uvoditi neki drugi atipični antipsihotik u terapiji održavanja (20,21). Ukoliko niti klozapinom nisu uspješno kontrolirani psihotični simptomi prihvatljiva je upotreba elektrokonvulzivne terapije, prije svega kod pacijenata s dominantno afektivnim ili katatonim simptomima (22).

Terapija održavanja se postiže dozom lijeka koja se pokazala učinkovitom kroz 6 mjeseci, nakon čega se može svakih 6 tjedana postepeno smanjivati do najniže djelotvorne doze. Ako su psihotični simptomi adekvatno kontrolirani, a pojave se neki drugi simptomi poput nesanice, anksioznosti ili razdražljivosti, treba razmotriti dodavanje nekih drugih psihofarmaka (npr. benzodiazepina, antidepresiva)(20).

Iako antipsihotici imaju relativno dobru terapijsku učinkovitost, zbog stimulacije različitih receptora imaju i brojne nuspojave. Većina tih nuspojava je vezana uz dozu pa se prije svega preporučuje smanjenje doze ili promjena antipsihotika, a ako je potrebno i uvođenje dodatne terapije. Jedino se u slučaju malignog neuroleptičnog sindroma odmah ukidaju antipsihotici te se postepeno i oprezno uvode tek nakon oporavka (20). Zbog navedenih razloga može adhenercija pacijenata na farmakoterapiju shizofrenije postati problematična što dovodi do slabijeg oporavka, čestih relapsa, kao i narušavanja kvalitete života (23). Stoga je potreban individualizirani pristup. U tom smislu je psihosocijalna terapija ključan dio liječenja shizofrenije. Preporučuje se liječenje u poznatoj, prirodnoj sredini uz ambulantne kontrole i pristup mreži psihijatrijskih institucija. Također je važna edukacija bolesnika i njegove obitelji o bolesti putem obiteljskih intervencija te psihoterapija, prije svega kognitivno-bihevioralna (20,24).

Noviji pristup liječenju shizofrenije jest kroz somatske terapije kao što su ponavljana transkranijalna stimulacija (*repetitive transcranial magnetic stimulation*, rTMS) te duboka moždana stimulacija (*deep brain stimulation*, DBS), međutim potrebno je još studija da se poboljšaju kriteriji uključivanja pacijenata u ovakve načine liječenja te ustanovi korisnost njihove šire primjene (24).

Većina antipsihotika i novijih terapijskih pristupa shizofreniji (rTMS) glavni učinak postiže djelovanjem na pozitivne simptome, dok se negativni simptomi (npr. apatija, anhedonija, avolicija) i kognitivni deficiti i dalje teže liječe (24).

1.1.3 Etiopatogeneza

Više od stoljeća nakon Bleulerovog prvog imenovanja shizofrenije (9), jedinstveni patofiziološki mehanizam koji stoji u podlozi razvoja bolesti i dalje nije jasno definiran. Raznolikost simptoma koji se vežu uz shizofreniju otežavaju konsenzus oko jedinstvene teorije koja bi objasnila cijelu patogenezu. Ipak, postoji suglasje da je u nastanak bolesti uključeno više čimbenika (25). Teorija koja se najduže održala i zasada najbolje opisuje etiopatogenezu shizofrenije jest neurorazvojna teorija. Njezini su začetnici psihijatri Murray i Weinberger koji su u zasebnim istraživanjima (26,27) došli do zaključka kako je neuropatologija shizofrenije kombinacija genetičke predispozicije i okolišnih čimebnika u prenatalnom i perinatalnom razdoblju te ranom djetinjstvu. Takva podloga čini mozak osjetljivijim na štetne čimbenike iz okoline, koji svojim djelovanjem u adolescenciji i ranoj zreloj dobi dovode do manifestacija prvih psihotičnih simptoma (28). Ovakav se model naziva još i hipoteza dvostrukog udarca budući da zahtijeva genetičku mutaciju (prvi udarac) koja u interakciji s nekim okolišnim čimbenikom (dugi udarac) dovodi do strukturnog i funkcijskog oštećenja mozga te razvoja shizofrenije (29). Najveća incidencija pojave prvih psihotičnih simptoma tek u 20-im godinama također govori u prilog uloge stresora kao „okidača“ bolesti u adolescenciji i ranoj zreloj dobi.

1.1.3.1. Genetička podloga shizofrenije

Nasljednost shizofrenije i ulogu gena u njezinoj patogenezi potvrđuju studije na blizancima. Meta-analizi iz 2003. godine koja je analizirala 12 studija na blizancima procijenila je visoku razinu nasljednosti od 81% (30).

Genetička komponenta neurorazvojne teorije prvi je puta dobila potvrdu jednim istraživanjem na populaciji Islanda koje je objavljeno 2002. godine (31). U tom je istraživanju ustanovljena povezanost između predispozicije za shizofreniju i gena za neuregulin 1 (*NRG1*) na kratkom kraku osmog kromosoma (8p12)(28). *NRG1* izoforme eksprimirane u središnjem živčanom sustavu (SŽS) utječu na razvoj mozga djelujući na gliogenezu, migraciju neurona te izraženost i aktivaciju glutamatnih *N*-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora (31). Vezanjem za ErbB3 i ErbB4 receptore (glavni receptori za NRG1 u neuronima SŽS-a), NRG1 mijenja konformaciju njihovog receptorskog kompleksa što dovodi do njihove heterodimerizacije s ErbB2 receptorima i putem autofosforilacije tirozina aktivira njihovu tirozin kinaznu aktivnost. Na taj se

način, između ostalih, regulira i aktivnost NMDA receptora, za koju Garcia i suradnici (32) misle da utječe na sinaptičku plastičnost. Vjeruje se da ove promjene mogu uzrokovati karakteristične poremećaje mišljenja i kognicije kakvi se vide u shizofreniji (31).

Otkako su se počele vršiti cjelogenomske asocijacijske studije (*genome-wide association studies*, GWAS) omogućeno je određivanje milijuna polimorfizama pojedinačnih nukleotida (*single-nucleotide polymorphisms*, SNP) u cijelom genomu te njihova povezanost s različitim patološkim stanjima. Prve varijante gena koje su se na taj način povezale sa shizofrenijom su *ZNF804* gen na kromosomu 2q32 i regija glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*major histocompatibility complex*, MHC) na kratkom kraku šestog kromosoma (6p21) (28). Nekoliko je studija različitih istraživačkih skupina povezalo višestruki broj SNP-a unutar MHC lokusa sa shizofrenijom (33–35), što ukazuje na važnu ulogu disregulacije imunosnog sustava kao jednog od čimbenika u razvoju shizofrenije (36).

Još jedno istraživanje koja je pridonijelo genetičkoj karakterizaciji shizofrenije jest GWAS studija iz 2014. godine. U ovom je istraživanjuutvrđena povezanost shizofrenije sa polimorfizmima 108 gena (35) od kojih su najveći stupanj povezanosti imali gen za dopaminski receptor D2 (*dopamine receptor D2*, *DRD2*), geni glutamatnog sustava (*GRM3*, *GRIN2A*, *GRIA1*, *SRR*) te geni za kalcijske kanale (*CACNA1C*, *CACNA1I*, *CACNB2*) (28) Navedene povezanosti govore u prilog hipotezi da poremećena aktivnosti neurotransmitera (prije svega dopamina i glutamata) stoji iza patogeneze psihotičnih simptoma shizofrenije. Atipična dopaminska aktivnost prisutna je u nekoliko moždanih regija koje se vežu uz razvoj različitih skupina simptoma u shizofreniji. U mezolimbičkom putu prevelika aktivnost dopamina uzrokuje pojavu pozitivnih simptoma (npr. halucinacije, deluzije), dok podloga negativnih simptoma (npr. anhedonija, apatija) i kognitivnih deficita stoji u sniženim razinama dopamina u mezokortikalnom putu (37). Snižena glutamatna aktivnost također pridonosi manifestaciji simptoma tako što indirektno regulira razinu dopamina u mezolimbičkom (glutamat stimulira GABA interneurone koji inhibiraju otpuštanje dopamina) i mezokortikalnom (glutamat izravno ekscitira dopaminske neurone) putu (38).

Osim genetičkih promjena povezanih sa shizofrenijom, na izraženost gena utječu i epigenetičke modifikacije, napose metilacija promotorskih dijelova gena (39).

Epigenetičke modifikacije posreduju između okolišnih čimbenika koji djeluju u ranom razdoblju života i moguće pojave prve psihotične epizode (28).

1.1.3.2. Okolišni čimbenici

Utjecaj iz okoline prepoznat je kao važan čimbenik koji pridonosi vjerojatnosti pojave simptoma shizofrenije. S obzirom na razdoblje izloženosti ti se utjecaji mogu podijeliti na prenatalne i perinatalne čimbenike te faktore izloženosti u djetinjstvu i adolescenciji.

Utjecaj različitih čimbenika iz okoline za vrijeme trudnoće može dovesti do poremećaja u razvoju živčanog sustava. Prema meta analizi Mary Cannon i suradnika (40), rizični čimbenici prisutni tijekom trudnoće mogu se svrstati u tri kategorije: komplikacije u trudnoći (gestacijski dijabetes, infekcije), poremećaji u fetalnom razdoblju (smanjena porođajna masa, kongenitalne malformacije) te otežani porod koji može uzrokovati asfiksiju (28). Od svih navedenih čimbenika, najznačajniji utjecaj na razvoj shizofrenije imaju asfiksija, neuhranjenost fetusa i infekcije.

Faktori koji u ranoj mladosti genetički predisponiranim osobama povećavaju rizik od razvoja psihotičnih simptoma najviše su vezani uz socio-ekonomske prilike i zlouporabu psihoaktivnih supstancija (28). Osobe koje konzumiraju psihostimulativne droge poput kokaina i amfetamina imaju gotovo 10 puta veću vjerojatnost od razvoja shizofrenije; novije studije sve više povezuju i kroničnu konzumaciju kanabisa kao „okidača“ za nastanak psihoze (41,42).

U mentalnom zdravlju djece veliku ulogu imaju zdrav odgoj i poticajno okruženje. Fizičko i psihičko zlostavljanje u djetinjstvu povezano je sa povećanim rizikom od pojave pozitivnih psihotičnih simptoma (halucinacije, deluzije) (43), a posebice se povezuje s atipičnim odnosom i zlostavljanjem od strane majke (44,45).

Primijećena je i razlika u prevalenciji shizofrenije s obzirom na geografsku širinu i razvijenost država. Tako je veća prevalencija shizofrenije u državama sa hladnijom klimom (46) i urbaniziranim načinom života. Primjerice u Finskoj je izmjerena najviša prevalencija shizofrenije među moderniziranim državama od 2,21% (47). Pretpostavlja se da je ovakva raspodjela pojavnosti shizofrenije posljedica kroničnog stresa i time dugotrajno niske razine inflamacije povezane s urbanim stilom života (48).

1.1.4. Neuroinflamacija u shizofreniji

Uravnotežen upalni odgovor važan je za normalno funkcioniranje SŽS-a, međutim trauma i izloženost određenim infektivnim uzročnicima i toksinima može poremetiti tu ravnotežu i uzrokovati patološku upalnu kaskadu (49).

Različiti infektivni uzročnici poput Toxoplasme gondii te nekih neurotropnih virusa (herpes simplex virusa, citomegalovirusa, virusa rubeole) ometaju normalan fetalni neurološki razvoj uzrokujući strukturne i funkcionalne abnormalnosti mozga, pa izloženost trudnice ranije navedenim uzročnicima može predstavljati rizičan faktor za razvoj shizofrenije u potomaka (49). Jedan od uzročnika čija je uzročno – posljedična povezanost najbolje istražena je parazit Toxoplasma Gondii. Primarni domaćin ove praživotinje je mačka, ali može se naći i u nekim drugim toplokrvnim životinjama. Prisutnost antitijela na T. Gondii relativno je česta u općoj populaciji (u rasponu od 10% do 75% između različitih populacija) međutim većina infekcija prolazi asimptomatski (50). Uočeno je kako je povišena razina IgG antitijela na T. Gondii u serumu povezana s većim rizikom od razvoja shizofrenije i to simptomatski zahtjevnijeg oblika (51), a vidljive su i vrlo slične promjene morfologije mozga u oba stanja (atrofija sive tvrai, povećanje ventrikula, upalne stanice u perivaskularnom prostoru) (52). Točan mehanizam kojim ovaj parazit djeluje na promjene u ponašanju nije sasvim poznat međutim jedan od predloženih načina je da kolonizacijom neurona i glija stanica mijenja koncentraciju upalnih citokina u mozgu, migraciju glije i aktivnost neurotransmitera (50). Povisujući proizvodnju glutamata te istovremeno inhibirajući astrocitnu ulogu uklanjanja viška glutamata, dolazi do akumulacije glutamata koji oštećuje živčane stanice. T. Gondii tako može zaraziti i do 30% stanica mikroglije u mozgu i 10% astrocita, uzrokujući kroničnu neuroinflamaciju (48).

Kako bi neki mikrobi utjecali na pojavu psihotičnih simptoma nužno je da prodiru u moždano tkivo uzrokujući neuroinflamaciju. Također, važno je i razdoblje života u kojem se infekcija javlja čineći prenatalno i perinatalno razdoblje kao najosjetljivije. Primjerice, zaraza majke virusom influenze tijekom trudnoće povećava osjetljivost potomka na razvoj shizofrenije kasnije u životu (53). Poremećaj u SŽS uslijed infekcije, nastao tijekom perinatalnog ili prenatalnog razdoblja, može dovesti do promjena u ponašanju već u djetinjstvu ili tek kasnije uz djelovanje još nekog stresora.

Nekoliko je istraživanja pokazalo istovremeni poremećaj u ekspresiji proupalnih i antiupalnih citokina u shizofreniji (54). Protuupalni biljezi kao što su interleukini IL-10 i IL-4, imali su smanjenu ekspresiju tijekom prve psihotične epizode shizofrenije, dok su proupalni pokazatelji kao što je IL-6 bili povećani. Također, u postmortalnom moždanom tkivu osoba oboljelih od shizofrenije opisana je prisutnost razgradnih produkta medijatora upale (55) i povišena razina proupalnih citokina IL-1, IL-6 i IL-8 u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) oboljelih (56). C-reaktivni protein (CRP), kao jedan od glavnih upalnih biljega, također pozitivno korelira s težinom simptoma shizofrenije i kognitivnim deficitom (57), a posebno visoke razine CRP-a su uočene u shizofreniji rezistentnoj na terapiju (58).

Izraženost ostalih proteina akutne faze kao što su haptoglobin (HP), α-1 antitripsin (A1T) i α-2 makroglobulin (A2M) analizirana je u studiji Yee i suradnika (59) pomoću kvantitativne polimerazne lančane reakcije (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) u osoba s prvom psihotičnom epizodom. Sva tri proteina pokazala su povišene vrijednosti u oboljelih, naspram zdravih kontrola. Ti su upalni biljezi povezani i s drugim stanjima gdje upala igra značajnu ulogu kao što su kardiovaskularne bolesti, endotelna disfunkcija i metabolički poremećaji (60), što je u skladu s povećanom prevalencijom šećerne bolesti tip 2 i metaboličkog sindroma u osoba oboljelih od shizofrenije (61).

Oksidativni stres vidljiv u shizofreniji također je povezan s povećanom sekrecijom proupalnih citokina uzrokućuji kronično upalno stanje. Ukoliko je majka izložena oksidativnom stresu tijekom trudnoće (posebice tijekom prva dva tromjesečja), ta inflamacija može uzrokovati genetičke promjene koje dovode do poremećenog neurološkog razvoja fetusa i time povećanog rizika od razvoja shizofrenije u djeteta (62).

Morfološke studije mozga u osoba oboljelih od shizofrenije pokazuju modifikacije sive i bijele tvari (prije svega redukciju sive tvari u frontotemporalnim režnjevima, cingulatnom girusu, talamusu) te povećanje ventrikula (63). Difuzijskim tenzornim snimanjem magnetskom rezonancom (DTI-MR) moguće je uočiti poremećaje i u bijeloj tvari kod pacijenata sa shizofrenijom, međutim tom analizom nije vidljiva razlika između aksonalne degeneracije i neuroinflamacije. Novija metoda MR snimanja (*free-water imaging*) koja procjenjuje doprinos slobodno difundirajućih molekula vode (u

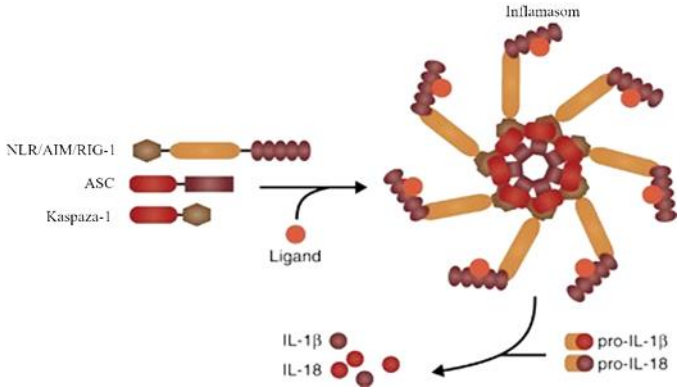
mozgu je to cerebrospinalna tekućina i voda koja može biti sadržana u obliku vazogenog edema) pokazala je dvije komponente koje objašnjavaju abnormalnost bijele tvari: izvanstanični volumen i frakcijska anizotropija molekula vode u tkivu (FAT). Pokazalo se da je većina promjena u bijeloj tvari u ranim stadijima shizofrenije posljedica povećanog izvanstaničnog volumena naglašavajući time neuroinflamaciju naspram degeneracije kao glavnog "okidača" za razvoj simptoma (64). Povećani izvanstanični volumen se ponaša kao biomarker za neuroinflamaciju budući da mikroglija i astrociti kao odgovor na štetni podražaj, produciraju kemijske tvari koje induciraju osmozu vode iz krvi u izvanstanični prostor (65).

1.2. Inflamasomi

Inflamasomi su unutarstanični proteinski kompleksi koji se aktiviraju oligomeriziranjem uslijed prepoznavanja molekulskih obrazaca povezanih s patogenim uzročnicima (*pathogen-associated molecular patterns,* PAMP) ili oštećenjem stanica (*danger-associated molecular patterns*, DAMP) (Slika 2.) (66). Za otkriće ovih makromolekula, zaslužan je švicarski biokemičar Jürg Tschopp koji je zajedno je sa svojim timom prvi imenovao inflamasome i definirao njihovu ulogu u upalnom odgovoru prirođene imunosti i stanične smrti (67,68). Tschopp navodi NLRP (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*) kao glavnu domenu u sastavu inflamasoma (67). NLRP je vrsta citosolnog NOD-u sličnog receptora (NOD-like receptor, NLR; NOD, domena za vezanje i oligomerizaciju nukleotida, *nucleotide-binding oligomerization domain*) koji pripadaju obitelji receptora za prepoznavanje PAMP i DAMP obrazaca (*pattern recognition receptors*, PRR), koji se aktivira u sklopu odgovora prirođene imunosti na mikroorganizme i stanično oštećenje te posreduje kaskadni upalni odgovor (66). NLR-ovi su građeni od 3 domene – središnje NACHT domene, C-terminalne domene ponavljanja bogata leucinom (*leucine-rich repeats*, LRR) i varijabilne N-terminalne domene (69). NACHT je kratica koja je nastala prema prvim proteinima kod kojih je takva domena pronađena, pa istovremeno označava **NA**IP (protein koji inhibira apoptozu neurona, *neuronal apoptosis inhibitory protein*), **C**IITA (transkripcijski aktivator molekula tkivne podudarnosti klase 2, *MHC class 2 transcription activator*), **H**ET-E (protein lokusa inkompatibilnosti iz gljivice Podospora anserina, *heterokaryon incompatibility protein from Podospora anserina*) i **T**EP-1 protein (protein povezan s telomerazom, *telomerase-associated protein component 1*). NACHT domena ima nukleozid-trifosfataznu (NTP-aznu) aktivnost i odgovorna je za oligomerizaciju (70), dok je funkcija C-terminalne LRR domene vezanje odgovarajućeg liganda (71). N-terminalna domena međudjeluje s drugim proteinima i razlikuje se između pojedinih vrsta unutar NLR obitelji. S obzirom na sastav N-terminalne domene razlikujemo receptore s kiselom transaktivacijskom domenom (NLR-A), bakulovirusnom domenom za inhibiciju apoptoze (NLR-B), domenom aktivacije i novačenja kaspaza (NLR-C) te domenom koja sadrži pirin (NLR-P) (71)

NLRP proteini imaju ulogu „detekcijske“ domene unutar inflamasoma. Nekolicina istraživanja pokazuju da postoje još neke receptorske obitelji koje mogu vršiti tu ulogu i

oblikovati inflamasome kao što su AIM2 sličan receptor koji umjesto LRR-a sadrži HIN200 domenu koja veže DNA (72) i RIG-1 sličan receptor koji osim produkcije IFN-a tip 1, ima i sposobnost aktivacije inflamasoma kao odgovor na neke RNA viruse (73,74).



Slika 2. Oligomerizacija inflamasoma nastaje uslijed vezanja liganda za „senzornu“ (detekcijsku) domenu (NLR/AIM/RIG-1) koja pokreće upalnu kaskadu. Preuzeto i prilagođeno iz Dagenais et al. (2011) (68).

Druga važna sastavnica inflamasoma jest proinflamacijska kaspaza. Kaspaze su enzimi koje u svom aktivnom (katalitičkom) mjestu sazdrže cistein te cijepaju proteinski supstrat nakon aspartata. S obzirom na ulogu u staničnim procesima mogu se svrstati u proapoptotičke i proinflamacijske (75). Kaspaza-1 je najbolje opisana proinflamacijska kaspaza i dio je klasičnog puta aktivacije inflamasoma, dok su mišja kaspaza-11 i kaspaza-4/5 u ljudi zaslužne za alternativni (nekanonski) put aktivacije (76).

Kanonski put započinje vezanjem kaspaze-1 izravno za receptore inflamasoma (NLRP) ili preko adaptacijskog proteina (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*, ASC). ASC sadrži pirinsku domenu (*pyrin domain*, PYD) pomoću koje se veže za receptore te CARD domenu (*caspase-recruitment domain*) za privlačenje kaspaza (77). Ovaj početni korak kanonskog puta uključuje i aktivaciju signalizacije jezgrinog čimbenika κB (*nuclear factor kappa B*; NF-κB), obično preko PRR-a, poput receptora sličnih Toll-u (*Toll-like receptors*, TLR). Nakon vezanja kaspaze-1 za N-terminalnu domenu receptora inflamasoma, dolazi do nukleacije i oblikovanja oligomernih filamenata (78), koji omogućuju autoproteolitičko cijepanje zimogena prokaspaze-1 i stvaranje aktivne kaspaze-1 (77,79). Istodobno, aktivacija NF-κB dovodi do proizvodnje pro-IL-1β i pro-IL-18, neaktivnih oblika ovih citokina. Kaspaza-1 potom aktivira pro-citokine IL-1β i IL-18 pretvarajući ih u zrele, biološki

aktivne oblike, te inducira upalni oblik stanične smrti, piroptozu (80). Na taj način kaspaza-1 pruža dvostruku zaštitu budući da dodatno oslobađa iz stanica navedene zrele upalne citokine koji pridonose upalnom odgovoru i uklanjanju oštećenih stanica (79).

Nekanonski put aktivacije ovisan je o kaspazi-11 (u glodavca), odnosno kaspazi-4/5 (u čovjeka). Ove kaspaze prepoznaju lipopolisaharide (LPS) vanjskih ovojnica gram-negativnih bakterija u citosolu što dovodi do autoproteolize (76). Tako aktivirane kaspaze induciraju piroptozu i oslobađanje upalnih proteina IL-1α i HMGB-1, a kao što je prethodno opisano, indirektno dovode i do aktivacije IL-1β i IL-18 preko NLRP3 inflamasoma (81–83).

1.2.1. NLRP1 inflamasom

NLRP1 prvi je opisani citosolni receptor koji ima sposobnost oblikovanja višeproteinskog kompleksa inflamasoma (67). Svoju osnovnu građu dijeli s ostalim predstavnicima NLRP skupine (69) uz dodatak još dvije domene na C terminalnom kraju – FIIND (domena s funkcijom pronalaženja, *function to find domain*) i CARD domene (84). Unutar FIIND domene dolazi do autoproteolitičkog cijepanja nužnog za aktivaciju NLRP1 inflamasoma, dok CARD domena posreduje vezanje za kaspazu-1 (85). Osim posebnosti u građi u odnosu na ostale predstavnike NLRP skupine, ovi receptori pokazuju i gensku specifičnost vezanu za vrstu (86). Naime, za razliku od čovječjeg NLRP1 kojeg kodira jedan gen (*NLRP1*), u miševa su otkrivena tri paralogna gena (*NLRP1a, b* i *c*) koji kodiraju ove receptore (87,88).

Važna razlika između čovječjeg i mišjeg NLRP1 je također i u PYD domeni koja je prisutna isključivo u čovjeka. PYD domena je u ostalim NLRP proteinima npr. NLRP3, „zadužena“ za vezanje ASC molekule i posljedično aktiviranje kaspaze-1, međutim kod NLRP1 receptora je uočena autoinhibicijska funkcija ove domene (89) Zhong i suradnici su pokazali da se u slučaju mutacije PYD domene gubi sposobnost autoinhibicije, što dovodi do propagiranja spontane oligomerizacije NLRP1 inflamasoma, što može biti podloga autoinflamacije u različitim bolestima (90).

Dosada su opisana dva fiziološka liganda koji aktiviraju čovječji NLRP1. Jedan od njih je enterovirusna 3C proteaza (91) koja cijepa N-terminalnu PYD domenu. N-terminalni ostatak sadrži degradacijske signale za put pravila N-kraja koji vodi do razgradnje u proteasomima. Nakon razgradnje, slobodni NLRP1 C-terminalni fragment formira

inflamasom i aktivira kaspazu-1, piroptozu te oslobađanje proupalnih citokina. Drugi aktivator NLRP1 je dvostruko uvijena RNA (*double-stranded RNA*, dsRNA) čiji je učinak otkriven proučavanjem virusa šume Semliki koji se pokazao da aktivira čovječji NLRP1 (92). Vezanje dsRNA na NLRP1 se odvija preko LRR domene i dovodi do hidrolize ATP-a koja je jedan od ključnih posrednika u promjeni konformacije i aktivacije NLRP1 inflamasoma (93).

Imunohistokemijskom analizom distribucije NLRP1 u ljudskom tkivu (94) dokazana je prisutnost NLRP1 u limfoidnom tkivu (tonzilama, limfnim čvorovima, slezeni) i to u regiji T-limfocita, žljezdanim epitelnim stanicama (gastrointestinalnog i respiratornog trakta, žućnog mjehura, prostate, endometrijskih i endocervikalnih žlijezda), testisima i moždanom tkivu. U mozgu je izraženost NLRP1 prisutna u neuronima, prije svega piramidalnim, te oligodendrocitima. U neuronima i limfocitima NLRP1 signal prisutan je u jezgri, dok je u epitelnim stanicama eksprimiran u citoplazmi što upućuje na moguću ulogu NLRP1 u nekim jezgrinim procesima neovisno o inflamacijskoj.

2. HIPOTEZA

Izraženost NLRP1 inflamasoma u orbitofrontalnom dijelu čeonog režnja različita je u uzorcima osoba oboljelih od shizofrenije naspram uzoraka zdravih kontrola.

3. CILJ RADA

S obzirom na upalnu genezu shizofrenije, cilj ovog istraživanja bio je:

- Kvantificirati signal NLRP1 inflamasoma u piramidnim neuronima orbitofrontalnog dijela čeonog režnja postmortalnih uzoraka mozga osoba sa shizofrenijom i uzoraka zdravih kontrola
- Ustanoviti postoji li razlika u izraženosti NLRP1 inflamasoma u postmortalnim uzorcima osoba sa shizofrenijom i zdravih kontrola

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Uzorci moždanog tkiva

Za istraživanje su analizirani postmortalni uzorci orbitofrontalnog dijela čeonog režnja mozga 7 osoba oboljelih od shizofrenije (SCH) i 5 normalnih kontrola (HC) iz Zagrebačke zbirke mozgova pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Moždano tkivo prikupljeno je i korišteno u skladu s propisanim etičkim pravilima i uz odobrenje etičkog povjerenstva (Ur.broj: 380-59-10106-23-111/93, Klasa: 641-01/23-02/01, 11.12.2015.). Osobama oboljelima od shizofrenije, dijagnoza je postavljena za života u skladu sa kriterijima Dijagnostičkog i statističkog priručnika za duševne poremećaje,četvrto izdanje, 2000 (DSM-IV-TR) te su isti bili na dugotrajnoj terapiji antipsihoticima (klozapinom, olanzapinom ili risperidonom) sve do smrti. (Tablica 1.) Kontrolni su uzorci uzeti od osoba usporedivih po dobi i spolu s onima oboljelima od shizofrenije, uz uvjet da nisu bolovale od neuroloških ili psihijatrijskih poremećaja, zloupotrebljavale opojna sredstva te bez zabilježenih traume glave. (Tablica 2.) Uzorci moždanog tkiva fiksiranog u neutralnom parafinu pažljivo su isecirani iz orbitofrontalne regije te uklopljeni u parafinske blokove kako je opisano u radu Mladinova (95). Blokovi su potom izrezani na rezove debljine 12 μm koji su se dalje koristili za imunohistokemijsko bojanje.

Tablica 1: Podaci o uzorcima oboljelih od shizofrenije korištenim za istraživanje

UZORCI OBOLJELIH OD SHIZOFRENIJE (SCH)			
Broj uzorka	Spol	Dob (godine)	Uzrok smrti
SCH1	Ž	56	Disekcija aorte
SCH2	M	59	Samoubojstvo vješanjem
SCH3	Ž	58	Samoubojstvo skokom s visine
SCH4	M	59	Samoubojstvo vješanjem
SCH6	M	81	Nije poznat
SCH7	Ž	57	Nagla srčana smrt
SCH8	Ž	50	Nije poznat

Tablica 2: Podaci o kontrolnim uzorcima korištenim za istraživanje

KONTROLNI UZORCI (HC)			
Broj uzorka	Spol	Dob (godine)	Uzrok smrti
ČO 354	M	64	Nagla srčana smrt
ČO 356	M	66	Nagla srčana smrt
ČO 357	M	73	Plućna embolija
KONT4	Ž	60	Nagla srčana smrt
KONT5	M	63	Nagla srčana smrt

4.1.2. Imunohistokemijski biljeg

Za vizualizaciju izraženosti NLRP1 inflamasoma u orbitofrontalnom dijelu čeonog režnja korišteno je primarno protutijelo NLRP1 (Abcam, AB_776633).

4.2. METODE

4.2.1. Imunohistokemijska vizualizacija

Preparati su najprije deparafinizirani ksilolom i rehidrirani nizom ispiranja etanolom u padajućim koncentracijama (apsolutni etanol, 96%-tni etanol, 70%-tni etanol). Nakon deparafinizacije i rehidracije slijedilo je ispiranje PBS-om (*phosphate buffered saline*, pH=7,4) te stvaranje epitopa antigena dostupnijim za reakciju s protutijelom (*antigen retrieval*) što je postignuto kuhanjem u citratnom puferu (pH=6,0) u mikrovalnoj pećnici, najprije na 700 W do ključanja pet puta uz kontrolu tako da se dodavala destilirana voda kako bi se smanjilo ključanje, a zatim na 350 W još 20 min.
Preparati su nakon hlađenja ponovo isprani PBS-om i potom uronjeni u predtretirajuću otopinu metanola i 0,02%-tnog vodikovog peroksida radi inaktivacije endogene peroksidaze.
Nakon daljnjeg ispiranja PBS-om uslijedilo je blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela otopinom koja je sadržavala 5%-tnu otopinu BSA (*bovine serum albumin*) u 0,5%-tnom Triton/PBS-u. Korišteni životinjski serum (BSA) stvara tanak sloj na

površini tkiva i time sprječava nespecifično vezanje protutijela. Prije samog nakapavanja otopine za blokiranje, preparati se okruže tankim slojem hidrofobne tekućine pomoću za to posebno dizajniranog „flomastera“ (PAP pen, Sigma Aldrich) što sprječava otjecanje nakapane otopine preko ruba stakalca. Blokiranje je provedeno kroz 60 min na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori.

Primarno protutijelo proizvedeno iz zečjeg seruma razrijeđeno je u odgovarajućoj otopini za blokiranje u omjeru 1:100. U toj su se otopini primarnog protutijela preparati inkubirali preko noći na 4°C, nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om. Za kontrolu bojanja uzet je i dodatni tkivni uzorak koji nije tretiran primarnim protutijelom, tzv. negativna kontrola (NK), odnosno kontrola specifičnosti vezanja primarnog protutijela.

Sekundarno protutijelo, koje će se vezati za zečje primarno protutijelo (Vector Laboratories, Newark, CA, USA, AB_2336810, AB_2336811) razrijeđeno je u omjeru 1:200 u dvostruko razrijeđenoj otopini za blokiranje. Inkubacija preparata provedena je u vlažnoj komori kroz 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om, a u otopini sekundarnog protutijela inkubirani su i NK rezovi .

Tercijarno se protutijelo (Vector Laboratories, AB_2336810, AB_2336811) kao i sekundarno, pripremalo u dvostruko razrijeđenoj otopini za blokiranje u omjeru 10:2000. Preparati su inkubirani u vlažnoj komori 60 min i potom isprani PBS-om.

Vizualizacija je provedena otopinom koja sadrži diaminobenzidin (3,3′-Diaminobenzidin, DAB) (SIGMAFAST DAB *with Metal Enhancer Tablet Set*, kataloški broj D 0426), a pripremljena je prema uputama proizvođača. Preparati su zatim nakapani otopinom za vizualizaciju i inkubirani na sobnoj temperaturi 4-5 min. Nakon inkubacije uslijedilo je ispiranje u PBS-u i zatim u destiliranoj vodi.

Preparati su ostavljeni da se osuše i potom su prebačeni u kadicu s Histoclear-om. Rezovi su prekriveni kapljicom Histomounta (Poly-Mount, kataloški broj 08381-120) i pokrovnim stakalcem.

4.2.2. Snimanje mikrofotografija

Imunohistokemijski preparati skenirani su skenerom za histološke preparate Hamammatsu Nanozoomer 2.0. RS u rezoluciji 0,45 μm x 0,45 μm (Hamammatsu Photonics K.K., Japan) i analizirani u NDP.view2 programu za digitalnu vizualizaciju preparata istoimene tvrtke. Za kvantifikaciju izražaja aktivacije inflamasoma NLRP1 zabilježen je svaki pozitivan signal u piramidnim neuronima. Konačni rezultati prikazani su kao gustoća imunopozitivnih signala, odnosno brojevi pozitivnih signala podijeljeni su s površinom analiziranog područja preparata.

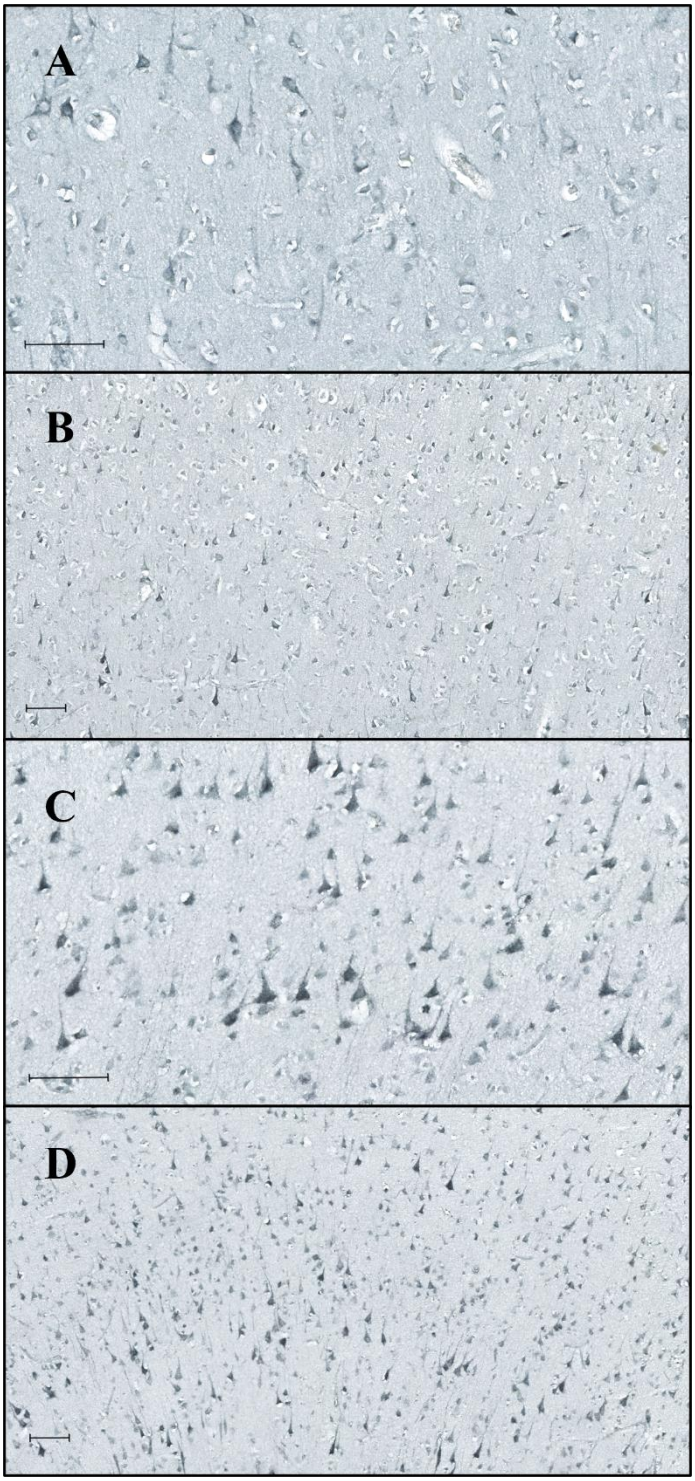
5. REZULTATI

Analiziran je izražaj NLRP1 proteina u moždanoj kori orbitofrontalnog dijela čeonog režnja kako bi se procijenila aktivnost NLRP1 inflamasoma. Kvantifikacija izraženosti NLRP1 proteina provedena je manualnim brojanjem pojedinih signala u u piramidnim neuronima te dijeljenjem tog ukupnog broja signala s površinom analiziranog područja preparata. Rezultati su prikazani kao gustoća imunopozitivnih signala (Tablica 3).

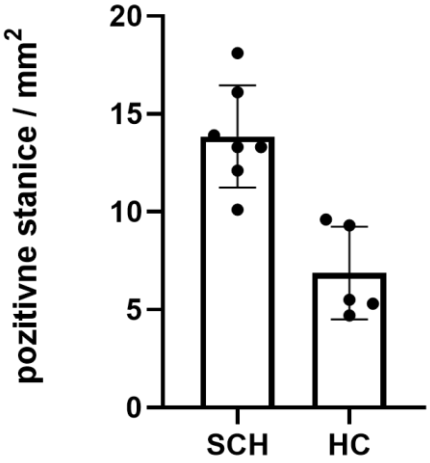
Tablica 3: Rezultati imunohistokemijskog bojanja na NLRP1 inflamasom

	Broj + signala u piramidnim neuronima	**Površina [mm^2]**	**Gustoća signala/mm^2**
ČO 354	254	47,8	5,3
ČO 356	1020	184,1	5,5
ČO 357	558	58	9,6
KONT4	422	89,7	4,7
KONT5	1064	114,7	9,3
SCH1	1248	93,6	13,3
SCH2	1224	87,8	13,9
SCH3	830	62,3	13,3
SCH4	648	35,8	18,1
SCH6	1602	158,7	10,1
SCH7	1037	64,4	16,1
SCH8	1010	83,3	12,1

Prisutnost NLRP1 proteina zabilježena je u svim uzorcima, ali imunoreaktivnost na NLRP1 bila je značajno veća u uzorcima SCH skupine, naspram HC uzorcima (Slika 1). Pomoću neparametrijskog Mann-Whitney testa, analizirali su se podaci o izraženosti imunohistokemijskog markera u tkivu SCH i HC skupine te je potvrđena statistički značajna razlika u korist SCH skupine ($p < 0,05$) (Slika 2).



Slika 1. Izraženost NLRP1 proteina u orbitofrontalnom dijelu čeonog režnja jednog odabranog uzorka HC (A,B) i SCH (C,D) pod povećanjem od 10x (B,D) i 20x (A,C). Mjerilo = 100 µm.



Slika 2. Stupanj imunoreaktivnosti NLRP1 inflamasoma u uzorcima. Ukupan izražaj NLRP1 bio je značajno veći u SCH uzorcima u odnosu na HC (p = 0,012).

6. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika u izraženosti NLRP1 inflamasoma u postmortalnim uzorcima osoba sa shizofrenijom i zdravih kontrola te može li se iz tog nalaza odrediti potencijalna uloga NLRP1 u patogenezi shizofrenije.

S obzirom na dobivene rezultate, uočena je statistički značajna razlika između dviju skupina uzoraka. Povećana ekspresija NLRP1 proteina u postmortalnim SCH uzorcima upućuje na veću aktivnost NLRP1 inflamasoma i govori u prilog neuroinflamacije kao jednog od mogućih značajnijih patoloških mehanizama shizofrenije.

Kao što je već ranije spomenuto, na neuroinflamaciju utječu brojni okolišni čimbenici poput infekcije tijekom trudnoće. U istraživanjima na životinjama gdje se analizira aktivacija majčinog imunosnog sustava, koriste se brojni imunološki stimulansi koji mobiliziraju upalne stanice i proupalne citokine (IL-1β, IL-6, and TNF-α). Jedan od korištenih imunostimulatora je poliriboinozinska: poliribocitidilična kiselina, poli (I:C), sintetska dvolančana RNA (50) . Korištenje poli (I:C) modela u istraživanju na glodavcima, pokazao se uspješnim u simuliranju promjena sličnih onima koje se događaju u osoba na čiji je razvoj shizofrenije utjecao imunosni odgovor majke tijekom trudnoće (96). Imunosni odgovor majke induciran pomoću poli (I:C) dovodi do promjena u ponašanju i kognitivnih deficita potomaka u ranoj odrasloj dobi te se ovisno o dozi, u potomaka mogu uočiti patološki fenotipi različite težine. Ovisnost težine simptoma o jačini imunosnog odgovora pruža mogućnost za istraživanje praga učinka na poremećaj neurološkog razvoja. Budući da je dvolančana RNA identificirana kao jedan od aktivatora NLRP1 inflamasoma (92), moguće je da NLRP1 inflamasom igra ulogu u kroničnoj neuroinflamaciji koja prati razvoj shizofrenije, čemu u prilog govore i rezultati ovog istraživanja.

Upalni citokini IL-1β, IL-6, TGF-β identificirani su kao biljezi akutne psihoze u shizofreniji budući da su izmjerene povišene razine tih citokina tijekom psihotične episode, a snižene u remisiji. Također, budući da IL-6 i IL-1β induciraju porast CRP-a, nekoliko istraživanja se bavilo mjerenjem razine CRP-a u krvi koja je također pokazala povišene vrijednosti u akutnom psihotičnom stanju, naspram remisije (97). S obzirom da NLRP1 inflamasom preko kaspaze-1 aktivira IL-1β, logično je pretpostaviti da je razina

NLRP1 inflamasoma također povišena u psihotičnoj epizodi. Ukoliko se NLRP1 inflamasom pokaže kao biljeg akutne psihotične episode, omogućio bi praćenje tijeka bolesti i samim time potencijalnu terapijsku prevenciju relapsa.

7. ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje pokazalo da postoji poveznica između ekspresije NLRP1 inflamasoma i shizofrenije. Ta se tvrdnja očituje u značajnijoj izraženosti NLRP1 proteina u postmortalnim uzorcima osoba sa SCH-om, naspram uzoraka zdravih kontrolnih ispitanika. Aktivirani NLRP1 protein formira inflamasom koji posreduje prirođeni imunosni odgovor tijekom upale pa njegova visoka izraženost u uzorcima osoba sa SCH-om govori u prilog neuroinflamacije kao važne sastavnice u patogenezi shizofrenije.

Ograničenja ovog istraživanja bila su mali broj uzoraka te indirektno praćenje same aktivnosti NLRP1 inflamasoma preko ekspresije NLRP1 proteina.

Potrebno je provesti daljnja istraživanja na većem uzorku koja bi pratila aktivnost NLRP1 inflamasoma u osoba oboljelih od shizofrenije, kako bi se dobila jasnija slika o ulozi ovih upalnih proteinskih kompleksa u patofiziologiji shizofrenije.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Goranu Šimiću na ukazanom povjerenju, strpljenju, pristupačnosti i stručnom vodstvu pri pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i komentorici dr.sc. Eni Španić Popovački na pristupačnosti, podršci i edukaciji pruženoj tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i dr.sc. Lei Langer Horvat na pruženom znanju i pomoći prilikom eksperimentalnog dijela izvođenja ovog diplomskog rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su uljepšali ovih 6 godina i pomogli mi završiti ovo akademsko putovanje.

Za kraj, najveće hvala mojoj obitelji, posebice majci Željki, sestri Luciji i bratu Domagoju koji su mi bili najveća podrška kroz sve sretne i one manje sretne trenutke, bez vas ovo ne bi bilo moguće.

9. LITERATURA

1. Schizophrenia: Definition, symptoms, causes, diagnosis, treatment[internet]. New York City: WebMD;2022[pristupljeno 17.06.2023.] Dostupno na: https://www.webmd.com/schizophrenia/mental-health-schizophrenia

2. Ferrari AJ, Santomauro DF, Herrera AMM, Shadid J, Ashbaugh C, Erskine HE, et al. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet Psychiatry. 2022 Feb;9(2):137–50. doi: 10.1016/S2215-0366(21)00395-3

3. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) data resources[internet]. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation;2021[pristupljeno 17.06.2023.] Dostupno na: https://ghdx.healthdata.org/gbd-2019

4. Chong HY, Teoh SL, Wu DBC, Kotirum S, Chiou CF, Chaiyakunapruk N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016 Feb; 12:357–73. doi: 10.2147/NDT.S96649

5. Mentalni poremećaji u Republici Hrvatskoj[internet].Zagreb:Hrvatski zavod za javno zdravstvo;2022[pristupljeno 20.6.2023.] Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/09/Bilten_Mentalni-poremecaji_2022.pdf

6. American Psychiatric Association. Diagnostic And Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR). Washington D.C.: American Psychiatric Association Publishing; 2022.

7. World Health Organization. International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11). Geneva:World Health Organization; 2022.

8. Kraepelin E. Dementia Praecox and Paraphrenia. 1919 edition. Barclay RM, Robertson GM, ur. New York: R. E. Krieger Publishing; 1971.

9. Bleuler E. Dementia praecox or the group of schizophrenias. New York: International Universities Press; 1950.

10. Karlović D, Aukst Margetić B, Peitl V, Silić A, Bogović Dijaković A, Matešić K. Razvoj koncepcije shizofrenija i poremećaja iz spektra shizofrenija. Zagreb: 2. međunarodni znanstveno-stručni skup Mozak i um: promicanje dobrobiti pojedinca i zajednice;2019.

11. Schneider K, Hamilton M. Clinical psychopathology. New York: Grune&Stratton; 1959.

12. Valle R. Schizophrenia in ICD-11: Comparison of ICD-10 and DSM-5. Rev Psiquiatr Salud Ment. 2020 Apr;13(2):95–104. doi: 10.1016/j.rpsm.2020.01.001

13. Tandon R. The Nosology of Schizophrenia: Toward DSM-5 and ICD-11. Psychiatric Clinics of North America. 2012 Sep 1;35(3):557–569. doi: 10.1016/J.PSC.2012.06.001

14. Picardi A, Viroli C, Tarsitani L, Miglio R, de Girolamo G, Dell'Acqua G, et al. Heterogeneity and symptom structure of schizophrenia. Psychiatry Res. 2012 Aug;198(3):386–394. doi: 10.1016/j.psychres.2011.12.051

15. Lykouras L, Oulis P, Daskalopoulou E, Psarros K, Christodoulou GN. Clinical Subtypes of Schizophrenic Disorders: A Cluster Analytic Study. Psychopathology. 2001;34(1):23–28. doi: 10.1159/000049276

16. Keller WR, Fischer BA, Carpenter Jr. WT. Revisiting the Diagnosis of Schizophrenia: Where have we been and Where are We Going? CNS Neurosci Ther. 2011 Apr;17(2):83–88. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00229.x

17. Gaebel W. Status of Psychotic Disorders in ICD-11. Schizophr Bull. 2012 Nov 1;38(6):895–898. doi: 10.1093/schbul/sbs133

18. Tandon R, Gaebel W, Barch DM, Bustillo J, Gur RE, Heckers S, et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. Schizophr Res. 2013 Oct;150(1):3–10. doi: 10.1016/j.schres.2013.05.028

19. Mattila T, Koeter M, Wohlfarth T, Storosum J, van den Brink W, de Haan L, et al. Impact of DSM-5 Changes on the Diagnosis and Acute Treatment of Schizophrenia. Schizophr Bull. 2015 May;41(3):637–643. doi: 10.1093/schbul/sbu172

20. Štrkalj Ivezić S, Folnegović Šmalc V, Mimica N, Bajs Bjegović M, Makarić G, Bagarić A, et al. Dijagnostičke i terapijske smjernice (algoritam) za liječenje shizofrenije - Preporuke Hrvatskog društva za kliničku psihijatriju Hrvatskoga liječničkog zbora.Liječnički vjesnik : glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora.2001;123:287–292.

21. Hudepohl NS, Nasrallah HA. Antipsychotic drugs.Handb Clin Neurol.2012;106:657–667. doi: doi: 10.1016/B978-0-444-52002-9.00039-5

22. Ali SA, Mathur N, Malhotra AK, Braga RJ. Electroconvulsive Therapy and Schizophrenia: A Systematic Review. Complex Psychiatry. 2019;5(2):75–83. doi: 10.1159/000497376

23. Haddad P, Brain C, Scott J. Nonadherence with antipsychotic medication in schizophrenia: challenges and management strategies. Patient Relat Outcome Meas. 2014 Jun;43-62. doi: 10.2147/PROM.S42735

24. Gaebel W, Zielasek J. Schizophrenia in 2020: Trends in diagnosis and therapy. Psychiatry Clin Neurosci. 2015 Nov;69(11):661–673. doi: 10.1111/pcn.12322

25. Lakhan SE, Vieira KF. Schizophrenia pathophysiology: are we any closer to a complete model?. Ann Gen Psychiatry.2009 May;8(12). doi: 10.1186/1744-859X-8-12

26. Murray RM, Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? BMJ. 1987 Sep;295(6600):681–682. doi: 10.1136/bmj.295.6600.681

27. Weinberger DR. Implications of Normal Brain Development for the Pathogenesis of Schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1987 Jul 1;44(7):660 – 669. doi: 10.1001/archpsyc.1987.01800190080012

28. Rybakowski J. Etiopathogenesis of schizophrenia – the state of the art for 2021. Psychiatr Pol. 2021 Apr 30;55(2):261–274. doi: 10.12740/PP/132953

29. Bayer TA, Falkai P, Maier W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the “Two hit hypothesis.” J Psychiatr Res. 1999 Nov;33(6):543–548. doi: 10.1016/S0022-3956(99)00039-4

30. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a Complex Trait. Arch Gen Psychiatry. 2003 Dec;60(12):1187 – 1192. doi: 10.1001/archpsyc.60.12.1187

31. Stefansson H, Petursson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al. Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. The American Journal of Human Genetics. 2002 Oct;71(4):877–892. doi: 10.1086/342734

32. Garcia RAG, Vasudevan K, Buonanno A. The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 Mar;97(7):3596–3601. doi: 10.1073/pnas.97.7.3596

33. The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. Nat Genet. 2011 Oct;43(10):969–976. doi: 10.1038/ng.940

34. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. Nature. 2016 Feb;530(7589):177–183. doi: 10.1038/nature16549

35. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature. 2014 Jul 22;511(7510):421–427. doi: 10.1038/nature13595

36. Zamanpoor M. Schizophrenia in a genomic era: a review from the pathogenesis, genetic and environmental etiology to diagnosis and treatment insights. Psychiatr Genet. 2020 Feb;30(1):1–9. doi: 10.1097/YPG.0000000000000245

37. Kuepper R, Skinbjerg M, Abi-Dargham A. The Dopamine Dysfunction in Schizophrenia Revisited: New Insights into Topography and Course. Handb Exp Pharmacol. 2012;1–26. doi: 10.1007/978-3-642-25761-2_1

38. Pralong E. Cellular perspectives on the glutamate–monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. Prog Neurobiol. 2002 Jun;67(3):173–202. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00017-5

39. Khavari B, Cairns MJ. Epigenomic Dysregulation in Schizophrenia: In Search of Disease Etiology and Biomarkers. Cells. 2020 Aug;9(8):1837 – 1864. doi: 10.3390/cells9081837

40. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric Complications and Schizophrenia: Historical and Meta-Analytic Review. American Journal of Psychiatry. 2002 Jul;159(7):1080–1092. doi: 10.1176/appi.ajp.159.7.1080

41. Sara GE, Burgess PM, Malhi GS, Whiteford HA, Hall WC. Stimulant and other substance use disorders in schizophrenia: Prevalence, correlates and impacts in a population sample. Australian & New Zealand Journal of Psychiatry. 2014 Nov;48(11):1036–1047. doi: 10.1177/0004867414533838

42. Di Forti M, Marconi A, Carra E, Fraietta S, Trotta A, Bonomo M, et al. Proportion of patients in south London with first-episode psychosis attributable to use of high potency cannabis: a case-control study. Lancet Psychiatry. 2015 Mar;2(3):233–238. doi: 10.1016/S2215-0366(14)00117-5

43. Read J, Argyle N. Hallucinations, Delusions, and Thought Disorder Among Adult Psychiatric Inpatients With a History of Child Abuse. Psychiatric Services. 1999 Nov;50(11):1467–1472. doi: 10.1176/ps.50.11.1467

44. Fisher HL, Jones PB, Fearon P, Craig TK, Dazzan P, Morgan K, et al. The varying impact of type, timing and frequency of exposure to childhood adversity on its association with adult psychotic disorder. Psychol Med. 2010 Dec;40(12):1967–1978. doi: 10.1017/S0033291710000231

45. Cannon M, Caspi A, Moffitt TE, Harrington H, Taylor A, Murray RM, et al. Evidence for Early-Childhood, Pan-Developmental Impairment Specific to Schizophreniform Disorder. Arch Gen Psychiatry. 2002 May;59(5):449 – 456. doi: 10.1001/archpsyc.59.5.449

46. Kinney DK, Teixeira P, Hsu D, Napoleon SC, Crowley DJ, Miller A, et al. Relation of Schizophrenia Prevalence to Latitude, Climate, Fish Consumption, Infant Mortality, and Skin Color: A Role for Prenatal Vitamin D Deficiency and Infections? Schizophr Bull. 2009 Mar;35(3):582–595. doi: 10.1093/schbul/sbp023

47. Hovatta I, Terwilliger JD, Lichtermann D, Mäkikyrö T, Suvisaari J, Peltonen L, et al. Schizophrenia in the genetic isolate of Finland. Am J Med Genet. 1997 Jul;74(4):353–560. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19970725)74:4<353::AID-AJMG3>3.0.CO;2-Q

48. Rantala MJ, Luoto S, Borráz-León JI, Krams I. Schizophrenia: The new etiological synthesis. Neurosci Biobehav Rev. 2022 Nov; 142:104894. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104894

49. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. American Journal of Psychiatry. 2010 Mar;167(3):261–280. doi: 10.1176/APPI.AJP.2009.09030361/ASSET/IMAGES/LARGE/0361TBL6.JPEG

50. Feigenson KA, Kusnecov AW, Silverstein SM. Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. Neurosci Biobehav Rev. 2014 Jan; 38:72–93. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.006

51. Yolken RH, Bachmann S, Rouslanova I, Lillehoj E, Ford G, Torrey EF, et al. Antibodies to Toxoplasma gondii in Individuals with First-Episode Schizophrenia. Clinical Infectious Diseases. 2001 Mar;32(5):842–844. doi: 10.1086/319221

52. Fuglewicz A, Piotrowski P, Stodolak A. Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2017 Sep;26(6):1033–1038. doi: 10.17219/acem/61435

53. Cheslack-Postava K, Brown AS. Prenatal infection and schizophrenia: A decade of further progress. Schizophr Res. 2022 Sep; 247:7–15. doi: 10.1016/j.schres.2021.05.014

54. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. Mol Psychiatry. 2016 Dec;21(12):1696–1709. doi: 10.1038/mp.2016.3

55. Körschenhausen DA, Hampel HJ, Ackenheil M, Penning R, Müller N. Fibrin degradation products in post mortem brain tissue of schizophrenics: a possible marker for underlying inflammatory processes. Schizophr Res. 1996 May;19(2–3):103–109. doi: 10.1016/0920-9964(95)00073-9

56. Khandaker GM, Cousins L, Deakin J, Lennox BR, Yolken R, Jones PB. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. Lancet Psychiatry. 2015 Mar;2(3):258–270. doi: 10.1016/S2215-0366(14)00122-9

57. Kroken RA, Sommer IE, Steen VM, Dieset I, Johnsen E. Constructing the Immune Signature of Schizophrenia for Clinical Use and Research; An Integrative Review Translating Descriptives Into Diagnostics. Front Psychiatry. 2019 Jan 31;9. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00753

58. Fond G, Godin O, Boyer L, Berna F, Andrianarisoa M, Coulon N, et al. Chronic low-grade peripheral inflammation is associated with ultra resistant schizophrenia. Results from the FACE-SZ cohort. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2019 Dec;269(8):985–292. doi: 10.1007/s00406-018-0908-0

59. Yee JY, Nurjono M, Ng WY, Teo SR, Lee TS, Lee J. Peripheral blood gene expression of acute phase proteins in people with first episode psychosis. Brain Behav Immun. 2017 Oct; 65:337–341. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.006

60. Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Wang L, Leweke FM, et al. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. Mol Psychiatry. 2012 May 12;17(5):494–502.doi: 10.1038/mp.2011.42

61. De Hert M, van Winkel R, Van Eyck D, Hanssens L, Wampers M, Scheen A, et al. Prevalence of diabetes, metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia over the course of the illness: a cross-sectional study Clin Pract Epidemiol Ment Health. 2006;2(1):14.doi: 10.1186/1745-0179-2-14

62. Vallée A. Neuroinflammation in Schizophrenia: The Key Role of the WNT/β-Catenin Pathway. Int J Mol Sci. 2022 Mar;23(5). doi: 10.3390/IJMS23052810

63. Dabiri M, Dehghani Firouzabadi F, Yang K, Barker PB, Lee RR, Yousem DM. Neuroimaging in schizophrenia: A review article. Front Neurosci. 2022 Nov 15; 16.doi: 10.3389/fnins.2022.1042814

64. Pasternak O, Westin CF, Bouix S, Seidman LJ, Goldstein JM, Woo TUW, et al. Excessive Extracellular Volume Reveals a Neurodegenerative Pattern in Schizophrenia Onset. J. Neurosci. 2012 Nov 28;32(48):17365–17372. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2904-12.2012

65. Schwartz M, Butovsky O, Brück W, Hanisch UK. Microglial phenotype: is the commitment reversible? Trends Neurosci. 2006 Feb;29(2):68–74. doi: 10.1016/j.tins.2005.12.005

66. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell. 2010 Mar;140(6):805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022

67. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. Mol Cell. 2002 Aug;10(2):417–426. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3

68. Dagenais M, Skeldon A, Saleh M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. Cell Death Differ.2011;19:5–12. doi: 10.1038/cdd.2011.159

69. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Cell.2010 Mar;140(6):821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040

70. Koonin E V., Aravind L. The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. Trends Biochem Sci. 2000 May;25(5):223–224. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01577-2

71. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei Med J. 2016;57(1):5. doi: 10.3349/ymj.2016.57.1.5

72. Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. Immunol Rev. 2011 Sep;243(1):109–118.doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01053.x

73. Ireton RC, Gale M. RIG-I Like Receptors in Antiviral Immunity and Therapeutic Applications. Viruses. 2011 Jun;3(6):906–919.doi: 10.3390/V3060906

74. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1β production. Nat Immunol. 2010 Jan;11(1):63–69. doi: 10.1038/ni.1824

75. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differ. 2007; 14:10–22. doi: 10.1038/sj.cdd.4402038

76. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle L Vande, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature. 2011 Nov;479(7371):117–121. doi: 10.1038/nature10558

77. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. Cell. 2014 Mar;156(6):1193–1206. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.008

78. Sborgi L, Ravotti F, Dandey VP, Dick MS, Mazur A, Reckel S, et al. Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. PNAS Nexus. 2015 Oct;112(43):13237–13242. doi: 10.1073/pnas.1507579112

79. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. Journal of Cell Biology. 2016 Jun 20;213(6):617–629. doi: 10.1083/jcb.201602089

80. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. Infect Immun. 2005 Apr;73(4):1907–1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005

81. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. Cell. 2014 May;157(5):1013–1022. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007

82. Broz P, Monack DM. Pearls Noncanonical Inflammasomes: Caspase-11 Activation and Effector Mechanisms. PLoS Pathog. 2013;9(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1003144

83. Gomes MTR, Cerqueira DM, Guimarães ES, Campos PC, Oliveira SC. Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. J Leukoc Biol. 2019 Sep;106(3):553–562. doi: 10.1002/JLB.4MR0119-013R

84. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Feb;4(2):95–104. doi: 10.1038/nrm1019

85. Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, et al. Autolytic Proteolysis within the Function to Find Domain (FIIND) Is Required for NLRP1 Inflammasome Activity. J. Biol. Chem. 2012 Jul;287(30):25030–25037. doi: 10.1074/jbc.M112.378323

86. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Dec;6(12):a016287–a016287. doi: 10.1101/cshperspect.a016287

87. Chavarría-Smith J, Vance RE. The NLRP1 inflammasomes. Immunol Rev. 2015 May;265(1):22–34. doi: 10.1111/imr.12283

88. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. Nat Genet. 2006 Feb 22;38(2):240–244. doi: 10.1038/ng1724

89. Bauernfried S, Hornung V. Human NLRP1: From the shadows to center stage. Journal of Experimental Medicine. 2022 Jan 3;219(1). doi: 10.1084/jem.20211405

90. Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. Cell. 2016 Sep;167(1):187-202. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.001

91. Robinson KS, Teo DET, Tan K Sen, Toh GA, Ong HH, Lim CK, et al. Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. Science. 2020 Dec;370(6521). doi: 10.1126/science.aay2002

92. Bauernfried S, Scherr MJ, Pichlmair A, Duderstadt KE, Hornung V. Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. Science. 2021 Jan 29;371(6528). doi: 10.1126/science.abd0811

93. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 May 8;104(19):8041–8046. doi: 10.1073/pnas.0611496104

94. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome Components NALP 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2007 May 22;55(5):443–452. doi: 10.1369/jhc.6A7101.2006

95. Mladinov M. Raspodjela i izraženost dopaminskih D2 receptora u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka i miša.[disertacija na internetu]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet;2016[pristupljeno 10.6.2023.] Dostupno na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:416670

96. Meyer U, Feldon J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. Neuropharmacology. 2012 Mar;62(3):1308–1321. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.009

97. Miller BJ, Buckley PF. Is Relapse in Schizophrenia an Immune-Mediated Effect? Focus (Madison). 2012 Jan;10(2):115–123. doi: 10.1176/appi.focus.10.2.115

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17.08.1998. u Zagrebu gdje i stanujem. Završila sam OŠ Malešnicu i 2013. upisala opći smjer Gimnazije Lucijana Vranjanina. Maturirala sam 2017. godine te tada upisala Medicinski fakultet u Zagrebu.

Bila sam član Sekcije za arterijsku hipertenziju te s njome sudjelovala u javnozdravstvenoj akciji „Lov na tihog ubojicu" pod vodstvom akademika prof. dr. sc. Bojana Jelakovića. Za taj smo društveno – koristan rad 2022. godine dobili Rektorovu nagradu.

Tijekom studiranja trudila sam se uključiti u izvannastavne aktivnosti fakulteta (StePP edukacija za niže godine, radionice šivanja Sekcije za kirurgiju, sudjelovanja na kongresima) te stjecati neko radno iskustvo izvan fakulteta (rad kao promotor farmaceutskih proizvoda za firmu DEKRA).

Zadnju godinu studiranja pjevala sam u Pjevačkom zboru studenata Medicinskog fakulteta „Lege Artis".

Slobodno vrijeme izvan fakulteta provodila sam u krugu prijatelja i obitelji te baveći se svojim najdražim hobijem, plesom.

Aktivno se služim engleskim jezikom te pasivno njemačkim jezikom.