

Rezumat teză de doctorat

Modificările genetice asociate schizofreniei

Doctorand **Corina Nicoleta Mărginean**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Liana Fodoreanu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Schizofrenia	17
1.1. Definiție și evoluție conceptuală	17
1.2. Epidemiologia schizofreniei	19
1.3. Etiopatogenia schizofreniei	20
1.3.1. Ipoteza vulnerabilității genetice	20
1.3.2. Ipoteza neuroanatomică și imagistică	20
1.3.3. Ipoteza neurochimică	21
1.3.4. Ipoteza infecțioasă, autoimună, complicații obstetricale	22
1.3.5. Ipoteza diateză-stres (sau a vulnerabilității)	22
1.3.6. Ipoteza socio-culturală	22
1.3.7. Ipotezele psihanalitice	23
2. Aspecte clinice în schizofrenie	25
2.1. Criterii de diagnostic	25
2.2. Clinica schizofreniei	26
2.3. Formele clinice	27
2.3.1. Schizofrenia paranoidă:	27
2.3.2. Schizofrenia catatonică	28
2.3.3. Schizofrenia dezorganizată, hebefrenică	28
2.3.4. Schizofrenia nediferențiată	28
2.4. Evoluție	28
2.5. Prognostic	29
2.6. Principii terapeutice în schizofrenie	29

3. Noile cercetări existente în domeniul geneticii	31
4. Schizofrenia rezistentă la tratament	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/ obiectivele studiului	47
2. Material și metodă	48
2.1 Selecția și descrierea populației de studiu	48
2.2 Criterii de includere	48
2.3 Criterii de excludere	49
2.4 Instrumente clinice	49
2.4.1 Scala de evaluare a simptomatologiei pacienților: PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale)	49
2.4.2 Scala de evaluare a severității simptomatologiei: CGI-S (Clinical Global Impression) și evaluarea răspunsului terapeutic	51
2.4.3 Scala de evaluare globală a funcționării (Global Assessment of Functioning - GAF)	51
3. Material și metode de genetică moleculară	52
4. Analiza statistică	53
5. Studiul 1: Implicațiile polimorfismelor genei MTHFR în etiologia schizofreniei	55
5.1 Introducere	55
5.2 Ipoteza de lucru/obiective	56
5.3 Material și metodă	56
5.3.1 Selecția și descrierea populației de studiu	56
5.3.2. Evaluarea clinică	57
5.3.3. Determinările genetice	57
5.3.4 Analiza statistică	58
5.4 Rezultate	58
5.5 Discuții	62
5.6 Concluzii	65

6. Studiul 2: Implicațiile mutațiilor MTHFR în apariția schizofreniei rezistente	67
6.1 Introducere	67
6.2 Ipoteza de lucru	69
6.3 Material și metodă	69
6.3.1 Selectarea și descrierea populației de studiu	69
6.3.2. Evaluare clinică	70
6.3.3 Determinari genetice	71
6.3.4 Analiza statistică	72
6.4 Rezultate	72
6.5 Discuții	76
6.6 Concluzii	79
7. Studiul 3: Relația între polimorfismele genei MTHFR și tabloul clinic al schizofreniei	81
7.1 Introducere	81
7.2 Ipoteza de lucru	83
7.3 Material și metodă	84
7.3.1 Selectarea și descrierea populației de studiu	84
7.3.2. Evaluare clinică	85
7.3.3 Determinări genetice	85
7.3.4 Analiza statistică	86
7.4 Rezultate	86
7.5. Discuții	89
7.6. Concluzii	92
8. Discuții generale	93
9. Concluzii generale	101
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	103
REFERINȚE	105

Cuvinte cheie: MTHFR, polimorfism, schizofrenie

INTRODUCERE

Schizofrenia reprezintă o afecțiune cu o etiologie insuficient cunoscută, cu debut la vârstă tânără, morbiditate crescută, cu severitate și evoluție influențate atât de factori genetici cât și de factori precipitanți și socioculturali.

Cercetări recente sugerează o implicare a mecanismelor de metilare, dependente de metabolismul homocisteinei. Prin urmare, cercetarea asocierii activității MTHFR, principala enzimă care limitează viteza de reacție în ciclul homocisteinei, cu riscul de apariție și evoluția clinică a schizofreniei este de o importanță deosebită. Enzima MTHFR joacă un rol central în metabolismul acidului folic prin transformarea ireversibilă a 5,10- MTHF (metilenetetrahidrofolatul) în 5-MTHF, forma circulantă predominantă a acidului folic. 5-MTHF are un rol crucial în one-carbone metabolism precum și în metilarea ADN.

Răspunsul diferit la tratament reprezintă o realitate care ar putea ajuta la divizarea schizofreniei în subtipuri biologic distincte prin utilizarea unor markeri genetici, acest lucru reprezentând un pas semnificativ spre introducerea unui medicament personalizat în tratamentul schizofreniei.

Studiul de față încearcă să evidențieze un posibil marker genetic corelat cu schizofrenia rezistentă la tratament și respectiv cea responsivă la tratament care să reconfirme ipoteza că cele două forme de schizofrenie sunt subtipuri categoriale distincte.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Este o prezentare sintetică structurată în patru capitole a datelor teoretice despre schizofrenie începând cu definiția bolii, istoricul schizofreniei continuând cu date epidemiologice, etiopatogenetice și ulterior aspectele clinice și terapeutice ale schizofreniei. Un capitol este reprezentat de noile cercetări privind genetica schizofreniei, studierea polimorfismelor genetice și în mod special ale MTHFR în schizofrenie. Capitolul final cuprinde principalele aspecte care vizează schizofrenia rezistentă la tratament.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Cercetarea personală cuprinde trei studii privind rolul mutațiilor genei MTHFR în predispoziția schizofreniei, relațiile acestor mutații cu o evoluție nefavorabilă a bolii și corelațiile între simptomatologia clinică și prezența mutațiilor MTHFR.

Persoanele participante la studiu au fost selectate din rândul pacienților care s-au prezentat la internare în Clinica Psihiatrie I și Centrul de Sănătate Mintală din cadrul Spitalului Clinic Județean Cluj, în perioada 1.04.2011-30.10.2011. Protocolul studiului a fost aprobat de Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu". Pacienților li s-a cerut acordul de a participa la studiu, li s-a explicat scopul studiului și li s-a solicitat să semneze un formular de consimțământ.

Prezența și intensitatea simptomelor negative, pozitive și generale a fost evaluată utilizând o scală PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale*), s-a evaluat severitatea bolii în momentul luării în studiu utilizând

scorul CGI-S(*Clinical Global Impression*) și funcționalitatea globală utilizând scala GAF (*Global Assessment Functioning*).

Determinările genetice:

Participanților li s-a recoltat 2ml sânge venos din plica cotului pe EDTA, iar probele de sânge au fost transportate în aceeași zi și prelucrate la Catedra de Biochimie Medicală din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, unde s-a efectuat izolarea și purificarea ADN prin metoda PCR de amplificare și digestie enzimatică. Izolarea ADN-ului s-a efectuat utilizând kitul ZymoResearch (ZR Genomic DNA II kit™).

Analiza statistică

Pentru descrierea distribuției datelor au fost calculați parametrii de centralitate adecvați pentru datele cantitative și proporțiile, exprimate procentual, pentru cele calitative. Eventualele diferențe de distribuție între loturi a datelor calitative au fost testate prin utilizarea testului Chi-patrat, respectiv Fisher Exact, după caz. Testarea distribuției normale a variabilelor cantitative a fost realizată utilizând testul Kolmogorov-Smirnov. Testarea diferențelor înregistrate în distribuția variabilelor cantitative între două loturi a fost realizată utilizând testul t-Student, iar pentru mai mult de două loturi a fost utilizat testul ANOVA. Valoarea prag a α a fost stabilită la 0.05. Analiza statistică a datelor a fost realizată utilizând Statistical Pack for Social Sciences (SPSS™) versiunea 22 (IBM, SUA).

Studiul 1 - Implicațiile polimorfismelor genei MTHFR în etiologia schizofreniei

Ipoteza de lucru: Studiul de față are ca scop identificarea mutațiilor în gena MTHFR care pot reprezenta un factor de risc pentru apariția schizofreniei, participând la crearea susceptibilității genetice pentru această tulburare, precum și asocierea dintre polimorfismele genei și vârsta de debut a bolii. Această ipoteză a fost verificată în studiul nostru prin testarea frecvenței de apariție a mutațiilor C677T și A1298C la un lot de participanți cu schizofrenie, față de un lot martor.

Material și metodă: Au participat 62 de pacienți care au semnat consimțământul informat. Criteriile de includere în studiu au fost: diagnosticul de schizofrenie conform criteriilor ICD-10 și DSM IV-TR vârsta peste 18 ani, capacitatea de a înțelege semnarea consimțământului informat și etnia română. Au fost excluși participanții cu: comorbidități psihiatrice sau somatice semnificative, tratament medicamentos care este posibil să influențeze tabloul clinic și pacienții care erau incapabili să înțeleagă instrucțiunile sau să ofere consimțământul informat la momentul prezentării.

Lotul martor a cuprins 60 de subiecți voluntari, sănătoși aleși aleator, fără istoric personal și familial de boală psihică, fără relații de familie cu pacienții din studiu. Voluntarii au semnat și ei un formular de consimțământ informat înainte de includerea în studiu.

Rezultate:

În cadrul studiului am demonstrat că mutația genei MTHFR în poziția C677T a fost mult mai frecventă la lotul de pacienți cu schizofrenie comparativ cu lotul martor, numărul heterozigoților fiind semnificativ crescut ceea ce sugerează implicarea polimorfismului MTHFR C667T în patogeneza bolii($p = 0.006$). Evaluarea mutației genei MTHFR în poziția A1298C nu are semnificație statistică , nefiind găsită o asocire între această mutație și schizofrenie.

Pacienții heterozigoți cu mutația A1298C au avut o vârstă de debut a bolii mai tânără comparativ cu pacienții homozigoți AA, existând o asociere semnificativă statistic($p=0.009$). În schimb corelația a fost

lipsită de semnificație statistică în cazul mutației C667T la care nu s-a găsit nici o asocierie cu vârsta de debut a schizofreniei.

AHC au existat în număr mare la pacienții heterozigoți față de homozigoți și cei cu genă normală dar fără o semnificație statistică între AHC și mutația genei C667T. În schimb la mutația A1298C și AHC au existat în număr mic la pacienții heterozigoți față de pacienții normali dar și în acest caz corelația a fost lipsită de semnificație statistică.

Concluzii:

1.La lotul de pacienți psihotici luați în studiu se evidențiază prezența mutației heterozigote pentru poziția 677 la un număr semnificativ de mare de pacienți cu schizofrenie comparativ cu lotul martor, numărul heterozigoților fiind semnificativ crescut ceea ce sugerează implicarea polimorfismului MTHFR în patogeneza bolii.

2.Pacienții heterozigoți cu mutația A1298C au avut o vârstă de debut a bolii mai tânără iar pacienții heterozigoți cu mutația C677T au avut antecedente heredocolaterale de patologie psihiatrică (una sau mai multe rude cu boli psihice) acest lucru putând explica evoluția mai trenantă a acestor pacienți și posibila lor rezistență terapeutică la medicația antipsihotică.

3.Cele mai multe studii se referă la pacienții schizofreni cu valori crescute ale homocisteiniei și au ajuns la concluzia că homozigotismul pentru MTHFR poate fi un factor de risc pentru psihoze, administrarea de acid folic diminuând acest risc. Astfel recomandarea unei terapii cu vitamina grup B și acid folic asociată medicației antipsihotice la schizofreni chiar în lipsa dozării folatului și homocisteinei având în vedere conceptul conform căruia genotipul 677TT poate fi asociat cu creșterea homocisteinei și efectul benefic recunoscut al suplimentării tratamentului cu acid folic asupra activității enzimei MTHFR.

Studiul 2 - Implicațiile mutațiilor MTHFR în apariția schizofreniei rezistente

Ipoteza de lucru: Scopul studiului a fost evaluarea asocierii dintre prezența polimorfismelor genei MTHFR C677T și A1298C și schizofrenia rezistentă la tratament. De asemenea s-a încercat stabilirea unei corelații între prezența polimorfismelor și severitatea mai mare a bolii, respectiv și funcționalitatea mai slabă a acestor pacienți.

Material și metodă: Criteriile de includere în studiu au fost: pacienți cu diagnosticul primar de schizofrenie conform criteriilor ICD-10 și DSM IV-TR, împărțiți în două subgrupe de pacienți cu diagnosticul de schizofrenie rezistentă, tratați cu clozapină respectiv de pacienți cu schizofrenie non-rezistentă, care răspund la antipsihotice non-clozapinice conform criteriilor care definesc schizofrenia rezistentă (durată a bolii, switch-uri de medicamente, funcționare deficitară-GAF și severitatea bolii în momentul luării în studiu-CGI-S). Rezistența la tratament este definită de starea clinică actuală și include pacienții care au urmat tratament cu cel puțin două antipsihotice în doze adecvate, pe o perioadă de timp corespunzătoare fără a se obține remisiune. Pacienții incluși în ambele subgrupe sunt pacienți capabili să înțeleagă informațiile legate de studiu. Criteriile de excludere au fost : rezistență la tratament definită după administrarea unui singur antipsihotic în doză corespunzătoare pe o perioadă de timp adecvată fără a se obține rezultatul terapeutic. Răspunsul la tratament a fost definit numai ca neîndeplinirea criteriilor rezistenței la tratament. Au fost excluși pacienții cu utilizare nocivă, dependență la alcool sau droguri ilicite sau cu tratamente medicamentoase care pot influența tabloul clinic precum și pacienții cu patologii organice asociate, patologii de dezvoltare psihică sau cu alte tipuri de tulburări psihotice. Nu au fost incluși în studiu pacienții incapabili să înțeleagă instrucțiunile sau să semneze consimțământul informat.

Rezultate:

Pacienții cu schizofrenie rezistentă la tratament (N=36, 60,00 %) au fost tratați cu clozapină iar cei cu schizofrenie parțial responsivă (N=24, 40,00 %) au urmat tratament cu antipsihotice non-clozapinice: risperidonă (16,7%), quetiapină (15%), altele : olanzapină, aripiprazol, amisulprid, paliperidonă (8,3%).

În studiul nostru nu am găsit nici o asociere semnificativă între genotipul modificat al genei MTHFR în poziția 677 la lotul de pacienți rezistenți comparativ cu cei non-rezistenți deși se observă un număr mai mare de pacienți cu genotip modificat în lotul de pacienți cu rezistență terapeutică (63,%) comparativ cu cei cu non rezistență terapeutică.

Similar s-a studiat și mutația genei MTHFR în poziția 1298 la lotul de pacienți cu rezistență terapeutică comparativ cu pacienții cu non-rezistență fără a exista o asociere semnificativă între rezistența la tratament și mutația A1298, deși și în acest caz se observă că un număr mai mare de pacienți cu rezistență terapeutică au avut genotipul modificat (61,1%) comparativ cu lotul de pacienți cu non rezistență.

Analizând heterozigotismul compus al genotipurilor modificate se observă o frecvență crescută a acestora la pacienții cu rezistență la tratament comparativ cu cei cu non rezistență terapeutică ($p=0,04$), în schimb nu apar diferențe semnificative a homozigotismului compus în relație cu severitatea și funcționalitatea pacienților.

Concluzii:

- 1.Studiul de față demonstrează că nu a fost găsită nici o asociere semnificativă între mutațiile genei MTHFR în pozițiile C677T și A1298C și rezistența terapeutică deși numărul de pacienți cu genotipul modificat în lotul cu rezistență terapeutică este mai mare comparativ cu numărul de pacienți în lotul cu non-rezistență terapeutică la ambele tipuri de mutație ale genei MTHFR.
- 2.De asemenea, nu s-a putut demonstra o relație între mutațiile genei MTHFR în pozițiile C677T și A1298C și severitatea bolii sau funcționarea globală a persoanelor afectate.
3. Heterozigotismul compus al genotipurilor modificate se asociază cu o frecvență crescută la pacienții cu rezistență la tratament comparativ cu cei cu non rezistență terapeutică ($p=0,04$).

Studiul 3 - Relația între polimorfismele genei MTHFR și tabloul clinic al schizofreniei

Ipoteza de lucru: A fost testată asocierea alelei T în poziția 677, respectiv a alelei C în poziția 1298 a genotipului MTHFR cu intensitatea simptomatologiei bolii schizofrene, precum și a simptomatologiei pozitive, negative și generale.

Marerial și metodă: Au fost respectate criteriile de includere și excludere ale celor două studii anterioare. Criteriile de încadrare a severității simptomatologiei la scala PANSS pe gradele ușoară, moderată și severă s-a realizat pornind de la evaluarea fiecărui item pe o scară de la 1 la 7 în funcție de severitate, de la absent-1, ușor: 2-3, moderat: 4-6 și sever: 6-7. Scala simptomelor pozitive conține 7 itemi: min.7-max.49, scala simptomelor negative conține 7 itemi: min.7-max.49 și scala simptomelor generale conține 16 itemi: min.16-max.112.

Rezultate:

În studiul nostru s-a testat existența unei corelații între mutația genei MTHFR în poziția C677, respectiv în poziția A1298 și simptomatologia predominantă a tabloului de boală psihică și anume simptomatologia pozitivă, negativă sau generală. Nu s-au observat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește intensitatea simptomatologiei per ansamblu sau pe subscale de simptome pozitive, negative sau generale în funcție de genotipul MTHFR în poziția 677, respectiv în poziția 1298.

Mutațiile MTHFR în poziția 677 și respective în poziția 1298 nu s-au asociat cu diferențe semnificative ale severității simptomatologiei generale a bolii, precum și pe scalele pozitivă și negativă a bolii schizofrene.

Din cei 24 de pacienți responsivi la tratament, predominanța simptomelor pozitive se regăsește în proporție de 58,3% comparativ cu predominanța ambelor simptomatologii, pozitivă și negativă care sunt prezente în proporție de 41,7% dintre pacienți. Dintre pacienții cu rezistență terapeutică, simptomatologia pozitivă este dominantă în proporție de 77,8% comparativ cu predominanța ambelor simptomatologii, pozitivă și negativă în proporție de 22,2%. Datele obținute în studiul de față arată că nu există o relație semnificativă între prezența sau absența rezistenței la tratament și tipul de simptomatologie care domină tabloul clinic, simptomatologia pozitivă dominând tabloul clinic atât al pacienților responsivi la tratament, cât și al celor cu rezistență la tratament.

Concluzii:

1. Mutațiile MTHFR C677T și A 1298C nu influențează intensitatea sau severitatea simptomelor schizofrenice (pozitive, negative sau per total).
2. Pacienții care dezvoltă rezistență la tratament nu au un tablou clinic dominat de un anumit tip de simptome schizofrenice (pozitive sau negative).

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI:

1.Evidențierea implicării polimorfismului genei MTHFR în patogeneza schizofreniei la lotul de pacienți luat în studiu.

2.Corelațiile mutațiilor MTHFR și rezistența la tratament nu a fost studiată până în prezent în România, acest fapt fiind în congruență cu lipsa de asociere a unui astfel de studiu într-o țară europeană existând la ora actuală un număr insuficient al studiilor de asociere care să confirme sau să infirme rezultatele obținute.

3.Studiul de față a încercat să evidențieze un posibil marker genetic corelat cu schizofrenia rezistentă la tratament și respectiv cea responsivă la tratament care să reconfirme ipoteza că cele două forme de schizofrenie sunt subtipuri categoriale distincte. Acest lucru ar reprezenta un prim pas spre medicina personalizată în psihiatrie.

4.Caracterul transdisciplinar al acestui studiu care implică psihiatria biologică și genetica medicală existând la ora actuală o nevoie urgentă de explorare științifică a neurobiologiei moleculare a schizofreniei precum și definirea unor noi obiective de tratament și dezvoltare de substanțe inovatoare. Progresul de-a lungul acestei linii ar putea permite medicilor să ușureze povara bolii la pacienții schizofrenici.

Abstract of the doctoral thesis

Genetic changes associated with schizophrenia

Doctoral candidate **Corina Nicoleta Mărginean**

Doctoral supervisor **Prof. Dr. Liana Fodoreanu**

Cluj-Napoca 2017



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Schizophrenia	17
1.1. Definition and evolution of the concept	17
1.2. Epidemiology of schizophrenia	19
1.3. Etiopathogenesis of schizophrenia	20
1.3.1. The hypothesis of genetic vulnerability	20
1.3.2. The neuroanatomical and imaging hypothesis	20
1.3.3. The neurochemical hypothesis	21
1.3.4. The infectious, autoimmune disease, obstetric complications hypothesis	22
1.3.5. The diathesis-stress (or vulnerability) hypothesis	22
1.3.6. The socio-cultural hypothesis	22
1.3.7. Psychoanalytical hypotheses	23
2. Clinical aspects in schizophrenia	25
2.1. Diagnostic criteria	25
2.2. Clinical picture of schizophrenia	26
2.3. Clinical forms	27
2.3.1. Paranoid schizophrenia	27
2.3.2. Catatonic schizophrenia	28
2.3.3. Disorganized hebephrenic schizophrenia	28
2.3.4. Undifferentiated schizophrenia	28
2.4. Evolution	28
2.5. Prognosis	29
2.6. Therapeutic principles in schizophrenia	29

3. New research in the field of genetics	31
4. Treatment-resistant schizophrenia	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis/objectives of the study	47
2. Material and method	48
2.1. Selection and description of the study population	48
2.2. Inclusion criteria	48
2.3. Exclusion criteria	49
2.4. Clinical instruments	49
2.4.1. Scale for the evaluation of patient symptoms: PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale)	49
2.4.2. Scale for the evaluation of symptom severity: CGI-S (Clinical Global Impression) and therapeutic response	51
2.4.3. The Global Assessment of Functioning (GAF) Scale	51
3. Molecular genetics material and methods	52
4. Statistical analysis	53
5. Study 1: Implications of MTHFR gene polymorphisms in the etiology of schizophrenia	
5.1. Introduction	55
5.2. Hypothesis/objectives	56
5.3. Material and method	56
5.3.1. Selection and description of the study population	56
5.3.2. Clinical evaluation	57
5.3.3. Genetic determinations	57
5.3.4. Statistical analysis	58
5.4. Results	58
5.5. Discussions	62
5.6. Conclusions	65

6. Study 2 : Implications of MTHFR mutations in the development of treatment-resistant schizophrenia	67
6.1. Introduction	67
6.2. Hypothesis	69
6.3. Material and method	69
6.3.1. Selection and description of the study population	69
6.3.2. Clinical evaluation	70
6.3.3. Genetic determinations	71
6.3.4. Statistical analysis	72
6.4. Results	72
6.5. Discussions	76
6.6. Conclusions	79
 7. Study 3: The relationship between MTHFR gene polymorphisms and the clinical picture of schizophrenia	 81
7.1. Introduction	81
7.2. Hypothesis	83
7.3. Material and method	84
7.3.1. Selection and description of the study population	84
7.3.2. Clinical evaluation	85
7.3.3. Genetic determinations	85
7.3.4. Statistical analysis	86
7.4. Results	86
7.5. Discussions	89
7.6. Conclusions	92
8. General discussions	93
9. General conclusions	101
10. Originality and innovative contributions of the thesis	103
REFERENCES	105

Key words: MTHFR, polymorphism, schizophrenia

INTRODUCTION

Schizophrenia is a disorder with an insufficiently known etiology, with onset at a young age and high morbidity, its severity and evolution being influenced by genetic as well as precipitating and socio-cultural factors.

Recent research suggests an implication of methylation mechanisms, dependent on homocysteine metabolism. Consequently, the study of the association of the activity of MTHFR, the main enzyme that limits the reaction speed in the homocysteine cycle, with the risk of development and clinical evolution of schizophrenia, is particularly important. The MTHFR enzyme plays a central role in folic acid metabolism through the irreversible conversion of 5,10-MTHF (methylenetetrahydrofolate) to 5-MTHF, the predominant circulating form of folic acid. 5-MTHF plays a crucial role in one-carbon metabolism as well as in DNA methylation.

The different response to treatment is a reality that might help in dividing schizophrenia into biologically distinct subtypes by using genetic markers, which represents a significant step towards the introduction of a personalized drug in the treatment of schizophrenia.

This study aims to evidence a potential genetic marker correlated with treatment-resistant schizophrenia and treatment-responsive schizophrenia, respectively, in order to reconfirm the hypothesis that the two forms of schizophrenia are distinct categorical subtypes.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This is a synthetic presentation, structured in four chapters of theoretical data about schizophrenia, starting with the definition of the disease, the history of schizophrenia, continuing with epidemiological, etiopathogenetic data and subsequently, the clinical and therapeutic aspects of schizophrenia. A chapter is devoted to the new research regarding the genetics of schizophrenia, the study of genetic polymorphisms, particularly MTHFR, in schizophrenia. The final chapter deals with the main aspects related to treatment-resistant schizophrenia.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal research comprises three studies on the role of MTHFR gene mutations in the predisposition to schizophrenia, the relationships of these mutations with an unfavorable evolution of the disease, and the correlations between clinical symptomatology and the presence of MTHFR mutations.

The participants in the study were selected from patients who presented for admission to the Clinic of Psychiatry I and the Mental Health Center of the Cluj County Clinical Hospital in the period 1.04.2011-30.10.2011. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the "Iuliu Hațieganu" UMPH. The patients were asked to give their consent to participate in the study, they were explained the purpose of the study and were invited to sign a consent form.

The presence and intensity of negative, positive and general symptoms were evaluated using the PANSS scale (*Positive and Negative Syndrome Scale*), the severity of the disease at the time of inclusion in the

study was assessed using the CGI-S (*Clinical Global Impression*) score, and global functioning was evaluated using the GAF (*Global Assessment Functioning*) scale.

Genetic determinations

The participants underwent collection of 2 ml venous blood from the elbow fold on EDTA, and the blood samples were sent the same day to the Department of Medical Biochemistry of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, where they were processed. DNA isolation and purification were performed by PCR amplification and enzymatic digestion. DNA isolation was carried out using the ZymoResearch kit (ZR Genomic DNA II kit™).

Statistical analysis

To describe data distribution, adequate centrality parameters for quantitative data and proportions expressed as percentage for qualitative data were calculated. Potential distribution differences of qualitative data between the groups were tested via the chi-square test or Fisher's exact test, depending on the case. The normal distribution of quantitative variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The differences in the distribution of quantitative variables between two groups were tested by the t-Student test, and for more than two groups, the ANOVA test was used. The threshold value of α was set at 0.05. Statistical data analysis was performed with the Statistical Pack for Social Sciences (SPSS™) version 22 (IBM, USA).

Study 1 - Implications of MTHFR gene polymorphisms in the etiology of schizophrenia

Hypothesis: This study aims to identify MTHFR gene mutations that can be a risk factor for the development of schizophrenia, participating in the creation of genetic susceptibility for this disorder, as well as the association between the gene polymorphisms and the disease onset age. This hypothesis was verified in our study by testing the frequency of C677T and A1298C mutations in a group of participants with schizophrenia compared to a control group.

Material and method: The study included 62 patients who signed the informed consent. The study inclusion criteria were: a diagnosis of schizophrenia according to ICD-10 and DSM IV-TR criteria, age over 18 years, the ability to understand the signing of the informed consent, and Romanian ethnicity. The following participants were excluded: patients with significant psychiatric or somatic comorbidities, drug treatment susceptible of influencing the clinical picture, and patients incapable of understanding instructions or giving their informed consent at the time of presentation.

The control group included 60 randomly chosen healthy volunteer subjects, without a personal or family history of mental disease, unrelated to the study patients. The volunteers also signed an informed consent form before inclusion in the study.

Results:

In this study, we demonstrated that the MTHFR gene mutation at position C677T was much more frequent in the group of patients with schizophrenia compared to the control group, the number of heterozygotes being significantly higher, which suggests the implication of the MTHFR C667T polymorphism in the pathogenesis of the disease ($p = 0.006$). The evaluation of the MTHFR gene mutation at position A1298C had no statistical significance, no association between this mutation and schizophrenia being found.

Heterozygous patients with the A1298C mutation had a younger disease onset age compared to AA homozygous patients, with a statistically significant association ($p=0.009$). In contrast, the correlation was

statistically insignificant in the case of the C667T mutation, for which no association with the onset age of schizophrenia was found.

A family history of schizophrenia was present in a high number of heterozygous patients compared to homozygous and normal gene patients, but without statistical significance between family history and the C667T gene mutation. In contrast, for the A1298C mutation, family history was present in a small number of heterozygous patients compared to normal patients, but this correlation was also without statistical significance.

Conclusions:

1. In the group of psychotic patients included in the study, the presence of the heterozygous mutation for position 677 was evidenced in a significantly higher number of patients with schizophrenia compared to the control group, the number of heterozygotes being significantly increased, which suggests the implication of MTHFR polymorphism in the pathogenesis of the disease.
2. Heterozygous patients with the A1298C mutation had a younger disease onset age, and heterozygous patients with the C667T mutation had a family history of psychiatric pathology (one or more relatives with mental diseases), which might explain the slower evolution of these patients and their potential treatment resistance to antipsychotic medication.
3. Most studies refer to schizophrenic patients with high homocysteine values and conclude that MTHFR homozygosity can be a risk factor for psychosis, the administration of folic acid reducing this risk. Thus, therapy with group B vitamin and folic acid associated with antipsychotic medication is recommended for schizophrenic patients, even in the absence of folate and homocysteine dosage, considering the concept according to which the 677TT genotype can be associated with an increase in homocysteine and the recognized beneficial effect of folic acid supplementation on MTHFR enzyme activity.

Study 2 - Implications of MTHFR mutations in the development of treatment-resistant schizophrenia

Hypothesis: The aim of the study was to evaluate the association between the presence of MTHFR C667T and A1298C gene polymorphisms and treatment-resistant schizophrenia. It was also attempted to establish a correlation between the presence of polymorphisms and the higher severity of the disease, the poorer functionality of these patients, respectively.

Material and method: The study inclusion criteria were: patients with a primary diagnosis of schizophrenia according to ICD-10 and DSM IV-TR criteria, divided into two subgroups: patients with the diagnosis of treatment-resistant schizophrenia, treated with clozapine, and patients with non-resistant schizophrenia, responding to non-clozapine antipsychotics according to the criteria that define treatment-resistant schizophrenia (disease duration, drug switches, deficient functioning – GAF, and disease severity at the time of inclusion in the study – CGI-S). Treatment resistance was defined by the current clinical state and included patients who received treatment with at least two antipsychotics in adequate doses, over an appropriate time period, without obtaining remission. The patients included in both subgroups were patients capable of understanding the information related to the study. The exclusion criteria were: treatment resistance defined after the administration of a single antipsychotic in an adequate dose, over an appropriate time period, without obtaining therapeutic results. Response to treatment was defined only as non-fulfillment of treatment resistance criteria. Patients with alcohol or drug abuse or dependence or with drug treatments susceptible of influencing the clinical picture, as well as patients with associated organic diseases, mental development disorders or other types of psychotic disorders were excluded from the study. Patients incapable of understanding instructions or signing an informed consent were also excluded.

Results:

Patients with treatment-resistant schizophrenia (N=36, 60.00%) were treated with clozapine, and those with partially responsive schizophrenia (N=24, 40.00%) received treatment with non-clozapine antipsychotics: risperidone (16.7%), quetiapine (15%), other: olanzapine, aripiprazole, amisulpride, paliperidone (8.3%).

In our study, we found no significant association between the altered genotype of the MTHFR gene at position 677 in the group of resistant patients compared to non-resistant patients, although a higher number of patients with an altered genotype were observed in the group of patients with therapeutic resistance (63%) compared to those without therapeutic resistance.

Similarly, the MTHFR gene mutation at position 1298 was studied in the group of patients with treatment resistance compared to non-resistant patients, without a significant association between therapeutic resistance and the A1298 mutation, although in this case also, a greater number of treatment-resistant patients had an altered genotype (61.1%) compared to the group of non-resistant patients.

By analyzing the compound heterozygosity of the altered genotypes, an increased frequency of these was observed in patients with treatment resistance compared to those without therapeutic resistance ($p=0.04$); in contrast, there were no significant differences in compound homozygosity in relation to severity and patient functionality.

Conclusions:

1. This study demonstrates that no significant association was found between MTHFR gene mutations at positions C677T and A1298C and therapeutic resistance, although the number of patients with an altered genotype in the treatment-resistant group was higher compared to the number of patients in the non-resistant group for both types of MTHFR gene mutations.
2. Also, no relationship could be demonstrated between MTHFR gene mutations at positions C677T and A1298C and the disease severity or the global functioning of the affected persons.
3. Compound heterozygosity of the altered genotypes was associated with an increased frequency in patients with treatment resistance compared to those without treatment resistance ($p=0.04$).

Study 3 – The relationship between MTHFR gene polymorphisms and the clinical picture of schizophrenia

Hypothesis: The association of the T allele at position 677, the C allele at position 1298 of the MTHFR genotype, respectively, with the intensity of the general symptoms of schizophrenia as well as positive and negative symptoms was tested.

Material and method: The inclusion and exclusion criteria of the two previous studies were met. The criteria for classifying the severity of symptoms on the PANSS scale as mild, moderate and severe were based on the evaluation of each item on a scale from 1 to 7 depending on severity, from absent: 1, mild: 2-3, to moderate: 4-6 and severe: 6-7. The scale of positive symptoms contains 7 items: min. 7 – max. 49; the scale of negative symptoms contains 7 items: min. 7 – max. 49; and the scale of general symptoms contains 16 items: min. 16 – max. 112.

Results:

Our study tested the presence of a correlation between the MTHFR gene mutation at position C677, at position A1298, respectively, and the predominant symptoms of the mental disease picture, i.e. positive, negative or general symptoms. There were no statistically significant differences regarding the intensity of general symptoms or by subscales of positive and negative symptoms depending on the MTHFR genotype at position 677 and at position 1298, respectively.

MTHFR mutations at position 677 and at position 1298, respectively, were not associated with significant differences in the severity of the general symptoms of the disease, or the positive and negative symptoms of schizophrenia.

Among the 24 treatment-responsive patients, the predominance of positive symptoms was found in a proportion of 58.3% compared to the predominance of both positive and negative symptoms, which were present in a proportion of 41.7% of the patients. Among treatment-resistant patients, positive symptoms were dominant in a proportion of 77.8% compared to the predominance of both positive and negative symptoms in a proportion of 22.2%. The data obtained in the current study evidence no significant relationship between the presence or absence of treatment resistance and the type of predominant symptoms in the clinical picture; positive symptoms dominate the clinical picture of treatment-responsive patients as well as treatment-resistant patients.

Conclusions:

1. MTHFR C677T and A 1298C mutations do not influence the intensity or severity of schizophrenia symptoms (positive, negative or general).
2. Patients who develop treatment resistance do not have a clinical picture dominated by a certain type of schizophrenia symptoms (positive or negative).

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

1. Evidencing the implication of MTHFR gene polymorphisms in the pathogenesis of schizophrenia in the group of studied patients.
2. The correlations between MTHFR mutations and treatment resistance have not been studied so far in Romania, which is consistent with the absence of such association studies in other European countries. There is currently an insufficient number of association studies to confirm or contradict the results obtained.
3. This study aimed to evidence a potential genetic marker correlated with treatment-resistant schizophrenia and treatment-responsive schizophrenia, respectively, in order to reconfirm the hypothesis that the two forms of schizophrenia are distinct categorical subtypes. This would represent a first step towards personalized medicine in psychiatry.
4. The transdisciplinary nature of this study which involves biological psychiatry and medical genetics. There is currently an urgent need to scientifically explore the molecular neurobiology of schizophrenia, as well as to define new therapeutic objectives and develop innovative substances. Progress in this area might allow doctors to alleviate the burden of the disease in schizophrenic patients.