МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА КАНДИДАТ ГЕНИ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С АФЕКТИВНИ РАЗСТРОЙСТВА

Научни ръководители:
Академик проф. д-р В. Митев, дм, дбн;
Доц. Радка Кънева, дб
Консултант: Проф. Иво Кременски

Докторант:
Мина Ангелова Иванова-Стоевска

София, 2015 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение **10**

II. Литературен обзор **12**

II. 1. Класификация на афективните разстройства 12

II. 2. Диагностика на афективните разстройства 14

II. 2.1. Диагностични критерии за депресивен епизод по DSM-IV - Американска психиатрична организация 1994 15

II. 2.2. Диагностични критерии за епизод на мания по DSM-IV - Американска психиатрична организация 1994 16

II. 3. Клинична картина и протичане на АР 17

II. 4. Епидемиология 18

II. 5. Фамилни изследвания 19

II. 5.1. Изследвания на близнаци 20

II. 5.2. Изследвания на осиновени деца 21

II. 6. Рискови фактори, коморбидност 22

II. 7. Ендофенотипи 23

II. 8. Лечение 24

II. 9. Патофизиология 25

II. 10. Етиология на афективните разстройства - хипотези 26

II. 10.1. Биогенно-аминна хипотеза 26

II. 10.1.1. Серотонин 27

II. 10.1.2. Допамин 28

II. 10.1.3. Норадреналин (НА) и Адреналин (А) 30

II. 10.1.4. Хистамин 30

II. 10.2. Други невромедиатори 31

II. 10.2.1. Гама- аминобутирова киселина (GABA) 31

II. 10.2.2. Глутамат, Глутаматергична система 31

II. 10.3. Хипотеза базирана на промени в оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек 32

II. 10.4. Нарушения в невропластичността и вътреклетъчни сигнални каскади 34

II. 10.5. Хипотеза за каналопатиите 37

II. 11. Определяне на генетичния модел на унаследяване 38

II. 12. Стратегии и методи за картиране на гени за предразположение към комплексни заболявания 40

II. 12.1. Параметричен анализ за скаченост (Linkage analysis) 40

II. 12.2. Непараметричен анализ за скаченост 42

II. 12.3. Асоциативен анализ 43
II. 12.4. Геномен подход за изследване / Геномни проучвания 45
II. 12.5. Кандидат-райони при АР, идентифицирани чрез анализ за скаченост, асоциативни проучвания и геномни сканове. 47
II. 12.6. Асоциативни изследвания при афективни разстройства 48
II. 12.6.1. Кандидат - ген *TPH2* 49
II. 12.6.2. Кандидат - ген *SLC6A4* 51
II. 12.6.3. Кандидат - ген *DRD2* 52
II. 12.6.4. Кандидат - ген *DISC1* 54
II. 12.6.5. Кандидат - ген *BDNF* 57
II. 12.6.6. Кандидат - ген *CLOCK* 59
II. 12.6.7. Кандидат - ген *CRH* 61
II. 12.6.8. Кандидат - ген *CACNA1C* 62
II. 12.6.9. Кандидат - ген *ANK3* 64
II. 13. Епистаза 65
III. Цел, задачи, материали и методи на изследванията 68
III. 1. Цел 68
III. 2. Задачи 68
III. 3. Биологичен материал 68
III. 4. Избрани генетични варианти 71
III. 5. Методи 72
III. 5.1. Изолиране на ДНК 72
III. 5.2. Оценка на качеството и пречистване на получената ДНК 76
III. 6. Аналитична обработка 76
III. 6.1. Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction) 76
III. 6.2. Качествен и количествен контрол на PCR 78
III. 6.3. 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) 79
III. 7. Статистически методи 81
III. 7.1. Изчисляване на хетерозиготност, алелни и генотипни честоти 81
III. 7.2. Нулева хипотеза (H_0) 82
III. 7.3. Метод $\chi 2$ 82
III. 7.4. Закон на Харди-Вайнберг 83
III. 7.5. TDT transmission disequilibrium test 84
III. 7.6. Анализ за статистическа епистаза 85

IV. Резултати 87

IV. 1. Кандидат-гени от серотонинова невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4* 87

IV. 1.1. Резултати за кандидат-ген *TPH2* 87

IV. 1.2. Резултати за кандидат-ген *SLC6A4* 92

IV. 2. Кандидат-гени от допаминова невромедиация 95

IV. 2.1. Резултати за кандидат-ген *DRD2* 95

IV. 3. Кандидат-гени, имащи връзка с невропластичноста - *DISC1, BDNF* 100

IV. 3.1. Резултати за кандидат-ген *DISC1* 100

IV. 3.2. Резултати за кандидат-ген *BDNF* 106

IV. 4. Резултати за кандидат-ген *CLOCK* 110

IV. 5. Резултати за кандидат-ген *CRH* 112

IV. 6. Кандидат гени, свързани с каналопатии 114

IV. 6.1. Резултати за кандидат ген *CACNA1C* 114

IV. 6.2. Резултати за кандидат ген *ANK3* 115

IV. 7. Резултати от анализа за статистическа епистаза между изследваните генетични варианти 119

V. Дискусия на резултатите 124

V. 1. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени от серотонинова невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4.* 124

V. 1.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *TPH2* 124

V. 1.2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *SLC6A4* 127

V. 2. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени от допаминова невромедиация 129

V. 2.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DRD2* 129

V. 3. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени имащи връзка с невропластичноста - *DISC1, BDNF* 132

V. 3.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DISC1* 132

V. 3.2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *BDNF* 135

V. 4. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CLOCK* 139

V. 5. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CRH* 140

V. 6. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат гени, свързани с каналопатии 141

V. 6.1. Дискусия на резултатите за кандидат ген *CACNA1C* 141

V. 6.2. Дискусия на резултатите за кандидат ген *ANK3* 142

V. 7. Дискусия на резултатите, получени при анализ за статистическа епистаза 144

V. 8. Обобщени резултати 150

VI. Изводи 153
VII. Научни приноси 155
VIII. Финансиране 156
IX. Публикации 157
X. Библиография 159
XI. Приложение №1 192
XII. Приложение №2 194

Използвани съкращения

A
AMP - Adenosine monophosphate
ATF4 - Activating transcription factor 4
ATF5 - Activating Transcription Factor 5
ADHD - Attention-Deficit Hyperactivity Disorder

B
BDNF - brain derived neutrophylic factor
BH4 – тетрахидробиоптеридин
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

C
COMT - катехол–О–метилтрансферазата
CREB - cAMP response element binding protein

D
DAT1 - dopamine transporter 1, SLC6A3
df - degree of freedom, степен на свобода
DISC1 - Disrupted-In-Schizophrenia-1
DIP - Diagnostic Interview for Psychoses
DAOA - D-amino acid oxidase activator
DMSO – диметилсулфоксид
dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат
ddNTPs- дидезоксинуклеотид трифосфати
DRD2- dopamine receptor D2
DRD4 - dopamine receptor D4
DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTNBP1 - dystrobrevin-binding protein 1
DZ – dizygotic (двуяйчни близнаци)

E
EDTA - етилен диамин тетраацетат
Ex.- екзон

F
FBAT - фамилно-базирани асоциативни тестове
FISH- флуресцентна in situ хибридизация
FIGS - Family Interview for Genetic Studies
fMRI - функционалния ядрено магнитен резонанс

G
GABA - gamma-aminobutyric-acid
GABRA1 - γ-Aminobutyric acid A receptor, α-1
GABRA5 - γ-Aminobutyric acid A receptor, α-5
GBD - Global Burden of Disease
GSK-3 - glycogen synthase kinase 3
GWA - Genome Wide Association
GPCRs - G protein coupled receptors

GRIK4 - glutamate receptor, ionotropic, kainat 4

H
H_O- нулева хипотеза
HHRR - haplotype based haplotype relative risk
5-HIAA - 5-хидроксииндолоцетна киселина
5-HT – 5-хидрокситриптамин, серотонин
5-HTTLPR - серотониновия транспортер
HTR –5-хидрокситриптамин рецептори, различни типове

I
ICD10 - International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IMPA2 - inositol(myo)-1(or 4)- monophosphtase 2
IP3 - моноинозитол-1,4,5-трифосфат

L
LD - Linkage disequilibrium
LIS1 - lissencephaly-1
LLP - ограниченият локусен полигенен модел

M
MAOA - моноаминооксидаза А
Mb- мега бази
MDD – Major depressive disorder
MRI – Magnetic Resonance Imaging (ядрено магнитен резонанс)
MAP1A - Microtubule-Associated Protein 1A
MIPT3 - Microtubule-Interacting Protein That Associates With receptor-associated factor 3 interacting protein
MRS - магнитно резонансната спектроскопия
MZ – monozygotic (едноядчни близнаци)
MFP - мултифакторен полигенен модел

N
NMDA - N-метил-D-аспартанова киселина
NDEL1 - Nuclear distribution protein nudE-like 1
NGF - Nerve growth factor, Невронен растежен фактор
NRG1 - neuregulin 1

O
OR –odds ratio

P
PCR-полимеразна верижна реакция
PKA - Протеин киназа А
PKC - Протеин киназа С
proBDNF - прекурсорен пептид на BDNF гена
PET - позитрон емисионната томография

R
RFLP - restriction fragment length polymorphism
Rpm – обороти (центрофуга) за една минута

S
SCAN - Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry
SDS – натриев додецил сулфат
SERT - серотониновия транспортер
SERTPR - промоторния регион на серотониновия транспортер
SNP - single nucleotide polymorphism
SLC6A4 - solute carrier family 6, невротрансмитерния транспортер, серотонин
SSRIs - Selective serotonin reuptake inhibitors
SML - single major locus

T
TrkB рецептор - neurotrophic tyrosine kinase, receptor
TBE буфер – трис боратен буфер
TDT - transmission disequilibrium test
TE буфер – Tris – EDTA буфер
TH - тирозин хидроксилаза
TRP – триптофан
TPH - триптофан хидроксилаза

U
UV – ултравиолетова светлина

V
VNTR - Variable Number Tandem Repeat

А
А - Адреналин

Б
БАР - биполярно афективно разстройство
БАР I - биполярно афективно разстройство I тип
БАР II - биполярно афективно разстройство II тип

Д
ДА - допамин
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

И
иРНК- информационна РНК

К
КоА- коензим А
КОФ – Кортикотропин освобождаващ фактор
КОХ - кортикотропин-отделящ хормон

М
МДП - манийно-депресивна психоза

Н
НА - норадреналин
НЦЗИ - Национален Център по Здравна Информация

П
ПААГ- полиакриламиден гел

Р
РД - рекурентна депресия
РНК – рибонуклеинова киселина

У
УАР - униполярно афективно разстройство

Х
ХХН - хипоталамус-хипофиза-надбъбрек
5-ХИОК - 5-хидроксииндолоцетна киселина
цАМФ – цикличен аденозин монофосфат
ЦНС - централната нервна система

I. Въведение

Афективните разстройства (АР) са тежки психиатрични заболявания, сериозно затрудняващи нормалното функциониране и интеграцията в обществото на засегнатите индивиди и според редица проучвания представляват глобална икономическа тежест. Изследването на генетичните и биологичните основи на заболяванията от афективния спектър може директно или индиректно да спомогне разработването на нови терапевтични подходи, повишаването качеството на живот на пациентите и съответно да доведе до намаляване на глобалната тежест на тези заболявания в световен мащаб. За изясняването на патологичните механизми в основата на АР и етиологията на заболяването се използват различни интердисциплинарни подходи. АР спадат към групата на комплексните заболявания, за развитието на които допринасят както множество генетични варианти така и фактори на околната среда с прагов ефект. Наблюдава се синергичност и епистаза между полиморфизмите, имащи отношение към патологията на АР, което може да модифицира действието им и да повлияе върху риска от развитие на заболявания от афективния спектър.

Съществуват няколко хипотези за причините на заболяването, които се базират на наблюдаваните промени в сигналните и невромедиаторните системи и абнормна невропластичност и неврогенеза. В настоящето проучване обект на изследване са кандидат гени от серотониновата система, генотипирани са варианти в *TPH2* гена, регулиращ серотониновата синтеза и варианти в *SLC6A4* гена, регулиращ неговия транспорт. Изследвани са генетични варианти от допаминовата невротрансмисия в допаминов рецептор тип 2, *DRD2* и варианти в кандидат гени, свързани с неврогенезата и невронното оцеляване, каквито са *DISC1* и *BDNF*. Проучването включва също така изследването и на полиморфни варианти в *CLOCK* гена, имащ отношение към регулацията на циркадните ритми в човешкия организъм, както и в гена кодиращ кортикотропиносвобождаващия фактор *CRH*, който регулира оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек и повлиява ендокринния отговор при стрес. Във връзка с често наблюдаваната дисфункция в комуникацията между невроните при пациенти с афективни разстройства са изследвани генетични варианти в калциевия канал *CACNA1C* и в гена *ANK3A*, взимащи участие в предаването на невронните сигнали и ефикасността на комуникация между тях. Проведено е асоциативно проучване от типа случаи–контроли и фамилно асоциативно изследване в семейства от български и ромски произход. Изследвани са 24 еднонуклеотидни замени в 9 кандидат гена. Целта е определяне на приноса на изследваните генетични варианти или хаплотипи с тяхно участие към развитието на АР. Изследвани са и всички възможни епистатични взаимодействия между проучваните полиморфизми чрез логистична регресия и е оценен свързаният с тях риск за развитие на заболяване от афективния спектър. Всички статистически анализи са проведени при две афективни дефиниции, в тесен афективен статус (А1) са включени пациенти с БАР (биполярно афективно разстройство) тип I, БАР тип II и шизоафективно разстройство от биполярен тип, а в широк афективен статус (А2) към пациентите с тесен статус са добавени и пациенти с УАР (уни полярно афективно разстройство). В настоящето

асоциативно проучване са включени 304 пациенти с тесен фенотип (A1), 414 пациента с широк фенотип (A2) и 205 здрави контроли, а фамилната извадка се състои от 119 български и 56 семейства от ромски етнически произход, включващи общо 197 пациента с тесен афективен статус (A1) и 269 с широк статус (A2). Генотипирани са общо 1240 индивида, от които 1010 с български етнически произход, а 230 от ромски етнос.

II. Литературен обзор

II. 1. Класификация на афективните разстройства

Афективните разстройства (АР) са едни от най-тежките и чести психиатрични заболявания с голямо социално значение, проявата им се дължи на действието на множество гени с малък ефект и влияние на външни фактори. Съществуват две основни клинични форми – биполярна, с редуващи се епизоди на мания и депресия и униполярна, проявяваща се с наличие на тежка депресия. Интензивността, продължителността и честотата на манията и депресията, както и на безсимптомните периоди между тях са индивидуални при различните пациенти.

Началото на заболяването е най-често между 17 и 21 годишна възраст. При пациенти с диагноза от този спектър се наблюдава висок риск от самоубийства, който варира между 15-20% според (Bostwick, 2000), около 25% според (Keck, 2001) и между 17%-19% според (WHO, 2008), както и висок риск от злоупотреба с наркотични вещества около 29 % (Regier, 1990; Cassidy, 2001). Ранното начало на АР често е съпътствано от по-тежко протичане и се състои в затруднения в социалното функциониране и междуличностните взаимоотношения както и в повишен риск от пристрастяване към наркотици и извършване на самоубийства (Cassidyl, 2001; Jamison, 2000; Maj, 2002). Същевременно има данни, че злоупотребата с наркотични вещества от своя страна също може да допринесе за по-ранен дебют и по-тежка симптоматика (Brady, 1995). Тежестта на АР може силно да варира, пациентите могат да изпитват от леки затруднения в интеграцията в обществото до сериозни трудности в социалната си адаптация, водещи до глобални икономически загуби (Skolnik, 2007; Maj, 2002; Jamison, 2000). Доклад на световната здравна организация посочва афективните разстройства като водещ инвалидизиращ фактор между 15 и 44 годишна възраст (WHO, 2008).

В групата на афективните разстройства с най-голяма честота се срещат следните диагностични подкатегории: биполярно афективно разстройство I тип (БАР I), биполярно афективно разстройство II тип (БАР II), шизоафективно разстройство от биполярен тип, униполярно афективно разстройство (УАР), дистимия, и рецидивираща депресия. Подробно описание на всички диагностични подкатегории в афективния спектър по ICD10 (Международна класификация на диагнозите и свързаните с тях болестни състояния) са представени на: http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/F30-F39.

При БАР I тип могат да се наблюдават както редуване на маниакални и депресивни епизоди с различна последователност и тежест, така и наличие само на маниакални. За поставяне на диагнозата БАР I тип е необходимо наличието на следните базисни критерии (Keck, 2001):

- Наличие на поне един тежък епизод на мания, без значение дали липсва или е налице предхождащ депресивен епизод;
- Епизода на мания да се различава от типичния за шизоафективното разстройство;
- Епизода на мания да не е част от друго нервнопсихиатрично разстройство.

БАР II тип се характеризира със сравнително лека форма на мания (хипомания) и повтарящи се депресивни епизоди.

За поставяне на диагнозата БАР II тип е необходимо наличието на следните базисни критерии:

Един или повече епизоди на тежка депресия;

- Наличие на поне един епизод на хипомания;
- Липса на епизод на типична мания.

Униполярното афективно разстройство (УАР) се характеризира с няколко повтарящи се депресивни епизода, с различна тежест или наличие на единичен епизод.

Дистимията представлява хронична депресия с по-слабо изразени симптоми като тежест, но по-продължителни в сравнение с тези при униполярното афективно разстройство.

Шизоафективното разстройство е диагностична подкатегория на границата между БАР и шизофрения. Клиничните симптоми обхващат някои характеристики на шизофренията (халюцинации, илюзии), както и епизоди на мания и депресия.

При БАР I и БАР II тип се срещат често когнитивни и поведенчески отклонения, като при тежки форми на заболяването могат да се наблюдават и психози по време на фазите на мания и депресия.

Психопатологията на афективните разстройства включва периодично нарушение на емоциите, настроението, поведението, също и на някои от соматичните функции. Водещите често срещани симптоми, могат да бъдат групирани в следните категории и отклоненията от нормалното състояние графично са представени на фигура №1:

- **Абнормни отклонения в настроението и афекта**:

При **депресия** – тъга, тревожност, липса на удоволствие от обичайни дейности;
При **мания** – еуфория или раздразнителност.

- **Нарушения в психомоториката:**

При **депресия** - забавяне или ускорение на двигателната активност и мисловния процес;
При **мания** – превъзбуда, ступор, психомоторна възбуда.

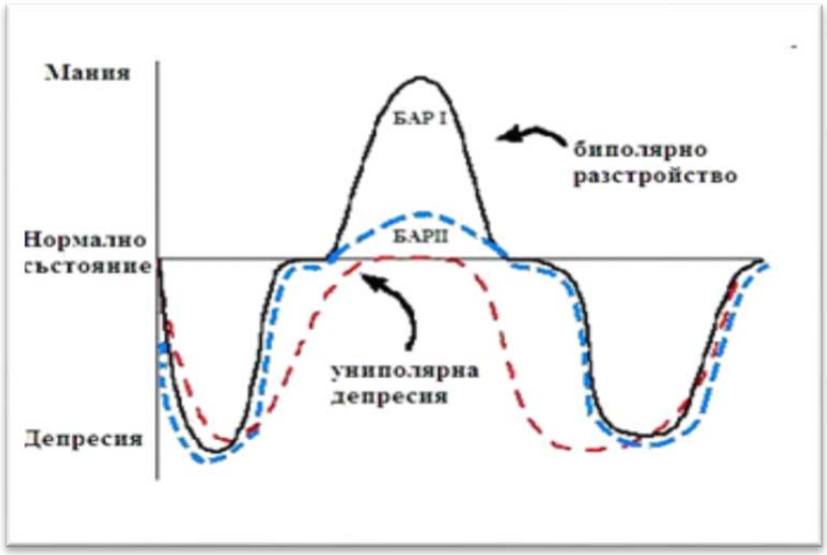
- **Соматичен нарушения** - промени в общия тонус – нарушения на съня, апетита, либидото, промени в теглото.

- **Когнитивен нарушения**:

При **депресия** - нарушена концентрация, преходни разстройства на паметта, негативна себеоценка, нарушено възприятие за време, песимистични и налудничави идеи, сетивни измами, мисли за самоубийство;

При **мания** – трудна концентрация, мисловни нарушения, повишена себеоценка, понижена себекритичност, отслабване на социалните задръжки.

Фиг. №1: Графично представяне на флуктуациите в настроението на пациенти и по-честите диагностични категории от афективния спектър спрямо нормалното състояние на афект. Представени са биполярно афективно разстройство I тип (БАР I), биполярно афективно разстройство II тип (БАР II), униполярно афективно разстройство (УАР).



II. 2. Диагностика на афективните разстройства

Диагностиката на афективните разстройства се извършва от лекар психиатър и се базира на описанията на промените в поведението на болния от самия него или от негови близки и членове на семейството му. Диагнозата се поставя на базата на съвкупност от критерии, които отчитат продължителността и тежестта на симптоматиката. Според диагностичните критерии, за да бъде взет под внимание един симптом той трябва да е бил с продължителност поне две седмици. Критериите за диагностика са обобщени и патентовани в диагностични наръчници, каквито са ICD10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems), 1993, на Световната Здравна Организация (WHO, 1999) и DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), на Американската Психиатрична Асоциация, 2013. В настоящето проучване е използвана номенклатурата на DSM-IV на Американската Психиатрична Асоциация, 2000, тъй като изследването е извършено с материал от пациенти предимно събиран преди 2013 година.

Поставянето на диагнозата се базира единствено на поведенчески изменения, тъй като досега не е открит утвърден биологичен маркер, който да бъде използван за целта. Стандартни медицински изследвания се извършват, за да се изключи наличието на аномалии в поведението като вторични симптоми от друго основно заболяване като епилепсия, наличие на мозъчни лезии, хипо и хипертироидизъм или други метаболитни нарушения.

Класическите случаи на АР лесно се отдиференцират, но някои пациенти с по-леки симптоми на мания, хипомания и депресия, както и пациентите с ранно начало на заболяването, още в предпубертета са трудни за прецизно диагностициране. Сравнително по-лесни за идентифициране са тежките и средно тежките форми на заболяването. Леките форми и тези с ранно начало често остават маскирани и следователно лишени от лечение, защото в пубертета честата смяна на настроението и хаотично поведение могат да бъде част от нормално индивидуално развитие без това да е част от някаква психопатология.

Следните критерии са характерни за **БАР** и разграничават наличието на заболяването от други психиатрични състояния:

- Наличие на БАР в рамките на фамилията;
- Бързо начало на симптомите;
- Хипоманиен отговор, в следствие на лечение с антидепресанти;
- Периоди на емоционална нестабилност или предшестващ депресивен епизод.

При поставяне на конкретната диагноза от афективния спектър трябва да се има предвид невъзможността да се предвиди по какъв начин може да прогресира болестта до разгръщането на пълната клинична картина. Възможно е в процеса на протичане на заболяването, диагнозата да се промени в зависимост от симптоматиката.

Изследване на (Evans, 2000) на пациентите диагностицирани с БАР години след първоначалния епизод, показва че при 35 % от тях това се дължи на нежелание да се потърси медицинска помощ, а при 34% диагнозата е била първоначално объркана, поради налични трудности в диагностицирането на заболяването.

II. 2.1. Диагностични критерии за депресивен епизод по DSM-IV - Американска психиатрична организация 1994

- Подтиснато настроение в по-голямата част на деня, ежедневно;
- Подчертано намален интерес и удоволствие към всичко или почти всичко, което преди това е носило удоволствие, ежедневно;
- Значителна загуба или увеличаване на теглото и апетита;
- Безсъние или увеличена нужда от сън, ежедневно;
- Психомоторна превъзбуда или забавяне на реакциите – симптоми обикновено забелязвани и съобщаван от близки на пациента;
- Бърза уморяемост почти ежедневно;
- Чувство на безполезност и прекомерна неоснователна вина;
- Намалена способност за концентрация, несигурност и неувереност при взимане на решения, почти ежедневно;
- Постоянни мисли за смърт, идеи за извършване на самоубийство, без или с наличие на конкретен план.

За да бъде класифициран един депресивен епизод, като такъв трябва да бъдат налични поне пет или повече от изброените симптоми за период не по малък от две

седмици и да се различават от нормалното състояние на индивида. Поне един от симптомите трябва да бъде или подтиснато настроение или загуба на интерес или удоволствие. Симптоми, които са следствие от други медицински състояния, или са предизвикани от прием на лекарства, наркотични вещества, или са следствие от шок, не се взимат под внимание. Депресиите повлияват по различен начин физическото здраве на мъжете и жените. Те са свързани са с повишен риск от коронарни болести и при двата пола, но смъртността при мъжете е по висока (Ferketick, 2000).

II. 2.2. Диагностични критерии за епизод на мания по DSM-IV - Американска психиатрична организация 1994

- Високо самочувствие и грандомания;
- Намалена нужда от сън;
- Увеличена нужда от водене на разговор;
- Бързо сменящи се идеи;
- Лесна разсеяност;
- Психомоторна превъзбуда, увеличена настоятелност с цел постигане на определена идея;
- Прекомерно отдаване на дейности, които носят удоволствие.

Взимат се под внимание периоди на различно от нормалното характерно поведение, продължаващи поне 1 седмица. Поне три от изброените симптоми трябва да са налични в значителна степен, тоест да водят до нарушаване на взаимоотношенията с други хора и нормалните социални активности. Изключват се симптомите, следствие от други заболявания или прием на медикаменти.

Съществуват разновидности на класическите епизоди на мания, каквито са: хипомания, смесен епизод на мания, вторична мания.

Хипоманията клинично наподобява мания в по-лека форма и не води до сериозни затруднения в нормалното функциониране на индивида.

Смесени епизоди се наблюдават при около 30 % от пациентите с БАР и се характеризират с къси депресивни епизоди по време на мания (Keck, 2001). Едновременно се наблюдават достатъчно симптоми покриващи критериите и за депресия и за мания. Наличието на смесени епизоди е асоциирано със повишен риск от пристрастяване към алкохол и наркотици и повишен риск от извършване на самоубийство (Suppes, 2000). Епизодите на мания, които най-често се срещат в детска и юношеска възраст на пациенти с БАР са именно смесени. Ефекта на смесените епизоди върху цялостното протичане на заболяването е неизяснен, но при наличието им пациентите по-трудно се възстановяват, в сравнение с тези при които има класически мании или депресивни епизоди.

Вторична мания възниква в следствие на състояния, които не принадлежат към групата на афективните разстройства и може да се наблюдава при пациенти без фамилна обремененост за наличие на психиатрични заболявания. Наличието на вторична мания може да се предизвика от мозъчни наранявания, епилепсия, удар, тумор, мигрена,

хипертиоридизъм, мултиплексна склероза или прием на медикаменти. Подхода за лечение на този тип мания зависи преди всичко от медицинското състояние, което го е причинило (Keck, 2001).

II. 3. Клинична картина и протичане на АР

Протичането на афективните разстройства зависи от няколко основни фактора като начало на заболяването, коморбидност с други състояния, честота на епизодите, специфика и тежест на протичане на самите епизоди.

Честота на епизодите

Обикновено фазите на ремисия между първият, вторият и третият епизод на мания и депресия са много по-големи в сравнение с тези между последващите епизоди. Въпреки това с протичането на заболяването често настъпва стабилизиране на честотата на фазите (Suppes, 2000).

Бързото циклиране се изразява в смяна на четири или повече епизода в рамките на една година, средната му честота при болни от БАР е между 5% и 20%. По-висока е честотата на бързо циклиране при пациенти с ранно начало на заболяването както и при жените (72%), мъже (28%) (Suppes, 2000).

Специфика на циклите

При някои пациенти се наблюдава добре установена специфична цикличност на фазите, докато при други те са непредсказуеми. Цикличността има отношение към протичането на заболяването и лечението му, установено е че индивиди при които манията предшества депресията, по добре се повлияват от определени групи лекарства (Suppes, 2000).

Коморбидни рискове при АР

Рискът от самоубийства е една от основните причини за смъртност при афективно болните. Пациентите с БАР имат по-висок риск от извършване на самоубийство в сравнение с болните от други психиатрични заболявания. Изследване на хора извършили опит за самоубийство показва, че това обикновено са индивиди с тежко протичане на заболяването, често хоспитализирани, които са планирали детайлно и нееднократно намеренията си. Опитите за самоубийство при жените са по-чести в сравнение с тези при мъжете, при които е установена по-висока успеваемост (Jamison, 2000).

Рискът от пристрастяване към наркотични вещества при пациентите с АР също е по-висок спрямо този в общата популация. Изследвания установяват, че 16.5% от пациентите с УАР злоупотребяват с алкохол, а 18% с други наркотични вещества, риска от пристрастяване при пациентите с БАР е по-висок и достига до 56%.

II. 4. Епидемиология

Данните за честотата на заболеваемост при АР силно варират според различните литературни източници в зависимост от използваните диагностични критерии, методология и конкретната популация обект на изследване.

За БАР честотата в световен мащаб се счита, че е между 0.4% и 1.6% (Yutzy, 2012; Bland, 1997; Maj, 2002), въпреки че някои проучвания посочват и по-високи данни, 2.6% в Американска популация (Kessler, 2005 A). Заболеваемостта при жените и мъже е еднаква за БАР I тип, докато при БАР II тип, тя е по-висока при жени (Montgomery, 1996), което се обяснява с по-високата честота на депресиите при жени.

Началото на заболяванията от афективния спектър са най-често в юношеството или около 20 годишна възраст, като в повечето случаи депресивния епизод предшества епизода на мания (Kessler, 2005 B; Bellivier, 2003; Akiskal, 2000; Rob, 1999), по-ранен дебют на заболяването също се наблюдава, но това затруднява прецизното поставяне на диагноза (Torrey, 1999). Симптоми на БАР, проявени за първи път при възрастни хора най-често са следствие от друго заболяване на централната нервна система или наличие на предшестващи симптоми в много лека форма, за които не е търсена лекарска помощ и лечение (Marnevos, 2000; Shulman, 1994).

Униполярното афективно разстройство (УАР) е с по-висока честота спрямо БАР, литературните данни в зависимост от изследваната популация, силно варират. Според (Tsuang, 1994) глобалния риск от развитие на УАР в общата популация е между 3.4% и 18%, а за Американската популация е посочен среден риск около 6.7% (Kessler, 2005 A). Наблюдава се голяма разлика в заболеваемостта в зависимост от пола, жените страдат от 1,6 до 2,3 пъти по-често от мъжете (Burt VK, 2002; Kessler, 2003). УАР може да се развие в сравнително широк възрастов диапазон, но се счита, че средната възраст на начало на заболяването е по-късна от тази при БАР и е около 30 годишна възраст (Kessler, 2005 B, Weissman, 1993). При около 50-60% от хората, които вече са имали депресивен епизод, той се повтаря.

Дистимията, представляваща хроничен лек депресивен епизод с голяма продължителност, също като УАР е от 2.1 до 2.3 пъти по-честа при жените, (Cross-National Collaborative Group, 1992). Две независими изследвания посочват заболеваемост между 3,1% (Weissman, 1998) и 6.4% (Kessler, 2003).

Таблица № 1: Представя честотите на заболеваемост от БАР I тип и БАР II тип според два независими източника - Epidemiologic Catchment Area Study (ECA) и National Comorbidity Study (NCS) (U.S. Department of Health and Human Services, 1999).

Заболяване	**ECA честота [%]**	**NCS честота [%]**
АР	7.1	11.1
БАР I тип	1.1	1.3
БАР II тип	0.6	0.2
УАР	4.4	17.1

Таблица № 2: Представя честотата на афективните разстройства за българската популация за 2011 година. Данните са от доклада на Националния статистически институт и Националния център по обществено здраве и анализи от 2012 година, където са отразени броя на пациентите потърсили лекарска помощ за съответния период.

	Заболеваемост 2009г. [%]	**Заболеваемост 2010г. [%]**	**Заболеваемост 2011г. [%]**
Заболяване			
АР	3.88	3.66	3.66
БАР	0.95	0.95	0.99
УАР	1.29	1.22	1.21
Единичен депресивен епизод	1.03	0.92	0.90
Единичен маниен епизод	0.49	0.45	0.44

II. 5. Фамилни изследвания

Емпирично е установено по-голямо струпване на пациенти с афективни разстройства в семейства, където вече има диагностициран случай, спрямо общата популация. Това се обяснява с факта, че членовете на семействата споделят част от един общ генофон, както и сходни фактори на средата като стил, качество на живот, стрес и др., което не е така при случайно подбрани индивиди от популацията.

Фамилните изследвания имат за цел да установят относителният принос на генетичния фонд и на този на околната среда за развитието на заболяването. При определяне на риска за заболеваемост при роднини се взима под внимание възрастта на изследваните индивиди, и за здрави се приемат само миналите условно приетата рискова възраст за проява на заболяването.

За първи път фамилност при 80% от пациентите с маниакално-депресивна психоза е описана от Крепелин (Kraepelin, 1922). Следващи изследвания потвърждават, че маниакалната депресия е по-честа при родственици на индексни пациенти отколкото в популацията като цяло (Slater, 1971). Ранните фамилни изследвания, не разграничават униполярни и биполярни разстройства като отделни диагностични единици и наличните

данни са само за маниакално-депресивна психоза. Изследване, обобщаващо епидемиологичните данни от този период, (Tsuang, 1990) посочва, че рискът за родители на пробанди е между 3.2 и 23.4%, рискът за техните деца е между 2.7 и 23.0%, като всички проучвания потвърждават, по-висок фамилен риск в сравнение с популационния (около 1%). След въвеждането на разделение на диагностичните единици се установява, че рискът за развитие на БАР е независим и различен от рискът за УАР. В таблица № 3 е представен емпирично установения риск за развитие на АР при родственици (Feinberg, 1994; Cardno, 2002).

Таблица № 3: Емпирично установен риск за развитие на афективно разстройство при родственици на пациенти с БАР и УАР (Feinberg, 1994; Cardno, 2002).

Родственици на пробанда	**Пробанд с БАР [%]**	**Пробанд с УАР [%]**
Монозиготни близнаци	40 - 70	50
Дизиготни близнаци	10 – 25	15 – 20
Деца на един болен родител	10 - 25	15 – 20
Деца на двама болни родители	10 - 50	40 – 50
Братя и сестри	15 – 25	10 – 20
Родственици по втора линия	3 – 7	3 – 5
Родител	15 – 20	10 – 15
Обща популация	1	4

Според други проучвания нивата на конкордантност са сходни, но не идентични с представените в таблицата. Проучване на (Kieseppa, 2004) установява при монозиготни близнаци, нива на конкордантност около 40%, а при дизиготни близнаци нива по-ниски от 10 %. В мета анализ включващ 12 отделни изследвания е изчислен, че средния риск за развитие на афективно разстройство при родственици от първа степен на пациенти с БАР е 11.4% за развитие на УАР и 7.8% за БАР (McGuffin,1986). Родственици на пробанди с УАР имат 9.1% повишен риск за развитие на УАР, а риска за развитие на БАР е сходен с популационния риск от 1% (Gershon, 1982; Kupfer, 1989). Ранното начало на заболяване при пробанди, съпроводено с по-тежко протичане, води до повишаване на морбидния риск при родственици.

Въпреки разликите в емпирично установеният риск в различните изследвания, данните убедително доказват наличието на фамилно предразположение за развитието на афективни разстройства.

II. 5.1. Изследвания на близнаци

Основната стратегия при изследванията на близнаци е сравняването на коркондантността на заболяването между монозиготни и дизиготни близнаци. Струпването на болни в рамките на фамилии може да се дължи на наличието на предразполагащи генетични фактори или на рискови фактори на околната среда, както и на комбинация между тях. По-високото ниво на конкордантност на заболяването при

дизиготните и монозиготните близнаци, сравнено с общата популация доказва относителната роля на генетичните фактори за развитие на АР.

Първото голямо и издържано от методологична гледна точка изследване проведено в Дания от (Bertelsen, 1977), съобщава за 0.61 конкордантност при монозиготни близнаци, което е почти три пъти по-високо отколкото стойностите при дизиготни близнаци – 0.20 (Bertelsen, 1977). Обобщени данни от други 6 изследвания на близнаци, показват, че вероятно 60% от вариабилността при афективните разстройства се дължи на генетични фактори, а 30-40% от вариабилността може да се причинява от фактори на околната среда (Tsuang, 1990). Повишена конкордантност, получена при няколко изследвания на едноячни близнаци с афективни разстройства (БАР и УАР) доказва, че относителния дял на генетичния ефект е сравнително по-голям спрямо дяла на околната среда.

Основното ограничение на този метод се състои в малкия брой индивиди, които могат да бъдат включени в него. В табл. №4 е представена установената конкордантност според някои изследователски групи.

Таблица №4: Конкордантност при близнаци за афективни разстройства (БАР и УАР).

Автори	Монозиготни близнаци		Дизиготни близнаци	
	брой	Конкордантност [%]	брой	Конкордантност [%]
Bertelsen et al., 1977	69	67	54	20
Gershon et al., 1982	91	69	226	13
Torgersen et al, 1986	37	51	65	20
McGuffin et al., 1991	62	53	79	28
McGuffin et al., 2003	98	56	146	19.6
Kieseppa et al., 2004	7	42.9	18	5.6

II. 5.2. Изследвания на осиновени деца

Друг метод за определянето на относителния дял на факторите на околната среда за развитието на АР е изследването на осиновени деца. Ограничаващ фактор за този тип изследване е трудното набиране на участници. Съществуват няколко подхода като се изхожда от факта, че осиновените деца споделят общ генетичен фон с биологичните си родители и сходни фактори на околната среда с осиновителите. При изследвания на осиновени деца може да се сравнява риска за заболяване между осиновени деца на засегнати биологични родители и осиновени деца на здрави родители. Осиновените деца на болни родители не споделят обща среда с биологичните си родителите като по такъв начин може да се изключи влиянието на околната среда за развитие на заболяването. Същевременно може да се оцени и доколко средата влияе за развитието на заболяване без наличие на генетична предизпозиция за токова. Може да се сравнява както рискът между осиновени деца, със засегнати биологични родители, но здрави осиновители така и между осиновени деца със здрави биологични родители и засегнати осиновители.

Първото изследване на близнаци с афективни разстройства е публикувано от Mendlewicz и Rainer през 1977 в Белгия (Mendlewicz, 1977). Те откриват, че биологичните родители на осиновени деца с БАР са с по-висока честота на психиатрични заболявания (28%) в сравнение с приемните родители (12%). Друго изследване установява увеличен риск от развитие на УАР при осиновени деца с болни биологични майки (38%) в сравнение с деца със здрави биологични майки (9%) (Cadoret, 1978).

Проучванията при осиновени деца показват, че относителния дял на споделените гени, спрямо сходните фактори на околната среда, са с по-голямо влияние за развитието на афективни разстройства.

II. 6. Рискови фактори, коморбидност

Афективните разстройства понякога могат да бъдат отключени от стресови фактори, които най-често са свързани с определени житейски промени, като раздяла, болест или смърт на близък човек, скорошни негативни събития, безработица и други. Заболеваемостта от УАР в провинциални райони е 6.1% спрямо 17.1% в голям град (Michalak, 2002). Съществуват хипотези, че рискови фактори освен живота в замърсени и пренаселени райони могат да бъдат също така и сезона на раждане, преждевременно раждане, усложнения по време на бременност или раждане както и възраст на родителите (Talati, 2013, Torreyl, 1997). Фактори като емиграция, схема на сън и будно състояние при работа на смени също увеличават риск от развитие на АР. Високите нива на олово, имащо невротоксично действие в околната среда също е асоциирано с повишен риск от развитие на АР (Bouchardl, 2009).

Коморбидните състояния при афективните разстройства са доста чести и водят до по-тежко протичане на заболяването. Изследване на (Brown, 2001; Suppesl, 2000) посочва, че 50% от пациентите с БАР злоупотребяват с алкохол или други наркотични вещества, а според (Marnevos, 2000) те са до 64%. Факторите, увеличаващи риска от коморбидни състояния при пациенти с АР са фамилна история на пристрастеност, ранно начало на заболяването и наличие на смесени епизоди. До 60 % от пациентите с АР страдат от тревожно разстройство, невлизащо в афективния спектър (Tamam, 2002), а 33 % имат личностно разстройство (Uecok, 1998). Други често срещани коморбидни състояния са паническо разстройство и социална фобия. Биполярното афективно разстройство с ранно начало често се припокрива симптоматично със синдром на дефицит на вниманието и хиперактивност (ADHD) или друго разстройство на развитието, 11% от изследвани юноши с БАР покриват и критериите за ADHD (Evans, 2000).

Коморбидните състояния правят коректното диагностициране и лечение по-трудни, възстановяването от фазите на мания и депресия по-бавно и повторяемостта на епизодите по-честа (Suppes, 2000).

II. 7. Ендофенотипи

Ендофенотипите се използват за по-прецизно дефиниране на фенотипа, което позволява индивидуален подход при лечение, както и търсенето на кандидат гени в по-тясно дефинирани групи пациенти. Изследването на специфична субгрупа пациенти позволява да се търсят генетични варианти указващи влияние на определен диагностичен профил. Резултатите от различни клинични изследвания показват, че нарушенията в някои когнитивни области могат да бъдат използвани като ендофенотип при АР, (Altshuler, 2004; Glahn, 2004; Martínez-Arán, 2004; Robinson, 2006; Torrent, 2006; Antila, 2007).

Понятието ендофенотип е въведено в психиатрията от (Gottesman;, Shields 1973), с което е обозначен, междинен фенотип и изследването му цели откриването на маркери, които по-добре да описват механизмите на болестта, а не симптомите. Търсенето на асоциация между различни ендофенотипи и подходящи кандидат гени може да допринесе за по-доброто разбиране на патологията на заболяването.

Според (Gottesman и Gould, 2003) основните критерии за ендофенотип са следните:

- Да се асоциира с болестта в общата популация;
- Да се унаследява;
- Да е независим от моментното състояние и да се проявява, независимо от това дали болестта е в активна фаза, или в ремисия;
- Да косегрегира в семействата;
- Ендофенотипът идентифициран при пробанда, трябва да се установява и при незасегнатите индивиди в по-голяма степен в сравнение с общата популация.

Когнитивни нарушения

Проучвания показват, че вариации в когнитивното функциониране при болни с АР отговарят на критериите за ендофенотип, въпреки че промените в тях са по-слабо изразени в сравнение с тези при пациенти с шизофрения и шизоафективно разстройство (Trivedi, 2008; Torrent, 2007). Най-силни доказателства за нарушени когнитивни функции при пациенти с АР са получени в областите, вербална памет и фронтални екзекутивни функции, планиране, организиране на стратегии за решения, логика, съобразителност, находчивост при извличане на знания от опита и взимане на конкретни решения (Glahn, 2004; Simonsen, 2008). Нарушенията са субклинични прояви, които са налице още преди началото на заболяването, по време на епизодите както и между тях при пациенти и са установени и при незасегнати родственици (Glahn, 2004; Hasler, 2006; Robinson, 2006 A). Когнитивният дефицит без значение от спецификата му е свързан с нарушено функциониране на пациентите в обществото (Martínez-Arán, 2004) и следва да е обект на лечение (Green, 2007), с цел подобряване качеството на живот на пациентите.

II. 8. Лечение

Според препоръките на Американската психиатрична организация най-ефективното лечение се състои в прилагането едновременно на медикаментозно лечение и провеждане на психотерапия (Rothbaum & Astin, 2000).

Литият е един от най-широко прилаганите медикаменти при АР, ефективен е при мания и депресия и при 79% от пациентите с БАР се наблюдава терапевтично повлияване (Compton & Nemeroffq 2000; Licht, 1998). Най-добре се повлияват пациенти със средно тежка мания и бърза цикличност на фазите (Keck, 2001), оптимални резултати се постигат след сравнително продължителен прием (6 - 8 седмици).

Лечение чрез антиконвулсанти

Антиконвулсантите имат най-добър терапевтичен ефект при пациенти с бързо циклиране на фазите или наличие на смесени епизоди в хода на заболяването (Muller-Oerlinghausen, 2002). Често прилаган антиконвулсант при дългосрочно лечение на БАР е карбамазепина, като приема му може да се комбинира с антидепресанти и литий. Той повлиява едновременно фазите на мания и депресия, посредством индуциране на P450 ензимната система (Compton & Nemeroff, 2000). Ламотригина е друг антиконвулсант, който активира някои натриеви канали, блокира серотониновите рецептори и повлиява само депресивните епизоди. Валпроата от своя страна е по-ефективен при лечение на мания, и има слаб антидепресантен ефект (Bowden, 2000; Young, 2000).

Лечение чрез антидепресанти

Антидепресантите са широко използвана група медикаменти при лечение на афективни разстройства, към тях се включват селективни инхибитори на обратното захващане на серотонина (SSRIs), трициклични антидепресанти и инхибитори на моноамин оксидазата.

Лечение чрез психотерапия

Целта на психотерапията е подпомагане придържането към медикаментозното лечение, и повишаване на интеграцията и качеството на живот. Най-често прилаганите терапии са когнитивно-поведенческа, фамилна или групова и те предлагат похвати за по-лесно справяне със симптомите в ежедневието. Подобрение се наблюдава при 50% и по-рядка хоспитализация при 60% от пациентите, подложени на психотерапия съвместно с медикаментозното лечение (Rothbaum & Astin, 2000).

Лечение чрез електроконвулсивна терапия

Електроконвулсивната терапия, се прилага рядко, при пациенти с много тежка симптоматика. Съвместното приложение с литий има невротоксичен ефект (Compton & Nemeroff, 2000).

II. 9. Патофизиология

Неврофизиологичните основи на АР се изследват с невровизуализиращи техники като ядрено магнитен резонанс (MRI), позитрон емисионна томография (PET), магнитно резонансна спектроскопия (MRS) и функционален ядрено магнитен резонанс (fMRI). Данни за връзката между проявата на емоциите и лимбичните зони на мозъка е установена още през 1937 г. (Papez, 1937).

Въз основа на патофизиологични изследвания и невровизуализиращи техники е доказано, че настроението и поведението се променят от невронните взаимодействия в два основни невроанатомични кръга на мозъка:

- кортико-стриато-таламичния кръг;
- лимбичен–стриато-палидален кръг (limbic-striatal-pallidal-cortical circuit).

Дисфункция в мозъчни региони на тези два пътя се наблюдава при повечето психиатрични заболяване. Няма убедителни доказателства, които да изясняват дали промени в тези пътища допринасят за развитието на заболяване или в рамките на протичането на самото заболяване се натрупват патологични промени в тях. Предполага се, че дисфункция на тези пътища в комбинация с негативни фактори на околната среда могат да доведат до повишена предразположеност към развитие на психиатрични заболявания (Soares, 1997). Когнитивните промени като трудности при концентрация и запаметяване, често срещани при пациенти с АР също предполагат дисфункция в тях (Adler, 2006). Кортико-стриато-таламичния път е отговорен за регулацията на емоциите (Price, 1999; Chen, 2005), а в лимбичния-страто палидиален кръг често са описвани промени в невропластичноста и неврогенезата и намален обем на мозъчните области.

Основните мозъчни структури, които са установени, че имат отношение към развитието на афективни разстройства са фронталния и темпоралните лобове на мозъка, префронталния кортекс, части на лимбичната система, хипокампуса, стриатума и амигдалата. Промените в тези мозъчни дялове установени при наличие на заболяване са както структурни така и функционални. Описани са намален цялостен обем на мозъка, намален обем на сивото вещество в областта на префронталния и темпоралния кортекс както и намален кръвоток в тези области при пациенти с депресия (Manji, 2000). Счита се, че намаляването на броя на невроните и на глиалните клетки, следствие от нарушена невропластичност, води до намален мозъчен обем и нарушена функционалност. Идентифицирани са аномалии в метаболизма на вторичните посредници, мембранния метаболизъм, и в биоенергетиката на стриатума и префронталния кортекс, което потвърждава хипотезата, че промени в стриатум-таламус-префронталните пътища водят до проява на АР.

Функционалните изследвания на болни и здрави контроли показват разлики във функционалната активност на антериорните лимбични региони, отговарящи за социалното и емоционалното поведение (Strakowski, 2005). Предполага се, че нарушения във функционирането на тези структури може да стои в основата на някои от характерните симптоми на АР като рязка промяна в настроенията и някои когнитивни

промени. Структурни и функционални промени в хипоталамуса също могат да са причини за характерната симптоматика при АР (Strakowski, 2005).

Въпреки че експерименталните данни от невровизуализиращите техники предоставят ключови данни за разбирането на етиологията на заболяването, те не могат да служат като биологични тестове за поставяне или потвърждаване на диагнозата, а се използват като индикация за области и механизми, които да бъдат допълнително изследвани.

II. 10. Етиология на афективните разстройства - хипотези

Етиологията както и патофизиологията на заболяването все още не е напълно изяснена. Съществуват няколко хипотези относно причините за заболяването, които се базират на наблюдаваните промени във функционалността на невромедиаторните системи, невропластичността и комуникация между невроните. За възникването и развитието на афективните разстройства съществено значение имат и екзогенни фактори с неблагоприятно действие като стрес, травми, нарушения в социалното функциониране. Важна роля играят острите и хронични стресови състояния и соматичните заболявания (депресията често е съпътствана и от хормонални промени), външни фактори могат да отключат първите признаци на заболяването при лица с наследствена предразположеност.

Във връзка с хипотезите свързани с етиологията на АР се изследват различни генетични варианти в гени кодиращи невромедиатори транспортери, рецептори и други елементи, участващи в невронната комуникация.

II. 10.1. Биогенно-аминна хипотеза

Биогенните амини са невромедиатори, взимащи участие в преноса на информация в мозъка и редица доказателства, сочат участието им в етиологията на АР. Те са пет вида, три катехоламина (допамин - ДА, норадреналин - НА и адреналин – А), и серотонин и хистамин. Катехоламините се синтезират в човешкия организъм от общ аминокиселинен прекурсор – тирозин, а серотонинът от триптофан. Скоростопределящите реакции в процеса на биосинтеза са реакциите на хидроксилация. Те се катализират от ензимите тирозин хидроксилаза и триптофан хидроксилаза, които имат нужда от кислород, желязо и кофактор тетрахидробиоптеридин (BH4), за функционирането си. Всички биогенни амини се синтезират в аксонното окончание, а ензимите участващи в процеса се намират в клетъчното тяло, откъдето се транспортират до мястото на синтеза. Хомеостазата на катехоламините в аксонното окончание се подържа чрез регулиране активността на тирозин хидроксилазата, която се фосфорилира и активира от Ca^{2+} и cAMP зависими протеин кинази. Дългосрочна регулация на ензима се осъществява също чрез промени в транскрипцията и стабилността на матричната РНК. Мястото на синтеза и на освобождаване на биогенните амини е едно и също като по този начин се осигурява бързата им екскреция, необходима в отговор на различни стимули. Тяхното действие се прекратява чрез обратното им приемане (reuptake) от аксона или чрез разграждането им от моноаминооксидазни ензими.

Изследването на биогенните амини при пациенти с афективни разстройства е започнало още през 1950г. с откритието, че антидепресанти и антипсихотици, успешно прилагани за лечение, модулират метаболизма на моноаминните невромедиатори (Goodwin, 1990). Трицикличните антидепресанти увеличават количеството на норадреналин и серотонин в синапсите като инхибират процеса на обратното им поемане от невроните. Нервомедиаторната система на биогенните амини е много активна в лимбичните региони на мозъка, които участват в контрола на съня, апетита, будността, сексуалната и ендокринните функции, както и в емоционалния статус. Характерно за симптоматиката на афективните разстройства са аномалии именно в тези функции.

II. 10.1.1. Серотонин

Серотонина в мозъка се синтезира от серотониновите неврони, излизащи от ядрата на шева на мозъчния ствол (raphe nuclei) и водещи до различни области в мозъка, включително и до отговорните за секрецията на норепинефрин. Той инервира много региони в мозъка като стриатум, нуклеус акумбенс, вентрален префронтален кортекс, амигдала, хипоталамус, които отговарят за функции, които са описани като абнормни при някои пациенти с АР (Stahl, 2008, Owens, 1994). Серотонина също така е ключов невротрансмитер в регулацията и на някои физиологични механизми като апетит, сън и агресивност, в които се наблюдават отклонения при пациенти. Нивата му са пряко зависими от нивата на прекурсора му, L–триптофан, който не се синтезира в човешкия организъм и се приема чрез храната и се конкурира с други аминокиселини при преминаване на кръвномозъчната бариера.

Продукцията и транспортирането на L–триптофан от кръвообращението в мозъка е ключово за синтеза на серотонин и може да бъде компрометирано от няколко фактора:

- Стрес, водещ до повишени нива на кортизол и дефицит на витамин B_6, което стимулира превръщането на L–триптофан (LT) в кинуренин, което трудно се компенсира. Това от своя страна води до ниска продукция на серотонин;
- Повишените серумни нива на кинуренин инхибират транспорта на L–триптофан (LT) в ЦНС и това също допринася за ниски нива на серотонин в ЦНС;
- Транспортирането на L–триптофан през кръвно-мозъчната бариера се извършва посредством свързването му с транспортна молекула, пренасяща и пет други аминокиселини. Синтеза на серотонин зависи пряко от кокнкуренцията на свързване между L–триптофан и другите аминокиселини.

В изследване на цереброспинална течност на болни с депресия са установени намалени нива на някои основни серотонинови метаболити, най-ниски нива са установени при извършилите опит за самоубийство (Mann, 2000). Друго проучване на серотониновия метаболизъм установява понижена концентрация на 5-хидроксииндолоцетна киселина при пациенти с БАР, метаболит получаващ се при разграждане на серотонин под въздействието на моноаминоксидазни ензими. Концентрацията на този метаболит е по-

висока в субгрупата с висока агресивност и опити за самоубийство, а ниска концентрация на метаболита е установен при деца и юноши с поведенчески отклонения (Sher, 2006; Mann, 2006).

Серотонинът осъществява ефекта си свързвайки се със седем групи рецептори: 5HT-1, 5HT-2, 5HT-3, 5HT-4, 5HT-5, 5HT-6, 5HT-7. Шест от седемте подтипа са G-протеин свързани рецептори, а 5-HT3 е рецептор лиганд-комплекс от затворен тип. G-протеин свързаните рецептори действат като активират фосфолипаза С, което се осъществява посредством катализиране и хидролиза на фосфатидилинозитол бисфосфат, който мобилизира вътреклетъчния калций и активира протеин киназа С.

Рецепторите тип 1 се срещат предимно в мозъка и мозъчните кръвоносни съдове, където служат като посредници в невралното инхибиране и вазоконстрикция, 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D и 5-HT4 въздействат върху регулацията на аденилат циклазната система. Намален брой на серотонинови рецептори тип 1А е описан в различни мозъчни области на пациенти с БАР (Delgado, 2000; Manji, 2000).

Рецепторите тип 2 са разпространени в централната и в периферната нервна система. Пост мортем изследване на мозъци на депресивно болни установява повишен брой серотонинови рецептори тип 2А 5-HT2A (Forutan, 2002). Друго изследване на мозъци на пациенти, извършили самоубийство показва повишена експресия на мРНК на 5-HT2A (Escriba, 2004), предполага се, че това може да е адаптивна регулация на организма към постоянно ниските нива на серотонин в синапса. Съществуват данни за скаченост с АР на район 13q14–q21, където е позициониран *HTR2A* гена (Serretti, 2008).

Серотонинови рецепторите тип 3 се наблюдават основно в периферната нервна система и рядко в чревните неврони, а рецепторите тип 4 се срещат в мозъка и в сърце, пикочен мехур и стомашно-чревен тракт. Сравнително по-слабо изследвани са серотониновите рецептори типове 5, 6, и 7.

Фармакологичните проучвания потвърждават ролята на серотонина при афективни разстройства. Един от механизмите на действие на трицикличните антидепресанти се изразява в намаляване обратното поемане на серотонина, в следствие на което се увеличават нивата му в синапсите (Blier, 2001). Действието се базира на селективното блокиране на обратното поемане от серотониновите транспортери (SSRIs). На този принцип действат антидепресанти като фуоксетин, флувоксетин, които са предпочитани със сравнително по-малкото си странични реакции (Szabo, 2002). На базата на наличната информация и фармакологичните данни, серотониновия Na+ и Cl - зависим транспортер (*SLC6A4*), многократно е изследван при пациенти с АР, както и при много други психиатрични заболявания.

II. 10.1.2. Допамин

Допаминът участва в регулиране на редица неврологични процеси, като мотивация, удоволствие, памет, учене, двигателна активност, хормоналната секреция и в поддържането на емоционална стабилност. Той активира мозъчни области, отговорни за

чувство на възнаграждение и мотивация (Wightman, 2002). Дисфункция в допаминовата невротрансмисия се счита в основата на различни психиатрични заболявания, каквито са шизофренията (Kienast, 2006), синдром на дефицит на вниманието, хиперактивност (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) (Faraone, 2006), и наркотични и алкохолни зависимости (Kienast, 2006; Hummel, 2002).

Допаминът се синтезира от аминокиселината тирозин, в мозъчния регион - substantia nigra и изпълнява функциите си в областта на базалните ганглии, като осъществява ефекта си посредством G протеин–свързани рецптори. Допаминовите рецептори имат седем трансмембранни сегмента и са подразделени в пет класа D1-D5. Генът кодиращ рецептор тип 4 е картиран в район скачен с БАР (11p15.5).

Повишена концентрацията на допамин е установена в мозъчни райони свързани с различни аспекти на емоционални реакции (Tzuang, 2004). Функционални невровизуализиращи изследвания показват промени в базалните ганглии, при пациенти с БАР и с УАР, при които се наблюдава понижен метаболизъм на допамин в подкоровите ядра в сравнение с метаболизма при здрави контроли (Neumeister, 2001).

Загубата на мотивация е една от най-разпространените характеристики при депресия, която се регулира чрез допаминовата невротрансмисия. Предполага се, че допаминергичната активност е понижена при депресия и повишена при мания (Stahl, 2008). Повишени метаболити на допамин са установени в цереброспинална течност на пациенти в мания (Gerner, 1984), а при болни с депресия от друга страна се наблюдава понижена концентрация на хомованилова киселина в цереброспинална течност, която е основен метаболит на допамина (Goodwin, 1990; Manji, 1997). Абнормни нива на допамин се наблюдават по време на хиперактивност при тежка мания, а на норадреналин при хипомания (Manji, 2000).

Допълнителни доказателства за ролята на допаминовата невротрансмисия идва от някои фармакологични изследвания. Обратното поемане на допамина от синапса се осъществява чрез допаминов транспортер, чийто ген е картиран в 5p15.3. Той представлява Na+ и Cl- зависим мембранен транспортерен белтък, който активно поема допамина от синапса обратно в неврона. Допаминовия транспортер е мишена за действието на амфетамини и кокаин, при което се блокира обратното му поемане и нивата му в синапса рязко се увеличават.

Амфетамините повишават постсинаптичния отговор към допамин и бързината на реакцията на външни стимули при биполярни пациенти в сравнение със здрави индивиди (Anand, 2000).

Успешно прилагани медикаменти за третиране на маниакална симптоматика действат, като блокират допаминовите рецептори и са антагонисти на допамина (Ghaemi, 2004). Допаминовите агонисти от своя страна са ефективни антидепресанти, но при предозиране могат да предизвикат мания при някои пациенти (Goodwin, 1990; Manji, 1997).

II. 10.1.3. Норадреналин (НА) и Адреналин (А)

Установено е, че промени в настроението е свързано с промени в нивата на норадреналин (норепинефрин). Този невромедиатор участва във физиологични процеси свързани с внимание и в механизмите предаващи сигнали към кортикалните и таламичните мозъчни части в следствие на сензорни дразнения. Той помага на ЦНС да обработи сензорната информация, понижава отговора при слаби стимули и увеличава този при силни.

Норадреналинът се образува от допамин с помощта на ензима допамин β-хидроксилаза. Отделя се от крайните окончания на симпатиковите нервни влакна, както и от влакната на невроните в locus coeruleus, екскрецията му е съпроводена и с отделяне на малки количества адреналин. Норадреналинът и адреналинът осъществяват своя ефект посредством α и β адренергични рецептори. Освен в постсинаптичната мембрана рецепторите се намират и в пресинаптичната мембрана, където участват в регулацията на количество отделен медиатор, взаимодействат с катехоламините в синаптичната цепка и контролират тяхното обратно захващане от пресинаптичното окончание.

Норадренергичните клетки намиращи се в locus coeruleus на мозъчния ствол инервират малкия мозък, хипоталамуса и дорзолатералния префронтален кортекс, които имат отношение към клиничната картина на депресия (Stahl, 2008). Post mortem изследване установява увеличен метаболизъм на НА в кортикални и таламични райони при пациенти с БАР (Young, 1994), а друго post mortem изследване на пациенти с депресия, извършили опит за самоубийство, показва повишена концентрация на определени рецептори за норадреналин в мозъчната кора (Little, 1997). Открити са по-ниски плазмени нива на НА и основния му метаболит, 3-метокси-4-хидроксифенилгликол (МХФГ) при пациенти с БАР, в сравнение на нивата им при пациенти с УАР. Установени са и по-високи нива на същите метаболити в урина, и в цереброспиналната течност при маниен, спрямо нивата им при депресивен епизод при пациенти с БАР (Goodwin, Manji, 1997; Grossman, 1999).

Антидепресантите и селективни инхибитори на обратното захващане на серотонина SSRIs регулират основно концентрацията на серотонина, но същевременно повишават и нивата на норадреналина в синапса. Други антидепресанти, блокират обратното поемане на норепинефрина и по този начин увеличават неговата концентрация в синапсите (Frazer, 2001).

II. 10.1.4. Хистамин

Хистаминът участва в различни поведенчески и физиологични функции, синтезира се в хипоталамуса, и се отделя и от мастните клетки в централната нервна система. Този невромедиатор се синтезира чрез декарбоксилация на аминокиселината хистидин, като за ензимите катализиращи процеса е важно наличието на витамин B_6. Съществуват три вида хистидинови рецептори, които са G протеин–свързани. Антихистаминовите препарати блокират хистаминовите рецептори от първи тип, имат успокояващ ефект и могат да доведат до сънливост. Рецепторите от тип 2 регулират екскрецията на стомашни

киселини, а рецепторите от тип 3 регулират синтезата и секрецията на хистидин и други невромедиатори. Метаболизма на хистидина се осъществява чрез моноаминоксидазните ензими.

II. 10.2. Други невромедиатори

II. 10.2.1. Гама- аминобутирова киселина (GABA)

Аминокиселината GABA (гама-аминобутирова киселина, gamma-aminobutyricacid), е основен инхибиторен невромедиатор в ЦНС при бозайници, и осъществява действието си посредством GABA рецептори. Рецепторите представляват трансмембранни йонни канали изградени от 5 хомоложни, но вариабилни субединици, които формират канал, през който хлоридните йони преминават през клетъчната мембрана. Всяка субединица се състои от дълга, вариабилна извънклетъчна част, 4 трансмембранни домена и вариабилен цитоплазмен регион (Whiting, 1999, Glatt, 1997). Установявано е че промени в транспорта и метаболизма на γ-аминобутирова киселина могат да допринасят за повишен риск от АР (Kosten, 2004).

Ниски нива на GABA са открити в мозък, цереброспинална течност и плазма на пациенти в депресия, както и в плазма на пациенти в мания (Swann, 1999). Промяна в нивата на аминокиселината GABA може да дисбалансира и други невротрансмитерни системи като серотониновата, норепинефриновата и допаминовата, които имат отношение към патогенезата на афективните разстройства (Benes, 2001). Рецепторите на γ-аминобутирова киселина взаимодействат и с бензодиазепини, барбитурати, стероиди и алкохол, повлияващи бързите промени в настроението. Фактори на средата, като стрес и злоупотреба с алкохол, повишават нивата на GABA, и това може да доведе до симптоми характерни за мания или депресия (Young, 2004). Типичната симптоматика на афективните разстройства като тревожност и разстройства в съня могат да се третират успешно с агенти, ускоряващи действието на γ-аминобутирова киселина върху рецепторите или повишаващи концентрацията на гама-аминобутировата киселина (Ashton, 2003).

Изследване на пациенти с БАР и УАР, установява асоциация със заболяванията на генетичен вариант в GABA рецептор тип 5 (GABRA5), определящ превеса на епизоди на мания или на депресия (Papadimitriou, 1998). Положителна асоциация между 156T>C вариант в GABA рецептор тип 1 (GABRA1) и БАР е получена, въпреки липсата на асоциация със заболяването на 12-те други изследвани варианта в рамките на същият ген (Serretti, 2008).

II. 10.2.2. Глутамат, Глутаматергична система

Глутаматът е друга аминокиселина, играеща роля на невромедиатор в ЦНС на човека, действа върху моноаминергичните неврони, посредством активирането на лиганд-зависими йонни канали и G протеин-свързани мембранни рецептори.

Описани са промени в метаболизма на глутамат при болни с депресия или извършили опит за самоубийство (Paul, 2003). При изследване на пациенти в остра мания

с позитронно-магнитна резонансна спектроскопия са установени и повишени нива на глутамат в левия дорзолатерален кортекс (Michael, 2003). Предполага се, че високи нива на глутамат индуцират невротоксичност и по този начин могат да допринасят за развитието на някои невродегенеративни заболявания включително и АР (Tsapakis, 2002). Някои антагонисти на глутамата показват действие подобно на антидепресантите, един от успешно прилаганите антиконвулсанти при лечението на АР, се изразява в инхибиране на излишната секреция на глутамат (Zarate, 2005; Frye, 2000).

Един от кандидат гените от глутаматергичната система, многократно изследван при пациенти с АР е генът *DAOA* (D-amino acid oxidase activator), намиращ се в регион 13q33.2, показал скаченост със заболяването, неговия продукт играе роля при активирането на N-метил-D-аспартатните рецептори, членове на суперфамилията на глутамат-зависимите йонни канали (Chumakov, 2002; Williams, 2006). Положителна асоциация с АР е установена за различни полиморфизми в рамките на *DAOA* гена в независими изследвания в европейската и американската популации (Hattori, 2003). NMDA (N-метил-D-аспартанова киселина, N-methyl-D-aspartic acid) е селективен агонист, който се свързва с определени рецептори, и това води до отварянето на йонните канали. Глутаматните рецептори се отличават с волтаж-зависима активация в резултат на блокиране на йонни канали от извънклетъчни Mg^{2+} йони, което позволява навлизането на Na^{+} и малки количества Ca^{2+} йони в клетката и отвеждането на K^{+} йони извън нея. Предполага се, че преминаването на Ca^{2+} йони през NMDA рецепторите е от съществено значение за синаптичната пластичност. Други кандидат-гени от глутаматергичната система, имащи отношение към психиатричните разстройства са гените кодиращи различните субединици на каинатните рецептори и функционални йонни канали (GRIK4, GRIK5, GRIK1, GRIK2 и GRIK3) (Yosifova, 2011; Shibata, 2006). Генът за *DTNBP1* (дистробревин-свързващ протеин 1), се експресира в невроните на хипокампуса и кодира протеин откриващ се в пресинаптичните мембрани на аксоните на глутаматергичните неврони. Установени са намалени нива на DTNBP1 (dystrobrevin-binding protein 1) в хипокампуса при болни от шизофрения (Kirov, 2004) и е съобщена асоциация на генетични варианти в гена с БАР (Gaysina, 2009; Arias, 2009).

II. 10.3. Хипотеза базирана на промени в оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек

Хипоталамуса отговаря за отделянето на хормони в човешкия организъм, като отделя освобождаващи фактори действащи на хипофизата, която от своя страна стимулира или инхибира секрецията на различни хормони от жлезите с вътрешна секреция. Хормоните, отделяни в следствие на подобни стимули изпращат обратна информация към хипофизата и хипоталамуса и контролират собствените си нива. Хипоталамус-хипофиза-надбъбрек (ХХН) оста е основна част на невроендокринната система и има централна роля при физиологичния отговор на стрес. Тя участва в регулирането на храносмилането, имунната система, настроението и емоциите, сексуалността, съхранението и разхода на енергия. Абнормни промени в регулацията на ХХН оста са описани при афективни разстройства (Manji, 2000; Varghese, 1999). В резултат на стрес кортико-тропин-освобождаващият фактор (КОФ) се синтезира в хипокампуса, може да действа едновременно като хормон и като невромедиатор в

регулацията на ендокринните и поведенчески реакции. Мозъчните участъци най-силно реагиращи на стрес се намират в амигдалата, те изпращат сигнал към паравентрикуларното ядро на хипокампуса, който от своя страна отделя кортико-тропин-освобождаващият фактор (КОФ). Хипофизата се повлиява от КОФ и тя отделя адренокортикотропен хормон (АКТХ) в кръвния ток, който достига до надбъбречната жлеза и я стимулира да отделя кортизол. Той от своя страна увеличава кръвотока към мускулите, а КОФ намалява желанието за храна и секс и повишава вниманието. Повишени нива на кортизол са намерени в урина, кръв и цереброспинална течност на пациенти с АР (Mitchell, 1998)

Хроничния стрес или постоянно високите кортизолни нива могат да доведат до атрофия на невроните (Stahl, 2008). При пациенти с УАР както и пациенти с БАР в епизод на депресия се наблюдава хиперактивност на ХХН оста, предполага се, че хроничното активиране на тази ос може или да допринася за развитието на заболяването или да е следствие от него (Garlow, 1999). За пациенти с УАР е установено, предразположение към бурна реакция в следствие на стресови фактори, водещи до неврохимични и невроендокринни въздействия от хиперсекреция на КОФ (Stout, 2002). Хроничният стрес и високите нива на кортизол предизвиква атрофия и смърт на неврони в хипокампуса (Sapolsky, 2000). Медикаментозно действие на валпроата и лития намалява РНК-експресията на КОФ гена в амигдалата, хипоталамуса и фронталния кортекс, с което се постига стабилизиране на настроението чрез въздействие върху КОФ невронната система (Gilmor, 2003).

Магнитно резонансни изследвания показват намален обем на хипокампуса при заболявания свързани с хиперкортизолемия, каквито са болест на Кушинг и посттравматичен стресов синдром. Нормално хипокампуса потиска ХХН оста, но когато той е увреден от стресови фактори, регулиращата му функция е възпрепятствана. Честите смени на настроението могат да бъдат повтарящи се стресови ситуации за организма и да повлияят регулирането на оста ХХН (Sapolsky, 2000).

Честото наблюдаване на струпване на депресивно болни във фамилии, предполага наличието на определено генетично предразположение, водещо до понижаване на прага за проява на депресия и по реактивна реакция на стрес. Генетичните фактори могат да водят до промени в концентрацията на моноамините в синапсите и до променена регулация на оста ХХН. В определени ситуации генетично обоснования праг сам по себе си не е достатъчен, за да предизвика депресия, при отсъствие на сериозен стрес, но същевременно наличието на стрес може да намали допълнително този праг (Penza, 2003). Преживян силен стрес в ранна детска възраст активира по-реактивен отговор към стреса и индуцира постоянна увеличена активност в невроните, продуциращи КОФ. При продължително подлагане на стрес невроните стават свръхчувствителни и реагират и на слаби дразнители. Предполага се, че при депресия могат да се проявят и невроендокринни и поведенчески реакции типични за АР (Shea, 2000). Експерименти проведени при плъхове потвърждават тази хипотеза, за съвместно влияние на генетични и фактори на околната среда водещи до трайни депресивни промени (Morley-Fletcher, 2003).

II. 10.4. Нарушения в невропластичността и вътреклетъчни сигнални каскади

Невропластичността представлява способността на мозъчните клетки да формират нови невронни връзки в зависимост от външни стимули. По този начин невроните могат да променят активността си на базата на дразнители от различен характер и промени в заобикалящата ги среда. Невроните могат да формират нови синап си и да разхлабват или заздравяват вече съществуващи такива в отговор на нови стимули. В невропластичността се включват процеси, като промени в дендритната функция, синаптично ремоделиране, дългосрочно потенциране, синаптогенеза и неврогенеза. Посредством невромедиаторите, техните специфични рецептори и вътреклетъчните сигнални пътища може да се осъществява контрол на експресията на определени гени. В следствие на хроничен стрес може да се инхибира или стимулира експресията на елементи участващи във формирането на рецептори в следствие на което стреса до бъде възприеман по-реактивно или обратното по-бавно и с притъпена чувствителност, което да повлиява състоянията на афект. Медикаментозната терапия с антидепресанти и електроконвулсивната терапия увеличава растежа на невроните, а хроничния стрес намалява броя на невроните и може да води до склонност към депресия.

Сигналните пътища играят ключова роля в приемането, предаването и обработката на информацията, както и във фината регулация на редица физиологични процеси. В централната нервна система сигналните каскади обработват и интегрират различни нервни сигнали и ги предават към ефекторите. Предполага се че нарушения във вътреклетъчните сигнални каскади могат да допринасят за етиологията на АР (Duman, 1997). Клетъчния отговор на различни стимули под формата на свързване на невромедиатор с рецептор, задейства сложна каскада от посредници, в които участват йони, йонни канали, рецептори, медиатори, транспортери, вторични посредници, ензими, участващи във фосфорилиране и дефосфорилиране в невроните. Установено е, че клетъчната атрофия на невроните и често наблюдаваните мозъчни структурни промени при пациенти с АР могат да се дължат на нарушения в невропластичноста, както и на каскадните механизми водещи до повишена невронна смъртност (Drevets, 2001; Strakowski, 2005).

Post mortem изследвания описват намален брой глиални клетки в различни мозъчни области (Coyle, 2000), което се предполага, че води до дисрегулация на синаптичните функции и промени в енергетичната хомеостазата на ЦНС. Точните механизми водещи до намаляване на броя на глиалните клетки не са изяснени, но съществува хипотеза според която това може да се дължи на нарушения в сигналните пътища, които регулират клетъчното оцеляване (Uranova, 2004). Намаления брой глиални клетки, затрудняващ поддържането на невропластичност и може да има отношение към развитие на заболявания от афективния спектър.

Установено е че продължителното медикаментозно третиране с литий модифицира функцията на G белтъка (Manji, 2000 A), неговите нива (Karege, 2000), както и повлиява върху фосфатидилинозитоловия сигнален път (Sjoholt, 2004). Докладвана е повишена активност на G белтъка в левкоцитите на нелекувани пациенти с мания и депресия,

предполага се, че това може да се дължи на промени в сигналните пътища водещи до нарушена транскрипция и транслация на гена (Manji, 2000). Инозитол фосфатазите играят важна роля във фосфатидилинозитоловия сигнален път, който също се повлиява от литий, а генетични варианти кодиращи тези ензими са асоциирани с БАР (Sjøholt, 2004).

Друг ключов елемент в сигналната трансдукция е ензима протеин киназа С (PKC), която участва в процеси като научаване и памет. Ензима е хетерогенно разпространен в мозъка, с най-високи нива в пресинаптичните краища на невроните. Установена е увеличена PKC активност в мозъчна тъкан на пациенти с мания (Friedman, 1993; Manji, 2000) и се предполага се че част от терапевтичното влияния на лития се състои и в намаляване активността на PKC (Manji, 2000 A).

В мозъчни структури като темпорален кортекс, малък мозък и таламус е наблюдавана по-ниска концентрация на регулаторната субединица на cAMP/протеин киназа А (PKA) при пациенти с БАР и са описани по-високи нива на фосфорилиране на белтъка Rap1 (Manji, 2000). Фосфорилирането на Rap1 е пряко свързано с вътреклетъчните калциеви сигнални каскади, които са с изменено функциониране при АР, повишени нива на калций са намерени в тромбоцити, лимфоцити и неутрофили на пациенти (Dubovsky, 1992). Калция участва в почти всички вътреклетъчни сигнални пътища, той е вторичен посредник и е много важен за регулацията на синтезата и секрецията на невромедиаторите, както и за невронната възбудимост. По-детайлно проучване на механизмите на тези пътища могат да допринесат евентуално за по-ефективно медикаментозно лечение (Manji, 2000).

Невроторофичните фактори какъвто е BDNF (brain derived neutrophylic factor) са важни за оцеляването и правилното функциониране на невроните и промени във функцията им влияе върху жизнеността им. Множество клинични изследвания установяват намален обем на определени мозъчни структури при пациенти с депресия, което може да е следствие от ниските нива на невротрофични фактори. Наблюдаваната клетъчна атрофия на неврони в хипокампуса на пациенти с АР може да се дължи на пониженатa експресия на *BDNF* в този регион, под действието на различни стресови фактори (Duman, 2002).

Продължителната активация на сигналната система цикличен AMP cAMP/протеин киназа А в определени мозъчни региони, срещана при пациенти продължително приемащи антидепресанти, води до увеличаване експресията на транскрибционния фактор (CREB) (cAMP response element binding protein). Той от своя страна води до повишена експресия на някои невротрофични фактори, включително и BDNF в невроните на хипокампуса и церебралния кортекс. Антидепресантите задействат сигнални каскади с вторични посредници, които водят също до увеличаване концентрацията на различни невротрофични фактори включително и BDNF (Duman, 2002).

Невротрофичните фактори повлияват клетъчната смърт на невроните посредством активацията на два различни сигнални пътя: PI-3-фосфатидилинозитол-3 киназен път и MAP-киназен път. При активирането на MAP киназна сигнална каскада се увеличава експресията на основни протеини на клетъчното оцеляване като Bcl-2 (Manji, 2002).

Антиапоптозния протеин Bcl-2 може да забави клетъчната смърт по различни начини, той има невротрофичен ефект и действа като нарушава отделянето на калций и цитохром С, премахва прекурсорите на каспазите и улеснява приемането на калций в митохондриите (Finkbeiner, 2000). Установено е, че литият и валпроата увеличават експресията на Bcl-2 в клетки с човешки невронен произход (Duman, 2002) и съответно водят до увеличаване на експресията на *BDNF*.

Възможно е нарушения във функционалността и експресията на елементи от каскадните системи, участващи в процесите на клетъчна смърт и отцеляване да имат отношение към патологията и лечението на афективните разстройства. Жизнеспособността на невроните подлежи на фин баланс между нивата и активността на факторите на клетъчна смърт и тези на клетъчното оцеляване, дори и малки вариации в тях са в състояние да указват влияние (Manji, 2003).

Невронната пластичност подлежи на регулация и от глутаматергичната система, глюкокортикоидите могат да индуцират отделяне на глутамат в CA3 региона на хипокампуса, което от своя страна активира кортикостероидни рецептори тип II и води до повишаване на калциевите потоци. Експресията на N-methyl-D-aspartate (*NMDA*) рецептор, вид глутаматергичен йонотропен рецептор се повишава в следствие високата концентрация на калций. Този процес в невроните на хипокампуса води до невротоксичност и атрофия (Skolnick, 1996). При пациенти с БАР чрез PET са установени аномалии в церебралния кръвен ток и глюкозния метаболизъм в мозъчните райони, които се инервират от глутаматергични неврони (Magistretti, 1996). Някои медикаменти с антидепресивен ефект представляват анти-глутаматергични агенти, което подкрепя хипотезата, че хиперактивността или хипоактивността при мания и депресия могат отчасти да се дължат и на промени в активността на глутаматергични пътища.

Литият и валпроатът, намаляват РНК-експресията на КОФ, също така влияят и на GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), ключов ензим в сигналните каскади. Протеин киназата GSK-3 участва в енергийния метаболизъм, клетъчното развитие, генната транскрипция, цитоскелетната организация, регулацията на клетъчния цикъл, невропластичността, пролиферацията и апоптозата. Ензима може да има проапоптична функция при съвпадане на активното му състояние с неактивната фаза на клетката и в хода на клетъчния отговор може да се инактивира. В активно състояние GSK-3 фосфорилира и съответно инактивира различни транскрипционни фактори (β-катенин, C-Jun, HSF-1, CREB), както и някои цитоскелетни протеини (tau, MAP1B). Фосфорилирането на MAP1B се асоциира със загуба или дисоцииране на стабилните аксонални микротубули. Освен това, инхибирането на GSK-3 води до акумулиране на синапсин и затруднява освобождаването на различни вещества (Gould, 2004; Agid, 2007; Hall, 2002).

Друг кандидат ген имащ отношение към развитието на невроните и предаването на сигнали между тях е *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1). Първоначално балансирана транслокация в локусът е идентифициран в голямо шотландско семейство (Blackwood, 2001) и е установено че тя сегрегира с няколко психиатрични разстройства, срещащи се в семейството, като шизофрения, БАР и рекурентно депресивно разстройство.

Унаследяването на транслокацията се свързва със значително повишен риск от развитие на психиатрично заболяване, въпреки наблюдаваната непълна пенетрантност. Транслокацията води до нарушения в два гена, *DISC1* и *DISC2*, като експресията на DISC1 намалява с около 50% при транслокация (Millar, 2000). Допълнителни доказателство за връзката на DISC1 с различни невропсихиатрични заболявания като шизофрения, афективни разстройства, синдром на Аспергер и аутизъм са обобщени в обзорно изследване проведено от (Chubb, 2008). Въпреки това проведените геномни проучвания не потвърждават така еднозначно връзката между генетичните варианти в DISC1 и психиатричните разстройства, което предполага, че честите варианти в този локус не допринасят съществено за развитието на тези заболявания, а по-скоро имат сравнително малък принос, заедно с други редки варианти. Определени полиморфизми в DISC1 указват влияние на мозъчните структури и по-специално на обема на сивото и бялото вещество и мозъчната плътност в определени региони (Callicott, 2005; Cannon, 2005), както и на когнитивното функциониране (Palo, 2007; Carless, 2011). DISC1 протеина взима участие в процеса на неврогенеза и зреене, който се извършва в целия мозък в подрастващи индивиди и само в определени области при възрастни, участва съвместно с LIS1 и NDEL1 в невронната миграция, както и в невронната интеграция. По–висока концентрация на DISC1 белтъка е описана в синапсите (Hayashi-Takagi, 2010), където той въздейства на глутаматните и NMDA рецепторите и участва в невропластичността. Описани са взаимодействия между различни протеини, имащи отношение към повишен риск от психиатрични заболявания (Ingason 2011; Kang, 2011). Проучванията показват участието на DISC1 в редица ключови процеси, които биха могли да имат отношение към етиологията на АР.

II. 10.5. Хипотеза за каналопатиите

Резултати от някои геномни асоциативни проучвания демонстрират, че гени кодиращи елементи участващи в структурата на йонни канали или в регулацията им могат да имат отношение към риска от АР. Първоначално в геномно асоциативно проучване включващо 4 387 болни от БАР и 6 209 контроли генотипирани за около 1.8 милиона маркера се съобщава за резултат OR=1.45, $p=9.1\times10^{-9}$ за rs10994336, намиращ се в кандидат гена *ANK3A* (Ferreira et al. 2008), който кодира протеин, взимащ участие в пространственото разположение на йонните канали. В последствие резултата е потвърден от (Baum et al., 2008), а по-късно (Schulze et al. 2009) идентифицира две еднонуклеотидни замени разположени на разстояние от ~340 kb една от друга в *ANK3*A гена, rs9804190 и rs10994336, имащи отношение към АР. Резултатите от три независими геномни асоциативни проучвания (Scott et al., 2009; Smith et al., 2009; Lee et al., 2010), които въпреки че не изпълняват критериите за значимост при такива изследвания, също потвърждават асоциацията на *ANK3A* с АР. Мета-анализ (Scott et al. 2009) получава резултат за rs10994336, (OR = 1.47, $p=1.1\times10^{-10}$) в *ANK3A* гена, а друго голямо проучване изследващо ~2.5 милиона маркера в 7 481 болни от БАР и 9 250 контроли съобщава за най-добри резултати отново за s10994397, намиращ се на 99 kb от rs10994336, както и за rs4765913 в *CACNA1C* гена.

Йонните канали представляват сложни гликопротеинни структури, често формирани от няколко субединици, разположени в хидрофобната мембраната, където образуват пора, през която се извършва селективен транспорт на заредени йони през нея. Транспортът променя потенциала на мембраната, което влияе на способността на невроните да комуникират чрез електрически импулси и невромедиатори. Доказателство за ролята на йонните канали в етиологията на АР е фактът, че те са мишена на някои успешно прилагани при такива състояния медикаменти. Литият влияе на функционирането на йонните канали, като навлиза в клетката посредством натриев канал, потиска мембранната проводимост, което от своя страна води до промени в мембранната възбудимост (Overington et al., 2006).

Гените кодиращи йонни канали или техни елементи и субединици представляват около 1–2% от целия геном (Clare, 2010; Stelzer et al., 2011), като повечето се отличават с тъканно-специфична експресия и високи нива на алтернативен сплайсинг. Те са изключително разнообразни като структура, което съответства и на разнообразната им функционалност. Същевременно в регулацията им са въвлечени и много допълнителни елементи. За част от тези гени са налични данни за скаченост или асоциация от геномните асоциативни проучвания. Начина на протичане на афективните разстройства и по-специално наличието на цикличност при тази група заболявания добре съответства на хипотезата за каналопатиите.

Кандидат-гена *ANK3A* кодира протеин, свързващ се с някои мембранни белтъци, а гена *CACNA1C* кодира алфа 1С субединицата на L-тип калциев канал. Наличието на сходна биологична функция на тези кандидат-гени и тяхната връзка към повишен риск от АР, демонстриран чрез геномните асоциативни проучвания е предпоставка за генерирането на хипотезата за каналопатии във връзка с етиологията на АР.

Посредством биоинформационна база данни, изследваща възможните взаимодействия между белтъци е установено, че връзката на ANK3 с KCNQ2 (калиев канал тип 2) води до повишен риск от БАР ($p = 3.18\times10^{-8}$) дори и след статистическа корекция на резултата (Szklarczyk, 2011). Изследване на (Borsotto, 2007) съобщава и за самостоятелен ефект на KCNQ2 гена върху АР. Други проучвания също предоставят данни за връзката на калиевите канали с АР. В района 8q24 показал скаченост с БАР (Newton, 2007) е позициониран гена KCNQ3 (калиев канал тип 3). Резултатите от анализи, базирани на определени пътища, за които се предполага че имат отношение към дадено заболяване (pathway-based analysis) показват, че гените въвлечени в структурата и регулацията на йонните канали могат да имат отношение към АР (Askland et al., 2009, Le-Niculescu et al., 2009). Акумулираните данни от генетичните изследвания, както и ролята на йонните канали за възбудимостта на невроните ги прави подходящи за изследване във връзка с АР.

II. 11. Определяне на генетичния модел на унаследяване

Изследванията върху моделите на унаследяване на афективните разстройства показват, че те са мултифакторни полигенни заболявания. Типът на унаследяване на АР е подобен на този на други комплексни заболявания, не се подчинява на менделовите

принципи и се предполага че е олигогенен или полигенен с прагов ефект (McGuffin, 1994). Множество генетични варианти и фактори на средата седят в основата на АР, определени генни механизми като локусна, алелна хетерогенност, епистаза и импринтинг също могат да имат отношение към етиологията. Използват се математически модели, които да изследват разпределението на засегнатите в рамките на семействата. Моделите тестват различни хипотези за участието на множество гени както и фактори на околната среда, с цел да се установи този, който най добре описва унаследяването. За да се развие едно полигенно мултифакторно заболяване е необходимо натрупване на фактори от различно естество, които да преминат определен праг.

Данните от фамилните проучвания, сочат, че степента на риска се увеличава с увеличавани близостта на родство с пробанда. Броят на предразполагащите локуси, рискът, които се определя от тях и степента на взаимодействие помежду им не може точно да се определи и най-вероятно варира при различните семейства. Прилаганите математически модели, тестват кои хипотези са най-вероятни в изследваната извадка.

Фамилните проучвания установяват различни генетични модели на унаследяване, които обясняват разпределението на болните индивиди в изследваните извадки. Колаборативно американско проучване на депресивно болни установява, че основен ген, действащ върху полигенен фон от предразполагащи фактори по-добре съответства на наблюдаваното унаследяване в изследваната група от чист полигенен модел (Rice, 1987). Друго американско изследване на семейства с тежка рекурентна депресия описват ко-доминантно унаследяване (Maher, 2002). Предполага се че в различните фамилии различни модели на унаследяване описват най-добре разпределението на болните индивиди.

Фиг. 2: Полигенен мултифакторен модел за генетично унаследяване и праг за развитие на заболяването (Tsuang 1990).

II. 12. Стратегии и методи за картиране на гени за предразположение към комплексни заболявания

Анализът за скаченост, асоциативните и геномните проучвания са подходи използвани за картиране на локуси, съдържащи генетични варианти, които водят до развитие на комплексни заболяване. Анализът за скаченост има най-голяма сила при детектиране на единични, основни гени предизвикващи заболяването, когато фенотипа може да бъде измерен с количествени показатели, но се използва и при изследване на комплексни заболявания. Методът прилага математически модели към фамилните данни с цел намирането на този, който най-добре описва разпределението на болните в поколенията. Най-общо има две разновидности на анализа на скаченост, параметричен и непараметричен. С него могат да се изследват както малки ядрени семейства, така и големи фамилии като силата на анализа нараства при големи семейства с множество болни. Чрез анализа за скаченост може да се детектира хромозомен локус, свързан с дадено заболяване без да е налична информация за молекулярните механизми водещи до повишен риск от самото заболяване.

Асоциативните проучвания изследват несвързани с родствена връзка индивиди и сравняват честотите на предполагаемите генетични варианти при здрави и болни. Съществуват разновидности на асоциативните проучвания, които целят преодоляване на някои ограничения на метода и по-прецизното отдиференциране на евентуалните болестотворни варианти.

Поради спецификата на психиатричните заболявания са налични някои трудности при анализа им. Основните затруднения при генетичното изследване на АР произтичат от следните фактори:

- Липса на директно съответствие между генотип и фенотип;
- Един и същ генотип може да доведе до различен фенотип, поради взаимодействие с други генетични варианти или фактори на средата;
- Различни генотипи могат да доведат до еднакъв фенотип, отново поради взаимодействие с други генетични варианти или фактори на средата;
- Различна възраст на настъпване, диагностична надеждност и непълна пенетрантност.

II. 12.1. Параметричен анализ за скаченост (Linkage analysis)

Основният принцип на анализа за скаченост се състои в проследяването на косегрегацията на молекулни маркери със заболяването в семейства с повече от един засегнат. Ако те сегрегират заедно, то в района около маркера могат да се намират гени, допринасящи за развитието на заболяването. Изследването на множество маркери цели установяването на малък район, където между маркерите и локуса на заболяването не се извършва рекомбинация. Параметричният анализ изисква предварително определяне на точен генетичен модел на заболяването, който включва алелни честоти, пенетрантност, както и предполагаем начин на унаследяване (доминантен, рецесивен, смесен, адитивен,

мултипликативен). Този вид анализ е прилаган успешно за картиране на гени при моногенни заболявания, но се прилага и при анализ на комплексни заболявания като АР.

Рекомбинацията е процес, протичащ по време на мейозата, при който става обмяна на генетичен материал между хомоложни участъци на майчината и бащината хромозома, осъществява се в определени локуси, наречени хиазми. Генетичното разстояние между даден маркер и болестния алел се измерва с параметъра рекомбинационната фракция (θ), която представлява вероятността за рекомбинация между два гена и е функция от физическото разстояние между техните локуси на хромозомата. При разглеждане на два локуса, хромозома съдържаща един локус от бащината и другия локус от майчината хромозома се нарича рекомбинантна. Фракцията от гамети, които са рекомбинантни се нарича рекомбинационна фракция между двата локуса. Рекомбинационна фракция равна на 0 означава, че между двата локуса не е настъпил нито един кросинговър, т.е. разстоянието между тях е много малко. Рекомбинационна фракция 0.5 означава, че алелите на двата локуса се комбинират случайно при мейоза, следователно са много отдалечени в рамките на хромозомата или се намират на различни хромозоми. Генетичното разстояние се измерва в см, където 1 см отговаря на честота на кросинговър един път на всеки 100 мейози (или е равна на рекомбинационна фракция 0.01). Методът за анализ на скаченост се основава на теорията на вероятностите и използва предварително зададени параметри, като рекомбинационната фракция и модел на унаследяване. Математически се използва Lod score метода (Morton, 1955), който представлява десетичен логаритъм на отношението между вероятността за наличие на скаченост при определена рекомбинационна фракция θ и вероятността за отсъствие на такава при θ=0.5. За изчисляване се използва следната формула:

$$\textit{lod score} = \log_{10}\frac{\text{вероятността } (\theta)}{\text{вероятността } (\theta = 0.5)}$$

Максималната стойност на Lod в целия диапазон на θ се приема за оценка на вероятността на наличието на скаченост между изследваните локуси. За двуточков анализи (един маркер и болестен алел) на менделово заболяване се използва праг за наличие на скаченост Lod>3 (Morton, 1955; Ott, 1999). Тези стойности на Lod представляват доказателство за скаченост с 0.05 вероятност за грешка. Хипотезата за скаченост може да бъде отхвърлена при Lod < - 2. Стойности на Lod между - 2 и +3 нямат статистическа значимост, при ниво на значимост 0.05.

При комплексните заболявания са необходими по-строги критерии, които да ограничат получаването на фалшиво положителни резултати, дължащи се на случайност. Използват се нива на Lod Score=3.3, съответстващи на $p=5x10^{5}$, при които се постига препоръчваното ниво на значимост от 5% (Lander & Kruglyak, 1995).

Lod стойностите могат да бъдат изчислени и за множество локуси, многоточковият анализ (multipoint analysis) за скаченост е по-информативен (Lathrop, 1984). При него се търси рекомбинация между много маркери едновременно като редът на маркерите е от

голямо значение. Проведените анализи за скаченост при афективни разстройства не предоставят убедителни доказателства за гени с голям ефект определящи риска от заболяването, а по-скоро наличие на множество гени с малък ефект.

II. 12.2. Непараметричен анализ за скаченост

Непараметричен анализ за скаченост не изисква задаването на модел на унаследяване на заболяването. Подходящ е за анализ на малки нуклеарни семейства и при анализ на заболявания с неизяснен модел на унаследяване. Базира се на пресмятане на степента на поделяне на алелите на изследваните маркери между засегнатите индивиди в семейството спрямо очакваното при Менделово унаследяване.

Метод на засегнатите двойки сибси (Affected Sib Pair Analysis)

Метод на засегнатите двойки сибси представлява вид непараметричен анализ, при който се анализират засегнати братя или сестри в малки семейства. Подхода е предложен от Penrose (Penrose L, 1935), и може да се фокусира само върху засегнатите братя или сестри (Bishop, 1990), като се изчислява количеството общи алели или хаплотипи при двойки засегнати братя или сестри. Принципът на анализа се базира на предположението, че братята и сестрите споделят случайно 50% от алелите си. Ако изследвания вариант е разположен в близост до болестен алел, предразполагащ към заболяването, то тази двойка ще споделя повече алели отколкото при случайно разпределение. Чрез този метод се взимат под внимание само засегнатите сибси, тъй като при комплексните заболявания незасегнатите индивиди могат да са носители на предразполагащи към заболяване гени, но да не са го проявили поради непълна пенетрантност или недостигане на праг за проява. За определянето на произхода на алелите се генотипират и родителите. Анализът включва пресмятане процента на „поделяне" на родителски алели, и се различават алели еднакви по състояние (identical by state – IBS) или еднакви по произход (identical by decent, IBD). Ако сибсите са засегнати, то те ще поделят и унаследяват сегмент от хромозомата, който носи локус, отговорен за заболяването. Изследването на голям брой семейства с поне двама сибса би позволило детекцията на маркери в определени хромозомни райони, които са унаследени много по-често в сравнение с очакваното при случайност на събитието. Предимство на метода е факта, че информативните семейства от този тип се срещат по-често и материал за изследване се събира по-лесно в сравнение с големи родословия.

Метод на засегнатите роднински двойки (Affected Relative Pairs Analysis)

Метода на засегнатите роднински двойки използва принципа на метода на засегнатите двойки сибси, който е допълнен с възможността за включват в изследването и на други роднински двойки (Risch & Merikangas, 1996). Сравняват се очаквания и действително наблюдавания брой засегнати родственици, при които става поделяне на алелите, унаследени от един общ предшественик. Метода позволява анализирането на множество маркери в големи семейства (Weeks, 1992).

II. 12.3. Асоциативен анализ

Асоциативните проучвания се основават на предположението, че при съществуване на асоциация между определен алел на даден маркер и заболяването, то честотата на този алел ще бъде по-висока в засегнатите индивиди спрямо здравите контроли. Изследват се несвързани с роднинска връзка болни и здрави индивиди от една популация или фамилии, при които се изследва неравновесно предаване в поколенията. Един генетичен вариант е асоцииран с даден фенотип, ако се наблюдава със съществено по-висока честота сред засегнатите в сравнение със здравите контролни индивиди. От съществено значение за получаване на коректни резултати е правилното подбиране на контролната група.

Позитивна асоциация може да бъде установена в следните ситуации:

- Ако определен генетичен вариант на изследваният маркер е функционален полиморфизъм и повлиява анализирания фенотип. Асоциативният анализ е подходящ за използване на функционални ДНК полиморфизми при откриване на локуси, свързани с количествени белези;

- Ако определен генетичен вариант не повлиява фенотипа, но се намира в неравновесна скаченост с друг локус, който действително има отношение към заболяването. Неравновесна скаченост се очаква при ниска мутационна честота и достатъчна близост между маркерния и евентуалния болестен локус, така че скачеността между тях да не е разрушена от рекомбинация по време на популационната история.

Предимство на асоциативните методи е сравнително по-лесното събиране на голяма група индексни пациенти и контроли спрямо събирането на семейства с повече от един засегнат индивид, за провеждане на анализ на скаченост. Чрез асоциативен анализ се дефинира малък кандидат-регион, в който по-лесно се търси ген за предразположение към изследваното заболяване. Подходящ е за откриване на локуси с малък ефект и сравнително висока популационна честота. Анализа за скаченост от своя страна може да идентифицира варианти, които не участват в потенциални патологични процеси и е по-ефективен за откриване на варианти с висок относителен ефект и ниска честота. Двата метода предоставят допълваща се информация и често при изследване на комплексни заболявания се комбинира използването им.

Ключов момент и при двата анализа е изборът на клинична извадка. Заради естеството на полигенните многофакторни заболявания се предпочита работата с възможно най-хомогенната в генетично отношение група, като така се избягва проблема с популационната стратификация. Предпочита се изследването на изолатните популации, които произлизат от малки и млади популации, разрастващи се бързо и културално рядко смесващи се с други. При тях обикновено се наблюдават по-големи региони на неравновесие в скачеността, в следствие на по-малко рекомбинационни събития. Именно поради генетичната хомогенност се предполага че при тях броя на генетичните варианти предразполагащи към дадено комплексно заболяване е сравнително по-малък и те са предпочитани за анализ.

Неравновесна скаченост (linkage disequilibrium, LD)

Алелна асоциация се получава при наличието на LD между тясно свързани локуси, независимо дали асоцииранят генетичен вариант има директен ефект върху заболяването. В същностна на неравновесната скаченост стои предаването на геномни сегменти в блокове от поколение на поколение при липса на мейотична рекомбинация. Тези LD блокове споделят еднаква генеалогична история, но силно се влияят от еволюционните процеси като генетичен дрифт, миграции, бързо популационно разрастване и следователно са зависими от популационната история. Рекомбинацията по време на мейозата води до намаляване нивото на LD между локусите от едно поколение към следващото. Алелите, които са тясно свързани на една хромозома могат да не бъдат разделени по време на мейозата и нивото на LD между тях намалява еволюционно с по-бавни темпове. Неравновесната скаченост е зависима от популационната история, една черта може да покаже позитивна асоциация с един алел в изолатна популация, с друг алел в друга изолатна популация и с нито един алел в голяма смесена популация. Същевременно в смесена популация всеки по-чест белег може да покаже фалшива позитивна асоциация с който и да е по-чест алел. Геномът се състои от блокове с високо и ниско ниво на LD, като те се означават като хаплотипни блокове. Няколко проучвания показват, че геномът е структуриран от блокове с високо LD, разделени от райони с високи нива на рекомбинация (рекомбинационни горещи точки) (Gabriel, 2002; Dawson, 2002; Philips, 2003). Съществуването на блокове с високо LD сред генома могат да се използват за редуциране на броя маркери за генотипиране при провеждане на асоциативно изследване.

Фамилно-базирани асоциативни тестове (FBAT)

Два от най-често използваните фамилно-базирани асоциативни тестове са анализ на хаплотипно-базирания относителен риск, haplotype based haplotype relative risk (HHRR) (Terwilliger, 1992) и анализ на неравновесно унаследяване, transmission disequilibrium test (TDT) (Spielman, 1993). И при двата модела хаплотипите или алелите, които не са предадени от родителите на засегнатите деца се използват като вътрешни контроли. Основната разлика между тези методи е, че докато TDT теста извлича алелните данни само от хетерозиготните родители, HHRR метода ги извлича и от хомозиготните родители.

Изследователския подход е от изключителна важност при генетичните изследвания. Най-често провеждани са асоциативни проучвания от тип случай-контроли, при които се сравняват честотите на генетичните варианти между пациенти и подходящо подбрани контроли и фамилни изследвания. Фамилните извадки могат да служат както за асоциативни проучвания така и за изследване за скаченост, като при тях се избягва проблема на популационната стратификация. Преимущество на фамилните извадки за разлика от извадките от тип случай-контроли е че в тях могат да се откриват de novo възникнали генетични варианти, като най-предпочитани за изследвания са големите семейства с множество болни. Извадки от тип случай-контроли са предпочитано използвани и в повечето геномни асоциативни проучвания, както и при секвениране от

следващо поколение, тъй като са ефективни и резултатите получени при тях са сравнително ясни и лесни за интерпретиране.

II. 12.4. Геномен подход за изследване / Геномни проучвания

Освен хипотеза-базираният подход, при който се избира функционален кандидат ген и се търси скаченост или асоциация със заболяването може да се използва и друг подход, който би могъл да доведе до генериране на хипотеза. При този метод обикновено се подбират полиморфизми, равномерно разпределени в генома и се определя скачеността със заболяването във всяка една точка. След идентифицирането на скачените райони се проверява дали те са разположени в райони кодиращи гени или в близост до такива и в зависимост от процесите в които участват продуктите на тези гени могат да се генерират хипотези за етиологията на АР, която да послужи за изходна точка на допълнителни проучвания с различни изследователски подходи. По-широкото въвеждане на microarray технологиите и секвениране от следващо поколение (next-generation sequencing) прави възможно анализирането на генома със значително по-висока резолюция както и изследването на различни структурни варианти.

Геномните асоциативни проучвания са подход, който има най-голяма сила при идентифициране на чести варианти, при чести заболявания, въпреки че установените по този начин варианти обясняват сравнително малка част от цялостния риск (Scott, 2009, Craddock, 2009). Могат да бъдат тестват за асоциация хиляди до милион еднонуклеотидни замени SNPs, като предпоставка за осъществяването на такива проучвания е акумулирането на достатъчно много информация относно честотата на полиморфните варианти в различните популации и информация за LD структурата на генома.

Психиатричния геномен консорциум е провело най-голямото до сега геномно асоциативно проучване, в което са включени 33 332 болни и 27 888 здрави контроли с различни психиатрични диагнози като шизофрения, БАР, УАР, аутизъм и синдром на хиперактивност и липса на концентрация. Използвана е мултиномна логистична регресия, извършен е анализ на полигенния риск и анализ на генетични варианти в определени пътища (pathways analysis). При изследването на подгрупата с АР са включени 7 481 пациенти с БАР и 9 250 контроли, при които са идентифицирани 34 потенциални локуса свързани със заболяването, измежду които и доста гени кодиращи субединици на калциеви канали. Допълнителните проучвания включващи пациенти и с други психиатрични заболявания показва, че варианти в гените кодиращи калциеви канали допринасят за повишен риск и към тях, което демонстрира съществуването на общи патологични механизми при психиатричните заболявания. Припокриване на локусите имащи отношение към психиатрични разстройства със сходна симптоматика като шизофрения и АР са съобщени от различни изследователски екипи. При проведеният анализ от психиатричния геномен консорциум са изследвани и 9 240 пациенти с УАР и 9 519 контроли, при които не са установени статистически значими резултати за нито един локус, което е необичайно за геномно асоциативно изследване от този мащаб. Най-вероятната предполагаема причина за това е високата хетерогенност на УАР.

При геномните сканове е необходимо използването на по-строги критерии за определяне на значимост. Класическата теория в статистиката, която изисква корекция за множество тестване се прилага при множество тестове на единична нулева хипотеза, докато при GWA изследванията, с цел преодоляване на този проблем се тестват множество хипотези (една хипотеза за всеки SNP). Нивото на статистическа значимост не трябва да се коригира спрямо броят на проведените тестовете, за да се постигне цялостно-геномно ниво на статистическа значимост (The Wellcome Trust Case Control Consortium; WTCCC 2007). Интерпретирането на резултатите за асоциация зависи в голяма степен от силата на изследването и от големината на извадката. Поради естеството на комплексните заболявания често са получавани фалшиво положителни и невъзпроизводими от други изследователски екипи резултати. В „Цялостно-геномно асоциативно проучване на 14 000 случая при седем комплексни заболявания и 3 000 споделени контроли" проведено от Wellcome Trust Case Control Consortium 2007 се описват възможностите за използване, дизайн на GWA изследванията и анализ на резултатите.

Структурните вариации, каквито са CNVs (copy number variation) имат принос към еволюционните процеси и генетичното разнообразие между индивидите в по-голяма степен от еднонуклеотидните замени, което прави изследването им във връзка с различни комплексни заболявания включително и АР смислено и резонно. Тяхната големина е от стотици килобази до стотици мегабазии и могат да се изследват чрез кариотипиране, array-базирани или различни секвенционни методи. Тяхното преимущество спрямо еднонуклеотидните замени (SNPs) се състои в по-голямата им честота и по-високата им информативност. Предполага се че рискът от много комплексни заболявания като афективните разстройства може да се повлиява и от множество редки структурни вариации. Различни изследователски екипи съобщават за идентифицирани структурни промени (CNVs), имащи отношение към развитието на шизофрения и БАР (Grozeva, 2013, Malhotra, 2011, McQuillin, 2011, Priebe, 2011, Zhang, 2009), както и на УАР (Rucker, 2011). За някой от идентифицираните редки структурни варианти е установена ниска специфичност, тъй като са свързани с повишен риск едновременно към няколко психиатрични заболявания.

Друг подход при изследването на комплексни заболявания е анализирането на различни генетични варианти в определени пътища (Pathway analysis), който се базира на схващането, че рисковите варианти за едно заболяване, по-вероятно са свързани функционално един с друг в сравнение със случайно избрани варианти. За подбора на варианти от различни биохимични, сигнални пътища или специфичен експресионен профил обикновено се използват бази данни като Gene Ontology, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, PANTHER (Kanehisa, 2012, Mi, 2010). Този подход се счита подходящ за изследване на варианти със слаба асоциация или варианти с ниска пенетрантност.

С цел постигане на по-голяма статистическа сила и изследване на повече пациенти се обединяват различни извадки и се провежда мета-анализ. Недостатък на този подход е че при комбинирането на множество извадки с различен етнически произход е възможно за някои генетични варианти асоциирани с риск от заболяване в отделни субпопулации да не бъдат получени статистически значими резултати при изследването им в рамките на

по-голяма извадка заедно със други субпопулации, при които те не се свързват с такъв риск.

Счита се, че всички психиатрични заболявания могат да се причиняват от чести и редки варианти, структурни вариации и de novo възникнали промени с различна пенетрантност и специфичност. Генетични вариации от всякакъв тип в различни локуси могат да причиняват множество малки промени, които при натрупване да водят до абнормно функциониране на цели невромедиаторни, сигнални или други пътища и системи.

Идентифицирането на локусите и вариантите свързани с етиологията на АР, както и тяхната честота и пенетрантност би спомогнало за по-целенасочени изследвания на биологичната им функционалност и по-добро разбиране на етиологията на заболяването. Така би се постигнало и по-добро разбиране на патологични процеси като влиянието на определени генетични варианти върху развитието и комуникационните способности на невроните, изясняване на епистазните взаимодействия между различни варианти както и между генетични варианти и околната среда и степента на влияние на епигенетичните фактори. Независимо от подхода при изследване на психиатрични заболявания като АР е важно използването на строги статистически критерии, за да могат да се отдиференцират генетичните вариации, които не водят до фенотипна промяна и да се ограничи генерирането на твърде много фалшиво положителни резултати.

II. 12.5. Кандидат-райони при АР, идентифицирани чрез анализ за скаченост, асоциативни проучвания и геномни сканове.

Множество генетични варианти в различни клинични групи са били обект на проучване при изследване на генетични основи на АР и различни методи за анализ и статистическа обработка са прилагани. Въпреки това, както е характерно за полигенните мултифакторни заболявания, получените резултати са противоречиви, значимите региони на скаченост заемат големи в генетично отношение райони и няма добра повторяемост на резултатите от различните изследователски групи. Често липсва информация за функционалноста на генетичните варианти, водещи до повишен риск от развитие на АР, както и за участието им във вероятните патологичните механизми.

При анализа и интерпретацията на резултатите би следвало да се взимат под внимание следните възможни ситуации:

- Резултатите на асоциация или скаченост може да са следствие от неравновесие в скачеността с друг неидентифициран вариант;
- Обширните локуси на скаченост могат да се дължат на присъствието на множество гени водещи до предразположение към АР, разположени в близост един до друг, в общ регион;
- Липсата на повторяемост на резултатите може да се обясни с факта, че при различни хора различни комбинации от предразполагащи генетични фактори водят до развитие на заболяването.

Съществува сравнително слаба повторяемост на получените резултати от различните изследователски групи, но въпреки това могат да се отдиференцират няколко района с най-убедителни и най-често докладвани доказателства за скаченост с АР, представени в Таблица №5 (Приложение №1). Международни мета-анализи анализират съвместно различни извадки с цел анализа на повече индивиди да доведе до подобряване на статистическа сила и избягване на фалшиво положителните резултати.

При български семейства, изследвани в рамките на голям международен геномен скан се потвърждава, докладваната от други изследователски групи скаченост в районите 4q и 6q и се установява и регион 1p като потенциален локус за предразположение към БАР (Schumacher, 2005). Обект на анализ са били 8 български семейства и 3 семейства български роми, като са генотипирани общо 448 индивида за 435 микросателитни маркера, със средно разстояние между тях 8.3 см. Значими резултати при ромските семейства са получени в следните региони, 1p34-p36, 4q25-q31, 6q21-q24, а при българските семейства в 6q21-q24. В последствие направеното фино картиране на трите района с допълнителни маркери, установява статистически още по-силна скаченост. При ромските семейства са получени противоречиви резултати след включване на нови членове и допълнително изследване с още маркери, не се потвърждава скачеността в част от районите, слабо положителни резултати са получени за 1p34-p36, и се потвърждават резултатите за 6q23-q24 и 4q28-q32. В района на шеста хромозома статистически силни резултати за скаченост са получени само при анализ на отделните семейства, а при комбинираното семейство резултатите са по-слаби, което предполага наличието на прародителски вариант отговорен за повишен риск от АР, който се губи в следствие на рекомбинации и мутации. В района на четвърта хромозома чрез генотипирането на допълнителните маркери е дефиниран по-тесен участък на скаченост.

II. 12.6. Асоциативни изследвания при афективни разстройства

В асоциативните проучвания като кандидат-гени, имащи отношение към афективните разстройства се изследват най-често позиционни и функционални генетични варианти. Позиционните кандидат-гени се намират в локуси показали скаченост със заболяването, а за функционалните се предполага, че са въвлечени в патологията на заболяването. Функционалните кандидат гени могат да кодират продукти, участващи пряко или непряко в синтеза, разграждането, транспорта и метаболизма на невромедиаторите, могат да кодират рецептори или техни елементи, както и да участват в невропластичността, предаването, обработката или отговор на невронните сигнали. Данните от фармакологични и клинични изпитания, както и изследвания върху животински модели се използват за подбирането на потенциални кандидат-гени, които да бъдат обект на изследване. Често изследваните кандидат гени във връзка с АР са свързани с неврогенезата или са невротрофични фактори, участват в сигналната трансдукция, регулират циркадните ритми или са с висока експресия в ЦНС.

Изборът на изследваните девет кандидат-гени в настоящото изследване се базира на тяхната функционалност, позиция и налични литературни данни за потенциалната им връзка с афективните разстройства или други психиатрични заболявания със сходна

фенотипна изява. Изследвани са кандидат гени от серотониновата система, варианти в *TPH2* гена, регулиращ синтезата на серотонин и (*SLC6A4*) гена регулиращ серотониновия транспорт. Също така обект на изследване са и генетични варианти в допаминовия рецептор (*DRD2*) и варианти в кандидат гени, свързани с неврогенезата и невронното отцеляване, каквито са (*DISC1*) и (*BDNF*), както и полиморфизми в гени имащи отношение към цирканите ритми (*CLOCK*). Изследван е също и вариант в кандидат гена (*CRH*), който кодира невромедиатор. Към повишена предразположеност от развитие на АР могат да повлияват и дисфункция в комуникацията между невроните и в тази връзка са изследвани генетични варианти в калциевия канал (*CACNA1C*) и в гена (*ANK3*), участващи в мембранния йонен транспорт. Някои от по-значимите резултати от асоциативни изследвания в литературата за избраните в настоящото проучване кандидат гени са обобщени в Таблица №6 (Приложение №1).

II. 12.6.1. Кандидат - ген *TPH2*

Триптофан хидроксилазата е първият ензим от биосинтезата на серотонин, катализиращ монооксиадцията на триптофана на 5-о място до 5-хидрокситриптофан (Kaufman, 1987), след което под действието на втори ензим (5-хидрокситриптофан декарбоксилаза) се получава невромедиатора серотонин. Скоростоопределящия ензим в биосинтезата на серотонина е триптофан карбоксилазата (Cooper, 1961), а в мозъка процеса се контролира основно от триптофан хидроксилаза тип 2 (TPH2). Ключовата роля на ензима го прави предполагаем предразполагащ фактор за развитие на АР. Генът *TPH2* е позициониран в 12q21.1, и се експресира предимно в невроните в мозъчния ствол. В дорзолатералния префронтален кортекс на пациенти с БАР са намерени по-високи нива на експресия на ензима в сравнение с тези наблюдавани при здрави индивиди (Zhou, 2005). Района, в близост до гена също така е кандидат регион показал скаченост с АР (Abkevich, 2003; Curtis, 2003).

Литературните данни посочват влиянието на различни *TPH2* полиморфизми върху риска за развитие на АР (Harvey 2004, 2007; Van Den Bogaert, 2006; Lopez, 2007; Cichon, 2008), въпреки че съществуват и проучвания опровергаващи наличието на подобна зависимост (De Luca 2004; Mann 2008). Асоциация на отделни генетични варианти само с УАР е установена от (Zhang, 2005; Zill, 2004 A, Gao, 2012), а други изследователки групи идентифицират различни хаплотипи асоциирани с повишен риск от АР (Zill, 2004 A; Zhou, 2005). При изследване на подгрупа от индивиди направили опит за самоубийство, също се открива асоциация с варианти в *TPH2* гена (De Luca, 2004; Lopez, 2007; Zill, 2004-B). Функционалните генетични варианти в *TPH2*, водещи до аминокиселинна замяна и до промяна във функциите на ензима са обект на множество изследвания. Несинонимната замяна rs120074175 (G1463A, Arg441His) води до продукция на ензим с намалена каталитична активност, намалена термична стабилност и разтворимост (Mernea, 2011) и е асоциирана с УАР (Zhang, 2005). Първоначално описаната от (Zhang, 2005) асоциация на този вариант с депресия не се подкрепя от няколко други проучвания най-вероятно поради ниската честота не алел А (His441) (Bicalho, 2006).

Друг полиморфизъм (rs17110563) водещ до аминнокиселинна замяна на Pro със Ser на позиция 206 в екзон 6 е асоциирана с БАР при Германски и Руски пациенти. Този вариант е позициониран в изключително консервативен генетичен район и се предполага, че замяната на хидрофобната аминокиселина Pro с полярната Ser променя функцията на ензима, което може да допринася за повишаване риска от развитие на заболяване от афективния спектъра (Cichon, 2008). Установено е, че Ser алела кодира значително по-нестабилен ензим и това води до по-бързото му преработване в клетката, при което синтезата на серотонин намалява, както е характерно за пациентите с АР (Lucki, 1998).

Намиращия се в 5` края на гена вариант rs11178997 е асоцииран с УАР в изолатна популация от северна Швеция (Van Den Bogaert, 2006) както и с БАР при Руски пациенти (Cichon, 2008). При изследване на румънски пациенти с БАР тип I не се потвърждава асоциацията (Grigoroiu-Serbanescu, 2008), въпреки данните че наличието на алел А намалява транскрипционната активност до 22% в мозъчна тъкан (Scheuch, 2007).

В 5` регулаторния регион на гена заедно с rs11178997 е позициониран и полиморфизма rs4570625 (G-703T), за който е установено неравновесно предаване на вариантите му от родители на деца с ADHD (Walitza, 2005), както и участие в хаплотип, по-често предаван на деца с обсесивно-компулсивно разстройство (Mössner, 2006). И двете заболявания, за които са получени тези резултати имат сходна симптоматика с АР. Алел Т на този генетичен вариант е значително по-рядък при Корейски пациенти с паническо разстройство, особено в субгрупата от женски пол (Kim, 2009), което предполага, ефект зависим от пола. Друго изследване, проведено в група от здрави индивиди установява, че носителите на алел Т имат по-малък обем на хипокампуса и амигдалата и по-висока зависимост от възнаграждение в сравнение с носителите на противоположния G алел (Inoue, 2010).

За генетичният вариант rs1386483 също е описан полово зависим ефект, той повлиява импулсивността (Stoltenberg, 2012) и е асоцииран с паническо разстройство при жени (Maron, 2006). Статистически силна асоциация с БАР е описана и за два други варианта намиращи се в неравновесна скаченост с rs1386483 (Roche, 2009).

Предполага се че полиморфизмът rs4290270 в екзон 9, водещ до синонимна замяна има отношение към процеса на сплайсинг, установено е че честотата на хомозиготно носителство на алел А при хора извършили самоубийство е по-висока спрямо тази при индивиди с депресия или здрави контроли. Този генотип задейства механизми на алтернативен сплайсинг, но начина, по които това се отразява на клиниката не е изяснена (Grohmann, 2010). Фамилно изследване съобщава за преференциално предаване на алел А на болни с БАР в Канадски семейства (Harvey, 2007). Същият алел участва и в хаплотип статистически по-често срещан при жени с УАР (Shen, 2011) и в хаплотип указващ влияние на реакцията на антидепресанти в Китайски пациенти с УАР (Xu, 2012). За генетичният вариант rs4570625 има данни, че повлиява също тежестта и наличието на психотични симптоми при пациенти с шизофрения (Zhang, 2011).

Литературните данни както и ключовите процеси, в които взима участие продукта на *TPH2* кандидат гена предполагат вероятното му отношение към етиологията на АР.

II. 12.6.2. Кандидат - ген *SLC6A4*

Ролята на серотонергичната невротрансмисия в етиологията на биполярното разстройство е основно предположена на базата на фармакологични наблюдения върху действието на определени медикаменти. Някои антидепресанти действат посредством блокиране на обратното захващане на серотонин от синаптичната цепка и в резултат на това могат да предизвикат симптоми на мания при предозиране (Drago, 2009). Мозъчният серотонинов транспортер (*5-HTTLPR*, *SLC6A4*, *SERT*) свързва високоафинитетно свободния серотонин от синаптичното пространство и го връща в пресинаптичните нервни окончания. Действието на селективните инхибитори на обратното захващане на серотонина (SSRIs - Serotonin Selective Reuptake Inhibitors) се осъществява чрез селективно блокиране на серотониновия транспортер (*5-HTTLPR*), който нормално свързва серотонина. В резултат в синапса се натрупва повече серотонин и се увеличава действието му (Rudnick, 1993). Тези наблюдения дават основание да се смята, че гените, кодиращи продукти свързани със серотониновата невротрансмисия могат да имат предполагаемо участие в етиологията на АР и са многократно изследвани във връзка със заболяването.

Генът кодиращ серотониновия транспортер - SLC6A4 е картиран в 17q11.1–q12 (Heils, 1996) и различни проучвания установяват асоциация на генетични варианти в него с АР. Продуктът на гена представлява Na^+ и Cl^- зависим транспортер с 12 трансмембранни домена и е най-често срещан в пресинаптичната мембрана на невроните. Серотониновият транспортер участва в обратното захващане на серотонина и структурата му наподобява тази на допаминовия транспортер тип 1, с който принадлежат към едно семейство транспортни белтъци. Генът кодиращ серотониновия транспортер е изграден от 14 екзона и е с приблизителна големина около 35kb. В 5’ регулаторния район се намира полиморфизъм представляващ инсерция или делеция на тандемно повтарящ се елемент с големина от 43bp (Heils, 1996). Секвенцията в този регион се състои от разнообразни неперфектни повтори от 20/23bp. Най-често срещаните алели са L (16 повтора), и S (14 повтора), като алелните честоти в различните популации се различават значително (Nakamura, 2000; Delbrück, 1997). Описани са и някои по-редки алели на този полиморфизъм, съдържащи по-голям брой повтори от L алела съответно с 17, 18, 19, 20, повтора, както и редки алели с по-малко от 11 повтора (Nakamura, 2000; Ehli, 2010). Установено е, че дългият L вариант (16 повтора) има три пъти по-висока активност спрямо късият S вариант (14 повтора) с делецията (Lesch, 1996). Късият вариант се характеризира с по-ниска експресия на *5-HTTLPR* и съответно по-ниска активност на обратното захващане на серотонин и е асоцииран с тревожност и невротизъм, които са характерни симптоми на заболяванията от афективния спектър.

В рамките на дългия L вариант на *5-HTTLPR* полиморфизма е описана еднонуклеотидна замяна rs25531 (A>G) с функционално значение. Замяната води до създаване на рестрикционно място за MspI (CCGG) и по-честият L_A алел се асоциира с по-висока активност, докато по-рядко срещания L_G алел не се различава по транскрициона активност от S алела на промоторния полиморфизъм.

Множество данни за асоциация на промоторния полиморфизъм с АР са налични в литературата, включително и няколко мета-анализа потвърждават наличието на асоциация на 43-bp ins/del с БАР и с повишен риск от извършване на самоубийство (Anguelova, 2003), но не и с УАР (Lasky-Su, 2005). Установен е предразполагащ ефект на генотип S/S за развитие на депресия (Cervilla, 2006; Zalsman 2006), УАР (Hauser, 2003; Lotrich 2004), БАР (Cho, 2005; Lotrich, 2004; Lasky-Su, 2005) както и симптоми на потиснатост и безпокойство (Melke, 2001). Същевременно както е характерно за мултифакторните полигенни заболявания са налични и данни за липса на асоциация (Mendlewicz, 2004; Mansour, 2005).

Друг често изследван полиморфизъм в *SLC6A4* гена е 17bp VNTR полиморфизъм, намиращ се в интрон 2. Този полиморфизъм представлява тандемно повтарящи се елементи от 16-17bp (Ogilvie, 1996), като алелите с 10 и 12 повтора са с най-висока честота. Има данни, че VNTR полиморфизма повлиява транскрипцията (Jernej, 2004) и е асоциациран с АР (Collier, 1996).

Имайки предвид функционалността и наличните литературни данни, *SLC6A4* е подходящ кандидат ген за изследване във връзка с различни психиатрични разстройства, включително и АР.

II. 12.6.3. Кандидат - ген *DRD2*

Допаминът се произвежда от невроните в substantia nigra, той е невромедиатор, който регулира моторните функции и участва в процеси като памет, настроения, когниция и контрол на ендокринната система. Той изпълнява функцията си посредством взаимодействието със специфични метаботропни G протеин свързани рецептори. Допаминовите рецептори имат седем сегмента преминаващи през мембраната, подразделят се на 5 класа D1-D5 и участват в различни неврологични процеси. Много от гените кодиращи допаминови рецептори както и гена кодиращ допаминов транспортер, са картирани в райони показали скаченост с БАР, (5q35.1 - *DRD1*), (11p15.5 - *DRD4*), (5p15.3 - *DAT1*). Генетични варианти в тях са изследвани във връзка с неврологични и психиатрични заболявания включително и АР.

Дисфункция на допаминовата невротрансмисия е описана при много невропсихиатрични заболявания със сходна на АР симптоматика като шизофрения (Kienast, 2006), синдром на дефицит на вниманието и хиперактивноста (ADHD) (Faraone, 2006), Паркинсон, наркотичната и алкохолната зависимост (Kienast, 2013; Hummel, 2002). Резултатите от различни изследователски подходи демонстрира участието на допаминовата невротрансмисия в мотивационни механизми, зависими от поощряване или липса на токова (Schultz, 2006; Horvitz, 2010), както и отношението им към зависимо от награда поведение (Aarts, 2010; Camara, 2010; Hahn, 2011). Допаминовата система регулира реакциите в следствие на различни емоции (Rasch, 2010; Swart, 2011; Williams, 2010). Тези факти показват че промени във функциите на допаминергичната система са част от симптоматиката на АР и могат да са предразполагащ фактор за развитие на заболяването (Fujiwara, 1997; Greenwood, 2012) и допаминовите кандидат-гени са подходящи за изследване във връзка с изследване на заболяването.

Генът за допаминов рецептор тип 2 *DRD2* е локализиран в хромозома 11q23, има 8 екзона, а продуктът има по-дълъг цитоплазмен домен и по-къс карбоксилен край. Известно е наличието на две изоформи, които се получават в следствие на алтернативен сплайсинг и имат сходна функцията, но подлежат на различна регулация. Функцията на рецептора след свързване с допамин се състои в инхибиране на аденилат циклазата и възпрепятстване синтезата на цАМФ. Високи нива на експресия на DRD2 са описани в базалните ганглии и мозъчният регион, nucleus accumbens septi. При пост-мортем изследване на пациенти с афективни разстройства се откриват отклонения в експресионния профил на допаминови рецептори тип 1 и тип 2 (Kaalund, 2013) и се демонстрира как определени генетични варианти водят до алтернативен сплайсинг, което вероятно допринася за патологията на заболяването.

Полиморфизма Taq1A (rs1800497) в допаминовият рецептор тип 2, *DRD2* е разположен в 3` нетранслиращия се край и се намира в непосредствена близост до друг функционален кандидат ген за АР, *ANKK1*. Въпреки липсата на конкретни доказателства за механизма, чрез който този вариант повлиява експресията на *DRD2* гена, са налични данни от три независими изследвания установяващи намалена концентрация или понижена способност за свързване на DRD2 рецептор в мозък при носителите на A1 алела (Thompson, 1997, Pohjalainen, 1998; Jönsson, 1999). Различни проучвания намират асоциация на този полиморфизъм с импулсивно поведение при здрави индивиди (Eisenberg, 2007), антисоциално поведение (Beaver, 2007) и с алкохолна зависимост (Wang, 2013; Munafò, 2007). При изследванията му във връзка с УАР са получени противоречиви резултати (He, 2013; Furlong, 1998; Hayden, 2010; Elovainio, 2007), но скорошен мета-анализ сочи, че rs1800497 се асоциира с повишен риск от АР и при анализ на отделните диагностични субгрупи и с БАР (Zhanga, 2014). Описани са няколко алелни или генотипни епистатични взаимодействия с участие на *DRD2* гена, влияещи на проявата на характерни симптоми и психиатрични разстройства. Предполага се, че взаимодействието между *DRD2* варианта rs6277 и rs4680 Val158Met в COMT води до дефицит в работната памет при болни от шизофрения (Xu, 2007). Същевременно епистаза между *DRD2* генотип A1/A2 и *BDNF* генотип Val/Val (rs6265) води до повишен риск от развитие на БАР II тип (Huang, 2012), а между генотип A1/A1 и Met/Met до по-предпазливо поведение (Montag, 2010).

Генетичният вариант C957T (rs6277), локализиран в екзон 7, води до синонимна аминокиселинна замяна и е асоцииран с шизофрения в три независими изследвания. В Хан китайска популация е установено, че алел T повишава риска от развитие на заболяването (Fan, 2010), докато в руска популация за рисков алел е установен алтернативния C-алел (Monakhov, 2008). Полиморфизмът (rs6277) е изследван и в български пациенти с шизофрения заедно с още 202 еднонуклеотидни замени в 59 кандидат гена и е единственият, за който са получени статистически значими данни за асоциация (P=0.0010) (Betcheva, 2009). Не е установена асоциация на rs6277 с УАР (Furlong, 1998; Huuhka, 2008), но генотип T/T е асоцииран с повече депресивни симптоми (Huuhka, 2008). Други проучвания установяват по-високо афинитетно действие на

рецептора при носителите на T алела (Hirvonen, 2009) и повишена импулсивност в следствие на стрес (White, 2009).

DRD2 полиморфизмите, rs6277, rs1079598 и rs1800497 са асоциирани с повишен риск от напълняване като страничен ефект в следствие на антипсихотична медикаментозна терапия на пациенти с шизофрения и шизоафективно разстройство (Müller, 2007).

Друг полиморфизъм в *DRD2* гена (-141C Del) също повлиява експресията, като притежателите на алела с делецията имат по-ниски нива на експресия спрямо тези с алела с инсерцията (Jönsson, 1999).

За функционалният VNTR полиморфизъм в екзон 3 на *DRD4* гена, състоящ се от 2–10 тандемни повтора с дължина 48 bp е установено, че алелите с 2 и 4 повтора са по-често предавани в засегнатото поколение на семейства с БАР предимно по майчина линия (Muglia, 2002).

Генът за допаминов транспортер (*DAT1*, dopamine transporter 1, *SLC6A3*) е изследван също многократно за асоциация с афективни разстройства, Na^+ и Cl^- зависимия транспортер играе ключова роля в регулацията на нивата на допамин в синапса и в допаминовата невромедиация. Транспортерът е единственият осъществяващ активното поемане на допамина от синапса обратно в неврона, заради което функцията му е изключителна важност за поддържането на определени нива на този невромедиатор. Той е главна мишена за действието на амфетамини и кокаин, които блокират активността му, възпрепятстват обратното поемане на допамин в следствие на което концентрацията му в синапса рязко се увеличава.

II. 12.6.4. Кандидат - ген *DISC1*

В рамките на гена *DISC1*, MIM 605210, (Disrupted-In-Schizophrenia-1) е идентифицирана балансирана хромозомна транслокация (1:11) (q42.1;q14.3) между 8-ми и 7-ми екзон в голямо Шотландско семейство, която сегрегира с шизофрения (lod score=3.6), биполярно разстройство както и други психиатрични заболявания (lod score=7.1) (Blackwood, 2001). Транслокацията води до загуба на С-края на белтъка кодиран от *DISC1* гена. Подобна хромозомна аберация (делеция на 4 bp в екзон 12), водеща до промяна на аминокиселинната секвенция в С-края на белтъка е описана само в още едно семейство (Sachs, 2005). Въпреки това предполагаемата роля на *DISC1* към етиологията на редица невропсихиатрични заболявания се потвърждава от изследвания за скаченост и асоциативни проучвания в различни популации. Скаченост в район 1q42 се съобщава в няколко независими финландски фамилии с шизофрения (Hovatta, 1999; Ekelund, 2000; 2001; 2004), както и в геномно изследване на семейства от Великобритания и Ирландия с шизоафективно разстройство (Hamshere, 2005). В Тайванско проучване са получени статистически най-значими резултати за маркер D1S251, намиращ се в най-голяма близост до първоначално описаната транслокация. Симптоматиката на шизофренията е сходна с тази на афективните разстройства и често двете заболявания косегрегират, което предполага наличието на общи генетични основи. Като цяло в литературните данни

преобладават изследванията върху пациенти със шизофрения, тъй като именно в семейство с такава доминираща диагноза е първоначално описаната транслокация. DISC1 е изследван и при пациенти с афективни разстройства, където също се съобщава за скаченост с район 1q31-q32 (lod score=2.67; p=0.0002) като резултата е получен при проучване включващо 607 микросателитни маркера в 365 информативни индивида от 22 семейства (Detera-Wadleigh, 1999). Друго геномно проучване на 7 семейства с 365 микросателитни маркера потвърждава скаченоста в 1q района с маркер D1S251 (Curtise, 2003). Независимо изследване на Шотландски семейства с БАР, несвързани със семейството с първоначално описаната *DISC1* транслокация потвърждава скачеността в район 1q (lod score >1.5), (Macgregor, 2004).

Едни от най-често изследваните полиморфни варианти в *DISC1* гена са позиционирани в кодиращи райони и водят до промяна в аминокиселинната последователност на белтъка. Несинонимният вариант rs821616, намиращ се в екзон 11 и водещ до замяна на Ser с Cys е асоцииран с шизофрения във фамилно изследване (Callicott, 2005) и съвместно с два други варианта в *DISC1* участва в хаплотип, също асоцииран със заболяването. Зависимостта между този генетичен вариант и шизофрения е потвърден и в Хан китайска популация (Qu, 2007) и отхвърлен в корейска популация, където за rs821616 се установява асоциация само с лоша концентрация (Kim,. 2007).

Генетичните варианти rs821616, rs6675281 и rs821597 са асоциирани с експресията на скъсен DISC1 белтък в хипокампуса на пациенти с шизофрения (Nakata, 2009). Чрез функционален магнитен резонанс е установено, че Ser алела на rs821616 е асоцииран със структурни и функционални промени в хипокампуса при здрави индивиди, както и намалено сиво вещество и когнитивни промени (Callicott, 2005). Друго проучване потвърждаващо връзката на rs821616 с когнитивните дейности е изследване на 425 индивида от Lothian Birth Cohort 1921 (LBC1921), при които се установява влошено когнитивно функциониране в подгрупата на възрастни жени хомозиготи по Cys алела (Thomson, 2005). Изследването демонстрира също така и възможно действие на варианти в *DISC1* в зависимост от пола.

Наличните данни за полиморфизма rs6675281 са противоречиви, в изследване на семейства от Северна Америка с шизоафективно разстройство се наблюдава по-висока честота на алел T (Phe) при пациенти (Hodgkinson, 2004), а асоциативно проучване на две независими групи тройки от Франция и Алжир с шизофрения установяват статистически значимо предаване на алел C (Leu) в засегнатото поколение (p=0.002 и при двете етнически групи). Носителите на C алел имат повече симптоми на депресия (Lepagnol-Bestel, 2010), което показва, че вариации в *DISC1* гена могат да се явяват предразполагащи за изявата на определена симптоматика.

Друг генетичен вариант многократно асоцииран с АР е rs821577. За него са налични данни за асоциация в Лондонска кохорта, както и в голямо Европейско проучване, където е установено, че този вариант е рисков. Повишеният риск от АР асоцииран с вариант rs821577 съвместно с други полиморфизми в рамките на гена е потвърден и от (Hennah, 2009). Изследване на здрави финландци показва, че носителите

на редкия алел на rs821577 страдат по-често от анхедония, характерен симптом при много невропсихиатрични заболявания (Tomppo, 2009). При проведен функционален ядрено-магнитен резонанс върху болни от БАР, шизофрения и здрави индивиди не се установяват морфологични и функционални промени на мозъчните структури по време на изпълняване на когнитивни задачи в зависимост от носителството на генетичен вариант rs821577 (Chakirova, 2011).

Въпреки противоречивите резултати от функционалните проучвания и изследванията за асоциация на отделните полиморфизми, няколко хаплотипни анализа описват влияние на *DISC1* хаплотипи върху когнитивното функциониране както и върху развитието на различни невропсихиатрични заболявания. При Финландски пациенти с шизофрения е идентифициран хаплотип, който е статистически по-рядко предаван на засегнатото поколение от женски пол, (Hennah, 2003). В друго независимо изследване на Финландски триоси с шизофрения същият хаплотип повлиява краткотрайната визуална памет и внимание и е асоцииран с по-лошо представяне на тестове независимо от пола (Hennah, 2005). Изследване потвърждаващо полово зависимо влияние, описва хаплотип, по-често предаван на жени, водещ до намалена експресия на mRNA в лимфобласти и със съпътстваща по-чести симптоми на мания (Maedaa, 2006). Идентифициран е и друг хаплотип намиращ се в 5' края на гена (T-A, rs751229, rs3738401), който е по-често предаван при мъже с психотични разстройства от Финландски произход, също и хаплотип T-T rs821616/rs1411771, който е по-рядко предаван в засегнатото поколение (Palo, 2007). В изследване на пациенти от Северна Америка са описани различни хаплотипи между екзони 1 и 9 асоциирани с шизофрения, шизоафективно разстройство и БАР (Hodgkinson, 2004), а в Шотландско асоциативно проучване хаплотипа (C-A, rs751229-rs3738401) е асоцииран с повишен риск от шизофрения (Zhang,. 2006).

Продуктът на Disc1 гена се експресира в ЦНС на човек като най-високите нива на експресия са установени в хипокампуса и в мозъчната кора (Austin, 2004; Schurov, 2004). При пост мортем изследвания на пациенти с афективни разстройства именно в тези области са установени структурни промени (Rajkowska, 2000). DISC1 участва в множество процеси и функции като вътреклетъчен транспорт, миграция на невроните, предаване на сигнали между тях и експресия. Промяна в секвенцията може да доведе до промяна в някои от функциите и в зависимост от вида и позицията на генетичния вариант различни функции и процеси, в които DISC1 участва се повлияват. Ролята на DISC1 в патологията на невропсихиатричните заболявания се подкрепя и от факта, че много белтъци с вече установено влияние в етиологията на тези разстройства се свързват с него. DISC1 протеина притежава отделни функционални домени и може да участва едновременно в множество междубелтъчни взаимодействия. Изхождайки от секвенцията на белтъка, вторичната структура има глобуларен N-край и структура тип coil-coil в С-края. С N-края си той взаимодейства с два протеина свързващи микротубули, MAP1A и MIPT3, които участват в събирането на микротубулите, което е важна стъпка в неврогенезата. С С-края, където се намира и първоначално описаната транслокация в Шотландското семейство, DISC1 белтъка извършва взаимодействие с NDEL1 и неговия хомолог NDE1, които са асоциирани към центрозомата и микротубулните протеини, взимащи участие при митоза и

миграция на невроните (Shu, 2004; Toyo-Okaet, 2005; Hirohashi, 2005). Функционалните генетични варианти Ser704Cys и Leu607Pro се намират проксимално на района, взаимодействащ с NDEL1. Някои транскрипционни фактори като ATF4 и ATF5 също взаимодействат с *DISC1* (Morris, 2003). Хипотези за влиянието, което идентифицираните взаимодействия могат да имат са представени в няколко обзорни статии (Bradshaw, 2012; Millar, 2005; Morris, 2003; Ozeki 2003; Brandon, 2004).

II. 12.6.5. Кандидат - ген *BDNF*

Друг потенциален кандидат-ген за развитие на АР е *BDNF* (brain derived neurotrophic factor OMIM *113505), кодиращ мозъчен невротрофичен фактор. Този растежен фактор се синтезира в допаминовите неврони и повлиява преживяемостта им и тяхната адаптивност към външни стимули (Thoenen, 1995). Първоначално е описана експресия на *BDNF* гена в неврокортекса, хипокампуса и амигдалата (Buchman, 1993), но по-късно е установена и в цялата ЦНС като най-високи нива на еспресия се наблюдават в хипокампуса, мозъчната кора, амигдалата и малкия мозък. (Hofer, 1990). По време на нормалното индивидуално развитие над 80% от невроните, участващи във формирането на нервната система умират. Предполага се, че този механизъм осигурява адекватен брой неврони за правилното функциониране на ефекторните системи и органи и се регулира от невротрофичните фактори. Невронния растежен фактор (NGF), както и BDNF участват в естествено протичащите процеси на клетъчна смърт в различни дялове на периферната нервна система. Те имат сходна аминокиселинна и нуклеотидна секвенция (Hofer, 1988). По време на индивидуалното развитие BDNF участва в промяната на морфологията на аксоните и растежа на дендритите (Binder, 2004; Bibel, 2000), също така играе роля и на модулатор на болката посредством регулиране на синаптичната невромедиация и пластичност (Pezet, 2006), а в хипокампуса BDNF променя възбудимостта на невроните (Yano, 2006; Tyler, 2001).

Данни от хистологични и невроизобразителни техники на пациенти с АР показват структурни и клетъчни промени в хипокампуса, където нивата на експресия на *BDNF* са най-високи. Ядрено магнитни и пост мортем изследвания на пациенти с БАР, съобщават също така за намалени нива на BDNF съпътствани от структурни промени в хипокампуса (Knable, 2004; Kempton, 2011; Arnone, 2012). Дисфункцията на хипокампуса при пациенти с АР се потвърждава и от факта, че един от най-често описваните когнитивни дефицити при пациенти е промяна в епизодичната памет, която се регулира главно от този регион (Glahn, 2004). Отклонения в процеси като учене и памет също се наблюдават при болни от АР, а мозъчните области отговорни в най-голяма степен за тези когнитивни функции се характеризират с високи нива на BDNF.

Редица изследвания показват нормализиране на отклоненията в концентрацията на BDNF в мозъчни области на пациенти с АР след медикаментозно лечение. При миши модели с депресия е установено, че прилагането на BDNF в хипокампуса има антидепресантен ефект (Shirayama, 2002). Съществуват данни също така, че приема на някои лекарства увеличава нивата на експресия на *BDNF* в мозъчната кора на плъх (Frey, 2006). При сравняването на BDNF нивата в плазма и серум, две независими изследвания

установяват по-ниски нива при пациенти с УАР както и тяхното нормализиране след медикаментозна терапия (Dell' Osso, 2010; Fernandes, 2009). Мета-регресионен анализ включващ 13 отделни изследвания и общо 1113 болни с БАР установява понижени BDNF нива по време на мания и на депресия, но не и по време на ремисия (Fernandes, 2011). При пациенти с еутимия е забелязано намаляване на концентрацията на BDNF с напредване на заболяването и възрастта (Fernandes, 2011).

BDNF генът, намиращ се в 11p14 има 11 екзона и съдържа 9 функционални промотора и 2 отделни сигнала за полиаденилиране (Pruunsild, 2007). Използването на алтернативни промотори води до експресията на транскрипти с различни 5′ участъци. В отделните части на мозъка са установени различни транскрипционни профили, като в хипокампуса се срещат високи нива на всички възможни транскрипти (Pruunsild, 2007) и съществуват данни, че стреса увеличава тоталната матрична РНК в хипокампуса на болни (Lubin, 2008). Процесинга от proBDNF до зрял BDNF, се извършва вътреклетъчно като се предполага участието на proBDNF в регулацията на синаптичната пластичност и апоптозата в хипокампуса (Teng, 2005), което е предразполагащ фактор към дълготрайна депресия (Woo, 2005). Баланса в нивата на proBDNF и зрелия белтък е важен за невронната пластичност и се регулира от тъканен плазминогенен активатор (Teng, 2005). Регулацията на експресията и концентрацията на BDNF в различните мозъчни части са сложни процеси и промени в нивата им се предполага, че могат да доведат до функционални изменения. (Huang, 2001).

Въпреки наличието на много изследвания на експресията на гена и функцията на белтъка няма изяснен молекулярен механизъм с тяхно участие, водещ до патологията на АР, както и няма еднозначно доказан генетичен вариант в *BDNF* гена, предразполагащ към заболяването. Един от най-често изследваните полиморфизми е несинонимната еднонуклеотидна замяна Val66Met (rs6265), асоциирана с АР в редица проучвания (Lohoff, 2005; Vincze, 2008 and Xu, 2010). Наличието на Val алел увеличава риска от БАР (Lohoff, 2005) включително и в Българска популация (Yossifova, 2011). В азиатската популация резултатите за връзката на rs6265 с АР са противоречиви, едно изследване потвърждава връзката между наличие на Val алел и увеличен риск от АР, но няколко други отхвърлят тази асоциация (Nakata, 2003; Kunugi, 2004; Tang, 2008), а изследване в Хан китайската популация установява асоциация с противоположния Met алел.

Допълнителни данни за връзката на Val алела с повишен риск от АР са получени от фамилни изследвания, в които се установява по-често предаване на този алел от родители в засегнатото поколение (Neves-Pereira, 2002; Sklar, 2002; Kremeyer, 2006 and Geller, 2004). Две независими проучвания посочват асоциация на Val алела при бързо циклиращи пациенти с АР (Müller, 2006; Green, 2006).

Мета-анализи, изследващи връзката между rs6265 и АР съобщават противоречиви резултати. Анализ включващ 11 отделни проучвания, не потвърждава наличието на асоциация (Kanazawa, 2007), докато друго изследване включващо 4248 болни от 858 нуклеарни семейства от 14 независими проучвания потвърждава наличието на асоциация с АР (Sklar, 2008).

Невропсихиатрични проучвания описват нарушения в неврокогнитивното функциониране на пациенти с АР, носители на редкия Met алел. Той повлиява вътреклетъчния процесинг и секреция и води до промени във функцията на хипокампуса и паметта (Egan, 2003). Други изследвания, съобщават за когнитивни трудности при честа смяна на задачи (Rybakowski, 2003; 2006), лоша визуална и вербална памет (Savitz, 2007) и повишена тревожност, страх, несигурност и срамежливост (Jiang, 2005; Montag, 2010) при носителите на Met алела. Въпреки тези резултати, мета-анализ, включващ 7095 индивиди, не открива статистически значими резултати между различните фенотипи и вариантите на rs6265 (Mandelman, 2012).

Невроизобразителни техники установяват значителна редукция на сивото вещество в темпоралните лобове на пациенти с БАР тип I, носители на Met алел спрямо пациентите без този алел (McIntosh, 2007). Установени са понижени нива на фосфокреатинин и креатинин в префронталния кортекс на пациенти с БАР, което предполага участието на Met алела в клетъчния енергиен метаболизъм (Frey, 2006).

Генетичният вариант rs6265 играе роля не само в етиологията на АР, но и в цялостното развитие на нервната система, което се потвърждава от участието му във важни процеси като учене и запаметяване (Egan, 2003; Hariri, 2003). Този полиморфизъм е асоцииран и с други невропсихиатрични заболявания като шизофрения и Алцхаймер (Ventriglia, 2002; Rybakowski, 2008). Противоречивите резултати за rs6265 могат да бъдат обяснени с участието в различни механизми, чрез които BDNF повлиява симптоматика и развитието на невропсихиатричните заболявания.

Друг широко изследван полиморфизъм, допринасящ за повишена предразположеност към АР е rs12273363. Той е разположен в много консервативен участък (Liu, 2008) и асоциация с него е описана в семейства с множество болни от БАР (Sears, 2011). Въпреки това резултатите са противоречиви, в изследването на (Liu, 2008) се съобщава за преференциално предаване на С алел, а в това на (Sears, 2011) за по-често предаване на Т алел в болното поколение. При пациенти с УАР не се потвърждава никоя от двете зависимости (Kocabas, 2011), но при УАР болни с травма в детска възраст е установена асоциация с по-редкия алел на rs12273363 (Juhasz, 2011). Пост мортем изследване на депресивно болни с С алел, показва намалена концентрация на BDNF в хипокампуса (Dunham, 2009), а друго изследване доказва, че наличието на С алел води до потискане активността на специфичен промотор активен в хипокампуса и съответно до намалена експресия на BDNF в тази част на мозъка (Hing, 2012). За микросателитният $(GT)_n$ динуклеотиден повтор, намиращ се 1040 bp преди началото на транслацията (Proschel, 1992) също са налични данни за асоциация с АР (Neves-Pereira, 2002).

II. 12.6.6. Кандидат - ген *CLOCK*

Друг клас кандидат гени, често изследвани във връзка с АР кодират участващи елементи в регулацията на циркадните ритми и в контрола на нормални биологични функции като сън, бодърстване и други в съответствие с околната среда. Съвкупноста от физиологичните, биохимичните и поведенческите реакции, които се повлияват от сигнали

от заобикалящата среда са известни като циркадни ритми. Флуктуациите във действието на ендокринната система, които са често срещани при пациенти се синхронизират също на базата на смяна на нощ и ден, тъмно и светло. Промените се регулират от вътрешен биологичен часовник, повлияван от стимули от външната среда. В хипоталамуса се намира специфична мозъчна структура suprachiasmatic nuclei (SCN), която отговаря за синхронизацията на циркадните ритми, в рамките на 24 часа, основно на базата на светлина. На промяна подлежат ритъма на спане и будно състояние, температурата на тялото, кръвното налягане, скоростта на реакция при стрес, както и секрецията на хормони, мелатонин норадреналин и серотонин. Предполага се, че изменения във функционирането на циркадните ритми могат да бъдат свързани със повишена предразположеност за развитие на АР (McClung, 2007; Harvey, 2008). Описана е нарушена фаза и амплитуда на циркадните ритми при пациенти от афективния спектър (Schulz, 2009; McClung, 2007), като най-осезаем ефект е отчетен за действието на светлината върху симптоматиката на сезонните афективни разстройства (Partonen, 2001).

Експресията на специфични циркадни гени са отговорни за правилния синхрон на биологичните ритми. При жени с депресия се наблюдават много по-често ендокринни промени, а промени в съня са характерни за по-голямата част от болните от АР (Dallaspezia, 2009). Според изследване на (Thase, 1999), около 90% от хората с депресия имат смущения в съня, което се отразява и на тяхното функциониране в будно състояние. Безсънието е симптом, появяващ се още преди началото на заболяването както и по време на ремисия, и указва негативно влияние върху качеството на живот на болните (Katz, 2002).

Асоциативни изследвания и проучвания на експресионните профили подкрепят хипотезата, че варианти в циркадните гени могат да допринасят за симптоматиката и развитието на АР (Mansour, 2005; Mansour, 2006; Mitterauer, 2000). Данни от експресионен анализ от Stanley Medical Research Institute's (SMRI) показват абнормна експресия на няколко циркадни гени при пациенти с БАР в сравнение с характерния за нормални контроли експресионен профил. Същевременно симптомите на АР се повлиява добре от медикаменти влияещи на циркадните ритми и по-конкретно на разстройството на съня (McClung, 2007). Трансгенни мишки с мутация в *Clock* гена демонстрират поведение подобно на мания при АР, което се подобрява при прием на литий или отключване на експресията на гена в мозъка (Roybal, 2007).

Clock гена кодира транскрипционен фактор съдържащ домен от типа helix-loop-helix, чрез който се осъществява регулацията на редица гени контролиращи циркадните ритми. В основата на този процес седи последователното активиране на експресия на гени в кръг. Активацията на първоначалния ген се регулира от продукта на последния ген, като така се получава авторегулиращ се кръг, съответстващ на нуждите на организма в рамките на 24 часа. Циркадните ритми се адаптират в зависимост от стимулите от околното среда и отключват биохимични пътища засягащи различни процеси в човешкия организъм. Светлината действа на клетъчно ниво, като променя концентрацията на Ca^{2+} и на цАМФ, които водят до фосфорилиране и хомодимеризиране на CREB протеина, който от своя страна се свързва с CRE регулаторни елементи в промотора на *Clock* гена или на други

циркадни гени. На този принцип се осъществява връзката между метаболитния статус и околната среда.

Еднонуклеотидна замяна, намираща се в 3′ региона на *Clock* гена (T3111C; rs1801260) е асоциирана с проблеми в съня при болни от БАР и депресия (Serretti, 2003; 2005), има отношение към подобряване на съня след медикаментозно третиране (Serretti, 2005) и е асоциирана с по-висока честота на БАР (Benedetti, 2003). Въпреки това няколко други изследователски екипа не успяват да потвърдят асоциация на този полиморфизъм с БАР и УАР (Bailer, 2005; Desan, 2000; Johansson, 2003; Mansour, 2006; Nievergelt, 2006; Serretti, 2003).

II. 12.6.7. Кандидат - ген *CRH*

Кортикотропин освобождаващия фактор или хормон – КОФ е невромедиатор, който синхронизира ендокринен и поведенчески отговор в следствие на стрес. Препропептида, от който той се образува се кодира от CRH кандидат-гена картиран в 8q13.1. КОФ се синтезира в паравентрикулярното ядро на хипокампуса и от Т лимфоцитите в периферните тъкани, основно в следствие на стрес, но е установена и синтеза от плацента при бременност. Секрецията от аксонните краища се предизвиква от деполяризация на клетъчната мембрана. Невроните синтезиращи КОФ също така синтезират и вазопресин, стимулиращ косвено отделянето на глюкокортикоиди. Аксонните краища, които не формират синапси с други неврони достигат до рецепторите в хипофизата, и под тяхно влияние се синтезира адренокортикотрофичен хормон, действащ директно върху надбъбречната жлеза и стимулиращ отделянето на глюкокортикоиди. Функцията на хипофизата се състои също така и в регулиране и на другите жлези с вътрешна секреция.

В резултат от стрес от всякакво естество, в човешкият организъм се отделят глюкокортикоиди, чиято секрецията се контролира от веригата хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, налични са данни както за хиперсекреция (Gillespie, 2005) така и за хипосекреция (Penninx, 2007; Ahrens, 2008) при депресивно болни. Стреса води да отключване на каскадни сигнали, в следствие на които се синтезират различни хормони включително и глюкокортикоиди от надбъбречната жлеза. Каскадните сигнали се регулират от концентрацията на синтезирания продукт, както и от тази на глутамат и норепинефрин. Регулацията се осъществява на базата на свързване с GRE-енхансерна система, която активира или потиска транскрипцията. Във веригата хипоталамус-хипофиза-надбъбрек КОФ взима участие основно в синтеза на ацетилхолин и действа потискащо на апетита, повишава тревожността и изостря вниманието. Дисрегулация на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек е описана при различни невропсихиатрични заболявания като АР (Arborelius, 1999; Daban, 2005; Watson, 2004), обсесивно-компулсивно разстройство (Gustafsson, 2008) и паническо разстройство (Abelson, 2007). Високи нива на КОФ са установени в цереброспинална течност на извършили опит за самоубийство (Arató, 1989). Промени във функцията на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек могат да повлияят и определени когнитивни функции, както е установено при

пациенти с УАР (Gallagher, 2008; Spijker, 2009; Daban, 2005), въпреки че друго изследване на пациенти с БАР не потвърждава тази зависимост (Van der Werf-Eldering, 2012).

КОФ упражнява своята биологична роля, свързвайки се с 2 типа КОФ рецептори с различна физиологична функция. Тези рецептори са от ключово значение за функционирането на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек и някои техни селективни антагонисти се използват като медикаменти за третиране на тревожност и депресия (Keck, 2001). Също така съществуват данни за асоциация на КОФ рецептор тип 1 (CRHR1) с депресия (Liu, 2013). Различни варианти в гени с ключово значение за правилното функциониране на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек също са асоциирани с АР. Наблюдавана е асоциация между вариант в близко разположен локус до CRH кандидат-гена и наследствената темпераментна черта на избягване на нови ситуации (Smoller, 2003). В шведска изолатна популация е докладвана асоциация между БАР и гена за глюкокортикоидния рецептор NR3C1 (Ceulemans, 2011). Генетични варианти в рамките на същия кандидат ген са асоциирани с униполярно разстройство и повлияват клиничната симптоматика при пациенти с БАР (Szczepankiewicz, 2011).

II. 12.6.8. Кандидат - ген *CACNA1C*

В резултат от геномните асоциативни проучвания, изследващи факторите потенциално отговорни за развитието на АР са получени статистически значими резултати за кандидат гени, които не са били обект на изследване до този момент. Няколко геномни асоциативни изследвания на пациенти с АР и шизофрения получават статистически значими резултати за гени кодиращи калциеви канали като CACNA1C и гени кодиращи белтъци от анкириновото семейство като ANK3.

Същевременно фармакогенетични изследвания на опитни животни демонстрират, че при прием на литий, се наблюдава понижена експресия на продуктите на *CACNA1C* и *ANK3* гените (Nanavati D, 2011).

Мета-анализ анализиращ геномни асоциативни проучвания публикувани до март 2011, посочва кандидат гените *CACNA1C* и *ANK3* като най-често докладвани във връзка с АР и с най-добри статистически резултати (Lee, 2012).

CACNA1C гена, намиращ се 12p13.3 принадлежи на семейството на калциевите канали, които участват в преноса на положително заредени Ca^{2+} йони през клетъчната мембрана. Преноса на Ca^{2+} йони повлиява много функции като междуклетъчната комуникация, способността на клетката да генерира и предава електрически сигнали както и регулацията на експресията на някои гени. *CACNA1C* гена кодира алфа 1 С субединицата на голям калциев канал от L тип, който контролира приема на Ca^{2+} в клетката от външната среда. Действието на канала е от особено значение за клетките в мозъчната и сърдечната тъкан. В следствие на алтернативен сплайсинг се генерират различни транскрипти и това има отношение към тъканно-специфичното функциониране. Генетични варианти могат да променят функционирането на канала като доведат до по-продължителното му отворено или затворено състояние и водят до промяна на вътреклетъчната концентрация на Ca^{2+} йони. Регулацията на експресията на някои гени с

доказана невротрофична и невропротективна роля като *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor, мозъчен невротрофичен фактор) и *BCL2* (B-cell lymphoma 2), са силно зависими от калциевата концентрация. Различни изследвания на варианти в тези гени съобщават за установена връзка с развитието и лечението на заболявания от афективния спектър (Lien, 2008; Manji, 2002). Базирайки се на резултатите на различни изследвания е генерирана хипотезата, че *CACNA1C* може директно и индиректно да допринася за развитието на АР.

В геномно асоциативно проучване, в което са изследвани 1.8 милиона генетични варианта в 4,387 болни от БАР и 6,209 контроли, статистически най-силен резултат за асоциация $p=7.0\times10^{-8}$ е получен за rs1006737 в кандидат гена *CACNA1C* (Ferreira, 2008). Това потвърждава данните от предишно геномно асоциативно изследване, част от Wellcome Trust Case-Control Consortium, в което също се съобщава за асоциация на полиморфизми в *CACNA1C* гена с АР (Sklar, 2008). В друго мултинационално геномно асоциативно проучване включващо едновременно болни от БАР и шизофрения, включително и български пациенти (16 374 болни, 14 044 здрави контроли) се установява асоциация $p=7.0\times10^{-9}$ за друг *CACNA1C* полиморфизъм, rs4765905 (GWAS Consortium 2011).

Най-много данни за асоциация с различни психиатрични разстройства са налични за варианта rs1006737 в *CACNA1C* гена. Алел А на rs1006737 е по-разпространен при пациенти с различни невропсихиатрични състояния каквито са шизофрения, БАР, депресии и психози. Той е асоцииран с когнитивни характеристики като повишена тревожност, наличие на параноидни идеи, избягване на потенциални опасни ситуации и висока реактивност при стрес (Roussos, 2011). Фамилно асоциативно изследване съобщава за асоциация на този генетичен вариант с БАР, протичащо с психотична симптоматика (Lett Tap, 2011). При изследване влиянието на rs1006737 при здрави индивиди подложени на структурен и функционален ядрено магнитен резонанс се установява, че носителите на алел А имат повишен обем на сивото вещество и намалена функционална проводимост в кортиколимбичната предна темпорална система на мозъка, без да е изяснено дали морфологичните промени водят до структурни или обратно. Не се изключва и варианта здравите участници, носители на другия алел да имат повишен обем на сивото вещество като компенсаторен механизъм (Wang, 2011). При носителите на алел А се наблюдава в по-голяма степен склоност към тревожност, депресия, обсесивно-компулсивни мисли и повишена чувствителност (Erk, 2010). При тях е описана и затруднена ориентация и намалена активност на десен париетален лоб по време на ориентация (Thimm, 2010), както и намалена комуникация между лявата и дясната част на хипокампуса и намалена активност в други мозъчни региони, многократно асоциирани с развитието на афективни разстройства и отговорни за адаптивните реакции при стрес. Същевременно е установено, че за носителите на генотип АА е характерно най-високи нива на експресия на mRNA (Bigos, 2010).

II. 12.6.9. Кандидат - ген *ANK3*

Семейството на анкирините участват в свързването на мембранните белтъци с изградения от спектрин и актин цитоскелет на клетката. Повечето от тях структурно са изградени от три отделни домена, N-края е съставен от множество повтори, C-края е най-малко консервативната част на белтъка имаща регулаторна функция, а средната част е най-консервативна и се свързва със спектрина. Анкирин 3 е имунологично различен от анкирин 1 и 2 и първоначално е открит във възлите на Ranvier в невроните на централната и периферната нервни системи. Налични са различни изоформи получавани в следствие на алтернативен сплайсинг като двете по-големи изоформи на белтъка са изключително богати на аминокиселината серин и се експресират само в нервната тъкан. Предполага се, че ANK3 участва в структурното поддържане на йонните канали и някои мембранни участъци (Kordeli, 1995), както и в клетъчни функции като пролиферация, подвижност на клетката и пространствено поддържането на специфични мембранни региони. Доказано е, че анкирин 3 е много важен и за нормалното групиране и функциониране на натриевите канали в аксона (Zhou, 1998; Pan, 2006).

Мета-анализ на резултати от различни геномни асоциативни проучвания установяват връзка между *ANK3* гена и БАР (Ferreira, 2008). Друго мета-изследване включващо 750 000 маркера при около 14 000 индивида от европейски и азиатски произход с БАР, съобщава за асоциация в хромозомния район 3p21.1, намиращ се в близост до гена *ANK3* като статистически най-значимите резултати са получени за вариантите rs4948418 и rs7618915 (Chen, 2011).

Най-многобройни данни за асоциация са получени за генетичния вариант rs9804190 в *ANK3* кандидат гена. Геномно асоциативно изследване, в което са изследвани около 550 000 еднонуклеотидни замени в две отделни популации с европейски произход установява асоциация на този вариант с БАР и в двете групи (Baum, 2008). Алел C на полиморфизма rs9804190 е наблюдаван по-често и при болни от БАР от немски и американски произход (Schulze, 2009). Същевременно постмортем изследване на мозъци от болни от шизофрения установява, че носителите на алел C на rs9804190 имат понижена експресия на mRNA, повишен риск за развитие на заболяването и по-лошо представяне на мисловни и екзекутивни задачи (Roussos, 2011). В подгрупа от германски произход е получен статистически значим резултат и за rs10994336 като алел T се наблюдава по-често при болните от БАР (Schulze, 2009), а друга изследователска група описва при здрави индивиди носители на алел T избягване на новости и развитие на анхедония (Roussos, 2011). Фамилно изследване описва също така отношение на rs10994336 към характерно протичане на заболяването (Lett Tap, 2011).

Асоциация и на двата генетични варианта (rs9804190 и rs10994336) в *ANK3* е установена и при изследване на 1,289 болни от БАР и 14,105 здрави контроли от скандинавски и исландски произход (Tesli M, 2011), въпреки че друго проучване в по-малка германска група не потвърждава взаимовръзката им със заболяването, но открива асоциация с rs10761482 варианта в *ANK3* гена (Gella, 2011).

II. 13. Епистаза

Терминът епистаза е въведен за първи път от Bateson и с него е описан маскиращия ефект на един локус върху фенотипната изява на друг (Bateson, 1909). Епистазата представлява количествени или качествени изменения зависещи от присъствието или отсъствието на други фактори, както и промяна в проявата на определен ген, зависеща от действието на модифициращи генетични варианти или външно влияние. Може да се наблюдава епистаза между различни полиморфизми, както и между генетични варианти и фактори на заобикалящата среда като светлина, температура, хормонални нива и други.

В еволюционно отношение епистазата има важна роля, тъй като води до функционални изменения, които се запазват дългосрочно.

Процесът на епистаза оказва влияние върху етиологията на различни заболявания включително и върху АР и би следвало да бъде изследван заедно с влиянието на отделните генетични варианти.

Предполага се, че за комплексните заболявания, които са дължат на множество генетични фактори с непълна пенетрантност, влияние на околната среда и са причинени от количествено натрупване на предразполагащи компоненти, наличието на епистаза между генетичните и негенетичните фактори е от съществено значение. Освен това анализът на епистаза предоставя възможност да бъдат идентифицирани взаимодействия, които имат слабо или нямат никакво самостоятелно влияние върху болестния фенотип, но в рамките на епистаза проявяват такова.

Липсата на добра репликация на резултатите получени при стандартните подходи за изследвания на комплексните заболявания се счита, че може да се дължи освен на хетерогенността и на високата степен на полигенност на АР така и на наличието на епистатични взаимодействия.

Ефектът на епистаза може да е директен или индиректен. При директно влияние на епистазата, гените, между които е установена такова взаимодействие кодират части от мултикомпонентни продукти (мембранни канали, рецептори и др.) или директно участват във формирането им и в следствие на наличието на епистаза се компрометира функционалността им. На ниво протеини, белтъците, които са функционално активни като димери могат да формират димери съставени от продукти на алтернативни генетични варианти и съответно да се наблюдава промяна във функцията.

Епистазата може да има и индиректен ефект, ако гените участващи в нея кодират елементи от метаболитни или сигнални пътища и косвено променят функционалността им. Възможно е взаимодействието да води до проявата на фенотип, който да е различен от предполагаемия фенотип на отделните участващи в епистазата генетични варианти. При епистатичното взаимодействие ефекта на участващите полиморфизми може да увеличи, намали или да е реципрочен на самостоятелното им влияние. При диплоидните организми, притежаващи по две копия от всеки ген може да се наблюдава и интралелна

комплементарност, при което двете различни копия на алелите си взаимодействат епистатично.

Наличието на епистаза се изследва чрез различни методи, един от които е регресионен анализ, при който генетичните варианти са зависими променливи. Статистическата епистаза не е задължително да се обяснява с биологически механизми, а може да се дължи на установено случайно едновременно присъствие или отсъствие на определени генетични варианти.

Най-многобройни са проучванията и данните в литературата за наличие на статистическа епистаза и по малко за наличие на функционална епистаза.

Функционалната епистаза представлява директно или индиректно взаимодействия между различни биологични единици. Взаимодействието води до промени във функционалността на определени механизми, в които те участват без непременно те директно да взаимодействат помежду си. В основата на този тип епистаза е възможно да седят генетични вариации променящи функционалността на участващите елементи. Епистаза с функционален ефект, може да бъде причинена също така и от най-различни молекулярни процеси, каквито са промени в промоторната активност, ремоделиране на хроматина, епигенетичен контрол и други.

Описани са различни видове функционални епистатични взаимодействия според начина, по който си повлияват участващите в тях генетични варианти. Най-често срещаните и описвани са: доминантна епистаза, доминантна дупликативна епистаза, рецесивна епистаза и рецесивна дупликативна епистаза.

Данните за статистическа епистаза не съответства задължително на наличие на биологическо взаимодействие. Обяснителната сила на статистическата епистаза за биологичните механизми причиняващи определено заболяване не е голяма. Наличието на биологическо взаимодействие, седящо в основата на установена статистическа епистаза би следвало да бъде проучено с допълнителни изследвания и молекулярни методи.

При интерпретацията на резултатите от проведен анализ за епистаза, трябва да се взимат под внимание някои ограничения. При липса на информация за функционалността на генетичните варианти, за които е установена статистическа епистаза, интерпретацията на взаимодействието може да бъде само спекулативно. Често при анализ за епистаза се изследват определени хипотези, за които се предполага, че имат връзка с патологията на заболяването и това може да доведе до пропускане на епистатични взаимодействия между кандидат гени, които не са изследвани.

Анализът за статистическа епистаза понякога се провежда с проучвателна цел или за да се генерира хипотеза, която да бъде обект на допълнителни проучвания. Идентифицирането на епистаза предоставя информация за възможните механизми, сигнални или метаболитни пътища, които седят в основата на изследваното заболяване.

При системно проучване и натрупване на данни за епистаза, тази информация може да се използват за по-доброто разбиране на етиологията на изследваните заболявания, на

самия процес на епистаза, както и евентуално за разработване на персонализирана медицинска терапия.

III. Цел, задачи, материали и методи на изследванията

III. 1. Цел

Целта на настоящата дисертация е оценка на приноса на генетични варианти в кандидат гени, подбрани на базата на ключови хипотези за етиологията на АР и асоциирания с тях риск чрез провеждане на асоциативно изследване от типа случаи–контроли и фамилно асоциативно изследване при българи и роми.

III. 2. Задачи

1. Събиране на биологичен материал и екстракция на ДНК от венозна кръв от пациенти с клинична диагноза АР, поставена посредством валидизирани диагностични инструменти както и от техни родственици и здрави контроли;

2. Подбор на полиморфни ДНК маркери в областта на кандидат-гени с предполагаемо участие в патогенезата на афективните разстройства;
3. Подбор на подходящ метод за генотипиране и оптимизиране на условията на генотипиране на изследваните маркери;

4. Генотипиране на подбраните полиморфни маркери в група от пациенти с афективни разстройства от български и ромски произход, техни родственици и съответстващите им здрави контроли чрез Real-Time PCR;

5. Статистическа обработка и анализ на получените резултати;

5.1. Определяне на алелните и генотипните честоти на изследваните маркери;

5.2. Използване на χ^2 тест за сравняване на алелните и генотипните честоти между групите на пациенти с АР и съответстващите им здрави контроли от български и ромски етнически произход;

5.3. Използване на TDT анализ за провеждане на фамилно-асоциативно изследване на ядрени семейства от двете етнически групи и търсене на неравновесно предаване на генетични варианти от родители на пациенти;

5.4. Хаплотипен анализ и изследване за асоциирани или неравновесно предавани хаплотипи в засегнатото поколение чрез χ^2 тест и хаплотипен TDT анализ;

5.6. Изследване за епистаза между генотипираните варианти с логистична регресия за прогнозиране на риска от АР в зависимост от комбинация от зависими променливи (генетични фактори).

III. 3. Биологичен материал

Изследваните пациенти с афективни разстройства в проучването са събрани в рамките на съвместни изследователски проекти на Център по Молекулна Медицина, МУ-София и Катедра по психиатрия, УМБАЛ „Александровска”, София. Биологичен материал само от пълнолетни лица е събиран в психиатричните болници и отделения в София,

Плевен, Русе, Търговище, Лом и Петрич. Всички пациенти са изследвани от лекари психиатри посредством SCAN (Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry, WHO, Wing et al., 1990) и DIP (Diagnostic Interview for Psychoses). Диагнозите на всички пациенти, включени в настоящото изследване съответстват на критериите на DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) на Американската Психиатрична Асоциация от 2000 година. Диагнозите са поставяни от лекари психиатри като при наличие на съмнение, двама лекари се запознават със случая и се достига до консенсусно решение. Членовете на семействата на пробандите са изследвани чрез FIGS (Family Interview for Genetic Studies) за уточняване на диагностичния им статут.

Контролната група от изследването от тип случаи-контроли е съставена от скринирани индивиди с потвърдена липса на психиатрично заболяване.

Контролите са доброволни участници, подбрани съобразно следните критерии:

- Съответстваща възраст с изследваните пациенти;
- Принадлежност към една и съща етническа група с пациентите;
- Липса на родствена връзка с пациентите;
- Липса на фамилна история за психични заболявания.

Всички изследвани индивиди (пробанди, техни родственици и контроли) са запознати с целите на проучването и са подписали информирано съгласие за участие. Изследването е одобрено и проведено в съответствие с изискванията и препоръките на Етичната комисия към Медицински Университет София.

В настоящото изследване бяха генотипирани общо 1240 индивида, от които 1010 с български етнически произход и 230 от ромски етнос.

Асоциативно изследване

В асоциативното проучване от типа случаи-контроли са изследвани 304 пациенти с тесен афективен статус (А1), включващ 270 пациента с БАР тип I, 29 пациента с БАР тип II, 5 пациента с шизоафективно разстройство от биполярен тип и 414 пациенти с широк афективен статус (А2), включващ освен пациентите с А1 и 110 пациента с УАР. В настоящата извадка преобладава процентното съдържание на жените (79% жени и 21% мъже). Контролната група се състои от 205 здрави индивиди, скринирани за отсъствие на психиатрични заболявания и фамилна история за такива. Участниците в контролната група са подбрани така, че да съответстват на пациентите с АР по пол, възраст и етнически произход. Детайлно описание на извадката и клиничните диагнози са представени в Таблица №7.

Таблица №7: Представяне на разпределението на пациентите от асоциативното проучване по диагнози и афективни статуси.

Афективен статус/ N=брой пациенти	**БАР тип I**	**БАР тип II**	**Шизоафективно р-во, биполярен тип**	**УАР**	**Здрави контроли**
А 1 n=304	270	29	5	0	171
А 2 n=414	270	29	5	110	205

Фамилно изследване

Във фамилното проучване са включени 175 семейства от тип триоси от български и ромски произход. Изследвани са 119 семейства от български етнически произход, включващи 96 пациента с БАР тип I, 16 пациента с БАР тип II, 45 пациента с УАР, 5 пациента с единичен депресивен епизод, 9 пациента с шизоафективно разстройство от биполярен тип, 3 пациента с паническо разстройство и 220 здрави родственици. В изследването са включени 56 Ромски семейства с 58 пациента с БАР тип I, 9 пациента с БАР тип II, 20 пациента с УАР, 2 пациента с единичен депресивен епизод, 2 пациента с шизоафективно разстройство от биполярен тип и 132 здрави родственици. По-детайлно описание на разпределението на изследваните индивиди от фамилното проучване по клинични диагнози е представено в Таблица №8.

Таблица №8: Представяне разпределението на индивидите от българските и ромските семейства по диагнози и афективни статуси.

N=брой семейства	**БАР тип I**	**БАР тип II**	**ША**	**УАР**	**А 1**	**А 2**	**Здрави родственици**
Български с-ва n=119	96	16	9	50	121	171	220
Ромски с-ва n=56	58	9	9	22	76	98	132
Общо с-ва n=175	154	25	18	72	197	269	352

III. 4. Избрани генетични варианти

Изследвани са 24 SNP (единични нуклеотидни замени) в 9 кандидат гена за АР. Информация за подбраните генетични варианти е представена в таблица №9.

Таблица №9: Изследвани генетични варианти, алелни варианти, локация и функционалност.

Кандидат ген	**SNP**	**Алели**	**Хромозома, позиция в гена**	**Локация**	**Функционалност на варианта**
DISC1	rs3738401	A; G	1, exon 2	231830295	Arg264Gln
	rs6675281	C; T	1, exon 9	231954101	Leu607Phe
	rs821577	T; G	1, intron 9	232067057	
	rs821616	A; T	1, exon 11	232144598	Ser704Cys
	rs980989	T; G	1, exon 13	232176195	
CLOCK	rs3805154	C; T	4, intron	56363927	
CRH	rs12721510	A,C	8, promotor	67091182	
ANK3A	rs9804190	C; T	10, 3' end	61839831	
	rs10994336	C; T	10, 5' end	62179812	
BDNF	rs6265	A,G	11, exon 2	27679916	Val66Met
	rs16917237	T; G	11, exon-intron boundaries	27702383	
	rs12273363	C; T	11, promotor	27744859	
DRD2	rs6277	C,T	11, exon 7	113283459	957C/T, Pro319Pro
	rs12800853	C; T	11, intron	113302514	
	rs7350522	T; G	11, intron	113305203	
	rs6589377	A; G	11, 5' end	113355736	
CACNA1C	rs1006737	A; G	12 intron 3	2345295	
TPH2	rs4570625	T; G	12, upstream	72331923	703G/T
	rs11178998	A; G	12, 5′ UTR (exon1)	72332715	A90G
	rs1386483	A,G	12, intron 8	72412494	
	rs4290270	A; T	12, exon 9	72416235	A57T, Ala375Ala
	rs1872824	C; T	12, intron 9	72430314	
SLC6A4	rs12150214	C; G	17, promotor	28550888	
	5-HTTLPR	L; S	17, promotor	28564346	

III. 5. Методи

За провеждането на генетичния анализ е използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени лимфоцити. Оптималните условия за взимане на кръв са между 30 мин. и 1 час след хранене в епруветка с антикоагулант-К3 EDTA (етилен диамин тетраацетат). Пробата се съхранява максимум 48 часа при +4°C. При невъзможност за обработка в този срок, може да бъде замразена и съхранена при -70°C за неограничено време.

Преданалитична обработка на биологичния материал

III. 5.1. Изолиране на ДНК

Целта на изолирането е да се получи високомолекулна ДНК с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини.

В настоящото изследване са използвани два метода за екстракция на ДНК от венозна кръв:

- чрез изсолване на белтъци (Miller et al.,1988);
- чрез полуавтоматичната сепарираща система - CHEMAGEN® Magnetic Separation метод.

Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез метода на Miller et al., 1988

При екстракцията на високомолекулна ДНК от венозна кръв, чрез изсолване на белтъците по метода на Miller et al., 1988, не се използват токсични и опасни за природата вещества. Метода включва следните няколко етапа:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Утаяване на ядрата след центрофугиране;
- Лизиране на ядрата с еритроцит лизиращ буфер и протеиназа К в присъствието на детергент - натриев додецил сулфат (SDS), който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действие на протеиназата;
- Утаяване чрез изсолване на остатъците от белтъците и протеиназата с 6M NaCl;
- Преципитиране на ДНК с абсолютен алкохол.

Използвани реактиви за екстракция на ДНК по метода на Miller са представени в Таблица №10.

Таблица №10: Състав и количество на използваните реактиви при изолиране на високомолекулна ДНК по метода на Miller et al., 1988.

	Разтвор:	**Изходни реактиви**	**Количества**	**dd H_2O**
1	**Еритроцит лизиращ буфер 10X (*pH* 7,4)**	155 mM NH_4Cl 10 mM $KHCO_3$ 0,1mM Na_2EDTA	82,9 g 10,0 g 0,034 g	до 1000 ml
2	**Нуклеолизиращ буфер 1x (SE buffer) pH 8,0** *pH се коригира с NaOH*	75 mM NaCl 25mM Na_2EDTA	4,39 g 8,41 g	до 1000 ml
3	**Протеиназа К**	10 mg/ml	0,01 g	1 ml
4	**10% Натриев додецил сулфат (**SDS**)**	Sodium dodecyl sulfate	10 g	до 100 ml
5	**Преситен NaCl**	6 M NaCl	360 g	до 1000 ml
6	**80% C_2H_5OH**	абсолютен C_2H_5OH	80,24 ml	до 100 ml
7	**ТЕ буфер** pH 7,4	10 mM Tris 0,1 mM EDTA	1,21 g 0,04 g	до 1000 ml

Използвана апаратура:

- Хладилна центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell);
- Клатачка.

Етапи:

- Получаване на клетъчно-ядрен лизат:

От 3 до 10 ml кръв се наливат в 50 ml конична епруветка и се добавя до 40 ml 1 х лизис буфер. Инкубира се 30 минути на лед и се центрофугира за 10 минути на 3000 rpm на 4ºC или 18ºC. Ядрата на левкоцитите падат на дъното, а в супернатантата остават клетъчните компоненти. Супернатантата се излива, добавят се 20 ml 1 х лизис буфер и се центрофугира при същите условия. Ако получената утайка е с бледо червен цвят, предходната стъпка се повтаря.

- Разграждане на ядрените мембрани, белтъците и РНК в лизатите:

Към получената утайка се добавят: 5 ml нуклеолизиращ буфер (SE буфер), 35-40 µl протеиназа К и 400 µl 10% SDS. Разбърква се и се оставя на 37ºC за 12 часа или на 55ºC за 5 часа. При добре протекъл лизис разтворът се избистря и не опалесцира.

- Преципитация на изчистената ДНК:

След протеолизата се добавят 2 ml 6 M NaCl, разбърква се на Vortex за около 15 секунди и се центрофугира за 15 минути на 3000 rpm на стайна температура. ДНК остава в супернатанта, а примесите се утаяват.

Супернатантата с ДНК се прехвърля в нова епруветка и се прибавят два обема студен абсолютен алкохол, при което ДНК видимо преципитира. Преципитиралата ДНК се изважда с пастьорова пипета и след промиване с 80% етанол се оставя да изсъхне на въздуха. Изсушената ДНК се разтваря в ТЕ буфер с обем между 300 µl и 1500 µl. Епруветката се запечатва много добре, надписва се и се оставя на клатачна машина до видимо разтваряне на изолираната ДНК. Ако екстрахираната ДНК ще бъде съхранявана в ДНК банка, не се разтваря, а се прехвърля в епруветка с 96% етанол.

Очакваният добив от 10 ml кръв е около 300-800 ng/ µl ДНК.

Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation Station

Етапи на изолиране:

- Получаване на клетъчно ядрен лизат и разграждане на белтъците и РНК:

В 50 ml конични епруветки, съдържащи 7ml кръв, се добавя 20µl протеиназа и 9ml лизис буфер.

- Свързване на ДНК с магнитните частици:

Към полученият лизат се добавят 25 мл свързващ буфер и 1мл поливинилалкохол с магнитни частици (M-PVA Magnetic beats). При карбоксилизиране на функционални групи в поливинил алкохола се получава високоспецифично свързване на магнитните частици с ДНК.

- Активиране на магнитното поле и миене на ДНК пробите:

В присъствието на активно електромагнитно поле частиците заедно с ДНК се привличат към металните типове на магнитната глава. Така захванати за типовете пробите биват пренесени в миещ буфер. Електромагнитното поле се деактивира и типовете се завъртат с цел максимално хомогенизиране на пробите. След спиране на ротацията на типовете, магнитното поле отново се активира и пробите се прехвърлят в следващия миещ буфер. Активирането на магнитното поле и миенето се повтаря общо пет пъти в различни по състав промиващи буфери.

- Елуиране на ДНК:

Елуиращият буфер деактивира взаимодействието между магнитните частици и ДНК. Той съдържа 10 мМ Трис–HCI с pH=8.0 и е аналогичен на ТЕ буфера. Вместо елуиращ буфер може да се използва и ddH_2O, но това може да намали крайния добив.

Използвани реактиви за екстракция на ДНК чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation метод:

- Елуиращ буфер, съдържа: 10 мМ Трис–HCl pH=8.0; ТЕ буфер pH=8.0; Може да се използва и ddH_2O pH=8.0;
- Свързващ буфер 2 и промиващ буфер 3 съдържат етанол. Необходимо е съхранение в добре затварящи се контейнери, за да се избегне бързото изпарение на етанола, което може да възпрепятства получаването на оптимален добив.
- Магнитните частици е необходимо да се разбъркват до достигане на хомогенно разпределение преди използването им, което цели по-добър добив.

Изолирането на ДНК от кръв чрез Chemagen полуавтоматичната сепарираща система, се извършва посредством магнитни частици, които съдържат матрица от поливинилов алкохол, която в последствие се карбоксилира с цел свързване на белтъци, нуклеинови киселини и други амино- лиганди. Магнитните частици с –COOH групи могат да се свързват с полимерни или неполимерни молекули, които съдържат амино групи. За целта предварително е необходимо активирането на –COOH група на матрицата, чрез регулиране на pH на средата между 4.7 и 6 като среда с pH>7.5 трябва да бъде избягвана. Магнитните частици се пренасят през различни промиващи разтвори заедно със свързаната към тях ДНК. Получената ДНК чрез този метод е с висок добив и чистота и може да бъде използвана за различни цели.

Фигура 3: CHEMAGEN® Magnetic Separation Station.

III. 5.2. Оценка на качеството и пречистване на получената ДНК

Качеството на получената високомолекулна ДНК може да бъде определено с тестване с агарозна гел електрофореза. Използва се обикновено 0,8% агарозен гел и 1x TBE (трисборатен буфер). Визуализацията на фрагментите се осъществява посредством етидиев бромид с концентрация 0,05 µl/ml. Чрез електрофореза и помощта на контроли може да се определи ориентировъчно целостта на геномната ДНК и полуколичествено нейната концентрация. Възможно е да се извърши допълнително пречистване на високомолекулната ДНК от останали белтъци и соли, ако това се налага.

Концентрацията на изолираната геномна ДНК най-точно може да бъде определена спектрофотометрично. Методът се базира на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната λ =260nm от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК.

Концентрацията на изолираната ДНК може да се измери автоматично чрез апарат Nanodrop. Отношението на абсорбцията, измерена съответно при λ=260 и λ=280, показва чистотата на ДНК, която трябва да е между 1.7 и 2.0. Стойности под 1.6 говорят за наличие на примеси от белтъци, а над 2.0 за примеси от РНК.

Използвана апаратура: NanoDrop (Thermo Scientific)

За генотипирането са използвани работни разтвори на ДНК с концентрация 20 ng/µl, които бяха приготвени чрез разреждане на аликвот от изходния разтвор в ТЕ буфер или ddH2O по формулата:

$$V2 = C1.V1/ C2,$$ където

C1 и C2 са съответно изходната и крайната концентрация, а V1 и V2 са изходния и крайния обем на разтворите.

III. 6. Аналитична обработка

III. 6.1. Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология. Състои се в in vitro ензимно намножаване (амплификация) на избран участък, ограничен от определени последователности. Методът е разработен от Kary Mullis през 1985г.

Във всяка амплификационна реакция участват:

- ДНК – едноверижна матрица, получена след топлинна денатурация на геномната ДНК;
- Taq – полимераза – осъществява процеса на намножаване на желаната ДНК последователност. За първи път е изолирана от бактерията Termophylus aquaticus. Ензимът Taq-полимераза е термостабилен и запазва активността си от 45 до 60 мин при 94˚C. Оптималната температура за синтез с Taq –

полимеразата е около 72˚C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е от 1 до 5 U;

- Праймери (зародиши) – къси (14–40 нуклеотида) синтетични олигонуклеотиди, комплементарни на последователности, ограничаващи целевия участък за намножаване. Те служат за начало на синтезата на ДНК при всеки нов цикъл на PCR – реакцията. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0,1 – 1,0 μM;
- Дезоксинуклеотидтрифосфати – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно на принципа на комплементарноста. Задължително е четирите типа дНТФ да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес, оптималната концентрация за всеки нуклеотид е 20 до 200 μM;
- Реакционен буфер – осигурява подходящото pH=8,3–9,0 на средата и необходимите йони за действие на ензима. В състава си обикновено включва 10-50 mM Tris-HCl, pH=8,3-9,0; до 50mM KCl и 0,5-5,0 mM MgCl2. Освен това, може да включва и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти, като диметил сулфооксид (DMSO) и други. Компонентите на буфера могат да варират по качество и количество в зависимост от използваната Taq – полимераза.

Етапи на амплификацията:

Полимеразната верижна реакция започва с продължителна денатурация за разделяне на двойно спиралната верига на геномната ДНК. Амплифицирането на желания участък се осъществява при условия на многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура и продължителност. Всеки от циклите включва следните три стъпки:

- Термична денатурация (denaturation) - Осъществява се при 90 ˚C до 97˚C, което осигурява пълно разделяне на двойноверижната ДНК до едноверижни матрици за амплификация;
- Хибридизация (annealing) - Осъществява се между праймерите и комплементарните им участъци от матричната едноверижна ДНК. Температурата на това взаимодействие е строго специфична и се определя от базовия състав и дължината на използваните праймерни последователности. Емпирично температурата на хибридизация може да бъде изчислена по следната формула:

$$T_C \text{ annealing}=(A+T)x2+(G+C)x4-5$$

- Удължаване (extension) – Синтеза на новата комплементарна ДНК-верига, се извършва в посока 5’→3’. Температурата при която се извършва синтеза подлежи на оптимизация, но обикновено е около 72˚C.

Използвана апаратура:

За провеждането на полимеразните верижни реакции в настоящото изследване са използвани апарати на фирмата QB-96.

III. 6.2. Качествен и количествен контрол на PCR

Качествена оценка на резултатите от извършените PCR реакции и получените фрагменти се извършва чрез използването на отрицателна контрола. Тази контрола съдържа всички компоненти, необходими за протичане на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която е заместена с ddH20. Липсата на продукт в отрицателната контрола показва, че реакционната смес не е замърсена със случайно попаднала чужда ДНК–матрица. Големината на продуктите на PCR се идентифицират с помощта на молекулни маркери. При провеждане на агарозна електрофореза, маркерът се нанася успоредно с анализираните проби, и така се определя дължината на продукта. Методът дава възможност и за ориентировъчна оценка на добива на ДНК.

Хоризонтална агарозна гел електрофореза

Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза позволява ДНК–фрагментите да се разделят в зависимост от тяхната молекулна маса. Тази техника се използва за определяне на качеството и количеството на амплифицираните продукти. Идентифицирането им се извършва спрямо подходящ молекулен маркер с известна концентрация. Използва се разтворен в агарозния гел етидиев бромид, който се интеркалира между базите на ДНК и позволява визуализирането на молекулата и на UV–светлина. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електричното поле. При слабо алкално pH, фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анода). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите се влияе силно от състава и йонната сила на използвания буфер. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минимално и ДНК фрагментите се придвижват по бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва трис боратен буфер (TBE).

Реактивите, използвани при агарозната електрофореза са представени в таблица №11.

Таблица №11: Състав и количество на използваните реактиви и разтвори за агарозната гел електрофореза.

	Разтвори	**Състав**	**Количество**	**ддH_2O**
1	**10 x TBE буфер, pH 8.0**	90 mM Tris-HCl 90 mM H_3BO_3 1 mM Na_2EDTA	108.00 g 55.00 g 9.52 g	до 1000 ml
2	**2% агарозен гел**	Агароза 10 x TBE буфер Етидиев бромид ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	2.00 g 10.00 ml 5.00 µl	до 100 ml
3	**Разтвор за нанасяне**	0.25% бромфенолсиньо 40% Ficoll 2 mM Na_2EDTA	0.25 g 40.00 ml 0.74 g	до 100 ml

Етапи:

Необходимото количество агароза се премерва, разтваря в буфер и стапя в микровълнова фурна. Прибавя се етидиев бромид, разбърква се, излива се в предварително приготвената ваничка и се оставя да полимеризира. Гелът се поставя във ваната за електрофореза, нанасят се пробите и се извършва електрофоретичното разделяне. Прави се снимка с помощта на UV трансилюминатор и фотодокументационна система.

III. 6.3. 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)

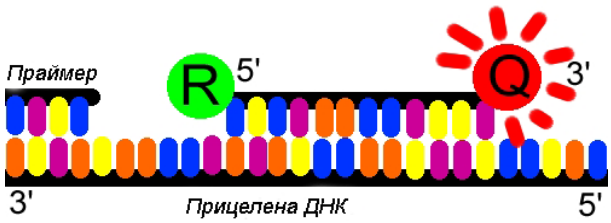
TaqMan® метод – количествен анализ за генотипиране на полиморфизми, подходящ за изследване на еднонуклеотидни замени. Всяка TaqMan® проба съдържа репортерна боя „reporter”(6-FAM), закачена към 5’ края и нефлуоресцентен гасител „quencher” (NFQ), прикачен към 3’ края както е представено на фиг. 8

Фиг. 4: Taqman проба:

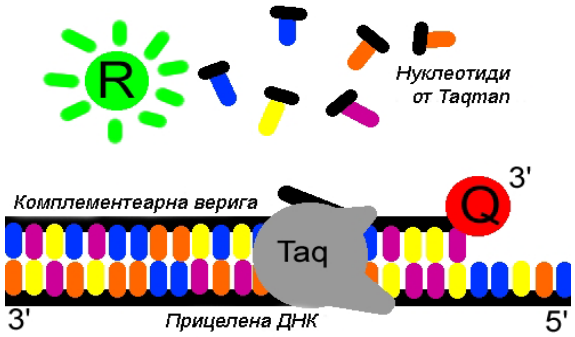
Когато сондата е интактна, близостта на гасителя до репортера действа така, че потиска флуоресценцията му. По време на реакцията репортера и гасителя се разделят и натрупването на PCR продукти се следи и се детектира с лазер на базата на увеличаването на флуоресценцията на репортера. Обработката на резултатите се извършват чрез

компютър и специфична операционна система. Taq полимеразата изгражда комплементарната верига чрез 5'->3' нуклеазната си активност (фиг. 5) поради наличието на праймер. Тя добавя нуклеотиди по растящата верига и премахва Taqman® нуклеотидите от таргетната ДНК, като процеса отделя репортера от гасителя и репортера се активира (фиг. 10).

Фиг. 5: Taqman олигонуклеотид и таргетна ДНК.



Фиг. 6: Полимеризация и активация на репортера.



Състав и количество на използваните реактиви за TaqMan® реакцията е представен в таблица №9.

Таблица №9: Крайни концентрации на компонентите използвани за амплификация на изследваните локуси.

разреждане SNP / **assay компоненти**	**x20**	**x40**
PCR MIX	2,5µl	2,5µl
SNP mix	0,25µl	0,125 µl
dH2O	1 µl	1,375 µl
DNA	1 µl	1 µl

Термален профил за всички амплификации:

Стъпка 1: 95°C за 10 мин. – 1 цикъл
Стъпка 2: 92°C за 15 сек. – 40 цикъла
60°C за 60 сек. – 40 цикъла

Успеваемостта при генотипирането на 384 плаките в настоящото изследване е над 95%.

III. 7. Статистически методи

Фенотипни модели

Статистическите анализите бяха проведени при два различни фенотипни модела:

- **A1 - "тесен**" фенотипен модел, при който бяха включени пациенти с БАРІ, БАРІІ и шизоафективно разстройство, докато всички други индивиди бяха считани, че са с неизвестна диагноза;
- **A2 - "широк**" фенотипен модел, който включва всички засегнати според "тесния" модел, както и всички пациенти с УАР (рекурентна депресия).

За статистическия анализ на резултатите от генотипирането са използвани програмите Vassar stats (http://www.vassarstats.net), PLINK (Purcell, 2007) и SPSS (SPSS IBM, New York, U.S.A).

Поради липса на статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти на всички изследвани варианти между българската и ромската етнически групи е проведено фамилно проучване, включващо едновременно семейства от двата етноса. Увеличаването на фамилната извадка е направено с цел да се постигне по-голяма статистическа сила на анализа, като същевременно е проведено и отделно изследване на двете етнически групи.

III. 7.1. Изчисляване на хетерозиготност, алелни и генотипни честоти

Изчисляване на хетерозиготност в извадката

Хетерозиготността (H) е мярка за степента на полиморфност на изследвания генетичен вариант. Тя изразява вероятността случайно избран индивид от популацията да е хетерозиготен по отношение на даден генетичен вариант. Очакваната хетерозиготност (H) се изчислява при предположение, че популацията е в равновесие със закона на Харди-Вайнберг. Използва се следната формула:

$$H = 1 - \sum (p_i)^2 ,$$

където p_i е честотата на i-тия алел.

Изчисляване на алелните честоти в извадката

Алелната и генотипната честота (f) се определят от наблюдаваните алели или генотипи в извадката спрямо всички алели/генотипи. Полученият резултат може да се представи в десетичен вид или в проценти. За изчисляване на алелната честота е използвана следната формула:

f = брой срещан алел / общ брой изследвани алели

За изчисляване на генотипна честота в извадката е използвана следната формула:

f = брой срещан генотип / брой изследвани индивиди

III. 7.2. Нулева хипотеза (H_0)

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни за тестване на хипотезата за липса на статистически значима разлика между сравняваните групи.

Приема се определено ниво на значимост – α (Significance Level), което представлява вероятността за отхвърляне на нулевата хипотеза. Най-често използваното ниво на значимост е α=0,05 или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли. Изчислява се вероятността (p) за получаване на наблюдаваните данни при положение, че нулевата хипотеза е вярна. За да може да се приеме или отхвърли нулевата хипотеза с определена достоверност се сравняват стойностите на вероятностите (p) и приетото ниво на значимост (α). Възможни са следните положения:

- При $p>\alpha$,H_0 се приема, което означава, че между сравняваните групи не съществува статистически значима разлика.
- При $p<\alpha$, H_0 се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи съществува статистически значима разлика.

Нулевата хипотеза, може да бъде проверена с различни статистически методи, един от които е метода χ2. При метода χ2, съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на χ2 и стойностите на вероятността p, при различни степени на свобода и нива на значимост.

III. 7.3. Метод χ2

Методът χ2 се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни, или с предварително приета хипотеза. Изчислява се χ2 по следната формула:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i},$$

където: n – брой сравнявани класове;

O_i – опитни (наблюдавани) стойности на I-тия клас след провеждане на експеримента;

E_i – очаквани стойности на I-тия клас.

Стойностите на χ2 зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били приети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по следната формула:

$$df = n - 1,$$

където n е броя на сравняваните класове.

Когато стойността на $\chi 2$ е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост (α) и степен на свобода (df), първоначалната нулева хипотеза се отхвърля като невярна.

Методът $\chi 2$ е приблизителен метод и поради тази причина е подходящ само ако общият размер на извадката и очакваните стойности са достатъчно големи.

При провеждането на асоциативни изследвания при мултифакторните полигенни заболявания се прави сравняване на честотите на наблюдаваните алели и генотипи в групите от засегнати индивиди и в контролната група. Ако наблюдаваната честота се различава значително от очакваната, нулевата хипотеза се отхвърля. Този статистически метод за сравнение изчислява стойностите на $\chi 2$ и p при степен на свобода df=1.

III. 7.4. Закон на Харди-Вайнберг

В основата на закона на Харди-Вайнберг е фактът, че в една голяма, свободно кръстосваща се популация, алелните и генотипните честоти в даден локус би следвало да са постоянни. Математическият израз на закона може да се представи чрез следната формула:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2.p.q + q^2,$$

където p е честотата на алела [A], q е честотата на алела [a], като [A] и [a] са двата алела срещащи се в изследвания локус и p+q=1.

Когато това съотношение между алелните честоти е спазено в популацията и съответно в представителната извадка, която се изследва, то това означава, че съществува генетично равновесие за изследвания локус.

Отклоненията от закона на Харди-Вайнберг могат да се дължат на следните причини:

- Извадката не е подбрана добре и може да съдържа родствено свързани индивиди;
- В популацията липсва свободно кръстосване и в нея могат да съществуват отделни субпопулации, в които алелните честоти да се различават значително от тези характерни за общата популация;
- Върху популацията могат да действат селективни фактори;
- Методът на изследване на генотипните честоти в извадката не е достатъчно прецизен и това води до грешки при отчитането на резултатите.

Проверката за съответствие със закона на Харди-Вайнберг се състои в сравняване чрез метода $\chi 2$ на установените в извадката генотипни честоти с очакваните, които са изчислени по съответния закон.

III. 7.5. TDT transmission disequilibrium test

Статистическият анализ на фамилно-базирани асоциативни изследвания може да се извършва чрез TDT метода (transmission disequilibrium test), при който алелите предадени от хетерозиготните родители на засегнато потомство се сравняват с нормалното очаквано разпределение на алелите в поколението (Spielman et al. 1993). В настоящото проучване е използвана програмата PLINK за прилагане на TDT метода.

При TDT теста се взимат предвид само хетерозиготните родители за даден маркер, като се отчита колко често и кои алели се предават на засегнатия пробанд. При случайно предаване и липса на асоциация на алелите със заболяването се очаква предаването му в 50% от случаите. За статистическа сравняване на наблюдаваното спрямо случайното предаване в поколението на алели се използва $\chi 2$ тест със степен на свобода df=1 (Spielman and Ewens, 1996), изчислена по следната формула:

$$\chi 2 = \frac{(a-b)^2}{(a+b)},$$

при която:

a – брой пъти, когато алела е предаден от хетерозиготните родители на засегнатото потомство,
b – брой пъти, когато същият алел не е предаден от хетерозиготните родители на засегнатото потомство.

Наличието на алелна хомогенност в болестния локус, както и силна неравновесна скаченост между болестния алел и определен фенотип се приема като доказателство за асоциация между заболяването и даден алел. В този случай ще се наблюдава преференциално предаване на този алел на засегнатите пробанди.

Три разновидности на TDT теста могат да бъдат извършени:

- Стандартният TDT анализ се състои в независима проверка за неравновесно предаване на всеки един от алелите поотделно.
- Изследването (allele-wise analysis) включва информация за всички маркерни алели. Асоциация се отчита в случаите, когато болестния(те) алел(и) са в неравновесна скаченост с определен брой маркерни алели, което дава възможност да се идентифицират неравновесно предавани хаплотипи.
- При третия тип анализ (genotype-wise analysis) се изследват родителските генотипи и се установява вероятността за предаване на всеки един генотип в засегнатото поколение. Този анализ може да установи асоциация ако алелите на два маркера са и двата в неравновесна скаченост с болестни алели. За всички родителски генотипи, които притежават само един от тези алели, той ще бъде предаван преференциално на пробандите. Предаването на кой да е алел, обаче, няма да се отклонява от случайното предаване, когато се разглеждат родителските генотипи, съдържащи и двата алела. Затова като се изследва начина на предаване за всеки един тип родителски генотип, ще е възможно установяването на асоциация.

В настоящото изследване са проведени стандартен TDT анализ, също и хаплотипен TDT анализ. В случай, при който броя на наблюденията са били под 5, оценката на асоциацията е осъществявана посредством по-строгия тест на Фишер, а не с $\chi 2$ тест. С цел постигане на по-голяма статистическа сила на анализа са сравнени алелните честоти на семействата от български и ромски произход и след като не са установени статистически различия между тях, те са анализирани заедно при TDT анализа на семействата.

III. 7.6. Анализ за статистическа епистаза

Интерпретацията на резултатите получени при изследването на комплексните заболявания със стандартни подходи е по-трудна в сравнение с тази при Менделовите заболявания поради спецификата им. Консистентното докладване на противоречиви резултати се дължи и на фактите, че множество генетични варианти допринасят за развитието на заболяването, наблюдава се непълна пенетрантност както и влияние на фактори на околната среда. Анализът на епистаза предоставя възможността да се идентифицират генетични варианти, които чрез другите подходи и методи остават незабелязани. Идентифицирането на статистическа епистаза между два или повече генетични варианта не означава непременно наличие на биологическа връзка между установените варианти. Данните за статистическа епистаза може да се използва като изходна точка за по-детайлно изследване посредством мултидисциплинарни експериментални подходи на евентуалните биологични механизми.

Оценката на статистическата епистаза е осъществена чрез използването на съответните функции в програмите PLINK (Purcell et al., 2007) и SPSS for Windows (IBM SPSS, ver. 21).

Био-информатичния софтуерен пакет PLINK включва няколко варианта за оценка на епистаза. Командата за епистаза при случай-контроли в PLINK е използвана като скриниращ метод с цел да се идентифицират генетичните варианти, които взаимодействат епистатично и имат отношение към развитието на АР в Българската популация. При нея се използва линейна и логистична регресия за изчисляване на OR (odds ratio). Теста за епистаза на PLINK проверява дали корелацията между два локуса при пациенти и контроли е статистически различна. За по-детайлно проучване на взаимодействащите се алели или генотипи е използвана логистична регресия (SPSS версия 21.0). Логистичната регресия определя вероятността, с която пациентите попадат в определена категория на зависими променливи, които могат да корелират с наличието на заболяването. Тя прогнозира наличието или отсъствието на определена характеристика в зависимост от набор променливи. Логистичната регресия е подобна на линейната, но се използва предимно при модели, където зависимите променливи са дихотомни.

Уравнение за логистична регресия:

$$\ln(p/1-p) = a + b1x1+b2x2+\ldots+bnxn$$

$$\text{Logit}(p) = a + b1x1+b2x2+\ldots+bnxn$$

където: p е вероятността да се принадлежи към категория 1,
p/1-p - OR (odds ratio),
a - константа,
n - брой прогнози,
b1 – bn - регресионни коефициенти.

Уравнението на логистичната регресия представлява нелинейна зависимост между предиктори и бинарни променливи. Регресионните коефициенти се изчисляват чрез maximum likelihood, представляващ вероятността да се принадлежи към една група разделена на възможността да не се принадлежи към същата група, OR е измерение на ефекта, описващ силата на асоциация или липсата на независимост между две независими бинарни стойности.

При изследване на генотипната епистаза между два маркера е необходимо разделяне на извадката на девет подкатегории (съответстващи на по 3 генотипа за всеки 2 SNP маркера) и в определени ситуации, когато няма достатъчно наблюдения във всяка една от тези подкатегории, не е възможно осъществяването на анализа. Този проблем е преодолян при анализа на алелната епистаза, където категориите по генотипи са обединени така че да има достатъчно, за провеждането на анализа, наблюдения във всички клетки на матрицата на Hessian. Друг начин за преодоляването на проблема е допълнителния анализ на повече пациенти, при което да се акумулират достатъчно наблюдения в деветте подкатегории.

За да се изключи получаването на фалшиво положителни резултати, дължащи се не на същинска епистаза, а на неравновесна скаченост между изследваните еднонуклеотидни замени е проведен предварителен анализ за скаченост на изследваните маркери с Haploview (Barrett, 2005) и скачените генетични варианти, както и тези разположени в рамките на един и същи ген, не са разглеждани в анализа за статистическа епистаза.

IV. Резултати

IV. 1. Кандидат-гени от серотонинова невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4*

IV. 1.1. Резултати за кандидат-ген *TPH2*

Продуктът на TPH2 гена кодира скоростопределящия ензим в синтезата на ключовия невромедиатор серотонин, с най-високи нива на експресия установени в мозъчната зона raphe nucleus. В настоящото проучване са изследвани 5 еднонуклеотидни замени в гена кодиращ триптофан хидроксилазин ензим (TPH; EC 1.14.16.4), за които се предполага, че повлияват нормалното му функциониране. Анализирани са 2 генетични варианта разположени в 5'UTR, rs4570625 (703G/T), rs11178998 (A90G) и 3 варианта (rs1386483, rs4290270, rs1872824) намиращи се съответно в интрон 8, екзон 9 и интрон 9.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на TPH2 кандидат гена

При сравнение на алелните и генотипните честоти на петте изследвани генетични варианта между пациенти и контроли от български произход не са открити статистически значими разлики при тясна и широка фенотипна характеристика. Проведеното проучване показва липса на асоциация на rs457062512, rs11178998, 1386483, rs4290270 и rs1872824 с афективни разстройства в българската популация. Резултатите от асоциативното изследване от тип случаи-контроли на избраните и изследвани полиморфизми в кандидат-гена *TPH2* и при двата фенотипни модела (A1 и A2) са подробно представени в Таблица №10.

Таблица №10: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *TPH2* гена в българска популация.

TPH2	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs4570625								
Алели								
T	101/20.36	54/20.45	133/21.04	54/20.45	1	0.99	0.84	1.04
G	395/79.64	210/79.55	499/78.96	210/79.55	1	1.01	0.84	0.96
Генотипи								
T/T	18/7.26	5/3.79	21/6.64	5/3.79	0.18	1.99	0.24	1.81
T/G	65/26.21	44/33.33	91/28.8	44/33.33	0.14	0.71	0.34	0.81
G/G	165/66.53	83/62.88	204/64.56	83/62.88	0.47	1.17	0.74	1.08
Доминантен модел					0.48		0.76	
Рецесивен модел					0.18		0.24	
rs11178998								
Алели								
G	34/6.56	20/7.46	47/7.12	20/7.46	0.64	0.87	0.86	0.95
A	484/93.44	248/92.54	613/92.88	248/92.54	0.64	1.15	0.86	1.05

Генотипи								
G/G	1/0.39	1/0.75	2/0.61	1/0.75	0.57	0.52	0.64	0.81
G/A	32/12.35	18/13.43	43/13.03	18/13.43	0.76	0.91	0.92	0.97
A/A	226/87.26	115/85.82	285/86.36	115/85.82	0.69	1.13	0.89	1.05
Доминантен модел					0.69		0.89	
Рецесивен модел					0.57		0.64	
rs1386483								
Алели								
T	211/36.76	106/34.42	294/37.8	128/33.86	0.49	1.11	0.19	1.19
C	363/63.24	202/65.58	484/62.2	250/66.14	0.49	0.90	0.19	0.84
Генотипи								
T/T	42/14.63	21/13.63	58/14.91	23/12.17	0.78	1.09	0.37	1.26
T/C	127/44.25	64/41.56	178/45.76	82/43.39	0.58	1.12	0.59	1.10
C/C	118/41.12	69/44.81	153/39.33	84/44.44	0.45	0.86	0.24	0.81
Доминантен модел					0.45		0.24	
Рецесивен модел					0.77		0.37	
rs4290270								
Алели								
A	191/38.05	83/32.42	226/37.05	83/32.42	0.13	1.28	0.19	1.23
T	311/61.95	173/67.58	384/62.95	173/67.58	0.13	0.78	0.19	0.82
Генотипи								
A/A	38/15.14	16/12.5	43/14.1	16/12.5	0.49	1.249	0.66	1.15
A/T	115/45.82	51/39.84	140/45.9	51/39.84	0.27	1.277	0.25	1.28
T/T	98/39.04	61/47.66	122/40	61/47.66	0.11	0.703	0.14	0.73
Доминантен модел					0.11		0.14	
Рецесивен модел					0.49		0.66	
rs1872824								
Алели								
T	183/36.17	85/31.95	241/36.85	85/31.95	0.24	1.21	0.16	1.24
C	323/63.83	181/68.05	413/63.15	181/68.05	0.24	0.83	0.16	0.81
Генотипи								
T/T	35/13.83	15/11.28	45/13.76	15/11.28	0.48	1.26	0.47	1.26
T/C	113/44.66	55/41.35	151/46.18	55/41.35	0.53	1.15	0.35	1.22
C/C	105/41.51	63/47.37	131/40.06	63/47.37	0.27	0.79	0.15	0.74
Доминантен модел					0.27		0.15	
Рецесивен модел					0.47		0.47	

Асоциативно изследване на TPH2 хаплотипи

Анализирани са допълнително и всички възможни хаплотипи формирани от изследваните генетични варианти в *TPH2* гена и са тествани за асоциация при тесен и широк фенотипен модел. Не са идентифицирани хаплотипи, асоциирани с A1 или A2 афективните статуси, което предполага, че в конкретната българска извадка *TPH2* хаплотипите не допринасят за развитието на разстройства от афективния спектър.

Фамилно изследване на полиморфизми в TPH2 кандидат ген

Проведен е TDT анализ на изследваните пет еднонуклеотидни замени в *TPH2* гена, но не е установена неравновесна трансмисия за някой от алелите на пациенти от техните родители при тясна и широка фенотипна характеристика. Анализирани са съвместно български и ромски семейства и е проведен също така и отделен анализ само на българските и само на ромските семейства. TDT тестът не идентифицира преференциално предаване на алели на rs457062512, rs11178998, 1386483, rs4290270 и rs1872824 независимо от етническата принадлежност и изследвания фенотипен модел. Резултатите от проведеното фамилно проучване на *TPH2* варианти чрез TDT анализ са представени в Таблица №11 (съвместен TDT анализ на български и ромски семейства) и Таблица №12 (TDT анализ проведен отделно при български и ромски семейства).

Таблица №11: TDT анализ на генетични варианти в *TPH2* гена проведен в обединена извадка от семейства от български и ромски произход.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs4570625	T	G	0.06	0.81	1.06	0.73	0.39	1.2
rs11178998	G	A	1.12	0.29	1.46	1.19	0.27	1.41
rs1386483	T	C	0.01	0.91	0.97	0.24	0.63	0.91
rs4290270	A	T	0.16	0.69	1.11	0.05	0.83	0.96
rs1872824	A	G	1.06	0.30	0.81	0.78	0.38	0.86

Таблица №12: TDT анализ на генетични варианти в *TPH2* гена проведен отделно в семейства от български и ромски произход.

Български семейства	**A1**			**A2**		
	CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs4570625	0.02	0.88	0.95	0.02	0.89	1.04
rs11178998	0.22	0.64	1.25	0.36	0.55	1.27
rs1386483	0.32	0.57	1.17	0.06	0.81	1.1
rs4290270	0.16	0.69	1.11	0.05	0.83	0.95
rs1872824	0.27	0.61	0.88	0.1	0.75	0.93
Ромски семейства						
rs4570625	0.36	0.55	1.27	1.48	0.22	1.54
rs11178998	1.14	0.28	1.8	1.00	0.32	1.67
rs1386483	0.86	0.35	0.7	1.40	0.24	0.67
rs4290270	N A	N A	N A	N A	N A	N A
rs1872824	1.10	0.30	0.70	1.26	0.26	0.69

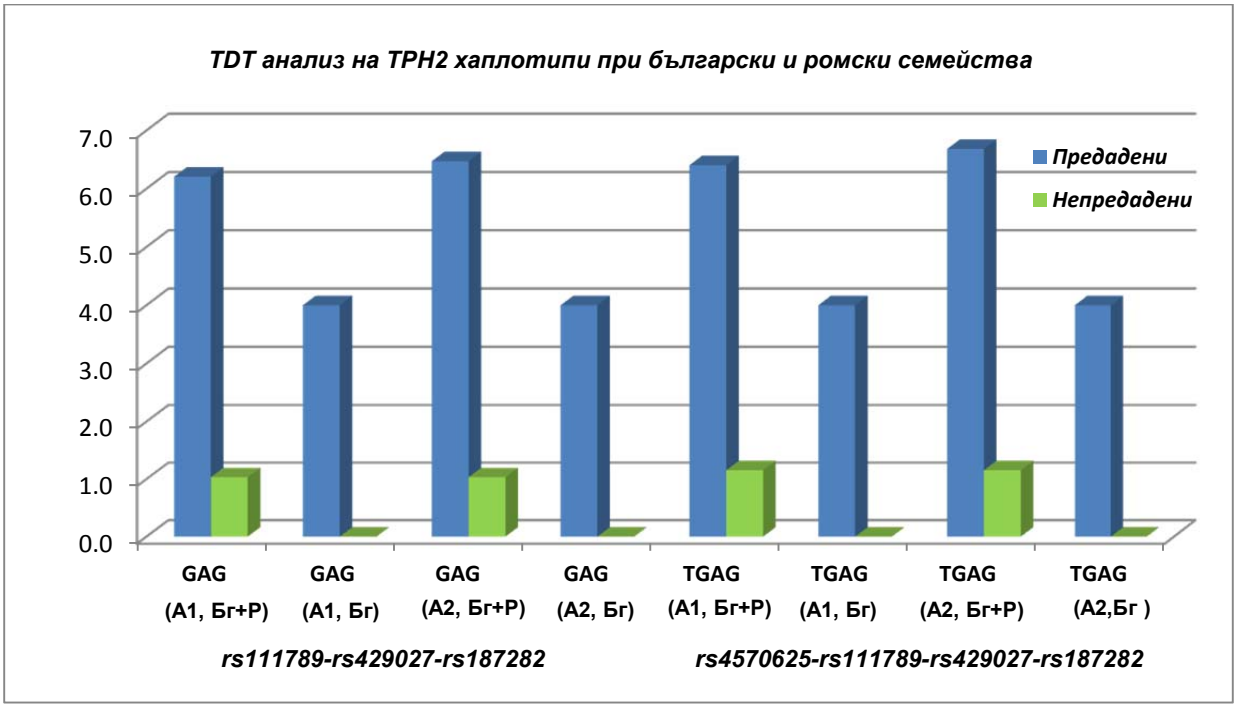
TDT анализ на TPH2 хаплотипи

При изследването на семействата от български и ромски произход, както и отделно само на българските семейства е проведен също така и хаплотипен TDT анализ. Анализ включващ само семействата от ромски произход не би бил статистически коректен и не е проведен заради малкия им брой. Идентифицирани са статистически гранични резултати за два *TPH2* хаплотипа, които вероятно имат връзка с повишен риск от развитие на заболяването в изследваната фамилна група. За хаплотип rs111789/rs429027/rs187282, GAG е установено, че е по-често предаван от родители в засегнатото поколение при анализа включващ едновременно семейства от български и ромски произход, както и при отделно проведения TDT тест само на български семейства и при двата фенотипни модела. Същата тенденция е установена и за сходния хаплотип rs4570625/ rs11178998/ rs4290270 / rs1872824, TGAG, който също е по-често предаван на пациентите от техните родственици при съвместния TDT анализ на български и ромски семейства както и само при българските семейства при A1 и A2. Получените резултати и за двата хаплотипа са с гранична статистическа значимост, но те най-вероятно допринасят за повишен риск от АР, макар и слабо както при българските, така и при ромските семейства независимо от фенотипа. Резултатите от проведения хаплотипен TDT анализ са представени в Таблица №13, а графичното съотношение на предадени към непредадени хаплотипи е представено на Фигура №7.

Таблица №13: TDT анализ на *TPH2* хаплотипи в семейства от български и ромски произход.
В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.

Хаплотип		CHISQ	p-value	Етнос	Фенотип
rs111789/rs4290270/rs187282	**GAG**	3.67	0.055	български+ромски с-ва	A1
	GAG	3.94	0.047	български+ромски с-ва	A2
	GAG	4	0.046	български с-ва	A1
	GAG	4	0.046	български с-ва	A2
s4570625/ rs11178998/ rs4290270 / rs1872824	**TGAG**	3.65	0.056	български+ромски с-ва	A1
	TGAG	3.9	0.048	български+ромски с-ва	A2
	TGAG	4	0.046	български с-ва	A1
	TGAG	4	0.046	български с-ва	A2

Фигура №7: Графично представяне на съотношението предавани към непредавани *TPH2* хаплотипи в български и ромски семейства при тясна (A1) и широка (A2) фенотипна дефиниция.



IV. 1.2. Резултати за кандидат-ген *SLC6A4*

В генът *SLC6A4,* картиран в район 17q11.1–q12 и кодиращ Na^+ и Cl^- зависим серотонинов транспортер са изследвани двата полиморфизма, rs12150214 и 5-HTTLPR. Разположеният в интрон 1, rs12150214 е асоцииран с повишено наличие на депресивни симптоми (Su et al. 2009) и е позициониран в район с множество регулаторни участъци. Другият изследван генетичен вариант 5-HTTLPR представлява 43 bp инсерция или делеция в промоторния регионр повлияваща транскрипционната активност на гена. Вариантът с инсерцията (L) има по-високи нива на транскрипция спрямо генетичния вариант с делецията (S) (Lesch, 1996), а S вариантът е асоцииран с АР както и с други психиатрични разстройства (Cho, 2005, Hauser, 2003).

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на SLC6A4 кандидат гена

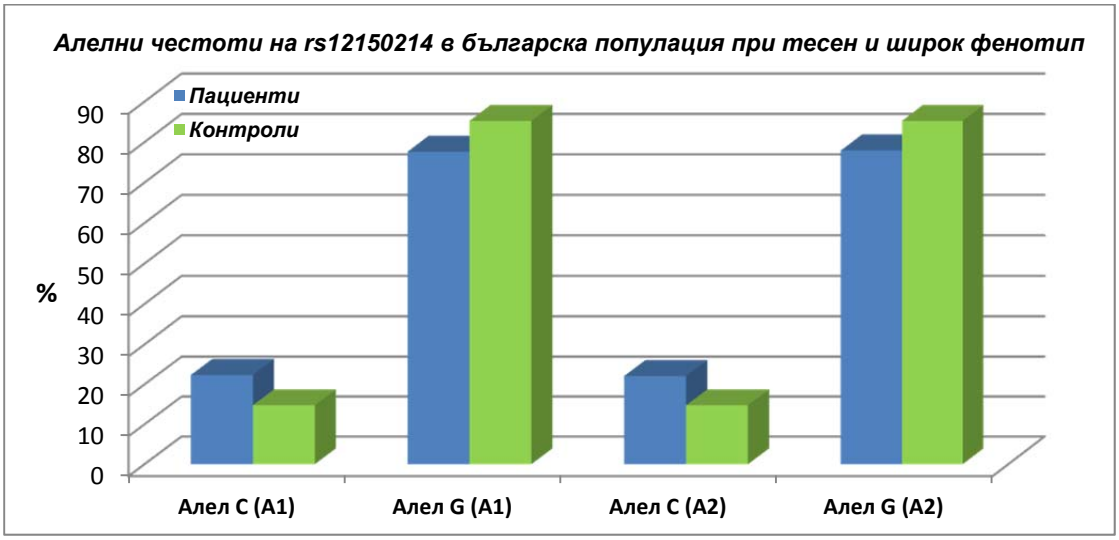
В настоящото изследване е установена асоциация на вариант rs12150214 с АР и при двата изследвани фенотипни модела. Алел С е по-често срещан при пациенти спрямо контроли и за него са получени идентични в статистическо отношение резултати и при тесен и при широк фенотип. Това се потвърждава и от анализа на генотипните данни, където генотип G/G е по-рядък при пациенти (p=0.03, A1 и p=0.3, A2), а генотипите C/C и C/G с участието на алел С са по-чести при болни. Генотипното асоциативно проучване демонстрира или доминантен ефект на по-редкия алел С, който повишава риска от афективни разстройства или рецесивен протективен ефект на алел G в българската популация без значение от фенотипната дефиниция.

Асоциативното проучване не показва данни за асоциация на промоторния полиморфизъм 5-HTTLPR с АР в изследваната извадка от български произход. При сравняване на алелните и генотипните честоти между болни и контроли не са установени статистически значими разлики при тесен и широк фенотипен модел. Резултатите от асоциативното проучване на rs12150214 и 5-HTTLPR в *SLC6A4* гена са представени в Таблица №14, а на Фигура №8 е представено графично разпределението на алелните честоти за rs12150214 в групите на пациенти и контроли.

Таблица №14: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *SLC6A4* гена в българска популация.

SLC6A4	Пациенти A1	Контроли A1	Пациенти A2	Контроли A2	P A1	OR A1	P A2	OR A2
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)				
rs12150214								
Алели								
C	115/22.37	39/14.77	144/22.09	39/14.77	0.01	1.66	0.01	1.63
G	399/77.63	225/85.23	508/77.91	225/85.23	0.01	0.60	0.01	0.61
Генотипи								
C/C	14/5.45	2/1.51	17/5.22	2/1.51	0.06	3.74	0.07	3.58
C/G	87/33.85	35/26.52	110/33.74	35/26.52	0.14	1.42	0.13	1.41
G/G	156/60.70	95/71.97	199/61.04	95/71.97	0.03	0.60	0.03	0.61
Доминантен модел					0.03		0.03	
Рецесивен модел					0.06		0.07	
5-HTTLPR								
Алели								
S	295/50.34	153/47.81	382/47.75	182/47.15	0.47	1.11	0.84	1.02
L	291/49.66	167/52.19	418/52.25	204/52.85	0.47	0.90	0.84	0.97
Генотипи								
S/S	70/23.89	33/20.63	91/22.75	40/20.73	0.43	1.21	0.58	1.13
S/L	155/52.9	87/54.37	200/50	102/52.85	0.76	0.94	0.52	0.89
L/L	68/23.21	40/25	109/27.25	51/26.42	0.67	0.91	0.84	1.04
Доминантен модел					0.67		0.83	
Рецесивен модел					0.43		0.58	

Фигура №8: Графично разпределение на алелните честоти на rs12150214 в *SLC6A4* гена.



Асоциативно изследване на SLC6A4 хаплотипи

Проведено е също така и асоциативно изследване на *SLC6A4* хаплотипи в българската популация. Не са установени статистически значими резултати, но е забелязана слаба тенденция два хаплотипа (rs12150214/5-HTTLPR - C/S, p=0.075, A1; rs12150214/5-HTTLPR - C/L, p=0.083, A2) да са по-често срещани в групата на пациентите при съответните фенотипни дефиниции.

Фамилно изследване на полиморфизми в SLC6A4 гена

Въпреки данните за асоциация получени за един от изследваните маркери в *SLC6A4* гена в асоциативното проучване от тип случаи-контроли, фамилното изследване не установява неравновесно предаване от родители на пробанди на алели на изследваните полиморфизми в кандидат-гена на серотониновия транспортер. Не се установява връзка на rs12150214 към развитието на АР при тесен и широк фенотип във фамилната извадка както при съвместния анализ на български и ромски семейства, така и при TDT анализа проведен само в подгрупите на българските и ромските семейства. Резултатите от TDT анализа са представени в Таблица №15 и Таблица №16.

Таблица №15: TDT анализ на rs12150214 генетичен вариант в *SLC6A4* гена в семейства от български и ромски произход.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs12150214	C	G	0.07	0.8	0.94	0.11	0.74	1.07

Таблица №16: TDT анализ на rs12150214 генетичен вариант в *SLC6A4* гена проведен отделно в семейства от български и ромски произход.

Български семейства	**A1**			**A2**		
	CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs12150214	0.27	0.61	0.87	0.1	0.75	0.94
Ромски семейства						
rs12150214	1	0.32	0	0.05	0.83	0.91

Не са идентифицирани неравновесно предавани в засегнатото поколение хаплотипи с участието на изследваните генетични варианти.

IV. 2. Кандидат-гени от допаминова невромедиация

IV. 2.1. Резултати за кандидат-ген *DRD2*

Кандидат-генът *DRD2* кодира допаминов рецептор от тип 2, намира се на 11 хромозома и в него са изследвани четири еднонуклеотидни замени, rs6277, rs12800853, rs7350522, rs6589377. Генетичният вариант rs6277 се намира в екзон 7 и води до синонимна аминокиселинна замяна, която влияе на стабилността на матричната РНК, вариантите rs12800853 и rs7350522 са разположени в интронни участъци, а rs6589377 в 5' края на *DRD2* кандидат гена.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на DRD2 гена

При сравняване на алелните и генотипните честоти и на четирите изследвани варианта в *DRD2* кандидат-гена не се откриват статистически значими разлики между пациенти и контроли. Настоящото изследване показва липса на алелна и генотипна асоциация на rs6277, rs12800853, rs7350522 и rs6589377 със заболявания от афективния спектър в изследваната извадка от български произход. Липса на статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли е получена както при тесен така и при широк фенотипен статус. Резултатите от проведеното асоциативно проучване на полиморфизми в *DRD2* гена са представени в Таблица №17.

Таблица №17: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *DRD2* гена в българска популация.

DRD2	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs6277								
Алели								
C	225/43.6	115 / 42.9	286/43.46	115/42.9	0.86	1.03	0.89	1.02
T	291/56.4	153 / 57.1	372/56.54	153/57.1	0.86	0.97	0.89	0.98
Генотипи								
C/C	51/19.77	23 / 17.16	66/20.06	23/17.16	0.53	1.19	0.47	1.21
C/T	123/47.67	69 / 51.49	154/46.81	69/51.49	0.47	0.86	0.36	0.83
T/T	84/32.56	42 / 31.35	109/33.13	42/31.35	0.81	1.05	0.71	1.08
Доминантен модел					0.81		0.71	
Рецесивен модел					0.53		0.47	
rs12800853								
Алели								
C	200/39.1	104 / 38.8	254/38.72	104/38.8	1	1.01	1	0.1
T	312/60.9	164 / 61.2	402/61.28	164/61.2	1	0.99	1	1.00
Генотипи								
C/C	40/15.63	15 / 11.2	52/15.85	15/11.21	0.23	1.47	0.2	1.49
C/T	120/46.87	74 / 55.22	150/45.73	74/55.22	0.12	0.71	0.06	0.68
T/T	96/37.5	45 / 33.58	126/38.41	45/33.58	0.45	1.19	0.33	1.23
Доминантен модел					0.44		0.33	
Рецесивен модел					0.23		0.2	
rs7350522								
Алели								
T	74/14.34	40 / 15.15	91/13.83	40/15.15	0.76	0.94	0.60	0.9
G	442/85.66	224/84.85	567/86.17	224/84.85	0.76	1.07	0.60	1.11
Генотипи								
T/T	6/2.33	2 / 1.52	8/2.43	2/1.52	0.45	1.55	0.42	1.62
T/G	62/24.03	36 / 27.27	75/22.8	36/27.27	0.48	0.84	0.31	0.79
G/G	190/73.64	94 / 71.21	246/74.77	94/71.21	0.61	1.13	0.46	1.18
Доминантен модел					0.61		0.46	
Рецесивен модел					0.45		0.42	
rs6589377								

Алели								
G	183/37.5	98 / 37.12	233/37.58	98/37.12	0.92	1.02	0.89	1.02
A	305/62.5	166/62.88	387/62.42	166/62.88	0.92	0.98	0.89	0.98
Генотипи								
G/G	43/17.62	20 / 15.15	52/16.78	20/15.15	0.54	1.2	0.67	1.13
G/A	97/39.75	58 / 43.94	129/41.61	58/43.94	0.43	0.84	0.65	0.91
A/A	104/42.63	54 / 40.91	129/41.61	54/40.91	0.75	1.07	0.89	1.03
Доминантен модел					0.75		0.89	
Рецесивен модел					0.54		0.67	

Асоциативно изследване на DRD2 хаплотипи

В проведеният анализ за хаплотипна асоциация, при който са изследвани всички възможни хаплотипи между *DRD2* маркерите rs6277, rs12800853, rs7350522, rs6589377, не са идентифицирани хаплотипи, които да се асоциират с повишен риск от развитие на АР в българската популация.

Фамилно изследване на полиморфизми в DRD2 гена

Проведеният TDT анализ на изследваните генетични варианти в кандидат гена *DRD2* не установява преференциално предаване на някои от алелите на rs6277, rs12800853 и rs7350522 от родители в засегнатото поколение. Съвместният TDT анализ на семейства от български и ромски произход, както и анализа отделно само на български и на ромски семейства потвърждава липсата на неравновесно предаване на алелите на тези три изследвани генетични варианти както при тесен така и при широк фенотип. За генетичен маркер rs6589377 са получени статистически гранични резултати (p=0.04) при съвместен анализ на български и ромски семейства и при двата фенотипа, като е установено по-рядко предаване на алел G и по-често предаване на алел A в засегнатото поколение. Забелязана е и слаба тенденция алел G на rs7350522 (p=0.05) да е по-често предаван в поколението при TDT анализа включващ само българските семейства, при широка фенотипна характеристика. Резултатите от фамилното проучване за rs6277, rs12800853, rs7350522 потвърждават тези от асоциативното изследване, показващо липса на асоциация с АР и демонстрират вероятен слаб протективен ефект на алел G на rs6589377. Резултатите от TDT анализите на български и ромски семейства и отделно проведеният TDT анализ на двете етнически подгрупи са представени в Таблица №18 и Таблица №19.

Таблица №18: TDT анализ на генетични варианти в *DRD2* кандидат гена в семейства от български и ромски произход.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs6277	T	C	1.67	0.2	0.75	2.79	0.1	0.73
rs12800853	C	T	2.59	0.11	1.42	3.03	0.08	1.38
rs7350522	T	G	0.02	0.90	0.97	0.46	0.5	0.86
rs6589377	G	A	4.25	0.04	0.63	4.10	0.04	0.69

Таблица №19: TDT анализ на генетични варианти в *DRD2* кандидат гена проведен отделно в семейства от български и ромски произход.

Български семейства	**A1**			**A2**		
	CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs6277	0.83	0.36	1.27	1.99	0.16	1.36
rs12800853	0.89	0.35	1.29	1.25	0.26	1.29
rs7350522	1.88	0.17	0.62	3.76	0.05	0.55
rs6589377	1.67	0.20	0.72	2.28	0.13	0.72
Ромски семейства						
rs6277	0.93	0.34	0.69	0.806	0.37	0.72
rs12800853	2.00	0.16	0.60	2.08	0.15	0.63
rs7350522	1.69	0.19	1.64	1.48	0.22	1.54
rs6589377	3.24	0.07	0.47	2	0.16	0.60

TDT анализ на DRD2 хаплотипи

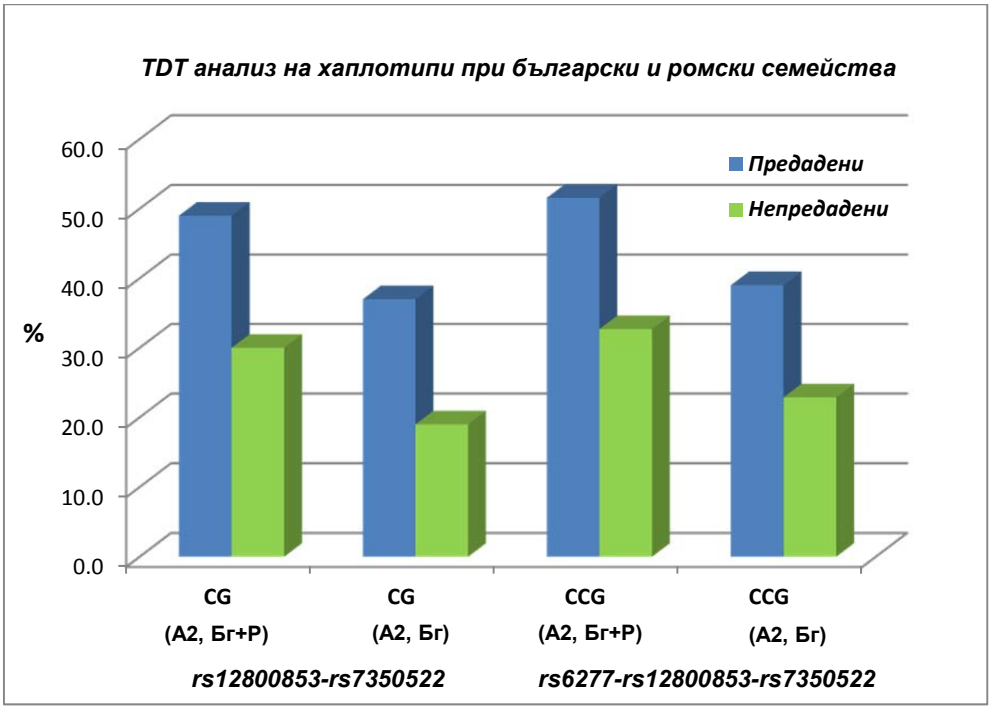
Проведен е хаплотипен TDT анализ на всички възможни хаплотипи, които могат да се формират от изследваните варианти в рамките на *DRD2* кандидат гена. Идентифицирани са няколко хаплотипа, които са неравновесно предавани на пациенти в изследваната фамилна извадка от български и ромски семейства. За хаплотипи rs12800853/rs7350522, CG; rs6277/rs12800853/rs7350522 и CCG, притежаващи еднаква основна част е установено че са по-често предавани в засегнатото поколение при широка фенотипна дефиниция. Хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG е по-рядко предаван в болното поколение отново при широк афективен модел. Същите тези хаплотипи са анализирани и отделно само при българските семейства където, за хаплотип rs12800853/rs7350522, CG е установена статистически по-силна тенденция да е по-често предаван от родители на пациенти. За хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG са получени идентични резултати независимо от етноса при широка фенотипна

характеристика. За хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG при анализа само на българските семейства не са реплицирани получените резултати за по-рядко предаване на хаплотипа на пробандите. Резултатите от проведеният хаплотипен TDT тест са представени в Таблица №20, а на Фигура №9 графично е представено съотношението на предавани към непредавани хаплотипи. Анализът показва, че е възможно някои *DRD2* хаплотипи да допринасят за етиологията на АР особено при широк фенотипен модел.

Таблица №20: TDT анализ на *DRD2* хаплотипи в семейства от български и ромски произход.
В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.

Хаплотип		CHISQ	p-value	Етнос	Фенотип
rs12800853/rs7350522	**CG**	4.57	0.03	български+ромски с-ва	A2
	CG	5.79	0.02	български с-ва	A2
rs6277/rs12800853/rs7350522	**CCG**	4.23	0.04	български+ромски с-ва	A2
	CCG	4.21	0.04	български с-ва	A2
rs6277/rs12800853/rs7350522/ rs6589377	**CCTG**	4.18	0.04	български+ромски с-ва	A2

Фигура №9: Графично представяне на съотношение предавани към непредавани *DRD2* хаплотипи в български и ромски семейства при широка (A2) фенотипна дефиниция.



IV. 3. Кандидат-гени, имащи връзка с невропластичноста - *DISC1, BDNF*

IV. 3.1. Резултати за кандидат-ген *DISC1*

DISC1 гена е картиран в региона 1q42.1 и участва в процеси свързани с регулация на развитието на невроните (пролиферация, диференциация и миграция), задейства cAMP сигналните каскади и влияе на транслацията на някои гени. Описани са множество DISC1 изоформи, предимно в следствие на наличието на алтернативни места за сплайсинг. DISC1 протеина има C-край с два Leu ципа, с който взаимодейства с други белтъци и глобуларен N-край. Описано е свързването на DISC1 с протеини участващи в процеси като неврогенеза, невронна миграция, вътреклетъчен транспорт, както и с някои транскрипционни фактори като ATF4 и ATF5. В настоящото изследване са генотипирани 5 еднонуклеотидни замени в рамките на *DISC1* кандидат гена, 3 функционални замени, водещи до аминокиселинна замяна, rs3738401 (Arg264Gln, екзон 2), rs6675281 (Leu607Phe, екзон 9), rs821616 (Ser704Cys, екзон 11) и 2 генетични варианта, намиращи се съответно в 3’ UTR, rs980989 и в интрон 9 rs821577, за които има данни, че имат връзка с повишен риск от АР (Palo, 2007, Hennah, 2009).

Асоциативно изследване от типа случаи-контроли на DISC1 гена

Не са установени статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между изследваните пациенти и контроли от български произход следователно не е идентифицирана алелна и генотипна асоциация както при тесен, така и при широк фенотипен модел. Резултатите от асоциативното проучване на *DISC1* генетичните варианти са представени в Таблица №21.

Таблица №21: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *DISC1* гена в българска популация.

DISC1	Пациенти A1	Контроли A1	Пациенти A2	Контроли A2	P A1	OR A1	P A2	OR A2
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)				
rs3738401								
A (Gln)	171/29.9	103/31.99	236/30.1	127/32.4	0.52	0.91	0.42	0.9
G (Arg)	401/70.1	219/68.01	548/69.9	265/67.6	0.52	1.10	0.42	1.11
Генотипи								
A/A	18/6.3	14/8.7	26/6.63	21/10.71	0.34	0.70	0.08	0.59
A/G	135/47.2	75/46.6	184/46.94	85/43.37	0.89	1.02	0.41	1.15
G/G	133/46.5	72/44.7	182/46.43	90/45.92	0.72	1.07	0.92	1.02
Доминантен модел					0.72		0.91	
Рецесивен модел					0.34		0.09	
rs6675281								
T (Phe)	85/14.81	48/14.72	115/14.63	59/15.21	1	1.01	0.79	0.96
C (Leu)	489/85.19	278/85.28	671/85.37	329/84.79	1	0.99	0.79	1.05
Генотипи								
T/T	4/1.39	6/3.68	6/1.53	6/3.1	0.11	0.37	0.17	0.49
T/C	77/26.83	36/22.09	103/26.21	47/24.2	0.32	1.29	0.60	1.11
C/C	206/71.78	121/74.23	284/72.26	141/72.7	0.57	0.88	0.92	0.98
Доминантен модел					NA		0.92	
Рецесивен модел					NA		0.20	
rs821577								
G	279/48.27	152/46.63	383/48.36	184/47.67	0.63	1.07	0.82	1.03
T	299/51.73	174/53.37	409/51.64	202/52.33	0.63	0.94	0.82	0.97
Генотипи								
G/G	70/24.22	33/20.25	95/23.9	40/20.73	0.33	1.26	0.35	0.75
G/T	139/48.1	86/52.76	193/48.8	104/53.88	0.34	0.83	0.24	0.81
T/T	80/27.68	44/26.99	108/27.3	49/25.39	0,89	1.04	0.63	1.10
Доминантен модел					0.87		0.63	
Рецесивен модел					0.33		0.38	
rs821616								
T (Cys)	163/28.49	96/30.57	221/28.12	109/29.3	0.52	0.91	0.68	0.94
A (Ser)	409/71.51	218/69.43	565/71.88	263/70.7	0.52	1.11	0.68	1.06
Генотипи								

T/T	24/8.39	17/10.83	31/7.9	19/10.22	0.40	0.75	0.35	0.75
T/A	115/40.21	62/39.49	159/40.4	71/38.17	0.89	1.03	0.60	1.10
A/A	147/51.4	78/49.68	203/51.7	96/51.61	0.73	1.07	1	1
Доминантен модел					0.73		0.99	
Рецесивен модел					0.40		0.35	
rs980989								
T	104/18.25	59/18.44	147/18.89	71/18.59	0.92	0.99	0.89	1.02
G	466/81.75	261/81.56	631/81.11	311/81.41	0.92	1.01	0.89	0.98
Генотипи								
T/T	14/4.91	4/2.5	17/4.37	5/2.6	0.22	2.10	0.30	1.70
T/G	76/26.67	51/31.9	113/29.05	61/31.9	0.24	0.78	0.48	0.87
G/G	195/68.42	105/65.6	259/66.58	125/65.5	0.34	1.22	0.79	0.86
Доминантен модел					NA		0.79	
Рецесивен модел					NA		0.23	

Асоциативно изследване на DISC1 хаплотипи

Проведен е същевременно и хаплотипен асоциативен анализ на всички възможни хаплотипи между изследваните полиморфизми в *DISC1* гена, но не са идентифицирани хаплотипи, които да са асоциирани с повишен риск от развитие на АР и при двата фенотипни модела.

Фамилно изследване на полиморфизми в DISC1 гена

Проведеният съвместен TDT анализ на семейства от български и ромски произход показва преференциална трансмисия само на по-честия G алел на генетичния вариант rs980989 при широк фенотипен модел (p=0.009). За другите изследвани маркери в рамките на *DISC1* кандидат гена, rs3738401, rs6675281, rs821577, rs821616 не е установено неравновесно предаване на някои от алелите им от родители на пробанди при широк и при тесен фенотипен модел. Подробните резултати от TDT анализа на български и ромски семейства са представени в Таблица №22, а на Фигура №10 графично е представено съотношението между предадени и непредадени алели за rs980989. Проведен е и отделен TDT анализ само на семействата с български етнически произход и само на семействата с ромски произход, където не се установява преференциална трансмисия на алелите на маркери rs3738401, rs6675281, rs821577, rs821616 в засегнатото поколение и при двата афективни статуса (Таблица №23). Потвърждават се получените резултати за rs980989 при широк фенотип при ромските семейства (p=0.03). Въпреки липсата на статистическа значимост при семействата от български етнос ясно се наблюдава тенденцията за по-често предаване на алел G от родители на пробанди. Вероятно принос към полученият резултат от TDT анализа съвместно на български и ромски семейства имат и двете етнически групи

като приноса на ромските семейства е възможно да е по-голям, което може да се дължи на факта, че те са по-хомогенна в генетично отношение група. Тъй като статистически значими резултати са получени само за широк фенотипен модел се предполага, че преференциалната трансмисия на G алела има отношение в по-голяма степен към развитието на УАР.

Таблица №22: TDT анализ на генетични варианти в *DISC1* кандидат гена в семейства от български и ромски произход.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs3738401	A	G	0.13	0.72	0.92	1.78	0.18	0.76
rs6675281	T	C	0.09	0.76	1.09	0.07	0.79	1.07
rs821577	T	G	0.33	0.56	1.14	0.04	0.84	0.96
rs821616	T	A	0.01	0.91	1.03	0.01	0.92	1.02
rs980989	T	G	3.31	0.07	0.59	6.91	0.009	0.52

Фигура №10: Графично представяне на съотношението предадени към непредадени алели от TDT анализа на rs980989 в *DISC1* гена.

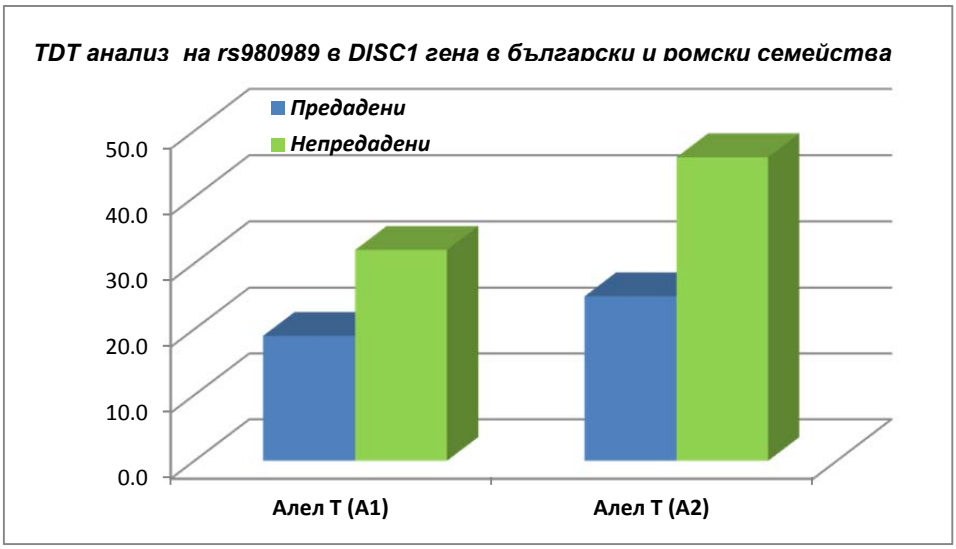


Таблица №23: TDT анализ на генетични варианти в *DISC1* кандидат гена отделно в семейства от български и ромски произход.

Български семейства	**A1**			**A2**		
	CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs3738401	0.02	0.88	0.95	0.6	0.44	0.82
rs6675281	0	1	1	0.10	0.75	0.91
rs821577	0.49	0.48	1.22	0.12	0.73	0.92
rs821616	0.35	0.55	0.84	0.25	0.62	0.88
rs980989	0.9	0.34	0.74	3.5	0.06	0.6
Ромски семейства						
rs3738401	0.14	0.71	0.87	1.4	0.24	0.67
rs6675281	0.29	0.59	1.33	1	0.32	1.67
rs821577	0	1	1	0.03	0.85	1.07
rs821616	1	0.32	1.5	0.86	0.35	1.42
rs980989	4.46	0.03	0.22	4.57	0.03	0.27

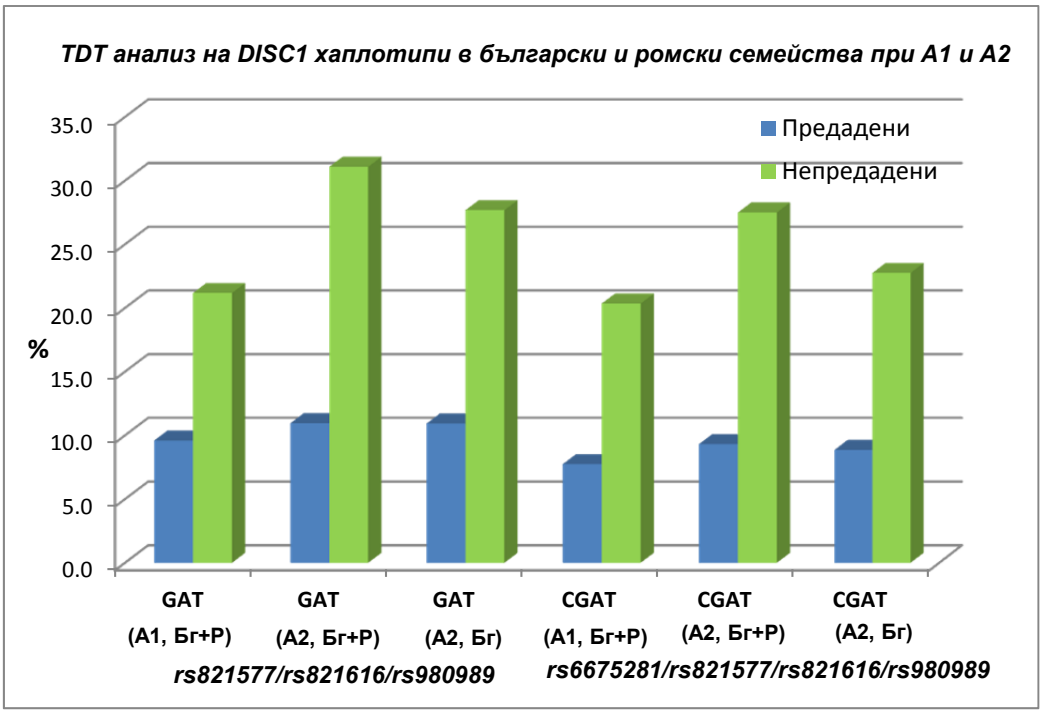
TDT анализ на DISC1 хаплотипи

Хаплотипният TDT анализ идентифицира няколко хаплотипа, които имат връзка с повишен риск от развитие на АР в изследваната извадка от български и ромски семейства. Преференциална трансмисия в болното поколение е установена за хаплотип rs6675281 / rs821577 / rs821616, TGT (T/U, 6.37/0.84, p=0.039). Същевременно потенциален протективен ефект могат да притежават хаплотипите: rs3738401 / rs6675281 / rs821577, ATT, (T/U, 0.91/6.62, p=0.037); rs3738401 / rs6675281 / rs821577 / rs821616, ATTA (T/U=0.23/5.08, p= 0.035); rs821577 / rs821616 / rs980989, GAT, (T/U=10.95/31.09, p=0.002) и rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989, CGAT (T/U=9.31/27.5, p= 0.003), които са статистически по-рядко предавани на пациенти от родителите им при широк фенотипен модел. Хаплотипите rs821577 / rs821616 / rs980989, GAT и rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989, CGAT показват по-слаби, но статистически значими резултати и при тесен фенотипен модел, като тази тенденция се забелязва и при отделния анализ само на семействата от български произход, както и на тези от ромски което показва, че най вероятно тези хаплотипи имат протективен ефект при болни както от БАР така и от УАР без значение от етническия им произход, но ефекта им е по-силен в групата с включени пациенти с УАР. Статистически значимите резултати от проведения TDT анализ на *DISC1* хаплотипи е представен в Таблица №24, а на Фигура №11 е представено графично съотношението на предадени към непредадени *DISC1* хаплотипи, за които е установено неравновесно предаване в поколението.

Таблица №24: TDT анализ на *DISC1* хаплотипи в семейства от български и ромски произход.
В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.

Хаплотип		CHISQ	p-value	Етнос	Фенотип
rs3738401 / rs6675281 / rs821577	**ATT**	4.33	0.037	български+ ромски с-ва	A2
	ATT	4.67	0.031	български с-ва	A2
rs6675281 / rs821577 / rs821616	**TGT**	4.25	0.039	български+ ромски с-ва	A2
rs821577 / rs821616 / rs980989	**GAT**	4.36	0.037	български+ ромски с-ва	A1
	GAT	9.65	0.002	български+ ромски с-ва	A2
	GAT	7.27	0.007	български с-ва	A2
rs3738401 / rs6675281 / rs821577 / rs821616	**ATTA**	4.43	0.035	български+ ромски с-ва	A2
rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989	**CGAT**	5.66	0.017	български+ ромски с-ва	A1
	CGAT	8.98	0.003	български+ ромски с-ва	A2
	CGAT	6.11	0.013	български с-ва	A2

Фигура №11: Графично представяне на съотношение предавани/непредавани *DISC1* хаплотипи в български и ромски семейства при тясна (A1) и широка (A2) фенотипна дефиниция.



IV. 3.2. Резултати за кандидат-ген *BDNF*

Кандидат-генът *BDNF* кодира малък димерен протеин, играещ роля на растежен фактор и участващ в процеси като оцеляване, диференциация зреене и апоптоза на невроните. *BDNF* генът е картиран в 11p14 и е с дължина около 70 kb. Състои се от 11 екзона, 9 функционални промотора и 2 различни сигнала за полиаденилиране (Pruunsild, et al. 2007), което позволява тъканно-специфична експресия на различни транскрипти, както и експресия в зависимост от етапа на развитие. Превръщането на про-BDNF в зрял BDNF се извършва вътреклетъчно и регулацията на нивата и съотношението им се контролира от тъканен плазминогенен активатор, което е от съществено значение за невронната пластичност (Teng et al. 2005). Предполага се, че про–BDNF има връзка с регулацията на синаптичната пластичност посредством улесняването на апоптозата и участва в предизвикване на дългосрочна депресия (Woo et al., 2005, Teng et al., 2005). Изследвани са три еднонуклеотидни замени в кандидат-гена *BDNF*, един функционален полиморфизъм (rs6265), водещ до замяна на аминокиселината Val на 66 място с Met, и два други полиморфизма, намиращи се преди промотора (rs12273363) и в екзон-интронните граници (rs16917237), за които се предполага, че взимат участие в регулацията на транскрипцията.

Асоциативно изследване от типа случаи-контроли на BDNF кандидат гена

При сравняване на алелните и генотипните честоти между контроли и пациенти от български и ромски произход не са установени статистически значими разлики за маркери rs6265 и rs12273363. Въпреки това се забелязва тенденция алел C (Val) да е по-чест в групата на пациентите при тясна фенотипна дефиниция (p=0.093), което е в унисон и с наблюдаваната гранично значима асоциация за генотип T/T (Met/Met) при тесен фенотип (p=0.05), който е по-рядък при пациентите.

В настоящата извадка значима асоциация с АР е получена за маркер rs16917237, като са наблюдавани разлики между честотите на алелите в групите на пациентите и контролите при тесен фенотип (p=0.015). След консервативната корекция за многократно тестване на Бонферони, статистическата значимост за алелна асоциация се запазва. И в двата изследвани афективни статуса се наблюдава по-висока честота на алел G и по-ниска честота на алел T при пациенти, въпреки че статистически значим резултат е получен само за A1. Сравняването на генотипните честоти показва, че генотип T/T е по-рядък в групата на пациентите както при тесен, така и при широк фенотип (p=0.002, A1; p=0.011, A2), като статистическата значимост се запазва и след корекция на Бонферони за множество тествания и при двата фенотипа. Настоящото изследване демонстрира, че рецесивен модел най-добре описва действието на алел T на rs16917237 в изследваната българска извадка (p= 0.002, A1, p= 0.011, A2).

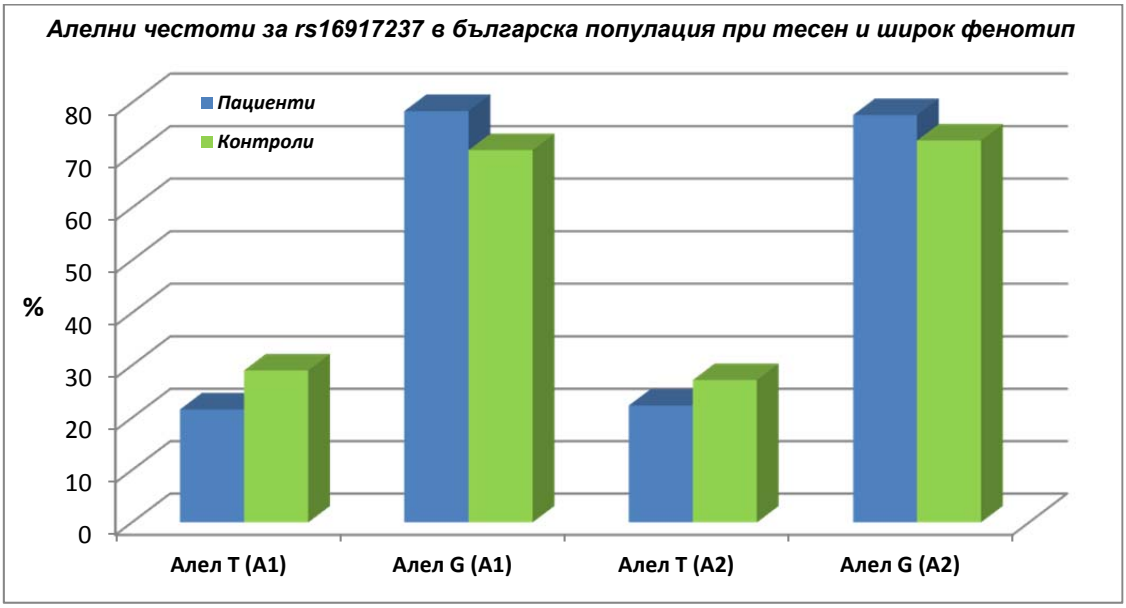
За третият изследван маркер в *BDNF* гена, rs12273363 не са установени разлики в алелните и генотипните му честоти между пациенти и контроли и при двата афективни статуса. Подробните резултати от асоциативното проучване на изследваните генетични варианти в *BDNF* кандидат-гена в българска популация са представени в Таблица №25, а на Фигура №12 графично е представена разликата в честотите на генетичните варианти на rs16917237 между пациенти и контроли.

Таблица №25: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *BDNF* гена в българска популация.

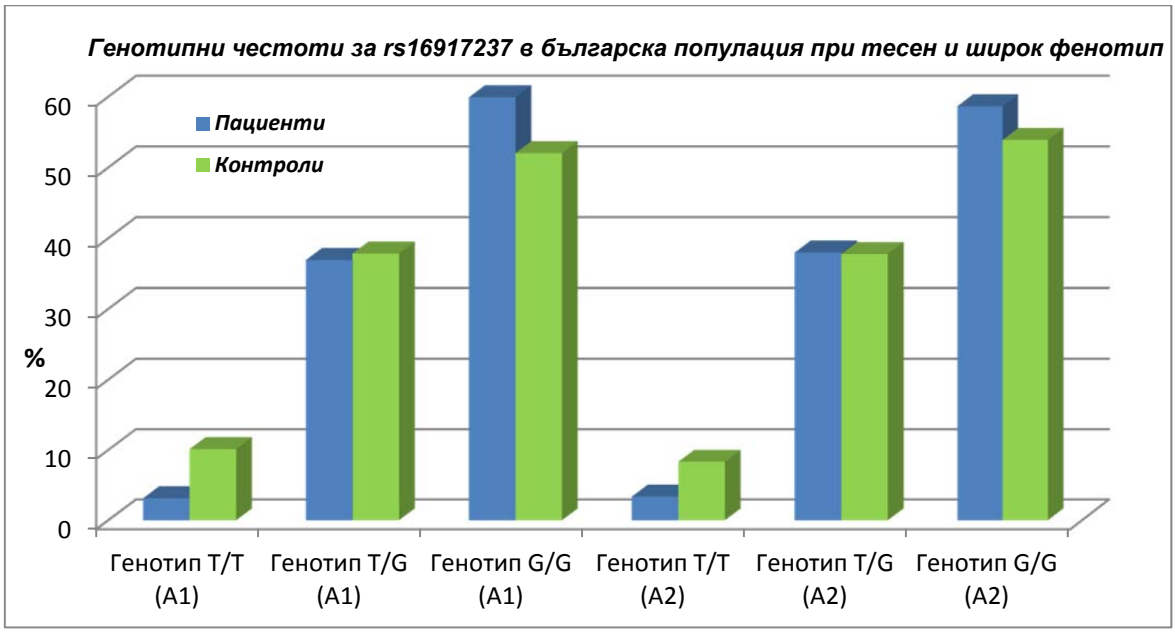
BDNF	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs6265								
T (Met)	113/19.28	76/24.05	157/19.67	86/22.63	0.09	0.75	0.24	0.84
C (Val)	473/80.72	240/75.95	641/80.33	294/77.37	0.09	1.33	0.24	1.19
Генотипи								
T/T	9/3.07	11/6.96	13/3.26	11/5.79	0.05	0.42	0.22	0.55
T/C	95/32.42	54/34.17	131/32.83	64/33.68	0.71	0.92	0.92	0.96
C/C	189/64.5	93/58.86	255/63.91	115/60.53	0.24	1.27	0.48	1.15
Доминантен модел					0.24		0.43	
Рецесивен модел					0.06		0.15	
rs16917237								
T	124/21.60	86/29.05	173/22.35	98/27.22	0.015	0.67	0.09	0.77
G	450/78.40	210/70.95	601/77.65	262/72.78	0.015	1.49	0.09	1.3
Генотипи								
T/T	9/3.14	15/10.13	13/3.36	15/8.33	0.002 *	0.29	0.011 *	0.38
T/G	106/36.93	56/37.84	147/37.98	68/37.78	0.86	0.96	1.00	1.01
G/G	172/59.93	77/52.03	227/58.66	97/53.89	0.12	1.38	0.29	1.21
Доминантен модел					0.11		0.29	
Рецесивен модел					0.002 *		0.011 *	
rs12273363								
C	62/10.80	43/13.44	91/11.67	51/13.08	0.24	0.78	0.49	0.88
T	512/89.20	277/86.56	689/88.33	339/86.92	0.24	1.28	0.49	1.14
Генотипи								
C/C	4/1.39	5/3.13	7/1.80	6/3.08	0.18	0.44	0.24	
C/T	54/18.82	33/20.62	77/19.74	39/20.00	0.65	0.89	0.92	0.98
T/T	229/79.79	122/76.25	306/78.46	150/76.92	0.42	1.21	0.67	1.09
Доминантен модел					0.42		0.67	
Рецесивен модел					0.18		0.32	

***** Статистически значим резултат след корекция на Бонферони

Фигура №12: Графично представяне на алелните честоти на rs16917237 в *BDNF* гена в българска популация.



Фигура №13: Графично представяне на генотипните честоти на rs16917237 в *BDNF* кандидат гена в българска популация.



Асоциативно изследване на BDNF хаплотипи

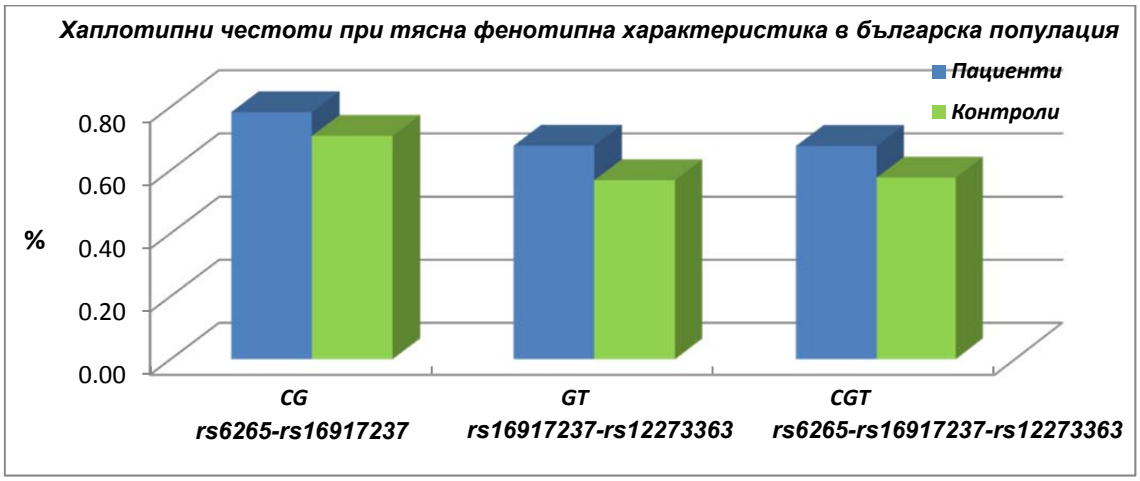
Проведеният хаплотипен анализ за асоциация идентифицира няколко хаплотипа, които се свързват с повишен риск от АР в изследваната извадка. Хаплотип rs6265/rs16917237, CG, (p=0.015) е срещан с по-висока честота при пациенти с тясна диагностична дефиниция. Въпреки липсата на алелна или генотипна асоциация на маркер rs12273363, са установени няколко хаплотипа с негово участие заедно с rs16917237, които имат връзка с повишен риск от АР. Хаплотип rs16917237/rs12273363, TT, (p=0.008, A1, p=

0.047, A2) е по-рядък в групата на пациентите и при двата афективни модела, а хаплотип rs16917237/rs12273363, GT, (p=0.002, A1, p=0.023, A2) е по-чест при пациенти отново и при двете афективни дефиниции. Тези резултати най-вероятно се дължат предимно на влиянието на rs16917237, тъй като повтарят вече установената тенденция при алелната асоциация, алел T да е по-чест при контроли, а алел G да е по-чест в групата на пациентите. Също така е идентифициран и тримаркерен хаплотип, rs6265/rs16917237/rs122733 CGT, (p=0.003, A1, p=0.028, A2), който е по-често срещан при пациенти, особено в групата, включваща пациенти с БАР и не включваща болни от УАР. Резултатите от асоциативното хаплотипно проучване са представени в Таблица №26, а на Фигура №14 е представено графично съотношението в честотите на хаплотипите между пациенти и контроли.

Таблица №26: Асоциативен анализ на *BDNF* хаплотипи в българска популация.

Хаплотип		CHISQ	p-value	Фенотип
rs6265 / rs16917237	**CG**	5.92	0.015	A1
	CG	3.2	0.071	A2
rs16917237 / rs12273363	**TT**	7.07	0.008	A1
	TT	3.94	0.047	A2
	GT	9.77	0.002	A1
	GT	5.16	0.023	A2
rs6265 / rs16917237 / rs12273363	**CGT**	8.91	0.003	A1
	CGT	4.83	0.028	A2

Фигура №14: Графично представяне на асоциираните *BDNF* хаплотипи в българска популация. *Представени са резултатите с най-голяма статитическа значимост.*



Фамилно изследване на полиморфизми в BDNF гена

След получените положителни резултати от асоциативното проучване беше направен опит те да бъдат реплицирани във фамилната извадка от български и ромски семейства. Проведеният TDT анализ на избраните *BDNF* еднонуклеотидни замени не идентифицира преференциална трансмисия на нито един от алелните варианти от

родители в болното поколение. Извършеният TDT анализ не потвърждава резултатите от асоциативното изследване нито при съвместния анализ на български и ромски семейства, нито при анализа само при българските семейства. Резултатите от фамилното изследване са представени подробно в Таблица №27 и Таблица №28.

Таблица №27: TDT анализ на генетични варианти в *BDNF* кандидат гена в семейства от български и ромски произход.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs6265	T	C	1.67	0.2	1.40	1.80	0.18	1.35
rs16917237	T	G	1.14	0.28	1.33	1.02	0.31	1.26
rs12273363	C	T	0.19	0.66	0.88	1.17	0.28	0.77

Таблица №28: TDT анализ на генетични варианти в *BDNF* кандидат гена отделно проведен в семейства от български и в семейства от ромски произход.

Български семейства	**A1**			**A2**		
	CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs6265	0.61	0.43	1.28	0.29	0.59	1.15
rs16917237	0.23	0.63	1.17	0.07	0.79	1.07
rs12273363	0.36	0.55	0.79	1.60	0.21	0.67
Ромски семейства						
rs6265	1.32	0.25	1.71	2.67	0.10	2.00
rs16917237	1.47	0.23	1.83	2.13	0.15	1.88
rs12273363	0	1	1	0.04	0.85	0.93

TDT анализ на BDNF хаплотипи

Проведеният TDT анализ на *BDNF* хаплотипи в семейства от български и ромски произход не установява преференциално предавани хаплотипи в засегнатото поколение и не успява да потвърди резултатите от хаплотипното асоциативно проучване.

IV. 4. Резултати за кандидат-ген *CLOCK*

Кандидат-генът *CLOCK* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), картиран на 4 хромозома, кодира транскрипционен фактор от тип спирала-бримка-спирала, който взема участие в регулацията на циркадните ритми и метаболизма. Установено е наличието на множество транскрипти в следствие на алтернативен сплайсинг. Промени в експресията на *CLOCK* гена се свързват с флуктуации в настроението според различни изследвания. Съществуват редица доказателства за асоциация на полиморфизми в този кандидат ген с поведенчески промени или психиатрични заболявания (Serretti, 2003, 2005; Benedetti,

2003). При по-голямата част от пациентите с АР е установено наличието на абнормни промени в циркадните ритми и част от медикаментозното лечение, което подобрява състоянието на пациентите цели възстановяване на този баланс. В настоящото проучване в кандидат-гена *CLOCK* е изследван полиморфизма rs3805154.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CLOCK гена

При сравняване на алелните и генотипните честоти в асоциативното изследване на пациенти и контроли от български произход не са установени статистически значими различия между двете групи. Липсват данни за асоциация на някои от алелите или генотипите на генетичният вариант rs3805154 в *CLOCK* кандидат-гена с афективни разстройства както при тесен така и при широк фенотип. Резултатите от асоциативното проучване от тип случаи-контроли са подробно представени в Таблица №29.

Таблица №29: Алелна и генотипна асоциация на rs3805154 в *CLOCK* гена в българска популация.

CLOCK	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs3805154								
Алели								
C	198/38.67	87/33.21	254/38.6	87/33.21	0.13	1.27	0.13	1.26
T	314/61.33	175/66.79	404/61.4	175/66.79	0.13	0.79	0.13	0.79
Генотипи								
C/C	33/12.89	13/9.92	47/14.29	13/9.92	0.39	1.34	0.21	1.51
C/T	132/51.56	61/46.57	160/48.63	61/46.57	0.35	1.22	0.69	1.09
T/T	91/35.55	57/43.51	122/37.08	57/43.51	0.13	0.72	0.20	0.76
Доминантен модел					0.13		0.20	
Рецесивен модел					0.39		0.21	

Фамилно изследване на полиморфизми в CLOCK гена

Проведеният TDT анализ на rs3805154 при съвместен анализ на български и ромски семейства не показва преференциално предаване на някои от алелите му в болното поколение. Този резултат се потвърждава и при отделно проведения TDT анализ само в подгрупата на българските семейства както и в подгрупата на ромските семейства. Не са установени статистически значими резултати за неравновесно предаване на алели в засегнатото поколение нито при тесен нито при широк фенотипен модел независимо от етноса. Резултатите от TDT анализа са представени в Таблица №30.

Таблица №30: TDT анализ на генетични варианти в *CLOCK* кандидат гена в семейства от български и ромски произход и отделен TDT анализ в двата етноса.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs3805154	C	T	0.4	0.53	1.14	1.16	0.28	1.21
Български семейства								
rs3805154	C	T	0	1	1	0.1	0.75	1.07
Ромски семейства								
rs3805154	C	T	1.29	0.26	1.55	2.46	0.12	1.75

IV. 5. Резултати за кандидат-ген *CRH*

Кортикотропин освобождаващия фактор – КОФ се секретира в следствие на стрес. Той представлява много консервативен пептиден хормон, който може да участва и като невромедиатор в отговор на стреса. Основната му функция е стимулиране на синтезата на ацетилхолин в рамките на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек. Зрелият КОФ се състои от 41 аминокиселини, които са получени от препрохормон изграден от 196 аминокиселини и се отличава с висока консервативност. В кандидат-гена *CRH*, картиран на 8 хромозома е изследвана еднонуклеотидната замяна rs12721510, за която се предполага, че повлиява функционалноста на кортикотропин освобождаващия фактор.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CRH гена

При проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли са сравнени алелните честоти при тясна и широка фенотипна характеристика, но не са установени статистически значими разлики между пациенти и контроли от български произход. Генотип T/T е рядко срещан и в нашата извадка не се наблюдава, но при сравняване честотите на другите два генотипа не се установяват статистически значими разлики и следователно този генетичен вариант не оказва влияние върху риска от АР. Липса на статистически разлики между генотипните честоти на rs12721510 са установени и при двата фенотипни модела в изследваната българска популация и не се установява асоциация с АР. Резултатите от асоциативното изследване от тип случай-контроли на rs12721510 в CRH гена е представен в Таблица №31.

Таблица №31: Алелна и генотипна асоциация на rs12721510 в *CRH* кандидат-гена в българска популация.

CRH	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs12721510								
Алели								
T	41/7.98	18/6.77	43/6.56	18/6.77	0.54	1.19	0.92	1.03
G	473/92.02	248/93.23	613/93.44	248/93.23	0.54	0.84	0.92	0.97
Генотипи								
T/T	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	NA	NA	NA	NA
T/G	41/15.95	18/13.54	43/13.11	18/13.54	0.53	1.21	0.92	0.96
G/G	216/84.05	115/86.46	285/86.89	115/86.46	0.53	0.82	0.92	1.04
Доминантен модел					0.53		0.92	
Рецесивен модел					NA		NA	

Фамилно изследване на полиморфизми в CRH гена

Проведеното изследване на rs12721510 във фамилната извадка от български и ромски семейства не установява неравновесно предаване на някои от алелите му в засегнатото поколение при тесен и широк фенотип. В отделно извършения TDT анализ на семействата от двете етнически подгрупи също не се установява преференциално предаване на алелите на rs12721510 на индексните пациенти от техните родители. Резултатите от извършения TDT анализ е подробно представен в Таблица №32 и потвърждава резултатите от асоциативното проучване за липса на връзка на изследвания *CRH* полиморфизъм с повишен риск от АР в българската популация.

Таблица №32: TDT анализ на генетични варианти в *CRH* кандидат гена в семейства от български и ромски произход и отделен TDT анализ при двата етноса.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs12721510	T	G	0.8	0.37	0.67	2.29	0.13	0.56
Български семейства								
rs12721510	T	G	0.25	0.62	0.78	1.09	0.30	0.64
Ромски семейства								
rs12721510	T	G	1	0.32	0.33	1.8	0.18	0.25

IV. 6. Кандидат гени, свързани с каналопатии

IV. 6.1. Резултати за кандидат ген *CACNA1C*

CACNA1C генът е локализиран в хромозома 12p13.3, принадлежи на семейството на калциевите канали и кодира 1C субединицата на волтаж зависимите калциеви канали от L тип. Субединицата 1C участва във формирането на пора в канала и има отношение към правилното му функциониране. Преноса на Ca^{2+} йони и неговите нива са есенциално важни за много процеси като междуклетъчната комуникация, способността на клетката да генерира и предава електрически сигнали както и регулацията на някои гени. Генетични варианти или мутации могат да доведат до по-продължително отворено или затворено състояние на канала, което от своя страна да доведе до дисбаланс на вътреклетъчната концентрация на Ca^{2+} йони. В настоящото проучване в рамките на *CACNA1C* гена е изследван полиморфизма rs1006737, за който е получен най-силен статистически резултат в цялостно геномно асоциативно проучване, с изследвани 1.8 милиона генетични варианта в 4 387 пациенти с БАР и 6 209 здрави контроли (Ferreira et al., 2008) и е често докладван във връзка с различни психиатрични разстройства.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CACNA1C гена

При сравняване на алелните и генотипните честоти на rs3805154 не са открити статистически значими разлики между болните и контролите и при двата изследвани фенотипни модела. Следователно не е установена асоциация на еднонуклеотидната замяна в *CACNA1C* кандидат-гена с афективните разстройства в изследваната извадка от български произход. Не са забелязани и тенденции някой от алелите или генотипите да е по-чест или по-рядък при пациенти. Резултатите са представени в Таблица №33.

Таблица №33: Алелна и генотипна асоциация на rs3805154 в *CACNA1C* кандидат-гена в българска популация.

CACNA1C	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs1006737								
Алели								
A	180/32.97	94/31.76	245/33.11	114/31.84	0.72	1.06	0.67	1.06
G	366/67.03	202/68.24	495/66.89	244/68.16	0.72	0.95	0.67	0.94
Генотипи								
A/A	28/10.26	18/12.16	36/9.73	20/11.17	0.55	0.82	0.60	0.86
A/G	124/45.42	58/39.19	173/46.76	74/41.34	0.22	1.29	0.23	1.20
G/G	121/44.32	72/48.65	161/43.51	85/47.49	0.40	0.84	0.38	0.85
Доминантен модел					0.39		0.38	
Рецесивен модел					0.55		0.60	

Фамилно изследване на полиморфизми в CACNA1C гена

Проведеният TDT анализ в български и ромски семейства не показва преференциална трансмисия на някой от алелите на изследвания полиморфизъм rs1006737 в засегнатото поколение. Отделното изследване включващо само българските и само ромските семейства потвърждава липсата на преференциално предавани алели в болните, които да имат връзка с повишен риск от развитие на АР. Резултатите от TDT анализа са представени в Таблица №34.

Таблица №34: TDT анализ на генетични варианти в *CACNA1C* кандидат гена в семейства от български и ромски произход и отделен TDT анализ при двата етноса.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs1006737	A	G	2.00	0.16	1.4	0.98	0.32	1.22
Български семейства								
rs1006737	A	G	2.47	0.12	1.58	0.69	0.41	1.22
Ромски семейства								
rs1006737	A	G	0.04	0.84	1.09	0.29	0.59	1.21

IV. 6.2. Резултати за кандидат ген *ANK3*

Генът *ANK3* е локализиран в 10 хромозома и кодира белтъка анкирин, който участва в свързването на мембранните белтъци с изградения от спектрин и актин, цитоскелет на клетката. Анкириновите белтъци взимат участие в клетъчни функции като пролиферация, подвижност на клетката и пространственото поддържане на специфични мембранни региони. Белтъкът анкирин 3 е важен за нормалното групиране и функциониране на натриевите канали в аксона (Pan Z et al., 2006). В рамките на кандидат-гена *ANK3* са изследвани 2 полиморфизма (rs9804190 и rs10994336), разположени на 380kb един от друг съответно в 3’ и 5’ края на гена. Асоциация на тези два варианта е докладвана от различни изследователски групи и за тях са получени едни от най-значимите статистически резултати в геномни асоциативни изследвания (Ripke S et al., 2011; Tesli M et al., 2011). В следствие на алтернативен сплайсинг и наличието на няколко стартови екзона е установено генерирането на множество транскрипти.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на ANK3 гена

Сравнени са алелните и генотипните честоти на rs9804190 в кандидаг-гена *ANK3* и не са установени статистически различия в тях между групите на болните и здравите контроли. Резултатите демонстрират липса на асоциация на rs9804190 със заболявания от афективния спектър при тясна и широка фенотипна дефиниция в българската популация.

Проведеното асоциативно проучване на втория изследван маркер rs10994336 в кандидат-гена *ANK3* също не показва алелна или генотипна асоциация. Не са установени статистически значими разлики при сравнение на алелните честоти между пациенти и контроли и при двете фенотипни дефиниции. Не е установена асоциация на някои от генотипите на rs10994336 с АР и при двата фенотипни статуса, но вероятно поради факта, че генотип T/T не се наблюдава в контролните групи за разлика от групата на пациентите, за него е получена статистически гранична стойност за асоциация (p=0.05) при тесен фенотипен модел и е наблюдавана същата тенденция (p=0.06) при широк модел.

Подробно описаните резултати от асоциативното проучване на генетични варианти rs9804190 и rs10994336 в кандидат-гена *ANK3* са представени в Таблица №35.

Таблица №35: Алелна и генотипна асоциация на rs3805154 и rs10994336 в *ANK3* кандидат-гена в българска популация.

ANK3	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs9804190								
Алели								
T	126/21.8	63/20.32	172/22.33	77/21.04	0.61	1.09	0.62	1.08
C	452/78.2	247/79.68	598/77.67	289/78.96	0.61	0.91	0.62	0.93
Генотипи								
T/T	16/5.54	3/1.94	23/5.97	5/2.73	0.07	2.97	0.09	2.26
C/T	94/32.53	57/36.77	126/32.73	67/36.61	0.37	0.83	0.36	0.84
C/C	179/61.93	95/61.29	236/61.3	111/60.66	0.89	1.03	0.89	1.03
Доминантен модел					0.89		0.88	
Рецесивен модел					0.07		0.09	
rs10994336								
Алели								
T	58/10.18	22/7.05	76/10.27	26/7.14	0.12	1.49	0.09	1.49
C	512/89.82	290/92.95	664/89.73	338/92.86	0.12	0.67	0.09	0.67
Генотипи								
T/T	7/2.46	0/0	7/1.89	0/0	0.05		0.06	
C/T	44/15.44	22/14.10	62/16.76	26/14.29	0.71	1.11	0.45	1.21
C/C	234/82.1	134/85.9	301/81.35	156/85.71	0.30	1.33	0.20	0.73
Доминантен модел					0.30		0.20	
Рецесивен модел					0.05		0.06	

Асоциативно изследване на ANK3 хаплотипи

Проведено е и хаплотипно асоциативно проучване, но не са идентифицирани хаплотипи с участието на изследваните генетични варианти в рамките на *ANK3* гена, rs9804190 и rs10994336 асоциирани с АР при тесен и широк фенотип.

Фамилно изследване на полиморфизми в ANK3 гена

Извършеният TDT анализ на rs9804190 в български и ромски семейства установява, че алел Т е по-рядко предаван на индексните пациенти от техните родители при широка фенотипна характеристика (p=0.03). Подобна тенденция, алел Т да е по-рядко предаван на болните от родителите им се забелязва и при тесен фенотип, но получените резултати не достигат статистическа значимост. Следователно алел Т на rs9804190 би могъл да има протективен ефект относно развитието на АР или противоположния алел С, който съответно е по-често предаван в засегнатото поколение да допринася за повишен риск от АР. Вероятно съществен принос за получените резултати е наличието на пациенти с УАР, тъй като статистически значим резултат е получен при А2, където те са включени, а при А1 се забелязва само подобна тенденция. При допълнителният TDT анализ проведен отделно в двете етнически групи не са получени статистически значими резултати. Възможно е разделянето на общата извадка на две по-малки подгрупи в зависимост от етническата принадлежност да води до загуба на статистическата сила за детекция влиянието на генетични варианти с по-слабо влияние върху фенотипа. Въпреки липсата на статистически значими резултати при ромските семейства ясно се забелязва тенденцията алел Т на rs9804190 да е по-рядко предаван, а алел С да е по-често предаван в засегнатото поколение.

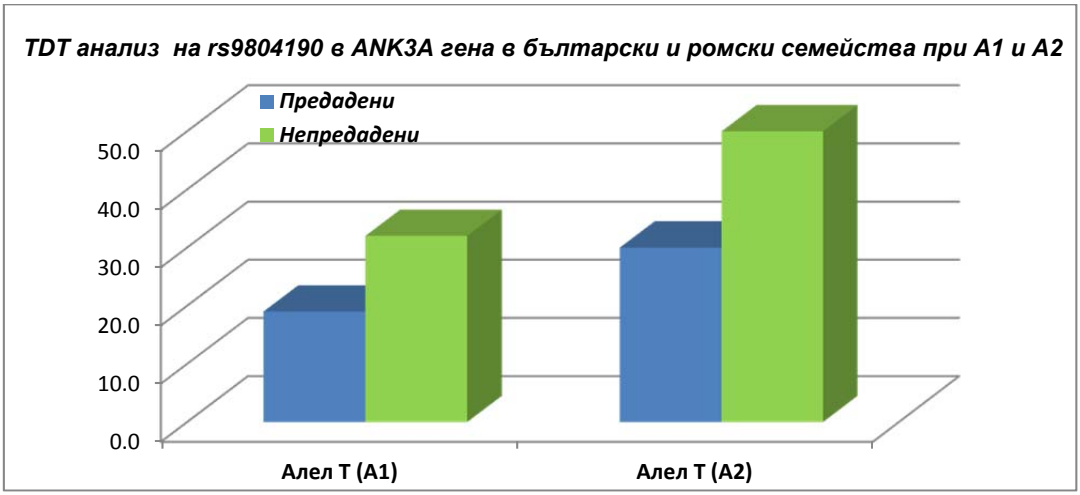
Фамилното изследване на rs10994336 в български и ромски семейства не показва неравновесно предаване на някой от алелите му в болното поколение при тясна и широка фенотипна характеристика.

Резултатите от проведеният TDT анализ на rs9804190 и rs10994336 в кандидат-гена *ANK3* са представени в Таблица №36. На Фигура №15 графично е представено съотношението на предадени към непредадени алели на алел Т на rs9804190 при съвместния TDT анализ на български и ромски семейства при двата афективни статуса.

Таблица №36: TDT анализ на rs9804190 и rs10994336 в *ANK3* кандидат гена в семейства от български и ромски произход и отделен TDT анализ в двете етнически групи.

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs9804190	T	C	3.31	0.07	0.59	5	0.03	0.60
rs10994336	T	C	2.46	0.12	1.89	3.27	0.07	1.85
Български семейства								
rs9804190	T	C	1.49	0.22	0.65	2.20	0.14	0.67
rs10994336	T	C	2.33	0.14	2.00	2.79	0.10	1.90
Ромски семейства								
rs9804190	T	C	2	0.16	0.5	3.24	0.07	0.47
rs10994336	T	C	0.2	0.66	1.50	0.50	0.48	1.67

Фигура №15: Графично представяне на съотношението предадени към непредадени алели на rs9804190 (*ANK3*) в български и ромски семейства.



TDT анализ на хаплотипи в ANK3 гена

Проведен е и TDT анализ на хаплотипи с участието на rs9804190 и rs10994336 в *ANK3* гена, но не са идентифицирани хаплотипи, които да са неравновесно предавани на пациенти от техните родители и които да имат връзка с повишен риск от развитие на АР.

IV. 7. Резултати от анализа за статистическа епистаза между изследваните генетични варианти

Афективните разстройства спадат към групата на комплексните психиатрични заболявания, които се причиняват от сложното взаимодействие на множество генетични фактори и влияния от околната среда, които освен че се допълват като ефект могат и да взаимодействат помежду си. В настоящото проучване са изследвани всички възможни комбинации на епистаза между изследваните генетични варианти. Като скриниращ метод за оценка на епистазата е използвана съответстващата команда за епистаза при случаи-контроли на PLINK програмата, а за по-детайлно проучване е използвана логистична регресия (SPSS version 21.0). Идентифицирани са статистически значими епистатични взаимодействия между кандидат гените *DISC1*, *TPH2*, *CRH*, *CLOCK* и *BDNF* като установените взаимодействия са схематично представени на Фигура №16А и по-подробно представени на Фигура №16В, (Приложение №2). Резултатите със степен на значимост $p<0.04$ са обобщени в Таблица №37А, а в Таблица №37В (Приложение №2) същите резултати са представени по-детайлно.

DISC1 – TPH2

Идентифицирана е епистаза между алел С на *DISC1* rs6675281 или генотипи с хомозиготното му участие и три последователно разположени еднонуклеотидни замени в *TPH2* гена, rs1386483, rs4290270 и rs1872824.

Скриниращият метод за епистаза на PLINK показва епистаза между rs6675281 и rs4290270 и rs1386483 само при широк фенотип, а с rs1872824 и при двете фенотипни дефиниции. Регресионният анализ потвърждава взаимодействието между генотипи СС на rs6675281 и АА на rs4290270, при широк фенотип ($p=0.02$), и статистически гранична стойност за епистаза при тесен фенотип ($p=0.04$). Генотип АА на rs4290270 е статистически по-чест при пациенти с АР, докато при взаимодействие с rs6675281 той проявява протективен ефект, тъй като съвместното им присъствие се наблюдава по-често при здрави индивиди.

Регресионният анализ между rs6675281 и rs1386483 установява статистически значима епистаза за А2 ($p=0.02$) между алел С на rs6675281 и алел G на rs1386483. Индивидуалния анализ на маркерите rs6675281 и rs1386483 показва, че алел С и алел G съответно са по-рядко срещани при пациенти при широк фенотипен статус, но в случай на епистаза тяхната честота е по-висока в групата на засегнатите ($p=0.02$).

Освен тази епистаза с участието на алел G на rs1386483, скриниращия тест на PLINK детектира и взаимодействие и с друг *DISC1* полиморфизъм (rs821616). Регресионният анализ установява значим резултат за епистазата между алел А на rs821616 и алел G на rs1386483 при А2 ($p=0.008$) и гранично значим резултат при А1 ($p=0.04$). Алел А на rs821616 е по-чест при пациенти, но в комбинация с алел G на rs1386483 е по-рядък при пациенти и по-чест при контроли. Това предполага протективен ефект на взаимодействието между алел А (rs821616) и алел G (rs1386483) с по-силен ефект при широка фенотипна дефиниция. Същевременно настоящите резултати демонстрират, че

алел А на rs821616 има самостоятелен ефект, увеличаващ риска от АР при А2, но протективен ефект при идентифицираното епистатичното взаимодействие с алел G на rs1386483, в което участва.

Статистически най-значимите резултати за епистаза между *DISC1* и *TPH2* кандидат гените са получени при установеното взаимодействие на rs6675281 с rs1872824. Идентифицирана е както алелна така и генотипна епистаза, като алел А на rs1872824 в комбинация с алел С на rs6675281 е по-рядък при пациенти и при двата изследвани фенотипни модела (p=0.005, А1 и p=0.004, А2). В категорията на индивидите притежаващи алел А са включени притежателите на генотипи А А и А G, което предполага доминантен ефект на алела. Установена е също така и по-слаба от статистическа гледна точка епистаза между генотип СС на rs6675281 и генотип АА на rs1872824 при тясна и широка фенотипна дефиниция (p=0.03, А1 и А2).

В заключение епистазата между rs6675281 в *DISC1* гена и трите последователно разположени полиморфизма в *TPH2* гена демонстрира по-силен ефект при пациентите с депресии, тъй като всички идентифицирани резултати за епистаза са статистически по-значими при широк фенотипен модел. Не може да бъде изключена и възможността това да се дължи на по-голямата извадка от пациенти при широка фенотипна дефиниция. Установен е протективен ефект на епистазата на rs6675281 с rs4290270 и rs1872824. Ефектът върху фенотипа на *TPH2* варианта rs1386483 в рамките на установените взаимодействия силно зависи от това с кой *DISC1* полиморфизъм си взаимодейства. Повишаващ риска от АР ефект се наблюдава при взаимодействие с rs6675281, докато протективен ефект има при епистаза с rs821616.

DISC1 rs980989 - BDNF rs16917237

Установена е епистаза на кандидат-гена *DISC1* както с *TPH2* така и с *BDNF*. Генетичните варианти, за които е открито взаимодействие са rs980989 в DISC1 и rs16917237 в *BDNF* гена. Регресионният анализ не успява да установи кои са взаимодействащите генотипи между двата полиморфизма, поради липса на достатъчно наблюдения във всички категории, но е установена епистаза между G алелите на двата варианта, rs980989 и 16917237 при широк фенотип. При пациенти алел G (rs16917237) е по-често срещан и в двете фенотипни дефиниции, което реплицира получените резултати от асоциативното проучване в българска популация и потвърждава вероятността от повишен риск от АР при наличието му. Въпреки това в рамките на идентифицираната епистаза се установява, че комбинираното присъствие на алел G, rs16917237 и алел G, rs980989 е по-рядко срещано при пациенти и по-често срещана при контроли само при широк фенотипен модел (p=0.03), но не и при тесен.

DISC1 rs980989 - CLOCK rs3805154

Идентифицирана е също така и епистаза между *DISC1* и *CLOCK* кандидат-гена. Регресионният анализ установява, че алел G в s980989 (*DISC1*) взаимодейства с алел С в rs3805154 (*CLOCK*). Наблюдава се протективен ефект на епистазата при широк фенотипен модел (p=0.02). Освен това регресионният анализ на индивидуалната оценка на приноса на

участващите във взаимодействието генетични варианти установява за алел C на rs3805154 по-висока честота при пациентите и при двата фенотипни модела (p=0.013, A1; p=0.007, A2). Епистатичното взаимодействие между алел G в rs980989 и алел C в rs3805154 с протективен ефект е получен само при широк афективен статус, където са включени едновременно пациенти с БАР и УАР.

CLOCK rs3805154 - BDNF rs16917237

Същият полиморфизъм в *CLOCK* кандидат-гена, rs3805154 участва в епистатично взаимодействие с генетичен вариант rs16917237 в *BDNF* гена. Не е идентифицирана генотипна епистаза, но е открито взаимодействие между алел C в rs3805154 и алел G в rs16917237 при тясна фенотипна дефиниция (p=0.028), като комбинацията между тях е по-рядка при пациенти. Регресионният анализ показва също така статистически значими по-високи честоти на генотип G/G, rs16917237 при пациенти, което е консистентно с получените резултати от предварително проведеното асоциативно проучване, но не идентифицира епистаза с участието на генотипа, която да повлиява фенотипа и да води до повишен риск от АР.

CRH rs12721510 - DISC1 rs821577 / ANK3 rs9804190

Установена е епистаза на генетичният вариант rs12721510 в *CRH* гена с варианти в *DISC1* и *ANK3* гените, които имат противоположен ефект върху фенотипа. Генотип C/C в rs12721510 (*CRH*) взаимодейства с генотип G/G в rs821577 (*DISC1*), като комбинацията е по-честа при пациенти и следователно най-вероятно допринася за повишен риск от развитие на заболяването. Влияние на епистатимното взаимодействие между вариантите в *CRH* и *DISC1* гените е установено при тясна фенотипна дефиниция. Не се наблюдава статистически значим самостоятелен ефект на участващите в тази епистазата генотипи.

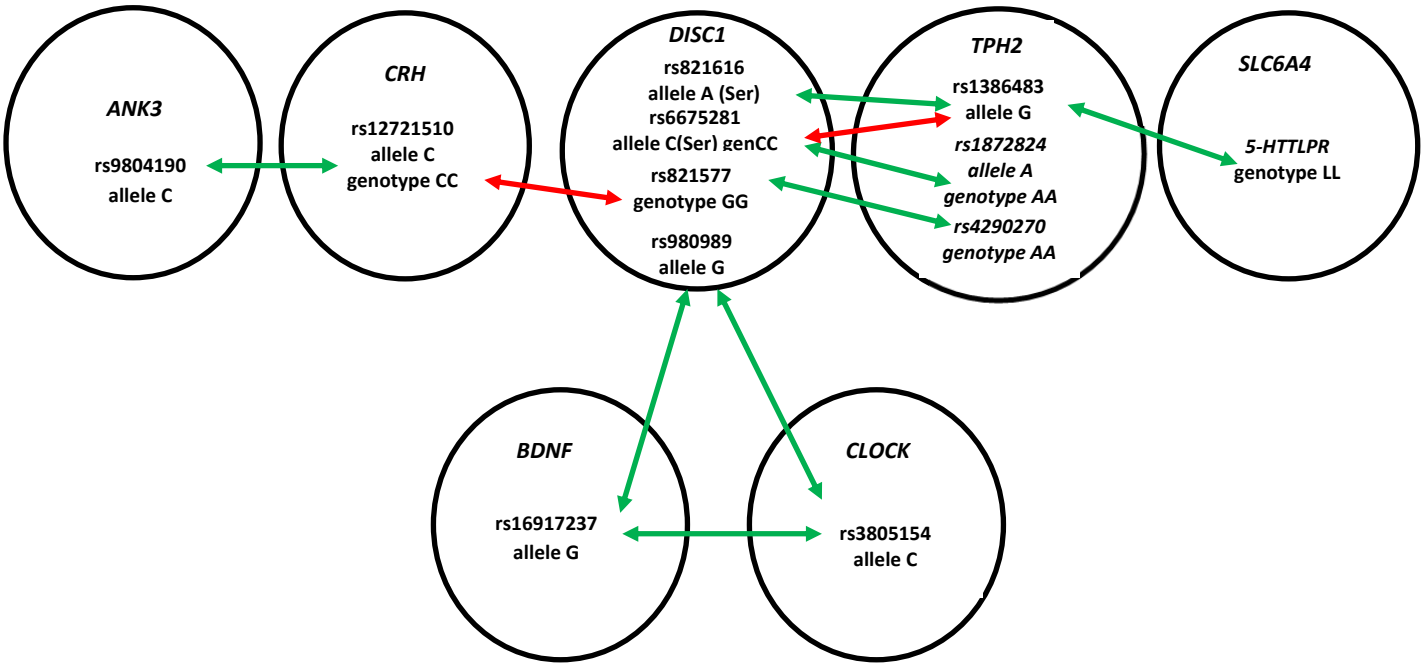
Същевременно е идентифицирана и епистаза между същият *CRH* полиморфизъм и rs9804190 в *ANK3*. Поради малък брой наблюдения във всички категории, не беше възможно определянето на евентуални взаимодействащи си генотипи, които да повлияват фенотипа, но е установена епистаза между алел C на rs12721510 и алел C на rs9804190, които са статистически по-рядко срещани при пациенти и при двата изследвани фенотипни модела (p=0.02, A1; p=0.03, A2). Регресионният анализ не установява статистически значим самостоятелен ефект на участващите в епистазата генетични варианти.

TPH2 rs1386483 - SLC6A4 5-HTTLPR

Установена е също така и епистаза между rs1386483 в *TPH2* гена и промоторния полиморфизъм, 5-HTTLPR в *SLC6A4* кандидат гена. Детектираното взаимодействие между генотип L/L в SLC6A4 и генотипи G/G и G/A в rs1386483 показва статистически значими резултати при тесен и широк фенотипен статус (епистаза между *SLC6A4* L/L и rs1386483 G/G, p=0.02, A1; p=0.01, A2; епистаза между *SLC6A4* L/L и rs1386483 G/A, p=0.01, A1; p=0.01, A2). Съвместното присъствие на взаимодействащите си генотипи са статистически по-редки в групата на пациентите, което предполага протективен ефект на

идентифицираната епистаза независимо от афективния статус. Регресионният анализ не установява самостоятелен ефект върху фенотипа на участващите във епистатичното взаимодействие генотипи.

Фигура №16А: Визуално представяне на установените епистатични взаимодействия между изследваните кандидат-гени.



Визуализация, направена със следната програма - Yubao Wu, Xiaofeng Zhu, Jian Chen, Xiang Zhang. EINVis: A visualization tool for analyzing and exploring genetic interactions in large-scale association studies. Genetic Epidemiology, 37(7), 675-685, 2013:

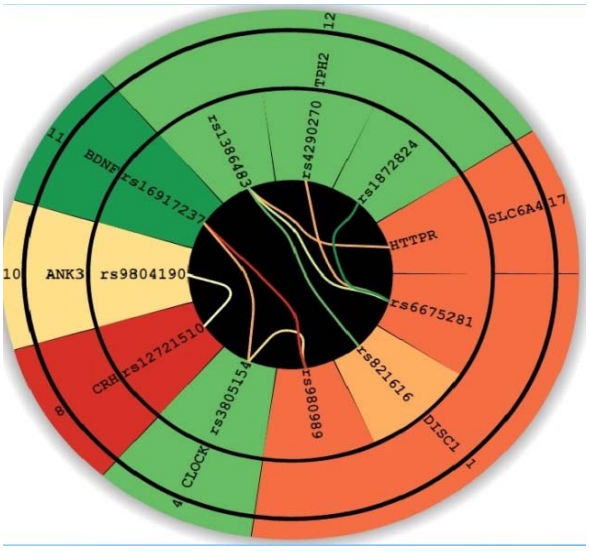


Таблица № 37А: Статистически най-добрите резултати, показали резултат за епистаза $p < 0.04$

Локус 1			Локус 2			Plink_Случаи-контроли		Регресионен анализ				
Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	P	Фенотип	B	OR	p	Фенотип	R^2
DISC1 rs6675281	1	***Tph2*** rs1386483	12	0.02	A2							
rs6675281=C * rs1386483=G								1.71	5.54	0.02	A2	0.02
DISC1 rs6675281	1	***Tph2*** rs4290270	12	0.04	A2							
rs6675281=CC * rs4290270=AA								-2.64	0.07	0.02	A2	0.04
DISC1 rs6675281	1	***Tph2*** rs1872824	12	0.005	A1							
rs6675281=CC * rs1872824=AA								-2.56	0.08	0.03	A1	0.05
r**s6675281=C * rs1872824=A**								-1.43	0.24	0.005	A1	0.04
DISC1 rs6675281	1	***Tph2*** rs1872824	12	0.005	A2							
rs6675281=CC * rs1872824=AA								-2.61	0.07	0.02	A2	0.05
rs6675281=C * rs1872824=A								-1.43	0.24	0.004	A2	0.03
DISC1 rs821577	1	***CRH*** rs12721510	8	0.03	A1							
rs821577=GG * rs12721510=CC								2.63	13.91	0.04	A1	0.02
DISC1 rs821577	1	***CRH*** rs12721510	8	0.03	A2							
rs821577=GG * rs12721510=CC								2.64	14.0	0.04	A2	0.02
DISC1 rs821616	1	***TPH2*** rs1386483	12	0.02	A2							
rs821616=A * rs1386483= G								-1.61	0.2	0.008	A2	0.02
DISC1 rs980989	1	***CLOCK*** rs3805154	4	0.03	A2							
rs980989=G * rs3805154=C								-1.03	0.36	0.02	A2	0.03
DISC1 rs980989	1	***BDNF*** rs16917237	11	0.02	A2							
rs980989=G * rs16917237=G								-0.82	0.44	0.03	A2	0.02
Clock rs3805154	4	***BDNF*** rs16917237	11	0.04	A1							
rs3805154=C * rs16917237=G								-1.03	0.36	0.03	A1	0.03
Clock rs3805154	4	***BDNF*** rs16917237	11	0.03	A2							
rs3805154=C * rs16917237=G								-0.92	0.40	0.04	A2	0.02
Crh rs12721510	8	***ANK3*** rs9804190	10	0.03	A1							
rs12721510= C * rs9804190=C								-1.55	0.21	0.02	A1	0.02
Crh rs12721510	8	***ANK3*** rs9804190	10	0.04	A2							
rs12721510= C * rs9804190=C								-1.45	0.23	0.02	A2	0.02
SLC6A4 **5-HTTLPR**	17	***TPH2*** rs1386483	12	NS	A1							
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA								-3.14	0.04	0.01	A1	
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG								-2.89	0.06	0.02	A1	0.04
SLC6A4 **5-HTTLPR**	17	***TPH2*** rs1386483	12	0.04	A2							
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA								-3.08	0.05	0.01	A2	
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG								-3.11	0.05	0.01	A2	0.03

V. Дискусия на резултатите

V. 1. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени от серотонинова невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4.*

V. 1.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *TPH2*

В кандидат-генът *TPH2*, кодиращ скоростопределящия ензим в биосинтезата на серотонин, триптофан хидроксилазата са изследвани общо пет генетични варианта. Полиморфизмите rs4570625 и rs11178998 са разположени в 5'UTR, а rs1386483, rs4290270, rs1872824 се намират в интрон 8, екзон 9 и интрон 9 на *TPH2* гена. Няколко изследователски групи демонстрират отношението на разположените в 5'UTR генетични варианти към развитието на различни психиатрични заболявания със сходна или частично припокриваща се симптоматика с тази на АР (Walitza, 2005, Cichon, 2008, Grigoroiu-Serbanescu, 2008, Kim, 2009). Описана е и асоциация на намиращите се в този участък на гена полиморфизми с отклонения от нормалното когнитивно функциониране (Strobel, 2007). Настоящото асоциативно проучване не открива статистически значими разлики между групите на пациентите и на контролите за изследваните две еднонуклеотидни замени, разположени в 5' нетранслиращата се част, rs4570625 и rs11178998 и при двете изследвани фенотипни дефиниции. Не са идентифицирани също така и хаплотипи с тяхно участие, които да са асоциирани с повишен риск от развитие на АР в изследваната българска извадка.

Генетичният вариант rs4570625 е асоцииран с УАР в мета анализ (Gao, 2012) както и с шизофрения (Schuhmacher, 2012) и паническо разстройство (Kim, 2009). Установени са статистически по-високи честоти на алел Т в групата на пациентите с паническо разстройство спрямо контролната (Kim, 2009). В нашето изследване не се потвърждава тази зависимост и не се откриват статистически значими разлики между пациенти и контроли при А1 както и при А2 където са включени пациентите с УАР. Настоящите резултати демонстрират липса на асоциация за rs4570625 с АР подобно на проучването на Serretti, 2011, в което при изследване на зависимостта на маркера с три отделни психиатрични заболявания, БАР, УАР и шизофрения не се открива асоциация с нито едно от тях (Serretti, 2011). На базата на получените резултати в нашето изследване може да се предположи, че rs4570625 няма самостоятелно влияние върху риска от БАР и УАР в българската популация. Като се има предвид, че литературните данни за положителна асоциация на изследвания генетичен вариант с УАР са предимно от големи проучвания включително и мета анализ е възможно липсата на асоциация да се дължи на недостатъчно голямата извадка при широк фенотип, необходима за идентифициране на сравнително по-слаби влияния. Евентуално проучване в по-голяма група както и в извадка включваща само пациенти с УАР би могла да изясни ефекта на rs4570625.

Във фамилно изследване на пациенти с обсесивно компулсивно разстройство е описана тенденция алел С на rs4570625 и хаплотипи с присъствието му да са преференциално предавани на засегнатото поколение от техните родители (Mössner, 2006). Проведеният TDT анализа при семействата от български и ромски произход не установява преференциално предаване на алелите на rs4570625, но при хаплотипния TDT

анализ са идентифицирани два по-често предавани хаплотипи на пациентите (Таблица №13) с участието на противоположния алел T, за който има данни за асоциация с паническо разстройство (Kim, 2009).

Другият намиращ се в 5'UTR регион генетичен вариант изследван в настоящото проучване е rs11178997, който е асоцииран с БАР при Руски пациенти (Cichon, 2008) и с УАР в изолатна популация от северна Швеция (Van Den Bogaert, 2006). Алел G на rs11178997 е асоцииран с посттравматичен стресов синдром (Goenjian, 2012), въпреки данните, че противоположния алел A води до намалена до 22% транскрипционна активност в мозъчна тъкан (Scheuch, 2007). Еднонуклеотидната замяна, rs11178997 съвместно с другия изследван от нас в 5'UTR полиморфизъм, rs4570625 са асоциирани с ADHD (синдром на липса на внимание и хиперактивност) (Walitza, 2005). Също така генетичният вариант, rs11178997 участва и в хаплотипи асоциирани с шизофрения в Хан китайска популация (Yi, 2012). В проведеното асоциативно изследване в българската популация не се потвърждава наличието на асоциация на rs11178997 с АР и не са идентифицирани хаплотипи, които да са асоциирани със заболяването при широка и тясна фенотипна дефиниция. Настоящите резултати частично реплицират докладваните от Grigoroiu-Serbanescu липса на асоциация на rs11178997, където не се открива връзка със заболяването и за други изследвани варианти в 5'UTR региона (Grigoroiu-Serbanescu, 2008). Въпреки това изследването на Grigoroiu-Serbanescu съобщава за неравновесно предаване на алелите на rs11178997 от родители на пробанди, което не се потвърждава в проведения TDT анализ в български и ромски семейства. Хаплотипният TDT анализ идентифицира два хаплотипа с присъствието на алел G, които е възможно да допринасят за повишен риск от АР, тъй като са по-често предавани в засегнатото поколение.

Генетичният вариант rs1386483 намиращ се в интрон 8 е скачен с rs1386482 и rs1386486, за които има данни за асоциация с БАР в ирландски семейства (Roche, 2009) и също така е асоцииран с повишена импулсивност като ефекта му е полово зависим (Stoltenberg, 2012). Той е изследван и при пациенти с паническо разстройство, но е отхвърлена хипотезата за асоциация със заболяването. В нашето изследване също не се потвърждава връзката на rs1386483 към развитието на АР и не са идентифицирани хаплотипи с негово участие, които да са асоциирани с повишен риск от АР и при двата фенотипни модела. TDT анализът в български и ромски семейства не показва преференциално предаване на някой от алелите от родители на пациенти.

За генетичният вариант rs4290270 са налични данни, че повлиява процеса на сплайсинг като биологичните механизми, чрез които това се осъществява все още не са напълно изяснени (Grohmann, 2010). Този полиморфизъм се намира в екзон 9, води до синонимна замяна и е асоцииран с БАР във фамилно изследване от канадски произход (Harvey, 2007), като е установена по-висока честота на алел A при пациентите. Също така силна асоциация с БАР е установена и за варианти скачени с изследвания от нас полиморфизъм (Roche, 2009). Хаплотипи с участие на алел A са асоциирани с УАР (Shen, 2011), повлияват реакцията при медикаментозно лечение с антидепресанти при пациенти с УАР (Xu, 2012) и указват влияние на наличието на психотични симптоми при пациенти с шизофрения (Zhang, 2011). При сравняване на честотата на генотип A/A се установява, че

тя е статистически по-висока в групата на хора извършили опит за самоубийство в сравнение с пациенти с УАР (Grohmann, 2010). В нашето асоциативно проучване не са установени разлики в алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли при тесен и широк фенотипен модел и се реплицират данните за липса на асоциация на този генетичен вариант с УАР (Shen, 2011).

Проведеният TDT анализ в български и ромски фамилии не открива неравновесно предаване на алелите на rs4290270 в засегнатото поколение и не реплицира установеното преференциално предаване на по-честия алел от (Harvey, 2007). Същевременно хаплотипния TDT анализ идентифицира два хаплотипа с присъствието на алел А на rs4290270, които са по-често предавани на пациентите при широк и тесен фенотип (Таблица №13). Въпреки липсата на установена връзка с АР при асоциативното проучване от тип случаи-контроли за rs4290270, настоящите резултати предоставят доказателство за потенциалната роля на алел А към повишен риск от АР, като вероятно влиянието е слабо и зависи от наличието на други варианти в рамките на установените хаплотипи.

За разположеният в интрон 9 rs1872824 не се наблюдават данни за асоциация с АР в българската популация, фамилното проучване на български и ромски семейства също не открива неравновесно предаване на алелите му в засегнатото поколение. Този вариант не е изследван в други проучвания и получените от нас резултати демонстрират липса на връзка с етиологията на АР при българи.

Може да се обобщи, че въпреки важната функционална роля на продукта на *TPH2* гена и наличните литературни данни за връзката на различни генетични варианти към широк спектър от психиатрични разстройства и характерни симптоми и състояния при тези заболявания, не се откриват данни за самостоятелно влияние на изследваните пет избрани от нас полиморфизма. Липса на асоциация е установена, както при проучването от тип случаи-контроли, така и при TDT анализа на български и ромски семейства и при двата фенотипни модела. Не са идентифицирани асоциирани хаплотипи при тесен и широк фенотип, но са установени гранични статистически резултати за два хаплотипа, които са по-често предавани от родители на пробанди. Хаплотипи rs111789/rs429027/rs187282, GAG и s4570625/ rs11178998/ rs4290270 / rs1872824, TGAG са по-често предавани в засегнатото поколение при тесен и при широк фенотип. Неравновесното предаване на хаплотипи се установява при съвместния анализ на български и ромски семейства както и при хаплотипния TDT анализ само на български семейства. Двата хаплотипа споделят еднаква обща част и са съставени от алели за които са налични данни от различни проучвания за връзка с психиатрични разстройства. Алел Т на s4570625 е асоцииран с паническо разстройство (Kim, 2009), алел G на rs11178998 с УАР, БАР и посттравматичен стресов синдром (Van Den Bogaert, 2006, Cichon, 2008, Goenjian, 2012) и алел А на rs4290270 с БАР и УАР (Roche, 2009, Shen, 2011). Въпреки че не се открива самостоятелно влияние на участващите алели в преференциално предаваните хаплотипи, нашите резултати демонстрират, че съвместното им присъствие в рамките на хаплотипи вероятно повишава риска от АР в българската популация.

Други проучвания установяват, че алелите участващи в идентифицираните от нас неравновесно предавани хаплотипи се срещат в различни комбинации и при пациенти с други психиатрични разстройства, алел A на rs4290270 е срещан в хаплотипи статистически по-често при пациенти с диагнози от аутистичния спектър (Singh, 2013), а хаплотипи с алел T на rs4570625 са асоциирани с шизофрения в Хан китайска популация (Yi, 2012).

Наличните в литературата данни и настоящите резултати предполагат, че присъствието на двата хаплотипа (GAG и TGAG) увеличава риска от АР независимо от фенотипната дефиниция и етническия произход. Същевременно не се установява статистически значим самостоятелен ефект на отделните изследвани *TPH2* полиморфизми, което вероятно може да се дължи на недостатъчната статистическа сила на изследваната извадка или относително слабия ефект на вариантите. Това би могло да обясни и факта, че са установени статистически значими резултати само в рамките на хаплотипни комбинации на варианти свързани вероятно със слаб риск към заболяването.

V. 1.2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *SLC6A4*

Серотониновият транспортер (*5-HTTLPR*, *SLC6A4*, *SERT*) извършва преноса на серотонин от синаптичното пространство към невроните. Определена група успешно използвани антидепресанти осъществяват терапевтичния си ефекта именно на базата на инхибиране на обратното захващане на серотонина от синапса. В рамките на кандидат ген кодиращ серотонинов транспортер *SLC6A4* са изследвани два полиморфизма разположени в промоторния участък и в интрон 1, съответно 5-HTTLPR и rs12150214.

При изследването на 360 двойки близнаци от мъжки пол за генетичният вариант rs12150214 е получена асоциация на този вариант с високи нива на депресия, установена чрез специфичен инструментариум за целта (Beck Depression Inventory) (Su, 2009). В същото изследване се установява, че връзката на rs12150214 с повишен риск от депресия е съпътствана и от високи плазмени нива на IL-6, който е цитокин повишаващ се при инфекция. Друго изследване, потвърждаващо отношението на rs12150214 към депресията, проведено върху 567 индивида докладва, че генетичният вариант rs140700, който е скачен с изследваната от нас еднонуклеотидна замяна повлиява тежестта на депресивните епизоди (Lazary, 2008). За друг (rs2020934) скачен вариант с изследвания от нас също са налични данни за асоциация с повишена тревожност и депресия (Wray, 2009). Литературните данни предоставят косвени данни за възможна връзка на изследвания от нас генетичен вариант rs12150214 с развитието на АР и по специално със симптомите на депресия. Настоящите резултати подкрепят хипотезата за отношение на rs12150214 към депресия и демонстрират също така и принос на този полиморфизъм към развитие на БАР, тъй като и при двете афективни дефиниции се получават идентични в статистическо отношение резултати. (Таблица №14). При пациентите независимо от фенотипния статус се наблюдава по-висока честота на алел C и по-ниска на алел G. Генотипният асоциативен анализ идентифицира по-ниска честота на генотип G/G при пациенти и по-висока при контроли. На базата на тези резултати може да се предположи, че вероятно алел G има рецесивен протективен ефект или алел C има доминантен повишаващ риска от АР ефект

(p= 0.028, A1 и p=0.027, A2). Получените почти идентични от статистически гледна точка резултати при A1 и при A2, предполагат липса на влияние на фенотипната дефиниция в изследваната българска извадка. При опит да се реплицират резултатите от асоциативното проучвани и във фамилната извадка от български и ромски семейства, не е установено преференциално предаване на алелите на rs12150214 от родители на пробанди. Възможно е липсата на асоциация при изследваните семейства да се дължи на факта, че фамилната извадка, с която разполагаме е сравнително малка и недостатъчна за откриване на асоциация с полиморфизми с по-слабо влияние към риска от определено заболяване. Въпреки това като се има предвид разположението на rs12150214 в район с множество регулаторни елементи и получените данни за асоциация в българската популация е препоръчително изследването му в по-голяма извадка с цел изясняване на ефекта му.

Другият изследван в настоящото проучване полиморфизъм в *SLC6A4* кандидат гена е 5-HTTLPR, който представлява 43 bp инсерция или делеция в промоторния участък на гена. Поради наличните данни за директно влияние на полиморфизма върху активността на серотониновия транспортерр той е многократно изследвана във връзка с различни психиатрични разстройства и поведенчески промени. За генетичният вариант с инсерцията (L) са установени три пъти по-високи нива на транскрипция в сравнение с варианта с делецията (S), при който ниската транскрипция води до по-неефективно обратно захващане на серотонина и съответно по-високи серотонинови нива в синапса (Lesch, 1996). Многократното изследване на връзката на този полиморфизъм с мултигенни и мултифакторни заболявания, каквито са психиатричните разстройства е довело до генерирането на доста противоречиви резултати. Няколко мета-анализа, проведени в големи извадки потвърждават наличието на асоциация между промоторния *SLC6A4* полиморфизъм и БАР, но отхвърлят наличието на такава с УАР (Lasky-Su, 2005), липсата на асоциация с депресия се потвърждава и от друг мета-анализ (Risch, 2009). Полиморфизмът 5-HTTLPR е асоцииран също така и с повишен риск от извършване на самоубийство (Anguelova, 2003), въпреки че друг изследователски екип не открива асоциация между него и повишена депресивност и суицидни мисли и не открива взаимодействието между този генетичен вариант и наличието на стрес да повлияват изследвания фенотип (Coventry, 2010).

Описаната функционална еднонуклеотидна замяна (rs25531) в дългият (L) вариант на 5-HTTLPR полиморфизма много често е изследвана паралелно с 43 bp инсерция или делеция. Вариантът (L_A) в rs25531 е с по-голяма честота и отговаря на по-висока транскрипционна активност на серотониновия транспортер, а вариант (L_G) съответства на транскрипционна активност подобна на S алела на 5-HTTLPR.

При УАР пациенти с (L_A) вариант се постига по-добър терапевтичен ефект при медикаментозното лечение с определена група антидепресанти и при тях са установени и най-високи серумни нива на прилагания антидепресант (Dreimüller, 2012). Същевременно е описана епистаза между носителството на (L_A) варианта и сравнително честото излагане на стрес или травми водеща до риск от развитие на посттравматично стресово разстройство (Grabe, 2009).

Хомозиготното носителство на късия S алел от своя страна е асоциирано с повишен риск от БАР (Cho, 2005; Lotrich, 2004; Lasky-Su, 2005), риск от УАР (Hauser, 2003; Lotrich 2004), склонност към депресия (Cervilla, 2006; Zalsman 2006) и засилена потиснатост и безпокойство (Melke, 2001). Генотипи с присъствието на S алела, както и генотипи с отговорния за сходна транскрипционна активност (L_G) вариант са асоциирани с БАР тип I, както и с БАР тип II при мъже, но не и при жени, което предполага влияние на този генетичен вариант в зависимост от пола (Wang, 2014). Освен това S алелът е асоцииран с по-висока възбудимост на амигдалата в следствие на стимулация от негативен характер и е описано епистатично взаимодействие с Met алела на *BDNF* гена, което води до по-висока от нормалната възбудимост на някои мозъчни региони (Wang, 2012).

В настоящото проучване не е изследвана еднонуклеотидната замяна rs25531, а само 43 bp инсерция/делеция и не е открита асоциация между някой от двата варианта и АР в изследваната българска извадка. Въпреки литературните данни за положителна асоциация на 5-HTTLPR с редица психиатрични разстройства (Zalsman 2006, Lotrich 2004, Lasky-Su, 2005) включително и асоциация с повишен риск от АР при хомозиготното носителство на S алела в друго изследване на български пациенти (Al-Djassem, 2014), настоящите резултати не подкрепят тези данни. Липсата на асоциация в българската популация подкрепя резултатите на други два изследователски екипа за липса на връзка на промоторния *SLC6A4* полиморфизъм с развитието на АР (Mendlewicz, 2004; Mansour, 2005).

Проведеният TDT анализ също не установява преференциално предаване на вариантите с инсерция или делеция в засегнатото поколение. Въпреки, че изследваната фамилна извадка в настоящото изследване не е особено голяма, получените резултати от нас реплицират друго голямо фамилно изследването на (Voyiaziakis, 2011), където също не се открива преференциално предаване от родители на пробанди.

V. 2. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени от допаминова невромедиация

V. 2.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DRD2*

В рамките на *DRD2* гена кодиращ допаминов рецептор от тип 2 са изследвани следните 4 еднонуклеотидни замени, rs6277 разположен в екзон 7, rs12800853 и rs7350522 намиращи се в интронните участъци и rs6589377 в 5' края.

Генетичният вариант rs6277 (C957T) води до синонимна аминокиселинна замяна и за него са налични много противоречиви данни в литературата. Този полиморфизъм влияе на стабилността на матричната РНК, което от своя страна повлиява експресията на крайния продукт на *DRD2* гена. Установена е по-висока честота на алел С и генотип СС, съответстващи на нормални нива на експресия при пациенти с шизофрения (Monakhov, 2008). Същевременно при носителите на същият генотип се наблюдават повече допаминови рецептори от тип 2 в таламуса и кортекса (Hirvonen, 2009). Получени са противоречиви резултати относно действието на хомозиготното носителство на алел С върху когнитивното функциониране, според (Bolton, 2010) е установена асоциация с

намалени когнитивни способности, докато (Huertas, 2012) описва по-добри способности за учене на моторни упражнения и по-малки отклонения на пулса при среден и малък стрес. При носителите на генотип CC също така е установена и промяна в когнитивното функциониране, настъпваща с възрастта на пациентите (Colzato, 2013). За алел C са налични и данни за асоциация с някои психиатрични заболявания, установена е асоциация с посттравматичен стресов синдром (Voisey, 2009) и асоциация с алкохолна зависимост при мъже, но не и при жени (Swagell, 2012). Същевременно няколко изследователски екипа докладват асоциация на противоположния T алел с шизофрения (Fan, 2010) и с наркотична зависимост и необходимост от по-високи дози на метадон за достигане на терапевтичен ефект при наркотично заместителна терапия (Doehring, 2009). Генетичният вариант rs6277 е изследван и в българската популация, при генотипиране на 183 еднонуклеотидни замени разположени в 53 кандидат гени в група от пациенти с шизофрения и шизоафективно разстройство и единствено за полиморфизма rs6277 е установена статистически значима асоциация с шизофрения като резултата е потвърден и в независима отделна извадка (Betcheva, 2009).

В настоящото асоциативно проучване не се установява статистически значими разлики между алелните и генотипните честоти на пациентите и контролите за rs6277 при тесен и широк фенотипен модел (Таблица №17). Въпреки наличието на много, макар и противоречиви данни за връзката на този генетичен вариант с психиатрични разстройства включително и в българската популация, нашите резултати от асоциативното проучване не потвърждават наличието на такава пряка зависимост. Проведеният TDT анализ в отделна фамилна извадка също не установява неравновесно предаване на някои от алелите на rs6277 от родители на пробанди (Таблица №18, Таблица №19). Въпреки че не са открити асоциирани с АР хаплотипи в асоциативното проучване, хаплотипният TDT анализ на семействата идентифицира няколко хаплотипа с участието на rs6277, които са едновременно по-рядко или по-често предавани в засегнатото поколение. Хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG с участието на алел C на rs6277 е по-често предаван от родители на пациенти при широка фенотипна дефиниция, докато хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG със същия алел на rs6277 е по-рядко предаван в засегнатото поколение (Таблица №20).

За другите участващи генетични варианти в неравновесно предаваните хаплотипи, rs12800853, rs7350522 и rs6589377 не е открита асоциация в настоящото изследване и не са идентифицирани асоциирани с АР хаплотипи с тяхно участие. TDT анализът едновременно на семейства от български и ромски произход не установява преференциално предаване на някои от алелите им в засегнатото поколение, но при отделно проведеният TDT анализ само в подгрупата с българските семейства е установена тенденцията алел G на rs7350522 да е по-често предаван в засегнатото поколение. При съвместният анализ на български и ромски семейства е установено също така, че алел A на rs6589377 е статистически гранично по-често предаван на болните, въпреки че отделния TDT анализ на двете етнически подгрупи не идентифицира такава зависимост вероятно поради факта, че в по-малките извадки статистическата сила се губи. Въпреки

това са идентифицирани няколко неравновесно предавани хаплотипа с участието на тези варианти.

Статистически най-значими резултати при хаплотипния TDT анализ е установен за хаплотип rs12800853/rs7350522, CG при широк фенотипен модел. При отделния анализ само на българските семейства се наблюдава засилване на резултата от статистически гледна точка, което говори за вероятно по-силно влияние в българската етническа група и че резултата получен при съвместния анализ на български и ромски семейства е основно повлиян от наблюдаваната зависимост в семействата от български произход. Възможно е резултатът за този хаплотип да е повлиян от статистически граничната тенденция алел G на rs7350522 да е по-често предаван в засегнатото поколение при българиски семейства, широк фенотип. Вероятно се наблюдава синергичен ефект и ефектът му е по силен и съответно статистически значим в рамките на хаплотип съвместно с алел C на rs12800853. Хаплотипен TDT анализ включващ само ромските семейства не е извършен, тъй като поради малката им бройка той не би бил статистически коректен. Хаплотипите rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG съдържащи алел C на rs12800853 и алел G на rs7350522 са по-често предавани на пробанди при широка фенотипна дефиниция и е възможно да допринасят за повишен риск от АР. Същевременно хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG с участието на същия алел C на rs12800853 и противоположния алел T на rs7350522 е по-рядко предаван от родители на пациенти при широк фенотип и вероятно може да има протективен ефект. Възможно е протективният ефект на по-рядко предавания хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG да се дължи на факта, че в него участва и алел G на генетичния вариант rs6589377, за който е установено неравновесно предаване в поколенията. За rs6589377 не е установена алелна, генотипна или хаплотипна асоциация при проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли, но той е единственият маркер, за който TDT анализът установява по-рядко предаване на алел G от родители на пробанди, което вероятно повлиява и резултата за целия хаплотип. За разположения в 5' края полиморфизъм, rs6589377 са налични данни от друго проучване, че е асоцииран с повишен риск от пристрастяване към никотин (Wei, 2012).

Нашите резултати потвърждават слабата връзка на допаминовата система към развитието на АР в българската популация. Най-вероятно избраните и изследвани от нас генетични варианти имат относително слаб ефект и това би могло да е причината да не се установява асоциация за самите полиморфизми, а да се идентифицират единствено хаплотипи с тяхно участие, които имат повишаващ риска от АР ефект или са протективни. Евентуалното им бъдещо изследване в по-голяма или по-тясно дефинирана в диагностично отношение група може да изясни и техния самостоятелен ефект или да установи асоциация с отделни ендофенотипи.

V. 3. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени имащи връзка с невропластичността - *DISC1, BDNF*

V. 3.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DISC1*

В *DISC1* генът са изследвани общо пет полиморфизма, от които три водят до аминокиселинни замени rs3738401 (Arg264Gln), rs6675281 (Leu607Phe), rs821616 (Ser704Cys) и rs980989 и rs821577. Тъй като взема участие в най-различни функции имащи отношение към патологичните механизми на психиатричните разстройства, кандидат гена *DISC1* е бил обект на множество изследвания с различни подходи в следствие на които са генерирани противоречиви резултати. В настоящото изследване не се открива асоциация на изследваните генетични варианти или хаплотипи с тяхно участие с АР (Таблица №21), но във фамилната извадка е открито преференциално предаване на един от алелите на rs980989 в засегнатото поколение (Таблица №22) и също така са идентифицирани и няколко неравновесно предавани хаплотипи, които повлияват върху риска от АР (Таблица №24).

Хаплотипи съдържащи rs3738401 са асоциирани с шизофрения, шизоафективно разстройство, БАР и УАР (Hennah, 2003, 2005) и са преференциално предавани на мъже с психотично разстройство (Palo, 2007) заедно с още един полиморфизъм изследван в настоящето изследване rs6675281. Асоциативното проучване за rs3738401, както и за rs6675281 проведено от нас не установява алелна или генотипна асоциация при широк и тесен фенотип. При TDT анализът на български и ромски семейства в настоящото изследване, както и при отделния анализ на двете етнически групи също не се идентифицира преференциално предаване на някой от алелите на тези два маркера на пациенти. Хаплотипният TDT анализ идентифицира два хаплотипа (rs3738401 / rs6675281 / rs821577 - ATT и rs3738401 / rs6675281 / rs821577 / rs821616 - ATTA) с участието на алел A на rs3738401, които са по-рядко предавани при широка фенотипна дефиниция (Таблица №24). Хаплотипите ATT и ATTA имат протективен ефект, особено в групата на пациенти с УАР. За алел T на rs6675281, кодиращ аминокиселината Phe, има противоречива информация. Установена е асоциация с шизоафективно разстройство и БАР (Hodgkinson et al., 2004), докато в друго изследване се съобщава за преференциално предаване на противоположния алел C при пациенти с шизофрения (Lepagnol-Bestel, 2010). Идентифицираните в настоящото изследване хаплотипи (ATT, TGT, ATTA, CGAT) са с участието както на алел T така и на алел C на rs6675281 в комбинация с други варианти, като всички без хаплотип TGT са по-рядко предавани в засегнатото поколение (Таблица №24).

По-редкият алел T на друг изследван от нас вариант, rs821577 е асоцииран с висока социална анхедония, което е често срещан симптом при психиатрично болни пациенти (Tomppo et al. 2009). В настоящото проучване са идентифицирани 3 и 4 маркерни хаплотипи, с участието на алел G на rs821577 (rs821577 / rs821616 / rs980989 - GAT, rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989 - CGAT, Таблица №24), които са статистически по-рядко предавани на пациенти. За двата хаплотипа са получени консистентни резултати за по-рядка трансмисия при съвместния анализ на българските и ромските семейства и

при двата фенотипни модела. Статистически по-значими резултати за GAT и CGAT са получени при широката фенотипна дефиниция, което предполага, че присъствието на пациенти с УАР допринася съществено за полученият резултат (GAT, p= 0.002, CGAT, A2, p= 0.003, A2). Влиянието на идентифицираните хаплотипи върху риска от УАР се потвърждава и от отделния анализ само на българските семейства, където статистическа значимост за тях се получава само при широк фенотипен модел. Тези резултати не могат еднозначно да потвърдят влиянието на редкия Т алел за повишен риск от развитие на АР, както и вероятен протективен ефект на алел G на rs821577, тъй като са идентифицирани едновременно и по-често и по-рядко предавани хаплотипи в засегнатото поколение. Интересно е да се отбележи, че първоначалните данни за асоциация на rs821577 са открити в група с психоза (Tomppo et al. 2009), докато в настоящето изследване се наблюдават статистически по-силни резултати в групата от пациенти с депресия.

За вариантите на полиморфизма rs821616 има данни, че могат да повлияват способността на DISC1 да се свързва с белтъци като NUDEL, MAP1A и транскрипционни фактори като ATF4 и ATF5, което води до промени в експресионния профил или експресия на по-къси продукти. Същевременно именно високи нива на къси DISC1 транскрипти са открити в мозъци на пациенти с шизофрения (Nakata et al. 2009). Генетичният вариант rs821616 е асоцииран и с повишен риск от различни психиатрични заболявания. Повишен риск от развитие на УАР е открит при носители на Т (Cys) алела, както и на хаплотипи с неговото участие (Hashimoto et al., 2006). Също така са описани и високи честоти на Т алела (Cys) при пациенти с шизофрения от китайски и европейски произход (Qu 2007, Song 2008). Същевременно е установено че алел Т участва в хаплотипи, по-рядко предавани на пациенти с БАР и е асоцииран с добра речева култура и пространствено ориентиране (Palo et al., 2007). Въпреки наличието на тези данни друг изследователски екип описва по-високи честоти на противоположния алел А при пациенти с БАР от индийски произход (Murthy 2012). Описан е и намален обем на сивото вещество и нарушено функциониране на хипокампуса по време на когнитивни дейности на здрави индивиди, носители на А (Ser) алел на rs821616 (Callicott 2005). Проведеното асоциативно проучване в нашето изследване не установява статистически значими разлики между алелните и генотипните честоти на пациенти и контроли независимо от фенотипната дефиниция и отхвърля хипотезата за самостоятелна връзка на този вариант към развитие на АР в българската популация. При изследване на нашите фамилни данни обаче е установено, че по-честият алел А на rs821616 участва в няколко по-рядко предавани хаплотипи (GAT, CGAT, ATTA, Таблица №24), а противоположния алел Т в единствения идентифициран по-често предаван хаплотип в засегнатото поколение (TGT), което подкрепя литературните данни за отношение на алел Т (Cys) на rs821616 към риск от АР. Възможно е ефектът на този полиморфизъм да е по-силен при по-тясно дефинирана ендофенотипна субгрупа, тъй като доминират данните сочещи отношение на rs821616 към промени в когницията.

За изследвания от нас вариант rs980989 е описано, че повлиява някои когнитивни характеристики като визуална, вербална памет и психомоторна гъвкавост (Palo et al., 2007). По-доброто представяне при психомоторни действия се наблюдава при носителите

на алел T, макар че в същата група от пациенти с БАР е установено и по-рядко предаване на хаплотипи с участието на алел G (Palo et al., 2007). В настоящото изследване rs980989 е единственият генетичен вариант, за който е установен статистически значим резултат при TDT анализа на отделните полиморфизми. Алел G на rs980989 е по-често предаван (p=0.009) при широка фенотипна дефиниция и подобна слаба тенденция, макар и недостигаща статистическа значимост се забелязва и при тесен фенотип (p=0.07). Преференциално предаване на алел G на пробандите е установен и при отделния TDT анализ в двете етнически подгрупи само при широка фенотипна характеристика (Таблица №24). Статистически най-значим резултат е получен при едновременния TDT анализ на семействата от двата етноса (p=0.009), вероятно поради факта, че анализа включва най-много на брой семейства, което е достатъчно за детекцията на сравнително слаби влияния. При TDT анализът на българските семейства получения резултат не достига статистическа значимост (p=0.06), а при ромските семейства, въпреки по-малката им бройка, се потвърждава статистически по-честото предаване на алел G в засегнатото поколение (p=0.03). Проведеният допълнителен анализ показва, че по-честото предаване на алел G в засегнатото поколението идва предимно от бащите на пробандите и вероятно има връзка с повишена предразположеност към АР. При ромските семейства са получени статистически по-силни резултати вероятно поради факта, че те са генетично по-хомогенна група. Същевременно настоящото проучване демонстрира, че преференциалното предаване на G алела на пациенти повлиява в по-голяма степен развитие на УАР, тъй като при широк фенотип се наблюдават статистически по-значими резултати.

Идентифицирани са и няколко по-рядко предавани хаплотипи (rs821577 / rs821616 / rs980989 - GAT, rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989 - CGAT) с участието на противоположния алел T на rs980989, което е в противоречие с изследването на (Palo et al., 2007), който съобщава за по-рядко предавани хаплотипи с участието на алел G. Възможно е получените резултати за самите хаплотипи да са силно повлияни от факта че локализираният в 3’ UTR вариант rs980989 е по-рядко предаван в засегнатото поколение.

Допълнителна информация за вероятно отношение на 3’-UTR района на *DISC1* кандидат гена към патологията на заболявания със сходна симптоматика до тази на афективните разстройства е предоставена от данните за асоциация на други две еднонуклеотидни замени, намиращи се в близост до rs980989. Асоциация между rs3737597 и шизофрения е установена независимо при пациенти от Финландия, Дания, Норвегия и Швеция (Hennah, 2003, Saetre, 2008). Изследване на епистаза между полиморфизми в *DISC1* кандидат гена и гени кодиращи продукти, които се свързват с DISC1 съобщава, че намиращият се в близост до rs980989, rs1411771 при епистаза с други варианти се явява рисков за шизофрения и води до по-неефективно когнитивно функциониране при здрави контроли. За разположеният в 3’ UTR вариант, rs1411771, който е енхансер на сплайсинга се предполага, че може да има функционално действие (Nicodemus, 2010).

При анализът на изследваните генетични варианти в *DISC1* кандидат гена в настоящото проучване са получени резултати за неравновесно предаване на алел G на

rs980989 от родители на пациенти и са идентифицирани хаплотипи имащи отношение към АР. Идентифицирани са различни потенциално протективни хаплотипи (ATT, ATTA, GAT, CGAT) с участието на всички изследвани полиморфизми и един хаплотип (TGT), който е асоцииран с повишен риск от АР при широк фенотип.

Лимитиращ фактор за нашето изследване е сравнително малката извадка, която възпрепятства откриването на предполагаеми варианти или хаплотипи, имащи сравнително по-слаб ефект върху риска от развитие на АР. Независимо от това ограничение настоящите резултати демонстрират, че алел T (Cys) на rs821616 участва само в по-често предаваните хаплотипи, а противоположния алел A (Ser) в по-рядко предаваните. Генетичните вариантите на rs3738401, rs6675281 и rs821577 се срещат както в по-често така и в по-рядко предавани хаплотипи. Същинският ефект на изследваните варианти може да се потвърди и интерпретира по-достоверно след изследването им в по-големи групи, тъй като субгрупите на индивидите притежаващи определен хаплотип в сегашното изследване са твърде малки за целта.

Имайки предвид разнообразните функции, в които *DISC1* участва както и данните за отношение на изследваните полиморфизми към по-специфичен клинични прояви като когнитивното функциониране, може да се предположи, че *DISC1* вариантите повлияват в по-голяма степен по-тесен диагностичен профил, който е част от клиничната проява на АР.

Нашите резултати подкрепят хипотезата за участие на *DISC1* вариантите в различни комбинации и хаплотипи с предполагаемо слабо влияние върху фенотипа на АР и предоставят насоки за бъдещи изследвания.

V. 3.2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *BDNF*

В настоящото изследване са изследвани три *BDNF* полиморфизма, функционален вариант rs6265 (Val66Met), разположен в кодиращ регион, rs16917237, който се намира в екзон-интронните граници и rs12273363, който е разположен в консервативен участък в 5’ края на гена.

Функционалният полиморфизъм rs6265 (Val66Met) е често изследван и в следствие на множеството проучвания с разнообразни изследователски подходи при пациенти с различни психиатрични заболявания са получени доста противоречиви данни за влиянието му.

За алел C (Val), за който се забелязва тенденция в нашата извадка да е по-чест при пациенти от двата фенотипни модела има данни за асоциация с БАР получени от няколко изследователски групи (Neves-Pereira, 2002; Sklar 2002, Geller 2004, Lohoff 2005, Vincze 2008, Xu 2010). Въпреки липсата на статистически значими резултати в настоящото проучване се наблюдава тенденцията алел C (Val) да е по-чест при пациенти и имайки предвид положителните резултати за асоциация на други изследователски екипи, може да се предположи, че е възможно Val66Met да има връзка с повишен риск от АР и в българската популация. Предполагаме, че ефекта му е твърде слаб и това е причината

резултатите за него да не достигат статистическа значимост. Освен това полиморфизмът rs6265 е бил обект на изследване и в геномно асоциативно изследване с участието на български пациенти, където също е открито слаба асоциация ($p = 6.92 \times 10{-}3$) на Val алела с БАР (Yossifova 2011), което съответства напълно на резултатите установени в настоящата извадка. Други изследователски екипи установяват, че алел C (Val) е асоцииран и с ранно начало на биполярно афективно разстройство (Geller 2004, Strauss 2005, Tang 2008), бързо циклиране (Muller 2006, Green 2006) и опити за самоубийство (Vincze 2008). Изненадващо е открита и асоциация на противоположния Met алел със същите характеристики като бързо циклиране и опити за самоубийство (Skibinska 2004, Kim 2008). Налични са данни в литературата сочещи, асоциация на алел T (Met) също и с БАР в китайска популация (Xu 2010) и с опити за самоубийство при корейски пациенти (Kim 2008). Възможно е това да се дължи на факта, че честотата на този алел в азиатската популация е по-висока в сравнение с тази на европейската, въпреки че друго независимо изследване на пациенти от Нова Зеландия, които не са от азиатски произход, потвърждава връзката на алел T (Met) с БАР (Sears et al. 2011). Влияние върху когницията на rs6265 е установена от няколко изследователски екипа, наблюдавано е подобряване на когнитивното функциониране при носителите на алел C (Val), и влошаване при алел T (Met) носителите (Kleim 2006;Goldberg 2008), като същевременно е съобщено и за обратната зависимост (Beste et al. 2010). Промените в когнитивното функциониране са доста често наблюдавани при пациенти с АР и се предполага, че нарушенията в динамиката и синхрона на невронните мрежи, които се контролират отчасти от BDNF, повлияват когнитивното функциониране. Генентичният вариант на rs6265 кодиращ Met алела също така е асоцииран и с намалена секреция на BDNF и нарушена памет (Egan 2003, Chen 2005).

Няколко изследвания съобщават за липса на асоциация на функционалния полиморфизъм, rs6265 с АР (Kunugi 2004, Nakata 2003, Skibinska 2004, Oswald 2004). Наличието на противоречиви резултати при комплексните болести не е необичайно, заради полигенния характер и хетерогенността на фенотипа при тази група заболявания. Влияние указва и разликата в изследваните кохорти пациенти по отношение на етнически произход и размер на извадката, повлияващ статистическата сила за откриване на слаб ефект. В опитите да се получи по-голяма яснота за действието на rs6265 полимолиморфизма, той е изследван и в мета анализи като в един от тях включващ 14 отделни асоциативни и фамилни изследвания е получена положителна асоциация с АР $p=0.004$ (Sklar et al. 2008).

В настоящото изследване, резултатите от генотипното асоциативно проучване съответстват на тенденцията алел C (Val) да е по-чест при пациентите. Установена е статистически гранична по-ниска честота на генотип T/T (Met/Met) при тясна фенотипна характеристика ($p=0.05$), като резултатите предполагат рецесивен ефект на Met алела и протективен ефект на хомозиготното му носителство със слабо влияние върху фенотипа (Таблица №25).

При опит да се реплицират резултатите от асоциативното проучване в независима извадка от български и ромски семейства не са получени статистически значими

резултати (Таблица №27, Таблица №28). Проведеният TDT анализ във фамилната извадка не открива преференциална трансмисия на Val алела, съобщена от няколко изследователски екипа (Neves-Pereira, 2002; Sklar 2002, Geller 2004, Kremeyer 2006), и не потвърждава установените от проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли резултати. Липсата на данни за преференциално предаване на някои от алелите може да се дължи на ниската информативност на фамилната извадка и малкото информативни трансмисии при TDT анализа (60 за A1 и 80 за A2). Също така не би следвало да се изключва като причина и евентуалната липса на връзка на rs6265 към риска от АР или наблюдаване на фалшиво положителна тенденция в асоциативното проучване. Лимитиращ фактор на настоящото изследване се явява размера на фамилната извадка както и на контролната група на асоциативното проучване, което не позволява категорично потвърждаване или отхвърляне на първоначално наблюдавани тенденции за по-висока честота на Val алел и по-ниска честота на Met алела при пациенти както и протективен рецесивен ефект на Met алела. Допълнителното изследване на повече семейства и здрави контроли би позволило да се определи предполагаемото слабо влияние на rs6265.

За генетичен маркер rs16917237 в нашата извадка е получена асоциация при тясна фенотипна дефиниция, която остава статистически значима и след консервативната корекция на Бонферони за множество тествания. По-честият алел G е с по-високи честоти в групата на пациентите спрямо тази на здравите контроли (p=0.015). Асоциацията на rs16917237 с АР се потвърждава и от генотипния анализ, където генотип T/T е изключително рядко срещан при пациентите (между 3.14% и 3.36% в сравнение с 10,14% и 8.33% при контроли). Установен е рецесивен ефект на генотипите съдържащи T алел (p=0.002, A1). Хомозиготното и хетерозиготното носителство на алел G увеличава риска от АР с OR=1.486 за БАР и OR=1.299 за широката фенотипна дефиниция включваща пациенти с УАР. Прегледа на литературните данни не показва данни за асоциация на rs16917237 с АР или други психиатрични заболявания и затова бяха проучени няколко генетични варианта, които са скачени с изследвания в настоящата извадка *BDNF* полиморфизъм. За rs2049045, който е скачен с rs16917237 има данни за асоциация с БАР, която е основно провокирана от наличието на бързо циклиращи пациенти (Muller et al. 2006). Други скачени генетични варианти, за които е открита асоциация при пациенти с шизофрения, пристрастени към никотин са rs7103411, rs11030104 и rs2049045 (Novak et al. 2010). Еднонуклеотидните замени rs79103411 и rs2049045 освен това са в хаплотипен блок с други генетични варианти, които са по-често срещани при пациенти с БАР с алкохолизъм. За вариант rs7103411 е установено влияние върху способността за запаметяване в зависимост от пола (Lainig et al. 2011). Нашите резултати и наличната в литературата информация показват, че е възможно rs16917237 да участва в етиологията на различни психиатрични разстройства включително и в тази на АР и допълнителното му изследване е обосновано.

Асоциативният хаплотипен анализ показва, че хаплотип съдържащ редките алели на двата полиморфизма е статистически по-рядък при пациенти в сравнение с контроли (Таблица №26). Хаплотип CG е по-чест при пациенти (78%, при пациенти с АР, A1 и A2

спрямо 70-73% при контроли), като е получен значим резултат (p=0.015) за БАР и статистически гранична значимост (p=0.071) за извадката с присъствие на пациенти с УАР. Хаплотип rs6265/rs16917237/rs122733, CGT повтаря тенденцията също да е по-чест при пациенти в сравнение с контроли (p=0.003, A1 и p=0.028, A2). Резултатите, получени от хаплотипния асоциативен анализ са статистически по-значими от тези получени за самостоятелния риск на участващите алели, при алелната асоциация, което предполага, че риска асоцииран с хаплотипите, въпреки че е силно повлиян от присъствието на rs16917237 не се дължи само на него.

TDT анализът на семействата не показва преференциално предаване на алелите на rs16917237 в засегнатото поколение. Извършен е анализ на български и ромски семейства както и отделен анализ само на двете етнически подгрупи, с цел да се идентифицира дали резултатите получени от асоциативното проучване за връзка на алел G с АР не са етнически зависими, но асоциацията не се потвърждава и в двете групи. Не са идентифицирани и хаплотипи с участието на rs16917237, които да са преференциално предавани от родители на пациенти. Възможно е недостатъчна статистическа сила на фамилната извадка да възпрепятства оценяването на потенциалния ефект на този вариант, за които е получена положителна асоциация с АР.

При сравняване на алелните и генотипните честоти на генетичен вариант rs12273363 не се наблюдават статистически значими разлики между групите на пациентите и контролите. Настоящото изследване потвърждава докладваната липса на асоциация на този генетичен вариант със заболяването (Kocabas, 2011). В други изследвания са съобщени противоречиви данни за асоциация с АР, едновременно на алел C (Liu, 2008) и на алел T (Sears, 2011). Полиморфизмът е локализиран във висококонсервативен район, част от специфичен промотор активен в хипокампуса и поради тази причина въпреки липсата на алелна и генотипна асоциация в настоящото изследване, потенциалното му влияние в патологичните процеси на АР не може да се изключи напълно, още повече че в настоящото изследване са идентифицирани хаплотипи с негово участие, които са асоциирани с повишен риск от АР.

Хаплотипите rs16917237/rs12273363 (TT и GT), за които е демонстрирана асоциация с АР са съставени от варианти, които повтарят установената тенденция от алелния анализ. В идентифицираните хаплотипи алел G на rs16917237 е по-чест при пациенти, а алел A е по-рядък при тях, а алел T на rs12273363 присъства едновременно в хаплотипите с по-голяма и по-малка честота при пациенти. Съответно хаплотип rs16917237 / rs12273363, T/T е по-рядък при пациенти, а хаплотип rs16917237 / rs12273363, G/T е по-чест при пациенти. Статистически значими резултати са получени и при двете фенотипни дефиниции, но при тесния фенотипен модел се получават по значими резултати, което предполага, че рискът е по-голям за пациентите с БАР.

Носителите на алел C на rs12273363 имат намалена експресия на BDNF в хипокампуса (Hing et al. 2012). В нашата извадка са идентифицирани хаплотипи с противоположния T алел, които в зависимост от другите участващи варианти са или по-чести или по-редки при пациенти. Възможно е наличието на синергичност с другите

полиморфизми или влияние на други фактори, които да модифицират действието му и да имат отношение към патогенезата на АР. Като се има предвид характера на комплексните заболявания е възможно един алел да се явява предразполагащ или протективен в зависимост от наличието или липсата на други фактори. Това най-вероятно възпрепятства идентифицирането на неравновесно предавани алели или хаплотипи при TDT анализа на фамилните данни.

Човешкият *BDNF* ген се отличава с доста сложен механизъм на транскрипция и транслация като регулацията на тези процеси се осъществява на различни етапи. Описано е наличието на много алтернативни промотори на *BDNF* гена, отговорни за степента на транскрипция както и за тъканната специфичност на експресията. Също така анти-Bdnf гена се транскрибира в некодираща антисенс РНК, която формира дуплекси с *BDNF* транскриптите в мозъка (Pruunsild et al 2007). Предполага се, че по този начин анти-Bdnf има регулаторна функция която директно може да инхибира *BDNF* транскрипцията или транслацията и да регулира сплайсинга. Транскрипцията на *BDNF* и транспорта на матричната РНК на *BDNF* указват влияние върху транспорта на продукта на гена в дендритите и секрецията му. Всички тези процеси повлияват правилното формиране на синаптични връзки и когнитивното функциониране (Lu et al 2003). Като се има предвид сложната регулация на транскрипцията, транслацията и транспорта на BDNF, както и ключовите процеси в които той участва е възможно участието му в различни патологични механизми, чрез които да се повлиява риска от АР.

В настоящето проучване са получени статистически значими резултати за rs16917237, разположен в екзон-интронен район, който до този момент не е бил обект на изследвания и според нашия анализ заслужава да бъде проучван в бъдеще. Получени са допълнителни доказателства за ролята на *BDNF* кандидат гена като предразполагащ фактор в сложната етиология на афективните разстройства, като се допуска приноса, както на синергичност в рамките на идентифицираните хаплотипи, така и на епистатични генетични механизми отговорни за повишен риск от заболяването.

V. 4. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CLOCK*

В кандидат гена *CLOCK*, участващ в регулирането на циркадните ритми е изследван полиморфизма rs3805154. При сравняване на алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли не се откриват статистически значими разлики и при двете фенотипни характеристики. Не е установено и преференциално предаване на някой от алелите на изследвания полиморфизъм, rs3805154 във фамилната извадка независимо от етническата принадлежност. Нашите резултати не подкрепят хипотезата за отношение на изследвания *CLOCK* полиморфизъм към развитие на БАР и УАР и не реплицират данните за положителна асоциация с АР докладвани от предходни изследвания (Mansour, 2005; Mansour, 2006; Mitterauer, 2000). При изследване на генетични варианти в рамките на *CLOCK* гена, полиморфизма rs1801260 (T3111C) е асоцииран с БАР (Benedetti, 2003), и нарушения в съня при пациенти с БАР и депресия (Serretti, 2003; 2005). Открита е асоциация на rs10462028 с БАР, както и асоциация на същия *CLOCK* вариант с УАР като в същото проучване са идентифицирани асоциации и с варианти в други гени, участващи в

регулацията на циркадните ритми (Soria, 2010). Установена е и епистаза с участието на rs11932595, която повлиява разстройствата на съня при пациенти с БАР (Maciukiewicz, 2014).

Изследваният в настоящата извадка генетичен вариант е различен от тези за които са преобладаващите литературни данни за положителна асоциация и нашите резултати не потвърждават влиянието му за развитието на АР. Получените резултати в настоящото проучване подкрепят по-скоро други изследвания (Bailer, 2005; Desan, 2000; Johansson, 2003; Mansour, 2006; Nievergelt, 2006; Serretti, 2003), които също не откриват зависимост между варианти в *CLOCK* кандидат гена и повишен риск от БАР и УАР. За да могат да бъдат направени по-категорични заключения относно ролята а циркадните ритми в етиологията на АР е необходима изследването на повече генетични варианти в *CLOCK* гена, както и в други кандидат гени участващи в регулацията им. Имайки предвид преобладаващите данни в литературата на връзката на циркадните ритми към специфична симптоматика е добре бъдещите изследвания да се провеждат и в по-тясно дефинирани диагностични подгрупи, където предполагаемия ефект, ако има такъв би бил по-ясно изразен. Би трябвало да се има предвид също така, че *CLOCK* гена кодира транскрипционен фактор, който отключва или потиска експресията на редица гени в рамките на денонощието и това негово действие, както и генетични вариации в гените, които се регулират от CLOCK могат да повлияват циркадните ритми и да имат индиректно влияние върху етиологията на АР.

V. 5. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CRH*

В кандидат гена *CRH*, кодиращ кортикотропин освобождаващия фактор или хормон (КОФ), действащ като невромедиатор и синхронизиращ ендокринния отговор при стрес посредством регулация на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек е изследван генетичния вариант rs12721510. Проведеното асоциативно проучване в настоящото изследване не открива статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти на rs12721510 между групите на пациентите и контролите и при двете фенотипни дефиниции.

TDT анализът също не открива преференциално предаване на някои от алелите от родители на пробанди независимо от етноса. Получените резултати в нашето изследване не предполагат съществуването на връзка между rs12721510 и риска от АР и реплицират наличните резултати от друго проучване за липса на асоциация между *CRH* полиморфизми и БАР, (Alda, 2000). При изследване, в което са използвани животински модели (Rhesus macaques) е установено, че изследваният от нас генетичен вариант, rs12721510 участва в хаплотипи, които повишават активността на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек и консумацията на алкохол при маймуни (Barr, 2008).

Регулацията на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек при наличие на стрес се регулира посредством действието на множество генетични фактори, които биха могли да допринасят за етиологията на различни психиатрични заболявания. Няколко изследователски екипи докладват асоциация на полиморфизми и хаплотипи в КОФ рецептор тип 1 (CRHR1) с депресия (Liu, 2013, Schatzbergp 2014, Liu, 2006), и на различни

хаплотипи в КОФ рецептор тип 2 (CRHR2) с опити за самоубийство при пациенти с БАР (De Luca, 2007).

Въпреки че нашите резултати не демонстрират връзка на rs12721510 с повишен риск от АР не трябва да се изключва напълно възможността за наличие на слаб предполагаем риск на изследвания в настоящото проучване вариант, който да допринася в по-голяма степен за развитието на определени симптоми или характерен симптоматичен профил и в по-малка степен за риска от развитието на заболяване от афективния спектър. Също така е възможно повишения риск от определено психиатрично разстройство да се повлиява от епистатични взаимодействия с други генетични варианти. Проучването на повече генетични варианти в различни кандидат гени, участващи в регулацията и функционирането на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек би спомогнало за по-добрата оценка на приноса им към развитието на психиатрични разстройства включително и на АР.

V. 6. Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат гени, свързани с каналопатии

V. 6.1. Дискусия на резултатите за кандидат ген *CACNA1C*

Кандидат-гена *CACNA1C* кодира алфа 1 С субединицата участваща във формирането на голям канал от L тип, който пренася положително заредени Ca^{2+} йони през клетъчната мембрана. В настоящото изследване е генотипиран еднонуклиотидната замяна rs1006737. Интересът към изследване на *CACNA1C* гена във връзка с афективните разстройства е провокиран от получените данни за силна асоциация на генетични варианти разположени в него от няколко геномни асоциативни проучвания (Ferreira, 2008, Sklar, 2008, GWAS Consortium 2011, Lee, 2012). Това става предпоставка да се формулира хипотеза за отношение на калциевите канали към развитието на заболявания от психиатричния спектър. Данни за положителна асоциация на изследваният в настоящата извадка генетичен вариант rs1006737 с БАР е получен при изследване на 1.8 милиона полиморфизма в 4 387 пациенти с БАР и 6 209 здрави индивиди в геномно асоциативно проучване, където за rs1006737 е получен резултат ($p = 7.0\times10^{-8}$) (Ferreira, 2008). Асоциация на полиморфизма rs1006737 е открита също така и в групи с пациенти с шизофрения и рекурентна депресия (Green, 2010). В нашето изследване не се потвърждава наличието на асоциация между изследвания генетичен маркер с БАР и УАР в българската популация. Липсата на статистически разлики в алелните и генотипните честоти между групите на пациентите и контролите в настоящото проучване може да се дължи на сравнително малката извадка, в която е проведено изследването. Наличните данни за асоциация на rs1006737, както и на други генетични варианти в рамките на *CACNA1C* гена в литературата произлизат от геномни асоциативни проучвания, където бройката на включените в анализа индивиди доста надхвърля изследваните от нас, а рискът асоцииран с носителството на съответния алел е сравнително малък (OR=1.21, Ferreira, 2008).

Няколко изследвания демонстрират връзка на изследвания от нас генетичен вариант също така и с когнитивното функциониране както при пациенти така и при здрави индивиди. Алел А е асоцииран с повишена тревожност, наличие на параноидни идеи,

стремеж към избягване на опасни ситуации, висока реактивност при стрес (Roussos, 2011), както и склонност към по-голяма тревожност, депресия, обсесивно-компулсивни мисли и висока чувствителност (Erk, 2010). Същевременно при носителите на този алел се наблюдава затруднена ориентация, която се свързва с намалена активност на определени мозъчни зони, както и по-ниски нива на комуникация между лявата и дясната част на хипокампуса (Thimm, 2010). Генотип A/A е асоцииран с по-лошо представяне при няколко когнитивни задачи, основно свързани с бързи реакции. Тази зависимост е наблюдавана само при пациенти хомозиготни носители на алел A, което съвпада с рецесивно действие на варианта и не се реплицира при близки родственици и контроли (Arts, 2013). Проведеното асоциативно проучване при български пациенти не открива зависимост между алелите на rs1006737 и БАР и УАР, вероятно поради сравнително малкия размер на изследваната група. Поради липса на неврокогнитивни данни за пациентите включени в настоящото проучване не е изследвана евентуалната зависимост между този вариант и определени симптоматични характеристики, каквито често са докладвани.

Алел A на rs1006737 също така е асоцииран и с БАР, протичащо със засилена психотична симптоматика във фамилно изследване (Lett Tap, 2011). При проведеният TDT анализ на семейства от български и ромски произход не се потвърждава връзката между алелите на този генетичен вариант и изследваните фенотипни характеристики. Допълнителните изследвания показват, че резултатите не са повлияни от етническата принадлежност. Липсата на асоциация при изследване на фамилната извадка в настоящето проучване съвпада с резултатите на (Gonzalez, 2013), в които също не се открива зависимост между rs1006737 и БАР в семейства от Мексико, Гватемала и Коста Рика, но са идентифицирани *CACNA1C* хаплотипи имащи връзка с развитие на заболяването. В настоящото изследване не е проведен хаплотипен анализ, тъй като в рамките на *CACNA1C* гена е изследван само един генетичен вариант.

Проучване имащо да цел изследване на функцията на rs1006737 чрез функционален ядрен магнитен резонанс съобщава, че този полиморфизъм както и други варианти скачени с него повлияват нормалното функциониране на мозъка и се допуска, че това може да седи в основата на неврогенетичния риск, открит в някои геномни асоциативни изследвания (Erk, 2010). Генетичниите варианти в гени кодиращи елементи на мембранни канали могат да повлияват нормалното им функциониране и в следствие на това да се подържа по-продължително време затворено или отворено състояние на канала. Това може да доведе до отклонения във вътреклетъчните и външноклетъчните йонни нива, които от своя страна участват активно в междуклетъчната комуникация както и в регулацията на експресията на някои гени.

V. 6.2. Дискусия на резултатите за кандидат ген *ANK3*

Кандидат-генът ANK3 кодира белтъка анкирин, който се свързва със спектрина и актина и участва в пространственото поддържане на клетъчната структура, в процесите на пролиферация, клетъчна подвижност както и в групирането на нормално функциониращи натриеви канали в аксона. В настоящото проучване в рамките на *ANK3* гена са изследвани генетичните варианти rs9804190 и rs10994336. Не са открити и при двата полиморфизма

алелни генотипни или хаплотипни асоциации при широк и тесен афективен статус в проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли. TDT анализът във фамилната извадка не показва преференциално предаване на алелите на rs10994336 в засегнатото поколение, но демонстрира по-рядко предаване на алел T на rs9804190 от родители на пациенти при широк фенотип. Асоциация на rs9804190 с БАР е докладвана в две независими подгрупи в геномно асоциативно проучване (Baum et al., 2008), както и в мета анализ обединяващ в анализа си няколко геномни асоциативни изследвания от Великобритания и САЩ (Ferreira et al., 2008). Налични са данни, сочещи отношението на полиморфизма към развитието на БАР (Schulze, 2009), посттравматичен стресов синдром (Logue, 2013), както и асоциация на rs9804190 съвместно с другия изследван от нас вариант, rs10994336 с БАР, но не и с шизофрения в голяма извадка от скандинавски и шотландски пациенти (Tesli, 2011).

Фамилното изследване установява по-рядко предаване на редкия алел T на rs9804190 от родители на болните деца, което съответства на по-често предаване на алел C. Статистически значими резултати са получени само при широк фенотип, но същата тенденция макар и недостигаща статистическа значимост е наблюдавана и при тесен фенотип. На базата на получените от нас резултати може да предположим, че по-честото предаване на алел C повишава риска от АР, особено от УАР. За алел C на rs9804190 има данни, че е асоцииран с БАР (Schulze, 2009), с ниска експресия на матрична РНК, лоша работна памет и повишена активност на префронталната мозъчна област, както и с повишен риск от развитие на шизофрения (Roussos, 2012). Според друг изследователски екип обаче не се установява асоциация на рисковия алел с промени в бялото вещество и невропсихологични промени (Linke, 2012). Въпреки липсата на статистически значими различия между пациенти и контроли в асоциативното проучване, нашите резултати от фамилната извадка демонстрират евентуален протективен ефект на алел T, заради по-рядкото му унаследяване в пробандите и рисков ефект на по-често предавания алел C при пациентите. В извършеният TDT анализ в двете етнически подгрупи не се установява неравновесно предаване на алелите на генетичния маркер rs9804190 от родители на засегнати индивиди, което най-вероятно се обяснява с факта, че при анализа на по-малка извадка се губи статистическата сила за детекция на слаби ефекти. Независимо от това при TDT анализът на ромските семейства отчетливо се забелязва тенденцията на по-рядко предаване на алел T и по-често предаване на алел C в болното поколение. Възможно е наблюдаваната тенденция да е по-ясно изразена в подгрупата на ромските семейства, тъй като те са генетично по-хомогенна група за разлика от българите, при които заради генетична хетерогенност повече варианти с вероятен по-слаб ефект могат да допринасят за повишен риск от АР.

За другия изследван от нас генетичен вариант rs10994336 в *ANK3* гена освен липса на асоциация с АР от проведеното асоциативно изследване се установява и липса на преференциално предаване на алелите му при фамилния TDT анализ, въпреки наличните литературни данни за връзка на този вариант с БАР (Schulze, 2009, Lett Tap, 2011, Lim, 2014), както и с БАР протичащо без психози (Lett Tap, 2011). Няколко изследвания сочат, че по-високата честота на носителство на алел T повлиява когнитивното функциониране,

като това може да допринася за характерната симптоматика при психиатричните заболявания и да повишава риска от АР. За алел Т е установена асоциация с нарушена способност да се идентифицират дразнители (Ruberto, 2011), със съзнателно избягване на новости и развитие на анхедония (Roussos, 2011) както и с по-ниски нива на възбудимост в определени мозъчни области, в които не се наблюдава такава при здрави контроли (Dima, 2013). Същевременно не е установено носителството на алел Т да повлиява други когнитивни процеси като памет, способност за взимане на решения и интелектуален потенциал (Ruberto, 2011) както и абнормно функциониране на работната памет и промени в интелектуалния потенциал (Hatzimanolis, 2012). При носителите на генотип Т/Т в сравнение с носителите на другите два генотипа Т/С и С/С се наблюдава нужда от повече време за реакция при външни стимули и по-малка прецизност при отговор (Zhang, 2014). Вероятно rs10994336 повлиява в по-голяма степен определени специфични когнитивни функции и няма отношение към други. Промени в когнитивното функциониране са често срещани при пациенти с АР и е възможно именно посредством такива симптоматични промени да се допринася за повишен риск от заболявания от афективния спектър. Възможно е генетичният вариант, rs10994336 да осъществява слаб принос към общия риск от АР и това да е причината да не е открита такава зависимост в настоящото изследване.

V. 7. Дискусия на резултатите, получени при анализ за статистическа епистаза

В настоящото изследване са установени епистатични взаимодействия с участието на 7 от изследваните кандидат гени. Статистически най-значими резултати са получени между *DISC1* и *TPH2*, *SLC6A4* и *TPH2* както и между *DISC1* и *CLOCK* кандидат гените. Логистичната регресия демонстрира най-висока стойност на псевдо R^2=0.05, което показва, че сравнително малка част от вариабилноста на заболяването може да се обясни с установените епистатични взаимодействия. Въпреки това резултатите за някои от епистазите между варианти в *DISC1* и *TPH2* гените остават статистически значими и след консервативната корекция на Бонферони.

DISC1 – TPH2

За кандидат генът *DISC1* са установени най-многобройни участия в епистатични взаимодействия, които указват влияние върху риска от АР като в настоящата извадка са идентифицирани взаимодействия с варианти в *TPH2*, *BDNF*, *CLOCK* и *CRH* гените. Продуктът на *DISC1* гена участва в процеси като неврогенеза, миграция на невроните, цитоскелетни движения, сигнална трансдукция и вътреклетъчен транспорт. Описани са в литературата взаимодействия, между *DISC1* генетичният вариант, rs821616, Ser704Cys и полиморфизми в *COMT* гена (Catechol-O-methyltransferase) (Nicodemus et al., 2007) и между Cys алела на същия *DISC1* полиморфизъм и rs3784859 в *NDE1* (NudE Neurodevelopment Protein 1), (Burdick et al., 2008), които повлияват риска от шизофрения. Освен това в зависимост от наличието на Cys или Ser алели е описан различен капацитет на свързване на DISC1 с NDEL1 и NDE1, взимащи участие в развитието на невроните (Burdick et al., 2008). В нашата извадка е идентифицирана епистаза между алел А (Ser) на несинонимния полиморфизъм, rs821616 и алел G на rs1386483 в *TPH2* при широк

фенотипен модел. Регресионният анализ демонстрира, че самият Ser алел е статистически по-чест при пациенти, но съвместното им присъствие с алел G е по-рядко срещан при болни индивиди, което предполага протективен ефект на епистазата между тях (B= -1.614, p=0.008).

Освен описаната епистаза между *TPH2* rs1386483 и *DISC1* rs821616, същия *TPH2* полиморфизъм взаимодейства и с *DISC1* rs6675281 в настоящата извадка. Идентифицираната епистаза между алел G (rs1386483) и алел C (rs6675281) при широк модел, за разлика от другата установена епистаза с участието на *TPH2* варианта, повишава риска от АР, тъй като съвместното присъствие на двата взаимодействащи си алела е статистически по-често в групата на пациентите.

Няма данни в литературата за директна асоциация на rs1386483 със заболявания от афективния спектър, но е докладвана такава асоциация с други варианти, които са скачени с rs1386483 (Roche, 2009). Този *TPH2* полиморфизъм в зависимост от пола и наличието на стрес повлиява проявата на импулсивност (Stoltenberg, 2012). Същевременно са налични данни, сочещи че хомозиготното носителство на алел A на същия генетичен вариант е свързан с опити за самоубийство, особено в подгрупата с множество опити (Fudalej, 2010). В настоящото изследване са установени две епистатични взаимодействия с противоположен ефект върху фенотипа, епистазата на алел G на rs1386483 с алел C на rs6675281 повишава риска от развитие на АР, докато взаимодействието на същия *TPH2* вариант с алел A на rs821616 има протективен ефект.

Установени са също така и други епистатични взаимодействия с участието на алел C или генотип C/C на rs6675281 в *DISC1* гена и три последователно разположени *TPH2* полиморфизма, (Таблица №37).

До сега не е докладвана от други изследователски групи епистаза с участието на водещия до несинонимна аминокиселинна замяна полиморфизъм, rs6675281 (L607F). Наблюдаваната в настоящата извадка епистаза с *TPH2* вариантите, rs1386483, rs4290270 и rs1872824 повлиява риска от АР в българската популация и по-специално риска от УАР, тъй като получените резултати и за трите идентифицирани епистатични взаимодействия са статистически по-силни при широк фенотипен модел. Въпреки това литературните данни за самостоятелния ефект на rs6675281 показва, че алел T (Phe) е преференциално предаван на пациенти с БАР (Hodgkinson, 2005, Hennah, 2003), а за противоположния алел C (Leu), с който е установена епистаза в нашето изследване е установена преференциална трансмисия на пациенти с шизофрения (Lepagnol-Bestel, 2010), както и асоциация с понижена експресия на къси транскрипти по време на ембрионалното развитие (Nakata, 2009). Генетичният вариант rs6675281 е асоцииран и с промени в обема на сивото вещество в префронтален и темпорален мозъчни дялове (Trost, 2013). Проведеният регресионен анализ не отчита статистически значими единични влияния на алелите и генотипите на rs6675281, участващи в епистазата. Идентифицирани са взаимодействия на алел C или алел C съдържащи *DISC1* генотипи с три последователно разположени генетични варианта в *TPH2* гена, кодиращ скоростопределящата реакция в биосинтезата на серотонин, които повлияват риска от АР в българската популация.

Проведеният регресионен анализ показва епистаза между генотип CC на rs6675281 (*DISC1*) и A/A на rs4290270 (*TPH2*) с протективен ефект при широк фенотипен модел (p=0.02) и статистически гранична зависимост при тесен (0.04). Генотип A/A е по-чест при пациенти с БАР и УАР, което частично потвърждава данните от друго изследване, където са установени високи честоти на хаплотипи съдържащи алел А при жени с УАР (Shen et al 2011). За носителите на алел А има данни и за по-добра реакция на медикаментозна терапия изразяваща се в повишаване на серотониновите нива (Nielsen et al. 2012). Генетичният вариант rs4290270 участва в епистатични взаимодействия в зависимост от пола, повлияващи развитието и на разстройства от аутистичния спектър (Singh, 2013).

Статистическа алелна и генотипна епистаза е установена и между rs6675281 (*DISC1*) и rs1872824 (*TPH2*) при тясна и широка фенотипна характеристика като по-силна зависимост е получени за взаимодействието между алелите (p=0.005, A1 and p=0.004, A2). Алел А (rs1872824, *TPH2*) и генотипите с неговото присъствие са по-чести при пациентите, но в контекста на епистаза с алел С (rs6675281, *DISC1*) се наблюдава протективен ефект.

Може да се обобщи, че резултатите при изследването на епистазата между *DISC1* и *TPH2* кандидат гените показват, че взаимодействията между rs6675281 (DISC1) и rs4290270 и rs1872824 (*TPH2*) проявяват протективен ефект, а епистазата с участието на rs1386483 (*TPH2*) може да има различен ефект върху фенотипа. Генетичният вариант rs1386483 (*TPH2*) допринася за повишен риск от АР при взаимодействие с rs6675281 (*DISC1*) и проявява протективен ефект при взаимодействие с rs821616 (*DISC1*).

Резултатите подкрепят хипотезата, че епистазата между полиморфизми в *DISC1* и *TPH2* гените има вариращ ефект върху фенотипната изява в зависимост от конкретните взаимодействия, в които участват. Участието на генетични варианти в *DISC1* гена в различни епистатични взаимодействия е възможно да обяснява частично от генетична гледна точка разнообразните функции, в които участва продукта на *DISC1* гена, както и връзката на някои от тези взаимодействия към етиологията на АР.

В настоящото изследване се забелязва, че епистатазата при широк фенотипен модел където са включени пациенти с БАР и УАР има по-силно влияние от статистическа гледна точка. Тази тенденция се наблюдава в група от пациенти, при които предразполагащите фактори за развитието на заболяването са генетично по-хетерогенни, което логично предполага точно при тях наличието на такъв род генетични взаимодействия да има по-силно влияние.

DISC1 rs980989 - BDNF rs16917237

Епистаза между 3’ разположения генетичен вариант rs980989 (*DISC1*) и полиморфизми в *BDNF* и *CLOCK* гените също са идентифицирани. Генетичният вариант rs980989 е асоцииран с повишена психомоторна скорост на реакцията (Palo, 2007) и в настоящата фамилна извадка е установено по-рядко предаване на неговият алел Т, както и на хаплотипи с негово присъствие от родители на пациенти (Ivanova MA, 2013A). Регресионният анализ потвърждава тенденцията алел G на rs980989 да е по-чест при

пациенти, съответстващ на по-ниска честота на предаване в поколението на реципрочния алел Т, въпреки че не е достигната статистическа значимост. Реплицирани са също така и резултатите от асоциативното изследване за алел G на rs16917237, което демонстрира по-високите му честоти при пациенти (Ivanova MA , 2013B), регресионния анализ установява същата зависимост (p=0.02, A1; p=0.01, A2). В рамките на епистазата между алел G на rs980989 и алел G на rs16917237 честотата на съвместното им присъствие в контролната група е по-висока, което предполага проявата на протективен ефект при взаимодействието. Друго изследване съобщаващо за по-висока честота на хомозиготното носителство на противоположния на алел G (rs16917237), алел Т при пациенти с булимия с повишено тегло (Gamero-Villarroel, 2014), предполага че този вариант в *BDNF* гена може да е асоцииран със специфична симптоматика характерна както за булимия така и за различни психиатрични разстройства. Вероятно идентифицираната от нас епистаза също се явява модифицираща на предварително установеното от асоциативното изследване действие на rs16917237 варианта и в рамките на епистаза с на rs980989 проявява протективен ефект върху фенотипа. Тъй като *DISC1* и *BDNF* са функционално въвлечени в процесите на растеж, развитие и оцеляване на невроните е възможно наличието на статистическа епистаза да потвърждава съвместната им връзка към етиологията на АР посредством синергично действие.

DISC1 rs980989 - CLOCK rs3805154

За същият вариант на *DISC1* полиморфизма, rs980989 (алел G) е установена и епистаза и с алел С на rs3805154 (*CLOCK*), като при взаимодействащите варианти се наблюдава тенденцията да са с по-ниска честота при пациентите с широка фенотипна характеристика. Алел С на rs3805154 е статистически по-чест при пациентите независимо от разглеждания фенотипен модел (p=0.013, A1 и p=0.007, A2). Генетичният вариант rs980989 е асоцииран с по-висока психомоторна скорост на реакция при пациенти с БАР (Palo, 2007), а настоящите резултати демонстрират евентуален протективен ефект на този полиморфизъм в рамките на епистаза с rs3805154 в *CLOCK* кандидат гена. Потвърждава се връзката на rs980989 към етиологията на АР като се демонстрира и асоциация на идентифицираната епистаза с повишен риск от развитие на УАР.

CLOCK rs3805154 - BDNF rs16917237

Регресионният анализ не показва статистически значима генотипна епистаза между rs16917237 (*BDNF*) и rs3805154 (*CLOCK*), но още веднъж потвърждава резултатите от асоциативното проучване за високи честоти на генотип G/G при пациенти (Ivanova et al., 2013). Установена е алелна епистаза между алел С на rs3805154 и алел G на rs16917237 при тясна фенотипна дефиниция (p=0.028) и статистически гранична зависимост при широк фенотип (p=0.04). Не открихме налични данни за епистаза на rs16917237 в литературните данни, но забелязахме няколко докладвани епистази с участието на функционалния полиморфизъм rs6265, които повлияват риска от БАР и други психиатрични заболявания (Huang et al., 2012), (Montag et al., 2010A), (Montag et al., 2010B), (Xiao et al., 2011), (Yang et al. 2010). Въпреки че в нашата извадка е идентифицирана епистаза с друг *BDNF* полиморфизъм, настоящите резултати предоставят

допълнителни доказателства за участието на генетични варианти в *BDNF* гена в епистатични взаимодействия повлияващи риска от АР и по-специално риска от БАР както е установено в епистазата между rs3805154 и rs16917237.

CRH rs12721510 - DISC1 rs821577 / ANK3 rs9804190

Идентифицирани са и епистатични взаимодействия между *CRH* гена и *DISC1* и *ANK3* гените, които повлияват риска от АР в българската популация.

Честотата на съвместно присъствие на генотип C/C на rs12721510 (*CRH*) и генотип G/G на rs821577 (*DISC1*) е по-висока в групата на пациентите и при двата фенотипа и е установено, че взаимодействието им има повишаващ риска от АР ефект.

Същевременно е установена и епистаза между rs12721510 в *CRH* и rs9804190 в *ANK3* гена с протективен ефект. Алел C на rs9804190 взаимодейства с алел C на rs12721510, като съвместното им присъствие е по-често в групата на здравите контроли.

Получените от нас резултати припокрива съобщеното от (Hennah,.2009) участие на полиморфизма в *DISC1* гена, rs821577 едновременно във взаимодействия, повишаващи или понижаващи риска от БАР. Анализът на епистаза потвърждава връзката на вариант rs821577 в *DISC1* гена с развитие на заболявания от афективния спектър в комбинация с други фактори както е установено и при хаплотипния анализ където са идентифицирани хаплотипи с негово участие имащи отношение към фенотипа на АР в изследваната българска популация. Не е установен статистически значим самостоятелен ефект на rs821577 при българи, въпреки наличните данни при други изследователски екипи за асоциация на този генетичен вариант с БАР и с анхедония (Hennah, 2009; Tomppo, 2009). Ясно разграничим ефект върху фенотипа в изследваната от нас извадка се наблюдава само при епистаза с rs12721510 (*CRH*), както и в рамките на идентифицирани хаплотипи с други *DISC1* варианти.

Противоположният *CRH* алел на този, с който е установена епистаза в нашето изследване е асоцииран с висока социална анхедония (Tompo et al 2009), а генетичният вариант в *ANK3* гена е асоцииран с посттравматично стресово разстройство (Logue et al. 2013), повишен риск от БАР (Schultze et al. 2009), както и ниски нива на експресия на матрична РНК, съответстваща на ниски нива на белтъка анкирин при носителите на алел C (Roussos et al 2012).

В настоящата извадка алел C в rs12721510 при епистаза с алел C в rs9804190, проявяват протективен ефект и при двата афективни статуса, но и регресионния анализ не установява двата генетични варианта, участващи в епистазата самостоятелно да повлияват развитието на АР в изследваната българска извадка. Подобно на нашите резултати няколко скорошни изследвания също потвърждават участието на *ANK3* в различни епистатични взаимодействия и отношението им към повишен риск от БАР (Pandey et al., 2012), (Judy et al., 2013). Настоящото проучване идентифицира връзката на генетичния вариант rs9804190 в *ANK3* гена в епистатични взаимодействия повлияващи риска от АР.

TPH2 rs1386483 - SLC6A4 5-HTTLPR

Освен изброените епистатични взаимодействия, в които участва *TPH2* кандидат гена, той си взаимодейства и с промоторния полиморфизъм, 5-HTTLPR в серотониновия транспортер, който е мишена на някои антидепресанти. Установената епистаза е между носителите на алел G, генотипи G/G и G/A на rs1386483 и генотип L/L на *SLC6A4* и при двата афективни модела като съвместното им присъствие е по-рядко при пациенти, което предполага вероятен протективен ефект. Друг изследователски екип съобщаващ също за наличие на епистаза между *TPH2* гена и промоторния серотонинов полиморфизъм установява влияние върху специфична черта на темперамента и по-специално търсенето на новости при жени с булимия (Thaler, 2013). Съществуват противоречиви литературни данни за епистаза с участието на различни варианти в *SLC6A4* гена. За генотип L/L, за който е установена епистаза в нашата извадка е съобщено че има протективно от стрес действие при взаимодействие с генотип Val/Val в *COMT* гена (Conway, 2010). Същевременно е описан и по-малък обем на сивото мозъчно вещество в амигдалата при епистаза на хомозиготни носители на алел Met в COMT гена и алел S в *SLC6A4* или алел Val в *COMT* и алел L в *SLC6A4* (Conway, 2010). Друг анализ за скаченост установява също така епистаза между алел S в *SLC6A4* и генетичен вариант намиращ се в четвърта хромозома, увеличаващ риска от УАР (Neff, 2010).

Други изследователски екипи докладват, че взаимодействия между полиморфизми в *SLC6A4* и *BDNF* гените повлияват различни психиатрични заболявания и състояния (Wells et al., 2010, Outhred et al., 2012, Pezawas et al. 2008, Grabe et al., 2012). В настоящата извадка не се идентифицира епистаза между изследваните генетични варианти в *SLC6A4* и *BDNF* кандидат гените, но нашите резултати дават допълнителни доказателства, че съвместното действие на генетични варианти в *SLC6A4* кандидат гена с варианти в *TPH2* кандидат гена повлиява психиатричните разстройства в българска популация.

Изследването на епистаза между полиморфизми, потенциално допринасящи за развитието на АР дава възможност да се идентифицират определени комбинации, които при други условия не биха били идентифицирани. Въпреки това при интерпретацията на резултатите трябва да се има предвид, че не винаги съществува директна връзка между наличието на статистическа епистаза и биологичните механизми, които да я обясняват. Идентифицираните епистатични взаимодействия в настоящето изследване могат да послужат като изходна точка за формиране на нови хипотези и провеждането на бъдещи изследвания, в по-тясно дефинирани във фенотипно отношение групи от пациенти и чрез използване на различни изследователски подходи.

V. 8. Обобщени резултати

TPH2

❖ Установени са два по-често предавани хаплотипа (rs111789/rs4290270/rs187282**,** GAG и rs4570625/rs11178998/rs4290270/rs1872824**,** TGAG) на пациенти с участието на асоциираните алел T (rs4570625) с паническо разстройство, алел G (rs11178998) с АР и посттравматичен стресов синдром и алел A (rs4290270) с АР.

❖ Установена е липса на алелна и генотипна асоциация, което може да се дължи на недостатъчна сила на извадката или слабо самостоятелно влияние на изследваните *TPH2* варианти.

❖ Идентифицирани са епистатични взаимодействия между варианти в *TPH2* и *DISC1* гените с протективен и повишаващ риска от АР ефект и протективна епистаза с 5-HTTLPR.

SLC6A4

❖ Установена е алелна и генотипна асоциация за rs12150214, по-висока честота на алел C и генотипи с негово участие при пациенти, съответстващо на доминантен ефект, повишаващ риска от АР или рецесивен протективен ефект на алел G.

❖ Не се потвърждава хипотезата за асоциация с АР на промоторния полиморфизъм 5-HTTLPR. Идентифициран е протективен ефект на L варианта само в контекста на епистаза с rs1386483 (*TPH2*).

DRD2

❖ Установена е по-висока честота на предаване в засегнатото поколение на алел A на rs6589377.

❖ Идентифицирани са няколко неравновесно предавани хаплотипи (rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG са по-често, а rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377 CCTG е по-рядко предаван).

❖ Установено е присъствието на алел C на rs6277 едновременно в по-често и в по-рядко унаследявани хаплотипи като ефекта му върху риска от АР се повлиява от другите участващи варианти.

DISC1

❖ Установено е по-често предаване на алел G на rs980989 на пациенти с АР.

❖ Идентифицирани са следните по-рядко предавани протективни хаплотипи rs3738401/rs6675281/rs821577**,** ATT; rs3738401/rs6675281/rs821577/rs821616, ATTA; rs821577/rs821616/rs980989**,** GAT; rs6675281/rs821577/rs821616/rs980989, CGAT и

един по-често предаван, повишаващ риска от АР хаплотип, rs6675281/rs821577/rs821616, TGT. Хаплотипният анализ реплицира резултатите за rs980989 като повишен риск от АР е свързан с по-често предавани хаплотипи съдържащи алел G, а протективен ефект с по-често предавани хаплотипи с алел T. Алел T (Cys) на rs821616, повлияващ свързването на *DISC1* с транскрипционни фактори участва само в по-често предавания хаплотип, а противоположния алел в по-рядко предаваните.

❖ Анализът за статистическа епистаза демонстрира най-многобройни взаимодействия повлияващи риска от АР с участието на варианти в *DISC1* гена.

BDNF

❖ Установена е асоциация за rs16917237, увеличен риск от АР е наблюдаван при хомозиготно и хетерозиготно носителство на алел G.

❖ Забелязва се тенденция алел C (Val) на rs6265 да е по-чест при болни и се потвърждават данните от друго българско проучване на пациенти с БАР (Yossifova 2011).

❖ Идентифицирани са асоциирани с АР хаплотипи с участието на алел C на rs6265 и алел G на rs16917237, както и протективни хаплотип с алел T на rs12273363. Рискът асоцииран с хаплотипите, въпреки че е силно повлиян от присъствието на rs16917237 не се дължи само на него тъй като резултатите от хаплотипния анализ са статистически по-значими от тези за самостоятелното влияние на rs16917237.

❖ Идентифицирани са протективни епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *CLOCK* гените.

CLOCK

❖ Не се открива асоциация или неравновесно предаване на алелите на rs3805154.

❖ Установена е статистическа епистаза с протективен ефект между rs3805154 и варианти в *DISC1* и *BDNF* гените.

CRH

❖ Не се открива асоциация и неравновесно предаване на алелите на rs12721510 с АР в българската популация.

❖ Идентифицирана е статистическа епистаза, с повишаващ риска от АР ефект при взаимодействие на rs12721510 с варианти в *DISC1* гена и протективен ефект при взаимодействие с варианти в *ANK3* гена.

CACNA1C

❖ Не са открити асоциация и неравновесно предаване на алелите на rs1006737 както и участие в епистатични взаимодействия.

ANK3

❖ Установено е по-често предаване на алел C и по-рядко предаване на алел T на rs9804190 в засегнатото поколение при A2.

❖ Установена е епистаза с протективен ефект с вариант в *CRH* гена.

VI. Изводи

VI.1. Изводи за кандидат-ген ***TPH2***

Изследваните варианти в *TPH2* кандидат гена имат слаб самостоятелен ефект върху риска от АР. Идентифицираните два по-често предавани хаплотипа и епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *SLC6A4* гена показват, че ролята на TPH2 е по-скоро модифицираща, а не определяща риска.

VI.2. Изводи за кандидат-ген ***SLC6A4***

SLC6A4 кандидат ген има принос за повишаване на риска от АР, установен, чрез доказване на доминантния ефект на алел С (rs12150214, интрон 1), но същевременно е отхвърлена хипотезата за връзка на функционалния полиморфизъм 5-HTTLPR с развитие на АР в българската популация.

VI.3. Изводи за кандидат-ген ***DRD2***

Потвърждава се приноса на *DRD2* гена за развитие на АР, идентифицирайки преференциално предаване на алел А (rs6589377, 5'UTR) и няколко по-често предавани хаплотипа с негово участие.

VI.4. Изводи за кандидат-ген ***DISC1***

Подкрепя се връзката на *DISC1* с повишен риск от АР чрез идентифицираните неравновесно предавани хаплотипи, наблюдаваното по-често предаване на алел G на намиращия се в 3'UTR rs980989 както и чрез участието на варианти в гена в множество епистази с различен фенотипен ефект.

VI.5. Изводи за кандидат-ген ***BDNF***

За първи път се открива асоциация на намиращия се в екзон-интронния участък rs16917237 с АР, което заедно с идентифицираните асоциирани хаплотипи и епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *CLOCK* гените потвърждава ролята на *BDNF* варианти за повишен риск от АР.

VI.6. Изводи за кандидат-гените ***CLOCK, CRH*** и ***CACNA1C***

Не се подкрепя хипотезата за самостоятелно влияние на изследваните вариантите в *CLOCK*, *CRH* и *CACNA1C* гените за развитието на АР, но са идентифицирани епистатични взаимодействия с тях с различен ефект върху риска от заболяването, което не позволява отхвърлянето им като кандидат-гени, допринасящи за развитието на заболяването.

VI.7. Изводи за кандидат-ген **ANK3**

По-честото предаване на алел С на rs9804190 (*ANK3*, 3'UTR) на пациенти с АР и установената епистаза с протективен ефект при взаимодействие с вариант в *CRH* гена показва, че *ANK3* гена е свързан с риск от развитие на АР.

VI.8. Общи изводи

VI.8.1. Липсата на асоциация с АР за някои от изследваните варианти може да се дължи на липсващо влияние при български пациенти, на слабата статистическа сила на изследваната кохорта от пациенти и контроли за идентифициране на варианти със слаб ефект, или на тяхното влияние само върху специфична симптоматика, но не и на диагнозата като цяло.

VI.8.2. Наблюдавана е тенденция за статистически по-значими резултати за А2 при анализа на *DRD2* и *ANK3* кандидат гените, дължащо се на по-голямата сила на извадката или на по-силния им ефект при рекурентна депресия. Същевременно статистически по-значими резултати за *BDNF* гена са получени при А1, демонстрирайки по-силното влияние на този ген при БАР.

VI.8.3. Резултатите от анализа за статистическа епистаза, въпреки ограниченията на метода, могат да бъдат използвани за генериране и приоритизиране на хипотези за бъдещи изследвания. Допълнителни анализи на по-тясно дефинирани ендофенотипи и в по-големи извадки могат да предоставят по-детайлна информация.

VII. Научни приноси

VII. 1. Научни приноси с научно-теоретичен характер

❖ Проведено е за първи път асоциативно изследване на генетични варианти в *CLOCK, CRH, CACNA1C* и *ANK3A* кандидат гените в български пациенти с АР и е установено слабото им влияние върху риска от заболяването.

❖ Установена е и е докладвана за пръв път асоциация на rs16917237 в *BDNF* гена с АР.

❖ Описано е неравновесно предаване на хаплотипи с участието на генетични варианти в *TPH2, DRD2* и *DISC1* в български семейства с АР.

❖ Потвърдено е наличието на статистически взаимодействия между алелите и генотипите на някои кандидат гени (*DISC1-TPH2; DISC1-BDNF/CLOCK; CLOCK-BDNF; CRH-DISC1/ANK3; TPH2-SLC6A4*), които повлияват риска от АР.

VII. 2. Научни приноси с потвърдителен характер

❖ Потвърдена е ролята на полиморфизми в *BDNF* гена за предразположение към АР в българската популация.

❖ Потвърждава се ролята на невропластичността в патогенезата на АР на базата на участия на варианти в *DISC1* и *BDNF* гените в много епистатични взаимодействия, както и откритото неравновесно предаване за rs980989 и *DISC1* хаплотипи в засегнатото поколение и идентифицираната асоциация на rs16917237 и *BDNF* хаплотипи с АР.

VIII. Финансиране

Всички изследвания, представени в дисертационния труд са финансирани от следните проекти:

- "Асоциативно изследване на кандидат гени *CACNA1C* и *ANK3* от геномни асоциативни проучвания, при болни с биполярно афективно разстройство в българската популация", МУ-2012г.;

- "Асоциативно проучване на кандидат гени за суицидно поведение при пациенти с различни психиатрични диагнози", МУ-2011г.;

- "Фамилно асоциативно изследване на неврокогнитивни нарушения и *DISC1* ген при болни с биполярно афективно разстройство", МУ-2009г.

Лабораторните изследвания са проведени в Център по молекулна медицина, Катедра по медицинска химия и биохимия, МФ, МУ-София.

IX. Публикации

Публикации, свързани с дисертационния труд, в международни и български списания с импакт фактор

1. Mina A. Ivanova, Tanya N. Christova, Christian S. Kostov, Ivo M. Kremensky, Vanio I. Mitev, Vihra K. Milanova, Radka P. Kaneva Case-control Study of DISC1 Genetic Variants in Bulgarian Affective Disorder Sample 2014, Comptes rendus de l'Acade'mie bulgare des Sciences, Vol 67, No6, pp.863-870, IF=0.198 (2013)

2. Ivanova MA, Kremensky IM, Christova TN, Kostov CS, Milanova VK, Mitev V, Kaneva RP, "Transmission disequilibrium of DISC1 haplotypes in Bulgarian families with affective disorder" Psychiatry Res Sep 30, 2013, IF=3.186, Цитати-1

3. Ivanova MA, Christova TN, Asan TS, Djurova NA, Alexiev SS, Kostov CS, Chorbov VM, Stoyanova VS, Onchev GN, Kancheva DM, Krastev SK, Vladimirova RK, Kremensky IM, Mitev V, Milanova VK, Kaneva RP, " Evidence of an a association between bipolar disorder and rs16917237 in the BDNF gene in a Bulgarian sample." Psychiatr genet., 2013 Jun;23(3):141-2, IF=2.274, Цитати-1

4. Kaneva R, Milanova V, Angelicheva D, Macgregor S, Kosov C, Vladimirova R, Aleksiev S, Angelova M, Stoyanova D, Loh A, Hallmayer J, Kalaydjieva L, Jablensky A, 2009, Bipolar disorder in the Bulgarian gypsies: Genetic heterogeneity in a young founder population, AM J MED Genet & Neuropsychiatric genet, Mar 5: 150B(2):191-201, IF=3.271, Цитати-7

Участия в международни научни форуми

1. Al-Djassem A, Dzhebir G, Ivanova M, Penchev M, Beltcheva O, Mitev V, Milanova V, Kaneva R. Association Study of the Triallelic 5-HTTLPR/rs25531 Polymorphism in the SerotoninTransporter Gene and Affective Disorders, Poster presentation, XXIInd World Congress of Psychiatric Genetics 2014.

2. Kaneva R, Ivanova MA, Christova TN, Kostov CS, Dzhebir G, Djurova NA, Spiridobov SA, Kremensky IM, Mitev VI, Milanova VM, " Association analysis of ANK3 and CACNA1C gene variants in Bulgarian affective disorder patients" Poster presentation, XXIth World Congress of Psychiatric Genetics, Boston, USA, 2013

3. Ivanova MA, Christova TN, Djurova NA, Christova TN, Milanova VK, Mitev V, Kremensky IM and Kaneva RP. "Assosiation studies of DRD2 polymorphisms and affective disorders in case-control and family based study of patients with Bulgarian and Roma origin" Poster presentation, XXth World Congress of Psychiatric Genetics, Hamburg, Germany, 2012

4. Mina Ivanova, Daliya Kancheva, Momchil Nikolov, Tania Hristova, Nikolina Djurova, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremenskyand Radka Kaneva Vanio Mitev "Association of TPH2 G-703T polymorphism and affective disorders revealed by family based association study" Poster presentation, XVIII World Congress on Psychiatric Genetics, Athens, Greece, 2010

5. Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremensky and Radka Kaneva "Association analysis of polymorphisms in serotonine and dopamine related genes and personality traits in Bulgarian subjects" - Poster Presentation, XIVth World Congress on Psychiatric Genetics, Cagliari, Italy – 2006

6. Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremensky and Radka Kaneva "Polymorphisms in serotonine and dopamine related genes and their relationship to personality traits in Bulgarian subjects" Poster Presentation, 7th Balkan Meeting of Human Genetics, Skopje, Macedonia – 2006

7. Radka Kaneva, Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Garabed Barakian, Antoaneta Galabova, Eleonora Nesheva, Ivo Kremensky, Alexandre Todorov, "Association analysis of the 5-HT2A receptor and serotonin and dopamine transporter genes with heroin abuse in Bulgarian subjects", Poster presentation XIIIth World Congress on Psychiatric Genetics, Boston MA, USA – 2005

X. Библиография

1. Aarts E, Roelofs A, Franke B, Rijpkema M, Fernandez G, et al. Striatal dopamine mediates the interface between motivational and cognitive control in humans: evidence from genetic imaging. Neuropsychopharmacology. 2010;35:1943–1951.
2. Abelson JL, Khan S, Liberzon I, Young EA. HPA axis activity in patients with panic disorder: review and synthesis of four studies. Depress Anxiety. 2007;24(1):66-76. Review.
3. Abkevich V, Camp NJ, Hensel CH, Neff CD, Russell DL et al. Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2. Am J Hum Genet. 2003;73:1271-1281.
4. Abou Jamra R, Fuerst R, Kaneva R, Diaz G, Rivas F et al. The first genomewide interaction and locus-heterogeneity linkage scan in bipolar affective disorder: strong evidence of epistatic effects between loci on chromosomes 2q and 6q. Am J Hum Genet. 2007 Nov;81(5):974-86.
5. Adams LJ, Mitchell PB, Fielder SL, Rosso A, Donald JA et al. A susceptibility locus for bipolar affective disorder on chromosome 4q35. Am J Hum Genet. 1998; 62: 1084-91.
6. Adler CM, DelBello MP and Strakowsk SM. Brain Network Dysfunction in Bipolar Disorder. CNS Spectr. 2006; 11(4):312-320.
7. Agid Y, Buzsáki G, et al. How can drug discovery for psychiatric disorders be improved? Nature Reviews Drug Discovery. 2007; 6: 189-201.
8. Ahrens, T., Deuschle, M., Krumm, B., Van Der Pompe, G., Den Boer et al. (2008). Pituitary–adrenal and sympathetic nervous system responses to stress in women remitted from recurrent major depression.Psychosom. Med. 70, 461–467.
9. Akiskal HS, Bourgeois ML, Angst J, et al. Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. J Affect Disord 2000;59(Suppl 1):S5–S30.
10. Alda M, Turecki G, Grof P, Cavazzoni P, Duffy A, Grof E, et al. Association and linkage studies of CRH and PENK genes in bipolar disorder: a collaborative IGSLI study. Am J Med Genet. 2000 Apr 3;96(2):178-81.
11. Al-Djassem A, Dzhebir G, Ivanova M, Penchev M, Beltcheva O et al. Association Study of the Triallelic 5-HTTLPR/rs25531 Polymorphism in the SerotoninTransporter Gene and Affective Disorders, XXIInd World Congress of Psychiatric Genetics 2014.
12. Altshuler LL, Ventura J, van Gorp WG, Green MF, Theberge DC et al. Neurocognitive function in clinical stable men with bipolar I disorder or schizophrenia and normal control subjects. Biol. Psychiatry Oct 15,2004:56(8):560-9
13. American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
14. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed, Washington (DC): American Psychiatric Association; 1994.
15. Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP et al. (2000). Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. Am J Psychiatry. 157(7):1108-14

16. Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. Molecular psychiatry. 2003 Jun;8(6):574-91.
17. Antila M, Tuulio-Henriksson A, Kieseppä T, Soronen P, Palo OM, et al. Heritability of cognitive functions in families with bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. Sep 5, 2007a;144B(6):802-8.
18. Arató M, Bánki CM, Bissette G, Nemeroff CB. Elevated CSF CRF in suicide victims. Biol Psychiatry. 1989 Feb 1;25(3):355-9. PubMed PMID: 2536563.
19. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J En-docrinol 160:1–12.
20. Arias B, Serretti A, Mandelli L, Gastó C, Catalán R et al. Dysbindin gene (DTNBP1) in major depression: association with clinical response to selective serotonin reuptake inhibitors. Pharmacogenet Genomics. 2009
21. Arnone D, McIntosh AM, Ebmeier KP, Munafò MR, Anderson IM, (2012), Magnetic resonance imaging studies in unipolar depression: Systematic review and meta-regression analyses, Eur Neuropsychopharmacol. 2012 Jan;22(1):1-16. Epub 2011 Jul 2.
22. Arts B, Simons CJ, Os Jv. Evidence for the impact of the CACNA1C risk allele rs1006737 on 2-year cognitive functioning in bipolar disorder. Psychiatr Genet. 2013 Feb;23(1):41-2.
23. Ashton H, Young AH. (2003). GABA-ergic drugs: exit stage left, enter stage right. J Psychopharmacol. 17(2):174-8. Review
24. Askland K., Read C., Moore J. (2009) Pathways-based analyses of whole-genome association study data in bipolar disorder reveal genes mediating ion channel activity and synaptic neurotransmission. Hum. Genet. 125 63–79.10.1007
25. Austin C.P, B Kya, L Maa, J.A Morrisa, P.J Shughruea, Expression of disrupted-in-schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development, Neuroscience Volume 124, Issue 1, 2004, Pages 3–10
26. Badenhop RF, Moses MJ, Scimone A, Mitchell PB, Ewen KR et al. A genome screen of a large bipolar affective disorder pedigree supports evidence for a susceptibility locus on chromosome 13q. Mol Psychiatry. 2001; 6: 396-403.
27. Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. Mol Psychiatry 2002; 7: 405–411.
28. Bailer U, Wiesegger G, Leisch F, Fuchs K, Leitner I et al. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders. Eur Neuropsychopharmacol 2005;15:51–55.
29. Barrett JC, Cardon LR. Evaluating coverage of genome-wide association studies.Nat Genet. 38:659-62 (2006).
30. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005 Jan 15;21(2):263-5. Epub 2004 Aug 5.
31. Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W et al. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. Mol Psychiatry. 2008 Feb;13(2):197-207. Epub 2007 May 8.
32. Beaver K, Wright J, DeLisi M, Walsh A, Vaughn M, et al. Behav Brain Funct. 2007; 3: 30.
33. Bellivier F, Golmard JL, Rietschel M, Schulze TG, Malafosse A et al. Age at onset in bipolar I affective disorder: further evidence for three subgroups. Am J Psychiatry. 2003

34. Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Barbini B, Lorenzi C et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2003;123:23–26.
35. Benes FM, Berretta S (2001). GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 25(1):1-27. Review
36. Bennett P, Segurado R, Jones I, Bort S, McCandless F et al. The Wellcome trust UK-Irish bipolar affective disorder sibling-pair genome screen: first stage report. Mol Psychiatry. 2002; 7: 189-200.
37. Bertelsen A, Harvald B& Gauge M (1977). A Danish twin study of manic depressive disorders. Br J of Psychiatry 130:330-351
38. Betcheva ET, Mushiroda T, Takahashi A, Kubo M, Karachanak SK et al. Case-control association study of 59 candidate genes reveals the DRD2 SNP rs6277 (C957T) as the only susceptibility factor for schizophrenia in the Bulgarian population. J Hum Genet. 2009 Feb;54(2):98-107.
39. Bibel M. Barde Y.A. (2000), Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000;14:2919–2937.
40. Bigos K, Mattay V, Callicott J H, Straub R, Vakkalanka R et al. Genetic Variation in CACNA1C Affects Brain Circuitries Related to Mental Illness, Arch Gen Psychiatry. 2010;67(9):939-945
41. Binder D.K. Scharfman H.E. (2004), Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors 2004;22:123–131.
42. Bishop DT, Williamson JA (1990) The power of identityby- state methods for linkage analysis. Am J Hum Genet 46:219-221
43. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, et al. (2001). "Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family". Am. J. Hum. Genet. 69 (2): 428–33.
44. Blackwood DH, Morris SW, McLean A, Whitton C, Thomson M et al. A locus for bipolar affective disorder on chromosome 4p. Nat Genet. 1996; 12: 427-30.
45. Bland RC. Epidemiology of affective disorders: a review. Can J Psychiatry 1997;42:367–377
46. Blier P, Abbott F (2001). Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. J Psychiatry Neurosci 26(1):37-43
47. Bolton JL, Marioni RE, Deary IJ, Harris SE, Stewart MC, et al. Association between polymorphisms of the dopamine receptor D2 and catechol-o-methyl transferase genes and cognitive function. Behav Genet. 2010 Sep;40(5):630-8. doi: 10.1007/s10519-010-9372-y. Epub 2010 Jun 22.
48. Borsotto M., Cavarec L., Bouillot M., Romey G., Macciardi F. et al. (2007) PP2A-bgamma subunit and KCNQ2 K+ channels in bipolar disorder.
49. Bostwick JM, Pankratz VS. Affective Disorders and Suicide Risk: A Reexamination. Am J Psychiatry. 2000; 157:1925-1932
50. Bouchard MF, Bellinger DC, Weuve J, Matthews-Bellinger J, Gilman SE et al. Blood lead levels and major depressive disorder, panic disorder, and generalized anxiety disorder in US young adults. Arch Gen Psychiatry. 2009 Dec;66(12):1313-9.

51. Bowden CL, Calabrese JR, McElroy SL, et al. A randomized, placebo-controlled 12-month trial of divalproex and lithium in treatment of outpatients with bipolar I disorder. Divalproex Maintenance Study Group. Arch Gen Psychiatry 2000;57:481–489.
52. Bradshaw N J and Porteous D J., DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia, Neuropharmacology. 2012 March; 62(3): 1230–1241
53. Brady, Kathleen T.; Sonne, Susan C., The relationship between substance abuse and bipolar disorder., Journal of Clinical Psychiatry, Vol 56(Suppl 3), 1995, 19-24.
54. Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain J-C, Pelling M et al. (2004) Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. Mol Cell Neurosci 25:42–55.
55. Brown, E. S., Suppes, T., Adinoff, B.,&Thomas, N. R. (2001). Drug abuse and bipolar disorder: Comorbidity or misdiagnosis? Journal of Affective Disorders, 65, 105–115
56. Buchman, V. L. and Davies, A. M. (1993). Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival embryonic sensory neurons. Development 118, 989-1001.
57. Burdick KE, Kamiya A, Hodgkinson CA, Lencz T, DeRosse P, Ishizuka K, Elashvili S, Arai H, Goldman D, Sawa A, Malhotra AK. Elucidating the relationship between DISC1, NDEL1 and NDE1 and the risk for schizophrenia: evidence of epistasis and competitive binding. Hum Mol Genet. 2008 Aug 15;17(16):2462-73.
58. Burt VK, Stein K (2002). Epidemiology of depression throughout the female life cycle. J Clin Psychiatry 63 Suppl 7:9-15. Review
59. Cadoret RJ. Evidence for genetic inheritance of primary affective disorder in adoptees. Am. J. Psychiatry. 1978; 135: 463-466.
60. Callicott J., Straub R., Pezawas L,. Egan M, Mattay V et al. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia, Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 June 14; 102(24): 8627–8632.
61. Camara E, Kramer UM, Cunillera T, Marco-Pallares J, Cucurell D, Nager W, et al. The effects of COMT (Val108/158Met) and DRD4 (SNP -521) dopamine genotypes on brain activations related to valence and magnitude of rewards. Cereb Cortex. 2010;20:1985–1996.
62. Cannon TD, Hennah W, Van Erp TG, Thompson PM, Lonnqvist J, Huttunen M, et al. Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory. Arch Gen Psychiatry. 2005; 62:1205–1213.
63. Cardno AG, Rijsdijk FV, Sham PC, Murray RM, McGuffin P. A twin study of genetic relationships between psychotic symptoms. Am J Psychiatry. 2002 Apr;159(4):539-45. PubMed PMID: 11925290.
64. Carless MA, Glahn DC, Johnson MP, Curran JE, Bozaoglu K, Dyer TD, et al. Impact of DISC1 variation on neuroanatomical and neurocognitive phenotypes. Mol Psychiatry. 2011; 16:1096–1104. 1063.
65. Cassidy F, Ahearn EP, Carroll BJ. Substance abuse in bipolar disorder. Bipolar Disord 2001;3:181–188.

66. Cassidy F, Zhao C, Badger J, Claffey E, Dobrin S, Roche S et al. Genome-wide scan of bipolar disorder and investigation of population stratification effects on linkage: support for susceptibility loci at 4q21, 7q36, 9p21, 12q24, 14q24, and 16p13. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Sep 5;144B(6):791-801.
67. Cervilla JA et al. The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Dec 5;141B(8):912-7.
68. Ceulemans S, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, Nordin A, Nilsson LG, et al. Evidence for the involvement of the glucocorticoid receptor gene in bipolar disorder in an isolated northern Swedish population. Bipolar Disord. 2011 Nov-Dec;13(7-8):614-23.
69. Chakirova G, Whalley HC, Thomson PA, Hennah W, Moorhead TW, Welch KA, et al. The effects of DISC1 risk variants on brain activation in controls, patients with bipolar disorder and patients with schizophrenia., Psychiatry Res. 2011 Apr 30;192(1):20-8. Epub 2011 Mar 3.
70. Chen DT, Jiang X, Akula N, Shugart YY, Wendland JR, Steele CJ, et al. Genome-wide association study meta-analysis of European and Asian-ancestry samples identifies three novel loci associated with bipolar disorder. Mol Psychiatry. 2013 Feb;18(2):195-205.
71. Cheng R, Juo SH, Loth JE, Nee J, Iossifov I, Blumenthal R, et al. Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. Mol Psychiatry. 2006 Mar;11(3):252-60.
72. Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, et al. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. Molecular psychiatry. 2005 Aug;10(8):771 81.
73. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. Mol Psychiatry. 2008; 13:36–64.
74. Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Oct 15;99(21):13675-80.
75. Cichon S, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Windemuth C, Strauch K, et al. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. Hum Mol Genet. 2001;10: 2933-44.
76. Cichon S, Winge I, Mattheisen M, Georgi A, Karpushova A, Freudenberg J, et al. Brainspecific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. Human molecular genetics. 2008 Jan 1;17(1):87-97.
77. Clare J. J. (2010) Targeting ion channels for drug discovery. Discov. Med. 9 253–260.
78. Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, et al., A novel functional polymorphism within promoter of the serotonin transporter gene: Possible role in susceptibility to affective disorder., Mol Psychiatry 1996; 1:453-60.
79. Compton MT & Nemeroff CB. The treatment of bipolardepression. J Clin Psychiatry 2000;61(Suppl 9):57–67.

80. Conway CC, Hammen C, Brennan PA, Lind PA, Najman JM. Interaction of chronic stress with serotonin transporter and catechol-O-methyltransferase polymorphisms in predicting youth depression. Depress Anxiety. 2010 Aug;27(8):737-45.
81. Cooper JR, Melcer I, (1961), The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin., J Pharmacol Exp Ther, 132, 265-268
82. Coyle JT, Schwarcz R. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. Arch Gen Psychiatry. 2000;57:90–93.
83. Craddock N, McGuffin P, Owen M. Darier's disease cosegregating with affective disorder. Br J Psychiatry. 1994;165. 272.
84. Craddock N, Sklar P (2009) Genetics of bipolar disorder: successful start to a long journey. Trends Genet 25: 99–105. doi: 10.1016/j.tig.2008.12.002
85. Cross-National Collaborative Group. The changing rates of major depression: cross-national comparisons. JAMA 1992; 268:3098–105.
86. Curtis D, Kalsi G, Brynjolfsson J, McInnis M, O'Neill J, Smyth C, et al. Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. Psychiatr Genet. 2003;13:77-84.
87. Daban C, Vieta E, Mackin P, Young AH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. Psychiatr Clin North Am. 2005 Jun;28(2):469-80. Review. PubMed
88. Dallaspezia S, Benedetti F. Melatonin, circadian rhythms, and the clock genes in bipolar disorder. Curr Psychiatry Rep 2009;11:488-493
89. De Luca V, Mueller DJ, Tharmalingam S, King N, Kennedy JL. Analysis of the novel TPH2 gene in bipolar disorder and suicidality. Molecular psychiatry. 2004 Oct;9(10):896-7.
90. Delbrück SJ, Wendel B, Grunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq MA, et al. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. Cytogenet Cell Genet. 1997;79(3-4):214-20.
91. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. J Clin Psychiatry 2000;61(Suppl 6):7–11.
92. Dell' Osso L, Bianchi C, Del Debbio A et al. (2010), Plasma brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression. Giorn Ital Psicopat 2010; 16: 138–143.
93. Desan PH, Oren DA, Malison R, Price LH, Rosenbaum J, Smoller J, et al.. Genetic polymorphism at the CLOCK gene locus and major depression. Am J Med Genet 2000;96:418–421.
94. Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Berrettini WH, Yoshikawa T, Goldin LR, Turner G, et al. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 5604-9.
95. Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ, Rau NL, et al. Genomewide linkage analyses of bipolar disorder: a new sample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative. Am J Hum Genet. 2003; 73: 107-14.
96. Dima D, Jogia J, Collier D, Vassos E, Burdick KE, Frangou S. Independent modulation of engagement and connectivity of the facial network during affect processing by CACNA1C and ANK3 risk genes for bipolar disorder. JAMA Psychiatry. 2013 Dec;70(12):1303-11.

97. Doehring A, Hentig Nv, Graff J, Salamat S, Schmidt M, Geisslinger G, et al. Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or functionmodulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution. Pharmacogenet Genomics. 2009 Jun;19(6):407-14.
98. Drago A, De Ronchi D, Serretti A: Pharmacogenetics of antidepressant response: an update.Hum Genomics 2009; 3:257-274.
99. Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. Curr Opin Neurobiol. 2001;11:240–249.
100. Dubovsky SL, Murphy J, et al. Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. Am J Psychiatry. 1992;149:118–120.
101. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. Arch Gen Psychiatry 1997;54:597–606.
102. Duman RS. Synaptic plasticity and mood disorders. Mol Psychiatry. 2002;7(Suppl. 1):S29–34.
103. Dunham JS, Deakin JFW, Miyajima F, Payton A, Toro CT (2009): Ex-pression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. J Psychiatr Res 43:1175–1184.
104. Edenberg HJ, Foroud T, Conneally PM, Sorbel JJ, Carr K, et al. Initial genomic scan of the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 3, 5, 15, 16, 17, and 22. Am J Med Genet. 1997; 74: 238-46.
105. Egan MF, Kojima M, Callicott JH et al. (2003), The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 2003; 112: 257–269
106. Ehli EA, Hu Y, Lengyel-Nelson T, Hudziak JJ, Davies GE. 2011. Identifi cation and functional characterization of three novel alleles for the serotonin transporter-linked polymorphic region. Mol Psychiatry
107. Eisenberg DT, Mackillop J, Modi M, Beauchemin J, Dang D, Lisman SA, et al. Examining impulsivity as an endophenotype using a behavioral approach: a DRD2 TaqI A and DRD4 48-bp VNTR association study. Behav Brain Funct. 2007 Jan 10;3:2.
108. Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, et al. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees, Molecular Psychiatry (2004) 9, 1037–1041
109. Ekelund J, Hovatta I, Parker A, Paunio T, Varilo T, Martin R, et al. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families, Hum. Mol. Genet. (2001) 10 (15): 1611-1617.
110. Ekelund J, Lichtermann D, Hovatta I, Ellonen P, Suvisaari J, Terwilliger JD, et al. Genome-wide scan for schizophrenia in the Finnish population: Evidence for a locus on chromosome 7q22. Hum Mol Genet. 2000 Apr 12;9(7):1049-57.
111. Ekholm JM, Kieseppa T, Hiekkalinna T, Partonen T, Paunio T, Perola M, et al. Evidence of susceptibility loci on 4q32 and 16p12 for bipolar disorder. Hum Mol Genet. 2003; 12: 1907-15.
112. Elovainio M, Jokela M, Kivimaki M, Pulkki-Raback L, Lehtimaki T, Airla N, Keltikangas-Jarvinen L. Genetic variants in the DRD2 gene moderate the relationship between stressful life events and depressive symptoms in adults: cardiovascular risk in young Finns study. Psychosom Med. 2007;69:391–395.

113. Erk S, Meyer-Lindenberg A, Schnell K, Opitz von Boberfeld C, Esslinger C, Kirsch P, et al. Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. Arch Gen Psychiatry. 2010 Aug;67(8):803-11.
114. Escriba PV, Ozaita A, Garcia-Sevilla JA (2004). Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. Neuropsychopharmacology. 2004 Aug;29(8):1512-21
115. Evans DL. Bipolar disorder: diagnostic challenges and treatment considerations. J Clin Psychiatry 2000;61(Supp 13):26–31.
116. Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. Psychiatr Genet. 1998; 8: 131-40.
117. Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. Support for the possible locus on chromosome 4p16 for bipolar affective disorder. Mol Psychiatry, 2002; 3: 442-8.
118. Fallin MD, Lasseter VK, Wolyniec PS, McGrath JA, Nestadt G, Valle D, et al. Genomewide linkage scan for bipolar disorder susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families. Am J Hum Genet. 2004; 75: 204-19.
119. Fan H, Zhang F, Xu Y, Huang X, Sun G, Song Y, et al. An association study of DRD2 gene polymorphisms with schizophrenia in a Chinese Han population. Neurosci Lett. 2010 Jun 21;477(2):53-6. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.017. Epub 2009 Nov 12.
120. Fan J, Ionita-Laza I, McQueen MB, Devlin B, Purcell et al. Linkage disequilibrium mapping of the chromosome 6q21-22.31 bipolar I disorder susceptibility locus. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2009 Mar 23
121. Faraone SV, Khan SA. Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. J Clin Psychiatry. 2006;67 Suppl 8:13-20.
122. Feinberg S. (1994). Genetic counseling issues in affective disorders. In Genetic studies in affective disorders, John Wiley & Sons, Inc, pp 146-174
123. Ferketick AK, Schwartzbaum JA, Frid DJ, Moeschberger ML (2000). Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study. National Health and Nutrition Examination Survey. Archives of Internal Medicine 160(9): 1261-8
124. Fernandes B et al. (2009), Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression: A potential adjunctive tool for differential diagnosis. Journal of Psychiatric Research (2009)
125. Fernandes BS, Gama CS, Ceresér KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, et al., (2011), Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis., J Psychiatr Res. 2011 Aug;45(8):995-1004. Epub 2011 May 6.
126. Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. Nat Genet. 2008 Sep;40(9):1056-8.
127. Finkbeiner S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. Neuron. 25(1):11-4. Review
128. Forutan F, Estalji S, Beu M, Nikolaus S, Hamacher K, Coenen HH, et al. (2002). Distribution of 5HT2A receptors in the human brain: comparison of data in vivo and post mortem. Nuklearmedizin. 41(4):197-201

129. Frazer A. Serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors: prediction of clinical effects from in vitro potencies. J Clin Psychiatry. 2001;62 Suppl 12:16-23. Review.
130. Frey B.N, Andreazza, A.C, Ceresér K.M, Martins M.R., Valvassori S.S., Réus G.Z, et al., (2006), Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania, Life Sci 79 (2006) 281–286.
131. Friddle C, Koskela R, Ranade K, Hebert J, Cargill M, Clark CD, et al. Full-genome scan for linkage in 50 families segregating the bipolar affective disease phenotype. Am J Hum Genet. 2000; 66: 205-15.
132. Friedman E, et al. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. Biol Psychiatry. 1993;33:520–525.
133. Frye MA, Ketter TA, Kimbrell TA, Dunn RT, Speer AM, Osuch EAet al. (2000). A placebo-controlled study of lamotrigine and gabapentin monotherapy in refractory mood disorders. J Clin Psychopharmacol. 20(6):607-14
134. Fujiwara Y, Yamaguchi K, Tanaka Y, Tomita H, Shiro Y, Kashihara K, et al. Polymorphism of dopamine receptors and transporter genes in neuropsychiatric diseases. Eur Neurol. 1997;38 Suppl 1:6-10.
135. Furlong RA, Coleman TA, Ho L, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, et al. No association of a functional polymorphism in the dopamine D2 receptor promoter region with bipolar or unipolar affective disorders. Am J Med Genet. 1998;81:385–387.
136. Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic hysiology of central CRH system. Eur J Pharmacol. 2008 Apr 7;583(2-3):215-25.
137. Gao J, Pan Z, Jiao Z, Li F, Zhao G, Wei Q, et al., TPH2 Gene Polymorphisms and Major Depression – A Meta-Analysis, May 31, 2012
138. Garlow S, Mussellman D, Nemeroff C. The neurochemistry of mood disorders The Neurobiology of Mental Illness. New York: Oxford University Press; 1999. pp. 348–364.
139. Gaysina D, Cohen-Woods S, Chow PC, Martucci L, Schosser A, et al. Association of the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) in a bipolar case-control study (BACCS). Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2009 Sep 5;150B(6):836-44.
140. Gella A, Segura M, Durany N, Pfuhlmann B, Stöber G, Gawlik M. Is Ankyrin a genetic risk factor for psychiatric phenotypes? BMC Psychiatry. 2011 Jun 24;11:103.
141. Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook Jr EH. (2004), Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. Am J Psychiatry 2004; 161: 1698–1700.
142. Gerner RH, Fairbanks L, Anderson GM, Young JG, Scheinin M, Linnoila M, et al. CSF neurochemistry in depressed, manic, and schizophrenic patients compared with that of normal controls. Am J Psychiatry. 1984 Dec;141(12):1533-40.
143. Gershon ES, Hamovit J, Guroff JJ et al (1982). A family study of schizo-affective bipolar I, bipolar II, unipolar and normal control probands. Archives of General Psychiatry 39, 1157-1167
144. Ghaemi SN, Rosenquist KJ, Ko JY et al. (2004), Antidepressant treatment in bipolar versus unipolar depression. Am J Psychiatry 161(1):163-165.
145. Gillespie, C. F., and Nemeroff, C. B. (2005). Hypercortisolemia and depression. Psychosom. Med. 67(Suppl. 1), S26–S28.

146. Gilmor ML, Skelton KH, Nemeroff CB, Owens MJ. (2003). The effects of chronic treatment with the mood stabilizers valproic acid and lithium on corticotropin-releasing factor neuronal systems. J Pharmacol Exp Ther. 305(2):434-9
147. Ginns EI, St Jean P, Philibert RA, Galdzicka M, Damschroder-Williams P, Thiel B, et al. A genome-wide search for chromosomal loci linked to mental health wellness in relatives at high risk for bipolar affective disorder among the Old Order Amish. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 15531-6.
148. Glahn DC, Bearden CE, Niendam TA, Escamilla MA. The feasibility of neuropsychological endophenotypes in the search for genes associated with bipolar affective disorder.Bipolar Disord. Jun,2004;6(3):171-82.
149. Glatt K, Glatt H, Lalande M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. Genomics. 1997 Apr 1;41(1):63-9.
150. GO Project. The Gene Ontology: enhancements for 2011. Nucleic Acids Res. 40, D559–D564 (2012)
151. Goenjian AK, Bailey JN, Walling DP, Steinberg AM, Schmidt D, Dandekar U, Noble EP. Association of TPH1, TPH2, and 5HTTLPR with PTSD and depressive symptoms. J Affect Disord. 2012 Nov; 140(3):244-52. Epub 2012 Apr 6.
152. Gonzalez S, Xu C, Ramirez M, Zavala J, Armas R, Contreras SA, et al. Suggestive evidence for association between L-type voltage-gated calcium channel (CACNA1C) gene haplotypes and bipolar disorder in Latinos: a family-based association study. Bipolar Disord. 2013 Mar; 15(2):206-14.
153. Goodwin FK. Jamison KR. Manic-depressive illness. New York: Oxford University Press. 1990; 101–136.
154. Gottesman I, Gould T. The endophenotype concept in psychiatry: Etymology and strategic intentions. Am J Psychiatry 2003; 160:636-645
155. Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate Jr C A, Manji HK. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. Molecular Psychiatry. 2004; 9: 734–755.
156. Grabe HJ, Schwahn C, Mahler J, Appel K, Schulz A, Spitzer C, et al. Genetic epistasis between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and the 5-HTT promoter polymorphism moderates the susceptibility to depressive disorders after childhood abuse. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Mar 30; 36(2):264-70.
157. Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, et al. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. Mol Psychiatry. 2010 Oct; 15(10):1016-22.
158. Green EK, Raybould R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC et al, (2006), Genetic variation of brain-derived neuro-trophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case–control study of over 3000 individuals from the UK. Br J Psychiatry 2006; 188: 21–25.
159. Green MJ, Cahill CM, Malhi GS. The cognitive and neurophysiological basis of emotion dysregulation in bipolar disorder. J Affect Disord. Nov 2007; 103(1-3):29-42.
160. Greenwood TA, Joo E-J, Shektman T, Sadovnick AD, Remick RA, Keck PE, et al. 2012. Association of Dopamine Transporter Gene Variants With Childhood ADHD Features in Bipolar Disorder. Am J Med Genet Part B 162B:137–145.

161. Grigoroiu-Serbanescu M, Diaconu CC, Herms S, Bleotu C, Vollmer J, Mühleisen TW, et al. Investigation of the tryptophan hydroxylase 2 gene in bipolar I disorder in the Romanian population., Psychiatr Genet. 2008 Oct;18(5):240-7.
162. Grohmann M, Hammer P, Walther M, Paulmann N, Büttner A, Eisenmenger Wet al. Alternative splicing and extensive RNA editing of human TPH2 transcripts. PLoS One. 2010 Jan 29;5(1):e8956.
163. Grossman F, Potter WZ (1999). Catecholamines in depression: a cumulative study of urinary norepinephrine and its major metabolites in unipolar and bipolar depressed patients versus healthy volunteers at the NIMH. Psychiatry Res 87(1):21-7
164. Grozeva D, Kirov G, Conrad DF, Barnes CP, Hurles M, Owen MJ, et al. Reduced burden of very large and rare CNVs in bipolar affective disorder. Bipolar Disord. 2013 Dec 15(8):893-8.
165. Gustafsson PE, Gustafsson PA, Ivarsson T, Nelson N. Diurnal cortisol levels and cortisol response in youths with obsessive-compulsive disorder. Neuropsychobiology. 2008; 57(1-2):14-21.
166. Hahn T, Heinzel S, Dresler T, Plichta MM, Renner TJ, Markulin F, et al. Association between reward-related activation in the ventral striatum and trait reward sensitivity is moderated by dopamine transporter genotype. Hum Brain Mapp. 2011; 32: 1557–1565.
167. Hall AC, Brennan A, Goold RG, Cleverley K, Lucas FR, Gordon-Weeks PR, et al. Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. Mol Cell Neurosci. 2002 Jun; 20(2):257-70.
168. Hamshere ML, Bennett P, Williams N, Segurado R, Cardno A, Norton N, et al. Genomewide linkage scan in schizoaffective disorder: significant evidence for linkage at 1q42 close to DISC1, and suggestive evidence at 22q11 and 19p13., Arch Gen Psychiatry. 2005 Oct; 62(10):1081-8.
169. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. J Neurosci. 2003 Jul 30; 23(17):6690-4.
170. Harvey AG. Sleep and circadian rhythms in bipolar disorder: seeking synchrony, harmony, and regulation. The American journal of psychiatry. 2008 Jul; 165(7):820-9.
171. Harvey M, Gagné B, Labbé M, Barden N. Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. Psychiatr Genet. 2007 Feb;17(1):17-22.
172. Harvey M, Shink E, Tremblay M, Gagne B, Raymond C, Labbe M, et al. Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. Molecular psychiatry. 2004 Nov;9(11):9801.
173. Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, et al. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15;15(20):3024-33.
174. Hasler G, Drevets W, Gould T, Gottesman I, Manji H. Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar. Biol Psychiatry. Jul 15, 2006;60(2):93-105.
175. Hattori E, Liu C, Badner JA, Bonner TI, Christian SL, Maheshwari M, et al. Polymorphisms at the G72/G30 gene locus, on 13q33 are associated with bipolar disorder

in two independent pedigree series. American journal of human genetics. 2003 May; 72(5):1131-40.

176. Hatzimanolis A, Smyrnis N, Avramopoulos D, Stefanis CN, Evdokimidis I, Stefanis NC. Bipolar disorder ANK3 risk variant effect on sustained attention is replicated in a large healthy population. Psychiatr Genet. 2012 Aug; 22(4):210-3.
177. Hauser J, Leszczynska A, Samochowiec J, Czerski PM, Ostapowicz A., ChlopockaM, et al. Association analysis of the insertion/deletion polymorphism in serotonin transporter gene in patients with affective disorder. Eur Psychiatry 18(3):129–132.
178. Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, et al. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. Nat Neurosci. 13:327–332.
179. Hayden EP, Klein DN, Dougherty LR, Olino TM, Laptook RS, Dyson MW, et al. The dopamine D2 receptor gene and depressive and anxious symptoms in childhood: associations and evidence for gene-environment correlation and gene-environment interaction. Psychiatr Genet. 2010; 20: 304–310.
180. He M, Yan H, Duan ZX, Qu W, Gong HY, Fan ZL, et al. Genetic distribution and association analysis of DRD2 gene polymorphisms with major depressive disorder in the Chinese Han population. Int J Clin Exp Pathol. 2013 May 15;6(6):1142-9. Print 2013.
181. Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. J Neurochem. 1996 Jun; 66(6):2621-4.
182. Hennah W, Thomson P, McQuillin A, Bass N, Loukola A, Anjorin A, et al. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder, Molecular Psychiatry (2009) 14, 865–873
183. Hennah W, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, et al. A haplotype within the DISC1 gene is associated with visual memory functions in families with a high density of schizophrenia, Mol Psychiatry. 2005 Dec; 10(12):1097-103.
184. Hennah W, Varilo Teppo, Kestilä Marjo, Paunio Tiina, Arajärvi Ritva, Haukka Jari, et al., Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects, Hum. Mol. Genet. (2003) 12 (23): 3151-3159.
185. Hing B, Davidson S, Lear M, Breen G, Quinn J, McGuffin P, et al. (2012), A Polymorphism Associated with Depressive Disorders Differentially Regulates Brain Derived Neurotrophic Factor Promoter IV Activity., Biol Psychiatry. 2012 Jan 18.
186. Hirvonen MM, Laakso A, Någren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of dopamine D2 receptor gene affects striatal DRD2 in vivo availability by changing the receptor affinity. Synapse. 2009 Oct; 63(10):907-12.
187. Hodgkinson C, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane J, Lipsky R, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1): Association with Schizophrenia, Schizoaffective Disorder, and Bipolar Disorder, Am J Hum Genet. 2004 November; 75(5): 862–872.
188. Hofer M, Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., Barde Y.A., (1990), Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain, EMBO J 9 (1990) 2459–2464.
189. Hofer, M. & Barde, Y.-A. (1988). Brain-derived neurotrophic factor prevents death in vivo. Nature, Lond. 331, 261-262.

190. Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. Neuroscience. 2000; 96(4):651-6. Review.
191. Hovatta I, Varilo T, Suvisaari J,. Terwilliger J D, Ollikainen V, Arajärvi R, et al. A Genomewide Screen for Schizophrenia Genes in an Isolated Finnish Subpopulation, Suggesting Multiple Susceptibility Loci, Am J Hum Genet. 1999 October; 65(4): 1114–1124.
192. Huang EJ, Reichardt LF. (2001), Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 2001;24 :677–736.
193. Hummel M, Unterwald EM. D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. J Cell Physiol. 2002 Apr;191(1):17-27.
194. Huuhka K, Anttila S, Huuhka M, Hietala J, Huhtala H, Mononen N, et al. Dopamine 2 receptor C957T and catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphisms are associated with treatment response in electroconvulsive therapy. Neurosci Lett. 2008;448:79–83.
195. IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
196. Ingason A, Rujescu D, Cichon S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Pietilainen OP, et al. Copy number variations of chromosome 16p13.1 region associated with schizophrenia. Mol Psychiatry. 2011; 16:17–25
197. Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Takei K, Suga M, Abe O, et al. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes., Brain Res. 2010 May 17;1331:51-7. Epub 2010 Mar 21.
198. Ivanova MA, Christova TN, Asan TS, Djurova NA, Alexiev SS, Kostov CS, et al. Evidence of an a association between bipolar disorder and rs16917237 in the BDNF gene in a Bulgarian sample. Psychiatr genet., 2013B Jun;23(3):141-2,
199. Ivanova MA, Kremensky IM, Christova TN, Kostov CS, Milanova VK, Mitev V, Kaneva RP, Transmission disequilibrium of DISC1 haplotypes in Bulgarian families with affective disorder, Psychiatry Res Sep 30, 2013A
200. Jamison KR. Suicide and bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2000;61 Suppl 9:47–51.
201. Jernej B, Stefulj J, Hranilovic D, Balija M, Skavic J, Kubat M. Intronic polymorphism of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter: indication for combined effect in predisposition to suicide, J Neural Transm. 2004 Jun;111(6):733-8. Epub 2004 Feb 17.
202. Jiang X, Xu K, Hoberman J, Tian F, Marko AJ, Waheed JF, et al. BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects Neuropsychopharmacology. 2005 Jul;30(7):1353-61.
203. Johansson C, Willeit M, Smedh C, Ekholm J, Paunio T, Kieseppa T, et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. Neuropsychopharmacology 2003;28:734–739.
204. Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P et al. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. Molecular Psychiatry. 1999;4:290–296.

205. Judy JT, Seifuddin F, Pirooznia M, Mahon PB; Bipolar Genome Study Consortium, et al. Converging Evidence for Epistasis between ANK3 and Potassium Channel Gene KCNQ2 in Bipolar Disorder. Front Genet. 2013 May 17;4: 87.
206. Juhasz G, Dunham JS, McKie S, Thomas E, Downey D, Chase D, et al. (2011): The CREB1-BDNF-NTRK2 pathway in depression: Multiple gene-cognition-environment interactions. Biol Psychiatry 69:762–771.
207. Kaalund S S, Newburn E N, Ye T, Tao R, Li C, Deep-Soboslay A, et al. Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain, Molecular Psychiatry , (10 December 2013)
208. Kanazawa T; Glatt S;Kia-Keating B;Yoneda, et al. (2007). Meta-analysis reveals no association of the Val66Met polymorphism of brain-derived neurotrophic factor with either schizophrenia or bipolar disorder, Psychiatric Genetics:June 2007 - Volume 17 - Issue 3 - pp 165-170
209. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res. 40, D109–D114 (2012)
210. Kang E, Burdick KE, Kim JY, Duan X, Guo JU, Sailor KA, et al. Interaction betweenFEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. Neuron.2011; 72:559–571.
211. Karege F, Buresi C, Golaz J, Schwald M, Malafosse A, Decreased expression of Gαs mRNA and protein levels in lithium-treated bipolar affective disorder, Volume 15, Issue 3, pages 191–197, April 2000
212. Katz DA, McHorney CA. The relationship between insomnia and health-related quality of life in patients with chronic illness. J Fam Pract 2002;51:229-235
213. Kaufman, S. (1987) in The Enzymes, eds. Boyer, P. D. & Krebs, E. G.(Academic, Orlando, FL), Vol. 18, pp. 217-282.
214. Keck PE, Jr., McElroy SL, Arnold LM. Bipolar disorder. Med Clin North Am 2001;85:645–61, ix.
215. Kempton MJ, Salvador Z, Munafò MR, Geddes JR, Simmons A, Frangou S, et al. (2011), Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder, Arch Gen Psychiatry. 2011 Jul; 68(7):675-90.
216. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). Journal of the American Medical Association, 2003; Jun 18;289(23):3095-105.
217. Kessler RC, Berglund PA, Demler O, Jin R, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). Archives of General Psychiatry. 2005 B Jun;62(6):593-602.
218. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of twelve-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). Archives of General Psychiatry, 2005 A Jun;62(6):617-27.
219. Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2006 Feb;5(1):109-31. Review.

220. Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2006 Feb;5(1):109-31.
221. Kienast T, Schlagenhauf F, Rapp MA, Wrase J, Daig I, Buchholz HG, et al. Dopamine-modulated aversive emotion processing fails in alcohol-dependent patients. Pharmacopsychiatry. 2013 Jun;46(4):130-6.
222. Kieseppä T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J, Lönnqvist J. High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. Am J Psychiatry. 2004 Oct;161(10):1814-21.
223. Kim HJ, Park HJ, Jung KH, Ban JY, Ra J, Kim JW, et al. Association study of polymorphisms between DISC1 and schizophrenia in a Korean population., Neurosci Lett. 2008 Jan 3;430(1):60-3. Epub 2007 Oct 22.
224. Kim YK, Lee HJ, Yang JC, Hwang JA, Yoon HK., A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder., Behav Genet. 2009 Mar;39(2):170-5. Epub 2009 Jan 9.
225. Kirov G, Ivanov D, Williams NM, Preece A, Nikolov I, Milev R, et al. Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. Biol Psychiatry. 2004 May 15;55(10):971-5.
226. Knable, B.M. Barci, M.J. Webster, J. Meador-Woodruff, E.F. Torrey, (2004), Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley neuropathology consortium, Mol Psychiatry 9 (2004) 609–620
227. Kohn Y, Lerer B. Excitement and confusion on chromosome 6q: the challenges of neuropsychiatric genetics in microcosm. Molecular Psychiatry. 2005; 10: 1062–1073.
228. Kordeli, E., Lambert, S., Bennett, V. Ankyrin-G: a new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. J. Biol. Chem. 270: 2352-2359, 1995.
229. Kosten TR, Kosten TA (2004). New medication strategies for comorbid substance use and bipolar affective disorders. Biol Psychiatry. 56(10):771-7
230. Kraepelin E (1922). Manic Depressive Insanity and Paranoia (trans. R.M. Barclay) Edinburg: E&S. Livingstone
231. Kremeyer B, Herzberg I, Garcia J, Kerr E, Duque C, Parra V, et al., (2006), Transmission distortion of BDNF variants to bipolar disorder type I patients from a south american population isolate, American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics Volume 141B, Issue 5, pages 435–439, 5 July 2006
232. Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, et. al. (2004), No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder in a Japanese population: a multicenter study., Biol Psychiatry. 2004 Sep 1;56(5):376-8.
233. Kupfer DJ, Frank E, Carpenter LL, Neiswanger K (1989). Family history in reccurent depression. J Affect Dis 17: 113-119
234. Lambert D, Middle F, Hamshere ML, Segurado R, Raybould R, Corvin A, et al. Stage 2 of the Wellcome Trust UK-Irish bipolar affective disorder sibling-pair genome screen: evidence for linkage on chromosomes 6q16-q21, 4q12-q21, 9p21, 10p14-p12 and 18q22. Mol Psychiatry. 2005 Sep;10(9):831-41
235. Lander E & Kruglyak L (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genetics 11:241-247

236. Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Feb 5;133B(1):110-5.
237. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J: Strategies for multilocus linkage analysis in humans. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:3443-3446.
238. Lazary J, Lazary A, Gonda X, Benko A, Molnar E, Juhasz G, Bagdy G. New evidence for the association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) haplotypes, threatening life events, and depressive phenotype. Biol Psychiatry. 2008 Sep 15;64(6):498-504.
239. Lee KW, Woon PS, Teo YY, Sim K. Genome wide association studies (GWAS) and copy number variation (CNV) studies of the major psychoses: what have we learnt? Neurosci Biobehav Rev. 2012 Jan;36(1):556-71.
240. Lee M. T., Chen C. H., Lee C. S., Chen C. C., Chong M. Y., Ouyang W. C., et al. (2010) Genome-wide association study of bipolar I disorder in the Han Chinese population. Mol. Psychiatry 16 548–556.10.1038/mp.2010.43
241. Le-Niculescu H., Patel S. D., Bhat M., Kuczenski R., Faraone S. V., Tsuang M. T., et al. (2009) Convergent functional genomics of genome-wide association data for bipolar disorder: comprehensive identification of candidate genes, pathways and mechanisms. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 150B 155–181.10.1002/ajmg.b.30887
242. Lepagnol-Bestel, A; Dubertret, C; Benmessaoud, D; Simonneau, M; Adès, J; et al. Association of DISC1 gene with schizophrenia in families from two distinct French and Algerian populations, Psychiatric Genetics:December 2010 - Volume 20 - Issue 6 - pp 298-303
243. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region., Science. 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.
244. Lett TA, Zai CC, Tiwari AK, Shaikh SA, Likhodi O, Kennedy JL, et al. ANK3, CACNA1C and ZNF804A gene variants in bipolar disorders and psychosis subphenotype., World J Biol Psychiatry. 2011 Aug;12(5):392-7.
245. Licht RW. Drug treatment of mania: a critical review. Acta Psychiatr Scand 1998;97:387–397.
246. Lim CH, Zain SM, Reynolds GP, Zain MA, Roffeei SN, Zainal NZ, et al. Genetic association of LMAN2L gene in schizophrenia and bipolar disorder and its interaction with ANK3 gene polymorphism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Oct 3;54:157-62.
247. Linke J, Witt SH, King AV, Nieratschker V, Poupon C, Gass A, et al. Genome-wide supported risk variant for bipolar disorder alters anatomical connectivity in the human brain. Neuroimage. 2012 Feb 15;59(4):3288-96.
248. Little KY, Ranc J, Gilmore J, Patel A, Clark TB. (1997). Lack of pineal beta-adrenergic receptor alterations in suicide victims with major depression. Psychoneuroendocrinology. 22(1):53-62
249. Liu J, Juo SH, Dewan A, Grunn A, Tong X, Brito M, et al. Evidence for a putative bipolar disorder locus on 2p13-16 and other potential loci on 4q31, 7q34, 8q13, 9q31, 10q21-24, 13q32, 14q21 and 17q11-12. Mol Psychiatry. 2003; 8: 333-42.

250. Liu L, Foroud T, Xuei X, Berrettini W, Byerley W, Coryell W, et al. (2008), Evidence of association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder, Psychiatr Genet. 2008 December ; 18(6): 267–274.
251. Liu Z, Liu W, Yao L, Yang C, Xiao L, Wan Q, et al. Negative life events and corticotropin-releasing-hormone receptor1 gene in recurrent major depressive disorder. Sci Rep. 2013;3:1548.
252. Logue MW, Baldwin C, Guffanti G, Melista E, Wolf EJ, Reardon AF, et al. A genome-wide association study of post-traumatic stress disorder identifies the retinoid-related orphan receptor alpha (RORA) gene as a significant risk locus. Mol Psychiatry. 2013 Aug;18(8):937-42.
253. Lohoff F.W., Sander T., Ferraro T.N., Dahl J.P., Gallinat J., and Berrettini W.H., (2005), Confirmation of Association Between the Val66Met Polymorphism in the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene and Bipolar I Disorder, American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) 139B:51–53 (2005)
254. Lopez VA, Detera-Wadleigh S, Cardona I, Kassem L, McMahon FJ. Nested association between genetic variation in tryptophan hydroxylase II, bipolar affective disorder, an suicide attempts. Biological psychiatry. 2007 Jan 15;61(2):181-6.
255. Lotrich FE, Pollock BG. Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. Psychiatr Genet. 2004 Sep;14(3):121-9.
256. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. Learn Mem. 2003 Mar-Apr;10(2):86-98. Review.
257. Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. (2008), Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. J Neurosci 2008; 28: 10576–10586.
258. Lucki, I. (1998) The spectrum of behaviours influenced by serotonin. Biol. Psychiatry, 44, 151–162.
259. Macgregor S, PM Visscher, SA Knott, P Thomson, DJ Porteous, JK Millar, et al. A genome scan and follow-up study identify a bipolar rdisorder susceptibility locus on chromosome 1q42, Molecular Psychiatry (2004) 9, 1083–1090
260. Maciukiewicz M, Dmitrzak-Weglarz M, Pawlak J, Leszczynska-Rodziewicz A, Zaremba D, Skibinska M, Hauser J. Analysis of genetic association and epistasis interactions between circadian clock genes and symptom dimensions of bipolar affective disorder. Chronobiol Int. 2014 Jul;31(6):770-8.
261. Maedaa K, Nwuliaa E, Changa J, Balkissoona R, Ishizukaa K, Chena H, et al. Differential Expression of Disrupted-in-Schizophrenia (DISC1) in Bipolar Disorder, Biological Psychiatry Volume 60, Issue 9, 1 November 2006, Pages 929–935
262. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. 1996;777:380–387.
263. Maher BS, Marazita ML, Zubenko WN, Spiker DG, Giles DE, Kaplan BB, et al. Genetic segregation analysis of recurrent, early-onset major depression: evidence for single major locus transmission. Am J Med Genet. 2002 Mar 8;114(2):214-21.
264. Maj M. et al. Bipolar Disorder. Chichester, UK:John Wiley & Son Ltd, 2002.
265. Malhi GS, Ivanovski B, Hadzi-Pavlovic D, Mitchell PB, Vieta E, Sachdev P. Neuropsychological deficits and functional impairment in bipolar depression, hypomania and euthymia. Bipolar Disord. Feb-Mar,2007;9(1-2):114-25.

266. Malhotra D, McCarthy S, Michaelson JJ, Vacic V, Burdick KE, Yoon S, et al. High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. Neuron. 2011 Dec 22;72(6):951-63.
267. Mandelman SD, Grigorenko EL. (2012), BDNF Val66Met and cognition: all, none, or some? A meta-analysis of the genetic association., Genes Brain Behav. 2012 Mar;11(2):127-36.
268. Manji H, Potter W. Monoaminergic mechanisms in bipolar disorder. Bipolar disorder: biological models and their clinical application. New York: Dekker; 1997. 1–40.
269. Manji HK and Lenox RH. The nature of bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2000b;61(suppl 13):41
270. Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. Mol Psychiatry. 2002;7(Suppl. 1):S46–56.
271. Manji HK, Lenox RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. Biol Psychiatry. 2000a;48:518–530.
272. Manji HK, Quiroz JA. The underlying neurobiology of bipolar disorder. World Psychiatry. 2003 October; 2(3): 136–146.
273. Mann JJ, Currier D, Murphy L, Huang YY, Galfalvy H, Brent D, et al. No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. Journal of affective disorders. 2008 Feb;106(1-2):117-21.
274. Mann JJ, Currier D, Stanley B, Oquendo MA, Amsel LV, Ellis SP. 2006 Can biological tests assist prediction of suicide in mood disorders? Int. J. Neuropsychopharmacol. 9, 465–474.
275. Mann JJ, Huang Y, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, Kelly TM, Dwork AJ, Arango V. (2000). A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. Arch Gen Psychiatry 57:729–738.
276. Mansour HA, Monk TH, Nimgaonkar VL. Circadian genes and bipolar disorder. Ann Med 2005;37:196–205.
277. Mansour HA, Talkowski ME, Wood J, Pless L, Bamne M, Chowdari KV, et al. Serotonin gene polymorphisms and bipolar I disorder: focus on the serotonin transporter. Ann Med. 2005;37(8):590-602.
278. Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ, et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia Genes, brain, and behavior. 2006 Mar;5(2):150-7.
279. Marcheco-Teruel B, Flint TJ, Wikman FP, Torralbas M, González L, Blanco L, et al. A genome-wide linkage search for bipolar disorder susceptibility loci in a large and complex pedigree from the eastern part of Cuba. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Dec 5;141B(8):833-43.
280. Marnevos A. and Angst J. Bipolar Disorder: 100 years after manic depressive insanity. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.
281. Maron E, Tõru I, Must A, Tasa G, Toover E, Vasar V, et al. Association study of tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in panic disorder. Neurosci Lett. 2007 Jan 16;411(3):180-4. Epub 2006 Nov 22.

282. Martínez-Arán A, Vieta E, Reinares M, Colom F, Torrent C, Sánchez-Moreno J, et al. Cognitive function across manic or hypomanic, depressed, and euthymic states in bipolar disorder. Am J Psychiatry. Feb,2004;161(2):262-70.
283. Maziade M, Bissonnette L, Rouillard E, Martinez M, Turgeon M, Charron L, et al. 6p24-22 region and major psychoses in the Eastern Quebec population. Le Groupe IREP. Am J Med Genet. 1997; 74: 311-8.
284. McClung CA. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. Pharmacol Ther 2007;114:222-232
285. McGuffin P & Katz R (1986). Nature, nurture and affective disorder. In The Biology ofDepression (ed. J.W.F.Deakin), pp 26-51, London: Gaskell
286. McGuffin P, Katz R &Rutherford J (1991). Nature, nurture and depression: a twin study. Psych Medicine 21:329-335
287. McGuffin P, Rijsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A (2003). The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. Arch Gen Psychiatry. 60(5):497-502
288. McInnis M, Dick DM, Willour VL, Avramopoulos D, MacKinnon DF, Simpson SG, et al. Genome-wide scan and conditional analysis in bipolar disorder: evidence for genomic interaction in the National Institute of Mental Health genetics initiative bipolar pedigrees. Biol Psychiatry. 2003 A; 54: 1265-73.
289. McInnis MG, Lan TH, Willour VL, McMahon FJ, Simpson SG, Addington AM, et al. Genome-wide scan of bipolar disorder in 65 pedigrees: supportive evidence for linkage at 8q24, 18q22, 4q32, 2p12, and 13q12. Mol Psychiatry. 2003 B; 8: 288-98.
290. McIntosh AM, Moorhead TW, McKirdy J, Sussmann JE, Hall J, Johnstone EC, et al. Temporal grey matter reductions in bipolar disorder are associated with the BDNF Val66Met polymorphism. Mol Psychiatry. 2007 Oct;12(10):902-3.
291. McQueen MB, Devlin B, Faraone SV. Combined Analysis from Eleven Linkage Studies of Bipolar Disorder Provides Strong Evidence of Susceptibility Loci on Chromosomes 6q and 8q. Am J Hum Genet. 2005 October; 77(4): 582–595.
292. McQueen, M. B.et al.Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q. Am. J. Hum. Genet. 77, 582–595 (2005)
293. McQuillin, A.et al.Analysis of genetic deletions and duplications in the University College London bipolar disorder case control sample. Eur. J. Hum. Genet. 19, 588–592 (2011)
294. Melke J, Landén M, Baghei F, Rosmond R, Holm G, Björntorp P, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women. Am J Med Genet. 2001 Jul 8;105(5):458-63.
295. Mendlewicz J, Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Nöthen MM, et al. Serotonin transporter 5HTTLPR polymorphism and affective disorders: no evidence of association in a large European multicenter study. Eur J Hum Genet. 2004 May;12(5):377-82.
296. Mendlewicz J, Rainer JD. Adoption study supporting genetic transmission in manic-depressive illness. Nature. 1977 Jul 28;268(5618):327–329.
297. Mernea M, Calborean O, Tita A and Mihalescu DF, Pro206Ser and Arg441His mutations influence on human tryptophan hydroxilase 2 activity – a molecular modeling study, Rev. Roum. Chim., 2011, 56(8), 833-841

298. Michael N, Erfurth A, Ohrmann P, Gossling M, Arolt V, Heindel W, Pfleiderer B (2003). Acute mania is accompanied by elevated glutamate/glutamine levels within the left dorsolateral prefrontal cortex. Psychopharmacology (Berl). 168(3):344-6
299. Michalak EE, Wilkinson C, Hood K, Srinivasan J, Dowrick C, Dunn G; (2002). Prevalence and risk factors for depression in a rural setting. Results from the North Wales arm of the ODIN project. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol 37(12):567-71
300. Middleton FA, Pato MT, Gentile KL, Morley CP, Zhao X, Eisener AF, et al. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. Am J Hum Genet. 2004; 74: 886-97.
301. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, et al. (2005) DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signalling. Science 310:1187–1191.
302. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, et al. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. Hum Mol Genet. 2000; 9:1415–1423
303. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.
304. Mitchell AJ (1998). The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review. Neurosci Biobehav Rev 22: 635-51
305. Mitterauer B. Clock genes, feedback loops and their possible role in the etiology of bipolar disorders: an integrative model. Med Hypotheses 2000;55:155–159.
306. Monakhov M, Golimbet V, Abramova L, Kaleda V, Karpov V. Association study of three polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia in the Russian population. Schizophr Res. 2008 Mar;100(1-3):302-7.
307. Montag C, Markett S, Basten U, Stelzel C, Fiebach C, Canli T and Reuter M, Neuropsychopharmacology. Aug 2010; 35(9): 1860–1867.
308. Montag C, Weber B, Fliessbach K, Elger C, Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. Psychol Med. 2009 Nov;39(11):1831-9.
309. Montgomery S. and Cassano G. Management of Bipolar Disorder. London, UK: Martin Dunitz Ltd, 1996.
310. Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagne B, et al. Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. Am J Med Genet. 1999;88:567-87.
311. Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. Eur J Neurosci. 18(12):3367-74
312. Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP (2003) DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. Hum Mol Genet 12:1591–1608.

313. Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, et al. (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. Science 321: 218–223. doi: 10.1126/science.1157657
314. Morton, N. E. (1955) Sequential tests for the detection of linkage. Am J Hum Genet 7: 277-318
315. Mössner R, Walitza S, Geller F, Scherag A, Gutknecht L, Jacob C, et al. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder., Int J Neuropsychopharmacol. 2006 Aug;9(4):437-42. Epub 2005 Sep 7.
316. Muglia P, Petronis A, Mundo E, Lander S, Cate T, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes in bipolar disorder: evidence for a role of DRD4.
317. Muller DJ, de Luca V, Sicard T, King N, Strauss J, Kennedy JL. (2006), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and rapid-cycling bipolar disorder: family-based association study. Br J Psychiatry 2006; 189: 317–323.
318. Müller DJ, Kennedy JL. Genetics of antipsychotic treatment emergent weight gain in schizophrenia. Pharmacogenomics. 2006;7(6):863–887. Review of genetic studies related to antipsychotic-induced weight gain.
319. Muller-Oerlinghausen B, Berghofer A, Bauer M. Bipolar disorder. Lancet 2002;359: 241–247.
320. Munafò MR, Matheson IJ, Flint J. Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. Mol Psychiatry. 2007 May;12(5):454-61. Epub 2007 Jan 9.
321. Murray CJ, Lopez AD (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. Lancet 349:1436-42
322. Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. Molecular psychiatry. 2000 Jan; 5(1):32-28
323. Nakata K, Lipska B, Hyde T, Ye T, Newburn E, Morita Y, et al. DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 15;106(37):15873-8. Epub 2009 Sep 2.
324. Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, et al. (2003), Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder., Neurosci Lett. 2003 Jan 30;337(1):17-20.
325. Nanavati D, Austin DR, Catapano LA, Luckenbaugh DA, Dosemeci A, Manji HK, et al. The effects of chronic treatment with mood stabilizers on the rat hippocampal post-synaptic density proteome. J Neurochem. 2011;119:617–629.
326. Neff CD, Abkevich V, Potter J, Riley R, Shattuck D, Katz DA. Evidence for epistasis between SLC6A4 and a chromosome 4 gene as risk factors in major depression. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):321-2.
327. Neumeister A, Willeit M, Praschak-Rieder N, Asenbaum S, Stastny J, Hilger E, Pirker W, et al. (2001). Dopamine transporter availability in symptomatic depressed patients with seasonal affective disorder and healthy controls. Psychol Med. 31(8):1467-73

328. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F & Kennedy JL. (2002), The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. Am J Hum Genet 2002; 71: 651−655.
329. Newton J. R. (2007) Linked gene ontology categories are novel and differ from associated gene ontology categories for the bipolar disorders. Psychiatr. Genet. 17 29–34.10.1097
330. Ng, M. Y.et al.Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. Mol. Psychiatry 14, 774–785 (2009).
331. Nicodemus KK, Kolachana BS, Vakkalanka R, Straub RE, Giegling I, Egan MF, Rujescu D, Weinberger DR. Evidence for statistical epistasis between catechol-O-methyltransferase (COMT) and polymorphisms in RGS4, G72 (DAOA), GRM3, and DISC1: influence on risk of schizophrenia. Hum Genet. 200 Feb;120(6):889-906
332. Nievergelt CM, Kripke DF, Barrett TB, Burg E, Remick RA, Sadovnick AD, et al. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2006;141:234–241.
333. Nwulia EA, Miao K, Zandi PP, MacKinnon D, DePauloJr RJ, McInnis MG. Genome-wide scan of bipolar II disorder. Bipolar Disord. 2007; 9: 580-588.
334. Ogilvie A. D., Battersby S., BubbV. J., Fink G., Harmar A. J., Goodwin G. M., Smith, et al. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression, Lancet 347: 731-733, 1996.
335. Ott J. Analysis of Human Genetic Linkage, Third Edition: The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1999. Pp. 405.
336. Outhred T, Das P, Dobson-Stone C, Griffiths K, Felmingham KL, Bryant RA, Malhi G, Kemp AH. The functional epistasis of 5-HTTLPR and BDNF Val66Met on emotion processing: a preliminary study. Brain Behav. 2012 Nov;2(6):778-88.
337. Overington J. P., Al-Lazikani B., Hopkins A. L. (2006) How many drug targets are there? Nat.Rev. Drug. Discov. 5 993–996.10.1038
338. Owens MJ, Nemeroff CB (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: Focus on the serotonin transporter. Clin Chem 40:288–295
339. Ozeki Y, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, et al. (2003) Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. Proc Natl Acad Sci U S A 100:289–294.
340. Palo OM, Antila M, Silander K, Hennah W, Kilpinen H, Soronen P, et al. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments., Hum Mol Genet. 2007 Oct 15;16(20):2517-28. Epub 2007 Aug 2.
341. Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, et al. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. J Neurosci. 2006;26:2599–2613.
342. Pandey A, Davis NA, White BC, Pajewski NM, Savitz J, Drevets WC, McKinney BA. Epistasis network centrality analysis yields pathway replication across two GWAS cohorts for bipolar disorder. Transl Psychiatry. 2012 Aug 14;2:e154.
343. Papadimitriou GN, Dikeos DG, Karadima G, Avramopoulos D, Daskalopoulou EG, Vassilopoulos D, et al. Association between the GABA(A) receptor alpha5 subunit gene

locus (GABRA5) and bipolar affective disorder. American journal of medical genetics. 1998 Feb 7;81(1):73-80.

344. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. 1937 [classical article]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1995; 7:103-112
345. Partonen, T.; Magnusson, A. Seasonal Affective Disorder. Oxford University Press; Oxford: 2001.
346. Pato CN, Pato MT, Kirby A, Petryshen TL, Medeiros H, Carvalho C et al. Genome-wide scan in Portuguese Island families implicates multiple loci in bipolar disorder: fine mapping adds support on chromosomes 6 and 11. Am J Med Genet. 2004; 127B: 30-4.
347. Paul IA, Skolnick P (2003). Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. Ann N Y Acad Sci. 1003250-72.
348. Penninx, B. W., Beekman, A. T., Bandinelli, S., Corsi, A. M., et al. (2007). Late-life depressive symptoms are associated with both hyperactivity and hypoactivity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis.Am. J. Geriatr. Psychiatry15, 522–529.
349. Penrose LN (1935). The detection of autosomal linkage in data that consists of pairs of brothers or sisters of unspecified parentage. Ann Eugen 8: 133-138.
350. Penza KM, Heim C, Nemeroff CB (2003). Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety. Arch Women Ment Health. 6(1):15-22
351. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Goldman AL, Verchinski BA, Chen G, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. Mol Psychiatry. 2008 Jul;13(7):709-16.
352. Pezet S. McMahon S.B., (2006), Neurotrophins: mediators and modulators of pain. Annu. Rev. Neurosci. 2006;29:507–538.
353. Pohjalainen T, Rinne JO, Någren K, Syvälahti E, Hietala J. Sex differences in the striatal dopamine D2 receptor binding characteristics in vivo. Am J Psychiatry. 1998 Jun;155(6):768-73.
354. Price JL. Prefrontal cortical networks related to visceral function and mood. Ann N Y Acad Sci. 1999; 877:383-396.
355. Priebe, L.et al.Genome-wide survey implicates the influence of copy number variants (CNVs) in the development of early-onset bipolar disorder. Mol. Psychiatry 17, 421–432 (2011)
356. Pröschel M, Saunders A, Roses AD, Müller CR. Dinucleotide repeat polymorphism at the human gene for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Hum Mol Genet. 1992 Aug;1(5):353.
357. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. (2007), Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. Genomics 2007; 90: 397–406.
358. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. American Journal of Human Genetics, 81.

359. Qu M, Tang F, Yue W, Ruan Y, Lu T, Liu Z, et al. Positive association of the Disrupted-in-Schizophrenia-1 gene (DISC1) with schizophrenia in the Chinese Han population., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Apr 5;144B(3):266-70.
360. Rajkowska G, Postmortem Studies in Mood Disorders Indicate Altered Numbers of Neurons and Glial Cells, Dysfunction in neural circuits involved in the pathophysiology of mood disorders, Biol Psychiatry 767 2000;48:766 –777
361. Ram Murthy A, Purushottam M, Kiran Kumar HB, ValliKiran M, Krishna N, Jayramu Sriharsha K, et al. Gender-specific association of TSNAX/DISC1 locus for schizophrenia and bipolar affective disorder in South Indian population. J Hum Genet. 2012 Aug;57(8):523-30.
362. Rasch B, Papassotiropoulos A, de Quervain DF. Imaging genetics of cognitive functions: Focus on episodic memory. Neuroimage. 2010 Nov 15;53(3):870-7.
363. Regier D, Farmer M E, Rae D, Locke B, Comorbidity of Mental Disorders With Alcohol and Other Drug Abuse, Results From the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study, 1990;264(19):2511-2518.
364. Rice J, Reich T, Andreasen NC et al (1987). The familial transmission of bipolar illness. Arch Gen Psychiatry 44: 441-447
365. Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin DY, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium., Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci., Nat Genet. 2011 Sep 18;43(10):969-76.
366. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases Science. 1996; 273: 1516-1517.
367. Robb AS. Bipolar disorder in children and adolescents. Curr Opin Pediatr 1999;11: 317–322.
368. Robinson L, Thompson J, Gallagher P et al. A meta-analysis of cognitive deficits in euthymic patients with bipolar disorder. Journal of Affective Disorders,2006B; 93:105-115
369. Robinson LJ, Ferrier IN. Evolution of cognitive impairment in bipolar disorder: a systematic review of cross-sectional evidence. Bipolar Disord. Apr, 2006A;8(2):103-16.
370. Roche S, McKeon P. Support for tryptophan hydroxylase-2 as a susceptibility gene for bipolar affective disorder. Psychiatr Genet. 2009 Jun;19(3):142-6.
371. Rothbaum BO, Astin MC. Integration of pharmacotherapy andpsychotherapy for bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2000;61(Suppl 9):68–75.
372. Roussos P, Giakoumaki SG, Georgakopoulos A, Robakis NK, Bitsios P., The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males., Bipolar Disord. 2011 May;13(3):250-9.
373. Roybal K, Theobold D, Graham A, Dinieri JA, Russo SJ, Krishnan V, et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007
374. Ruberto G, Vassos E, Lewis CM, Tatarelli R, Girardi P, Collier D, Frangou S. The cognitive impact of the ANK3 risk variant for bipolar disorder: initial evidence of selectivity to signal detection during sustained attention. PLoS One. 2011 Jan 31;6(1):e16671.
375. Rucker, J. J.et al.Genome-wide association analysis of copy number variation in recurrent depressive disorder. Mol. Psychiatry 1 Nov 2011

376. Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. Biochim Biophys Acta. 1993 Oct 4;1144(3):249-63.
377. Rybakowski JK, (2008). BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia, Pharmacogenomics. 2008 Nov;9(11):1589-93.
378. Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Skibinska M, Hauser J. (2003), Polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive prefrontal test in bipolar patients. Bipolar Disord 2003; 5: 468–472.
379. Sachs NA, Sawa A, Holmes SE, Ross CA, DeLisi LE, Margolis RL., A frameshift mutation in Disrupted in Schizophrenia 1 in an American family with schizophrenia and schizoaffective disorder., Mol Psychiatry. 2005 Aug;10(8):758-64.
380. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry. 2000; Vol. 57 pp. 925–935.
381. Savitz J., van der Merwe L, Solms M, Ramesar R. Neurocognitive function in an extended Afrikanerancestry family with affective illness. J Psychiatry Neurosci 2007;32(2):116-20.
382. Schatzberg AF, Keller J, Tennakoon L, Lembke A, Williams G, Kraemer FB, Sarginson JE, Lazzeroni LC, Murphy GM. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. Mol Psychiatry. 2014 Feb;19(2):220-7.
383. Scheuch, K., Lautenschlager, M., Grohmann, M., Stahlberg, S., Kirchheiner, J., Zill, P., et al. (2007) Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons. Biol. Psychiatry
384. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. Nat Genet. 2011 Sep 18;43(10):969-76.
385. Schulz P, Steimer T. Neurobiology of circadian systems. CNS Drugs 2009;23(Suppl. 2):3-13
386. Schulze T. G., Detera-Wadleigh S. D., Akula N., Gupta A., Kassem L., Steele J., et al. (2009) Two variants in ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. Mol. Psychiatry 14 487–491.10.1038
387. Schumacher A, Becker T, Rujescu D, Quednow BB, Lennertz L, Wagner M, et al. Investigation of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) in schizophrenia and in the response to antipsychotics. J Psychiatr Res. 2012 Aug;46(8):1073-80.
388. Schumacher J, Kaneva R, Abou Jamra R, Diaz GO, Ohlraun S, Milanova V, et al. Genomewide scan and fine-mapping linkage studies in four European samples with bipolar affective disorder suggest a new susceptibility locus on chromosome 1p35-p36 and provides further evidence of loci on chromosome 4q31 and 6q24. Am J Hum Genet. 2005 Dec;77(6):1102-11.
389. Schurov I L, Handford E J, Brandon N J, Whiting P J, Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment, Molecular Psychiatry (2004) 9, 1100–1110.
390. Scott L. J., Muglia P., Kong X. Q., Guan W., Flickinger M., Upmanyu R., et al. (2009) Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

391. Sears C, Markie D, Olds R, Fitches A, (2011), Evidence of associations between bipolar disorder and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene, Bipolar Disord. 2011 Nov-Dec;13(7-8):630-7.
392. Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger Jr JI et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. Am J Hum Genet. 2003; 73: 49–62.
393. Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2003;121:35–38.
394. Serretti A, Chiesa A, Porcelli S, Han C, Patkar AA, Lee SJ, et al. Influence of TPH2 variants on diagnosis and response to treatment in patients with major depression, bipolar disorder and schizophrenia. Psychiatry Res. 2011 Aug 30;189(1):26-32.
395. Serretti A, Cusin C, Benedetti F, Mandelli L, Pirovano A, Zanardi R, et al. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005;137:36–39.
396. Serretti A, Mandelli L. The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. Molecular psychiatry. 2008 Aug;13(8):742-71.
397. Shea A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M (2005). Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. Psychoneuroendocrinology. 30(2):162-78. Review
398. Shen X, Wu Y, Qian M, Wang X, Hou Z, Liu Y, et al. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depressive disorder in a female Chinese population. J Affect Disord. 2011 Oct;133(3):619-24.
399. Sher L, Carballo JJ, Grunebaum MF, Burke AK, Zalsman G, Huang YY, et al. 2006 A prospective study of the association of cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels with lethality of suicide attempts in patients with bipolar disorder. Bipolar Disord. 8, 543–550.
400. Shibata H, Aramaki T, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, et al. Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. Psychiatry Res. 2006 Jan 30;141(1):39-51. Epub 2005 Dec 1.
401. Shink E, Morissette J, Sherrington R, Barden N. A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. Mol Psychiatry. 2005;10: 545-52.
402. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. (2002), Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. J Neurosci 2002; 22: 3251–3261.
403. Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.D., Xie, Z., Gleeson, J.G., Tsai, L.H. (2004) Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. Neuron, 44, 263–277.
404. Shulman KI & Tohen M. Unipolar mania reconsidered: evidence from an elderly cohort. Br J Psychiatry 1994;164:547–549
405. Simonsen C, Sundet K, Vaskinn A, Birkenaes A, Engh J A, Hansen C, et al. Neurocognitive profiles in bipolar I and bipolar II disorder: differences in pattern and

magnitude of dysfunction., Bipolar Disorders Volume 10, Issue 2, pages 245–255, March 2008

406. Singh AS, Chandra R, Guhathakurta S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, et al. Genetic association and gene-gene interaction analyses suggest likely involvement of ITGB3 and TPH2 with autism spectrum disorder (ASD) in the Indian population. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013 Aug 1;45:131-43.
407. Sjoholt G, Ebstein RP, Lie RT, Berle JO, Mallet J, Deleuze JF, et al. Examination of IMPA1 and IMPA2 genes in manic-depressive patients: association between IMPA2 promoter polymorphisms and bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2004 Jun;9(6):621-9.
408. Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, Slopien A, Zakrzewska M, Rybakowski JK. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. World J Biol Psychiatry. 2004 Oct;5(4):215-20.
409. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim Y-, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neutrophic factor. Mol Psychiatry. 2002;7(6):579-93.
410. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim Y-M, Tsan G, et al. (2002), JR DePaulo and ES Lander, Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus, Molecular Psychiatry (2002) 7, 579–593
411. Sklar P, Smoller JW, Fan J, Ferreira MA, Perlis RH, Chambert K, et al. Whole-genome association study of bipolar disorder. Mol Psychiatry. 2008 Jun;13(6):558-69.
412. Skolnick P, Layer RT, et al. Adaptation of N-methyl-Daspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. Pharmacopsychiatry. 1996;29:23–26.
413. Skolnik RL. Essentials of global health. Jones & Bartlett Publishers. 2007; 217-218.
414. Slater E & Cowie V (1971). The genetics of Mental Disorder. London: Oxford University Press
415. Smith E. N., Bloss C. S., Badner J. A., Barrett T., Belmonte P. L., Berrettini W., et al. (2009) Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. Mol. Psychiatry 14 755–763.10.1038
416. Smoller JW, Rosenbaum JF, Biederman J, Kennedy J, Dai D, Racette SR, et al. Association of a genetic marker at the corticotropin-releasing hormone locus with behavioral inhibition. Biol Psychiatry. 2003 Dec 15;54(12):1376-81. PubMed PMID: 14675801.
417. Soares JC & Mann JJ. The functional neuroanatomy of mood disorders. J Psychiatr Res 1997; 31:393–432.
418. Song W, Li W, Feng J, Heston LL, Scaringe WA, Sommer SS. Identification of high risk DISC1 structural variants with a 2% attributable risk for schizophrenia. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Mar 14;367(3):700-6.
419. Soria V, Martínez-Amorós E, Escaramís G, Valero J, Pérez-Egea R, García C, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and CLOCK and VIP with bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 2010 May;35(6):1279-89.

420. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. Am J Hum Genet. 1996 Nov;59(5):983-9.
421. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet. 1993 Mar;52(3):506-16.
422. Spijker AT, van Rossum EFC. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Annals of the New York Academy of Sciences 2009; 1179:199e215.
423. Stahl SM, Wise DD. The Potential Role of a Corticotropin-Releasing Factor Receptor-1 Antagonist in Psychiatric Disorders. CNS Spectr. 2008;13(6):467-472,476-483
424. Stelzer G., Dalah I., Iny Stein T., Satanower Y., Rosen N., Nativ N., et al. (2011) In-silico human genomics with GeneCards. Hum. Genomics 6 709–717
425. Stoltenberg SF, Christ CC, Highland KB. Serotonin system gene polymorphisms are associated with impulsivity in a context dependent manner. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Oct 1;39(1):182-91.
426. Stout SC, Owens MJ, Nemeroff CB (2002). Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. J Pharmacol Exp Ther. 300(3):1085-92
427. Strakowski SM, DelBello MP and Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. Molecular Psychiatry. 2005; 10, 105–116.
428. Strauss J, Barr CL, George CJ, Devlin B, Vetró A, Kiss E, Baji I, King N,Shaikh S, Lanktree M, Kovacs M, Kennedy JL. Brain-derived neurotrophic factor variants are associated with childhood-onset mood disorder: confirmation in a Hungarian sample. Mol Psychiatry. 2005 Sep;10(9):861-7.
429. Strobel A, Dreisbach G, Müller J, Goschke T, Brocke B, Lesch KP. Genetic variation of serotonin function and cognitive control. J Cogn Neurosci. 2007 Dec;19(12):1923-31.
430. Su S, Zhao J, Bremner JD, Miller AH, Tang W, Bouzyk M, et al. Serotonin transporter gene, depressive symptoms, and interleukin-6. Circ Cardiovasc Genet. 2009 Dec;2(6):614-20.
431. Suppes T, Dennehy EB, Gibbons EW. The longitudinal course of bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2000;61(Suppl 9):23–30.
432. Swagell CD, Lawford BR, Hughes IP, Voisey J, Feeney GF, van Daal A, et al. DRD2 C957T and TaqIA genotyping reveals gender effects and unique low-risk and high-risk genotypes in alcohol dependence. Alcohol Alcohol. 2012 Jul-Aug;47(4):397-403.
433. Swann AC, Petty F, Bowden CL, Dilsaver SC, Calabrese JR, Morris DD (1999). Mania: gender, transmitter function, and response to treatment. Psychiatry Res. 88(1):55-61
434. Swart M, Bruggeman R, Laroi F, Alizadeh BZ, Kema I, Kortekaas R, et al. COMT Val158Met polymorphism, verbalizing of emotion and activation of affective brain systems. Neuroimage. 2011;55:338–344.
435. Szabo ST, Blier P (2002). Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake inhibition plus 5-HT(2A) receptor antagonism on the firing activity of norepinephrine neurons. J Pharmacol Exp Ther. 302(3):983-91
436. Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarz M, Wilkosc M, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with

major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. J Affect Disord. 2011 Nov;134(1-3):138-44.

437. Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguez P., et al. (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucleic Acids Res. 39 D561–D568.10.1093
438. Talati A, Bao Y, Kaufman J, Shen L, Schaefer CA, Brown AS. Maternal smoking during pregnancy and bipolar disorder in offspring. Am J Psychiatry. 2013 Oct 1;170(10):1178-85.
439. Talbot K, Eidem WL, Tinsley CL, Benson MA, Thompson EW, et al. Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia J Clin Invest. 2004 May;113(9):1353-63.
440. Tamam, L., Ozpoyraz, N. (2002). Comorbidity of anxiety disorder among patients with Bipolar I Disorder in remission. Psychopathology, 35, 203–209
441. Tang J, Xiao L, Shu C, Wang G, Liu Z, Wang X, et al., (2008), Association of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder with early age of onset in mainland China., Neurosci Lett. 2008 Mar 12;433(2):98-102. Epub 2008 Jan 10.
442. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. (2005), ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J Neurosci 2005;25:5455–5463.
443. Tesli M, Koefoed P, Athanasiu L, Mattingsdal M, Gustafsson O, Agartz I, et al. Association analysis of ANK3 gene variants in nordic bipolar disorder and schizophrenia case-control samples. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2011 Dec;156B(8):969-74.
444. Thaler L, Groleau P, Joober R, Bruce KR, Israel M, Badawi G, et al. Epistatic interaction between 5HTTLPR and TPH2 polymorphisms predicts novelty seeking in women with bulimia nervosa spectrum disorders. Psychiatry Res. 2013 Jun 30;208(1):101-3.
445. Thase ME. Antidepressant treatment of the depressed patient with insomnia. J Clin Psychiatry 1999;60(Suppl. 17):28-31
446. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature 447: 661-678 (2007).
447. The World Health Organisation 2008, The World Health Report.
448. Thimm M, Kircher T, Kellermann T, Markov V, Krach S, Jansen A, et al. Effects of a CACNA1C genotype on attention networks in healthy individuals. Psychol Med. 2011 Jul;41(7):1551-61.
449. Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. Science 270:593–598.
450. Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. Pharmacogenetics. 1997 Dec;7(6):479-84.
451. Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ., Association between genotype at an exonic SNP in DISC1 and normal cognitive aging., Neurosci Lett. 2005 Nov 25;389(1):41-5.

452. Tomppo L, Hennah W, Miettunen J, Järvelin MR, Veijola J, Ripatti S, et al. Association of variants in DISC1 with psychosis-related traits in a large population cohort., Arch Gen Psychiatry. 2009 Feb;66(2):134-41.
453. Torgersen S (1986). Genetic factors in moderately severe and mild affective isorders. Arch of Gen Psychiatry 43:222-226
454. Torrent C, Martínez-Arán A, Daban C, Sánchez-Moreno J, Comes M, Goikolea JM, et al. Cognitive impairment in bipolar II disorder. Br J Psychiatry. Sep,2006;189:254-9.
455. Torrent C., Martínez-Arán A., Amann B., Daban C., Tabarés-SeisDedos R., González-Pinto A., et al., Cognitive impairment in schizoaffective disorder: a comparison with non-psychotic bipolar and healthy subjects, Acta Psychiatrica Scandinavica Vol 116, Is 6, p 453–460, Decr 2007
456. Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. Schizophr Res. 1997 Nov 7;28(1):1-38. Review.
457. Torrey EF. Epidemiological comparison of schizophrenia and bipolar disorder. Schizophr Res 1999;39:101–106.
458. Toyo-Oka, K., Sasaki, S., Yano, Y., Mori, D., Kobayashi, T., Toyoshima, Y.Y., et al. (2005) Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. Hum. Mol. Genet., 14, 3113–3128.
459. Trivedi J., Goel D, Dhyani M, Sharma S , Anand P., Pramod S et al., Neurocognition in first-degree healthy relatives (siblings) of bipolar affective disorder patients., Psychiatry and Clinical Neurosciences Volume 62, Issue 2, pages 190–196, April 2008
460. Tsapakis E, Travis M (2002). Glutamate and psychiatric disorders. Adv. Psych. Treat. vol. 8, pp. 189–197
461. Tsuang M, Faraone S, Green R (1994). Genetic epidemiology of mood disorders. In: Papolos D and Lachman H (eds) Genetic studies in affective disorders. Wiley & sons, New York, pp 3-27
462. Tsuang MT, Faraone SV. The genetics of mood disorders. Baltimore, MD: Johns Hopkins Press. 1990.
463. Tsuang MT, Taylor L, Faraone SV (2004). An overview of the genetics of psychotic mood disorders. J Psychiatr Res. 38(1):3-15. Review
464. Tyler WJ, Pozzo-Miller LD., (2001), BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses, J Neurosci. 2001 Jun 15;21(12):4249-58.
465. Uecok, A., Karaveli, D., Kundakci, T., &Yazici, O. (1998). Comorbidity of personality disorders with bipolar mood disorders. Comprehensive Psychiatry, 39, 72–74
466. Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. Schizophr Res. 2004 Apr 1;67(2-3):269-75
467. Van Den Bogaert A, Sleegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, et al. Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population. Archives of general psychiatry. 2006 Oct;63(10):1103-10.

468. Van der Werf-Eldering MJ, Riemersma-van der Lek RF, Burger H, Holthausen EAE, Aleman A, et al. (2012) Can Variation in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA)-Axis Activity Explain the Relationship between Depression and Cognition in Bipolar Patients? PLoS ONE 7(5): e37119.
469. Varghese FP, Brown S. The Hypothalmic-Pituitary-Adrenal axis in major depressive disorder: a brief primer for primary care physicians. Primary Care Companion J Clin Psychiatry 1999;3:151–155.
470. Venken T, Claes S, Sluijs S, Paterson AD, van Duijn C, Adolfsson R, et al. Genomewide scan for affective disorder susceptibility Loci in families of a northern Swedish isolated population. Am J Hum Genet. 2005 Feb;76(2):237-48. Epub 2004 Dec 21.
471. Vincze I, Perroud N, Buresi C, Baud P, Bellivier F, Etain B et al. (2008), Association between brain-derived neurotrophic factor gene and a severe form of bipolar disorder, but no interaction with the serotonin transporter gene. Bipolar Disord 2008; 10: 580–587.
472. Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Morris CP, van Daal A, Noble EP, Kann B, Heslop KA, Young RM, Lawford BR. The DRD2 gene 957C>T polymorphism is associated with posttraumatic stress disorder in war veterans. Depress Anxiety. 2009;26(1):28-33.
473. Voyiaziakis E, Evgrafov O, Li D, Yoon HJ, Tabares P, Samuels J, et al. Association of SLC6A4 variants with obsessive-compulsive disorder in a large multicenter US family study. Mol Psychiatry. 2011 Jan;16(1):108-20.
474. Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer Ch, Halbach A, et al. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder., Mol Psychiatry. 2005 Dec;10(12):1126-32.
475. Wang F, McIntosh AM, He Y, Gelernter J, Blumberg H, The association of genetic variation in CACNA1C with structure and function of a frontotemporal system, Bipolar Disord. Nov 2011; 13(7-8): 696–700.
476. Wang F, Simen A, Arias A, Lu QW, Zhang H. A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. Hum Genet. 2013 Mar;132(3):347-58.
477. Weeks DE, Lange K. Related (1992). A multilocus extension of the affected-pedigree-member method of linkage analysis. Am J Hum Genet. 1992 Apr;50(4):859-68. Review.
478. Weissman MM, Bland R, Joyce PR, Newman S, Wells JE, Wittchen H-U. Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. J Affect Disord 1993;29:77–84.
479. White MJ, Lawford BR, Morris CP, Young RM. Interaction between DRD2 C957T polymorphism and an acute psychosocial stressor on reward-related behavioral impulsivity. Behav Genet. 2009 May;39(3):285-95.
480. Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, et al. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. Ann N Y Acad Sci. 1999 Apr 30;868:645-53.
481. Wightman RM, Robinson DL. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. J Neurochem. 2002;82:721–735.
482. Williams LM, Gatt JM, Grieve SM, Dobson-Stone C, Paul RH, Gordon E, et al. COMT Val(108/158)Met polymorphism effects on emotional brain function and negativity bias. Neuroimage. 2010;53:918–925.

483. Williams NM, Green EK, Macgregor S, Dwyer S, Norton N, Williams H, et al. Variation at the DAOA/G30 locus influences susceptibility to major mood episodes but not psychosis in schizophrenia and bipolar disorder. Archives of general psychiatry. 2006 Apr;63(4):366-73.
484. Willour VL, Zandi PP, Huo Y, Diggs TL, Chellis JL, MacKinnon DF, et al. Genome scan of the fifty-six bipolar pedigrees from the NIMH genetics initiative replication sample: chromosomes 4, 7, 9, 18, 19, 20, and 21. Am J Med Genet. 2003; 121B: 21-7.
485. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. (2005), Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. Nat Neurosci 2005;8:1069–1077.
486. World Health Organization. International Statistical Classificationof Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD10). World Health Organization, Geneva; 1999.
487. Wray NR, James MR, Gordon SD, Dumenil T, Ryan L, Coventry WL, et al. Accurate, Large-Scale Genotyping of 5HTTLPR and Flanking Single Nucleotide Polymorphisms in an Association Study of Depression, Anxiety, and Personality Measures. Biol Psychiatry. 2009 Sep 1;66(5):468-76.
488. Xiao Z, Liu W, Gao K, Wan Q, Yang C, Wang H, Wang X, Wang G, Liu Z. Interaction between CRHR1 and BDNF genes increases the risk of recurrent major depressive disorder in Chinese population. PLoS One. 2011;6(12):e28733.
489. Xu H, Kellendonk CB, Simpson EH, Keilp JG, Bruder GE, Polan HJ, et al. DRD2 C957T polymorphism interacts with the COMT Val158Met polymorphism in human working memory ability. Schizophr Res. 2007 Feb;90(1-3):104-7. Epub 2006 Nov 17.
490. Xu J, Liu Y, Wang P, Li S, Wang Y, Li J, et al. (2010, Positive association between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in the Han Chinese population., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):275-9.
491. Xu Z, Zhang Z, Shi Y, Pu M, Yuan Y, Zhang X, et al. Influence and interaction of genetic polymorphisms in the serotonin system and life stress on antidepressant drug response. J Psychopharmacol. 2012 Mar;26(3):349-59.
492. Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV., (2006), BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex., Nat Neurosci. 2006 Aug;9(8):1009-18. Epub 2006 Jul 2.
493. Yi Z, Zhang C, Lu W, Song L, Liu D, Xu Y, Fang Y. Common variants in the TPH2 promoter confer susceptibility to paranoid schizophrenia. J Mol Neurosci. 2012 Jul;47(3):465-9.
494. Yosifova A, Mushiroda T, Kubo M, Takahashi A, Kamatani Y, Kamatani N, et al.. Genome-wide association study on bipolar disorder in the Bulgarian population. Genes Brain Behav. 2011 Oct;10(7):789-97.
495. Young AH, Macritchie KA, Calabrese JR. Treatment of bipolar affective disorder. Brit Med J 2000;321:1302–1303.
496. Young LT, Warsh JJ, Kish SJ, et al. Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder. Biol Psychiatry. 1994;35:121–127.
497. Young RM, Lawford BR, Feeney GF, Ritchie T, Noble EP (2004). Alcohol-related expectancies are associated with the D2 dopamine receptor and GABAA receptor beta3 subunit genes. Psychiatry Res. 127(3):171-83

498. Yutzy SH, Woofter CR, Abbott CC, Melhem IM, Parish BS. The increasing frequency of mania and bipolar disorder: causes and potential negative impacts. J Nerv Ment Dis. 2012 May;200(5):380-7.
499. Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu XZ, Brent DA, et al. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. Am J Psychiatry. 2006 Sep;163(9):1588-93.
500. Zarate CA Jr, Quiroz JA, Singh JB, Denicoff KD, De Jesus G, Luckenbaugh DA, et al. (2005). An open-label trial of the glutamate-modulating agent riluzole in combination with lithium for the treatment of bipolar depression. Biol Psychiatry. 57(4):430-2
501. Zhang C, Li Z, Shao Y, Xie B, Du Y, Fang Y, Yu S. Association study of tryptophan hydroxylase-2 gene in schizophrenia and its clinical features in Chinese Han population. J Mol Neurosci. 2011 Mar;43(3):406-11.
502. Zhang F, Sarginson J, Crombie C, Walker N, St Clair D, Shaw D., Genetic association between schizophrenia and the DISC1 gene in the Scottish population., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Mar 5;141B(2):155-9.
503. Zhang LuShun, Hub Ling, Lic Xin, Zhangd Jing, Chene Bo, The DRD2 rs1800497 polymorphism increase the risk of mood disorder: Evidence from an update meta-analysis, Journal of Affective Disorders, 10 February 2014
504. Zhang, D.et al.Singleton deletions throughout the genome increase risk of bipolar disorder. Mol. Psychiatry 14, 376–380 (2009).
505. Zhang, X., Gainetdinov, R.R., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Burch, L.H., et al. (2005) Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. Neuron, 45, 11–16.
506. Zhou D, Lambert S, Malen P, Carpenter S, Boland L, Bennett V, AnkyrinG Is Required for Clustering of Voltage-gated Na Channels at Axon Initial Segments and for Normal Action Potential Firing, J Cell Biol. Nov 30, 1998; 143(5): 1295–1304.
507. Zhou, K.et al. Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. Am. J. Med. Genet. B 147, 1392–1398 (2008)
508. Zhou, Z., Roy, A., Lipsky, R., Kuchipudi, K., Zhu, G., Taubman, J., et al. (2005) Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydrosyindoleacetic acid in 4 populations. Arch. Gen. Psychiatry, 62, 1109–1118
509. Zill, P., Bahgai, T.C., Zwanzger, P., Schule, C., Eser, D., Rupprecht, R., et al. (2004 A)SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform(TPH2) gene provide evidence for association with major depression. Mol. Psychiatry, 9, 1030–1036.
510. Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Moller, H.J., Bondy, B. and Ackenheil, M. (2004 B) Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. Biol. Psychiatry, 56, 581–586.

XI. Приложение №1

Таблица № 5. Резултати от някои по-значими геномни сканове, съобщаващи за скаченост с Афективни разстройства:

Хромозома	Позиция	Най-добри резултати	Популация	Автор
4	4p14-p13	lod score=1.54	Британско-Ирландска	Bennett, 2002
	4p15	NPL=4.05	Американка (изолатна)	Ginns, 1998
	4p16-p13	lod score=4.1	Шотландска	Blackwood, 1996
	4p16	lod score=3.42	Датска	Ewald, 2002
	4q	NPL=2.97	Португалска	Middleton, 2004
	4q12-q21	 lod score=2.38	Американка (изолатна) Британско-Ирландска	Ginns, 1998 Lambert, 2005
	4q31	lod score=3.16 NPL=5.49	Американска Българи и Български роми	Liu, 2003, Schumacher, 2005
	4q32	lod score=2.16 lod score=2.7 NPL=2.80	Американска Финландска Американска	Willour, 2003, Ekholm, 2003 McInnis, 2003 B
	4q35	lod score=2.20 lod score=2.49	 Американска	Adams, 1998 Willour, 2003
6	6q		Американска	Fan, 2010
	6q, D6S1021	lod score=3.61	Американска	Dick, 2003
	6q16.3	NPL = 2.59	Португалска	Pato, 2004
	6q21	P = 6.72 x 10(-5)		Fan, 2009
	6q22 6q22	NPL = 3.06 NPL=4.20	Португалска	Pato, 2004 Middleton, 2004
	6q22.2-q24.2	lod score=2.48	Шведска	Venken 2005
	6q24	NPL=3.3 NPL=4.87	Американска Български роми	McInnis, 2003 A Schumacher, 2005
	6q25		Американска	Cheng, 2006
	6q15, 6q16-q21, 6q22, 6q23-q24, 6q26, 6q21			Kohn, 2005 McQueen, 2005
	Епистаза между 6q23-q24 и 2q22-q24	NPL=7.63	Европейска	Abou Jamra, 2007
8	8q			Segurado, 2003 McQueen, 2005
	8q12.2-12.3		Кубинска	Marcheco-Teruel, 2006

	8q13	lod score=2.06	Американска	Liu, 2003
	8q24	lod score=3.62 NPL 3.13	Германска, Италианска, Израелска Американска Американска	Cichon, 2001 McInnis, 2003 B Cheng, 2006
12	12q21	NPL=3.9 NPL=5.05 p=7.57 x 10(-7) p = 6.72 x 10(-5)	Канадска Канадска	Morissette, 1999 Shink, 2005 Sklar, 2008 Fan, 2009
	12q23-q24.1			Craddock, 1994
13	13q11		Американска	Cichon, 2001 Badner, 2002
	13q14	NPL=4.1 p=1.5 x 10(-8)	Австралийска Американска	Badenhop, 2001 Baum, 2008
	13q32	lod score=2.2	Американска	Liu, 2003
	16p12.3	lod score=4.1	Канадска	Maziade, 2005
	16p12-p13			Edenberg, 1997
16	16p13	p = 0.006 NPL of 3.3 lod score=2	Американска Американска Датска Ирландска	Ekholm, 2003 McInnis, 2003 B Ewald, 2002 Cassidy, 2007
	16p13, 16q24,		Американска	Cheng, 2006
18				
	18q22	 NPL 2.90 lod score=1.54	Еврейска (Ашкенази) Американска Ирландска	Fallin, 2004, McInnis, 2003 B Bennett, 2002
	18q21	 p=2.04 x 10(-8)	 Американска	Nwulia, 2007 Sklar, 2008

XII. Приложение №2

Таблица № 37В: Статистически най-добрите резултати показали резултат за епистаза p < 0.04:

Локус 1			Локус 2			Plink-случаи-контроли		Регресионен анализ				
Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	P	Фенотип	B	OR	p	Фенотип	R^2
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1386483	12	0.02	A2					
	rs6675281=C							-1.54	0.21	0.02	A2	
				rs1386483=G				-1.46	0.23	0.03	A2	
	rs6675281=C * rs1386483=G							1.71	5.54	0.02	A2	0.02
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs4290270	12	0.04	A2					
	rs6675281=CC							-0.31	0.73	0.79	A2	
				rs4290270=AA				2.40	11.03	0.03	A2	
	rs6675281=CC * rs4290270=AA							-2.64	0.07	0.02	A2	0.04
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1872824	12	0.005	A1					
	rs6675281=CC							0.68	1.97	0.50	A1	
				rs1872824=AA				2.33	10.29	0.03	A1	
	rs6675281=CC * rs1872824=AA							-2.56	0.08	0.03	A1	0.05
	rs6675281=C							0.54	1.71	0.11	A1	
				rs1872824=A				1.29	3.64	0.003	A1	
	rs6675281=C * rs1872824=A							-1.43	0.24	0.005	A1	0.04
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1872824	12	0.005	A2					
	rs6675281=CC							0.52	1.68	0.58	A2	
				rs1872824=AA				2.42	11.25	0.02	A2	
	rs6675281=CC * rs1872824=AA							-2.61	0.07	0.02	A2	0.05
	rs6675281=C							0.62	1.87	0.05	A2	
				rs1872824=A				1.35	3.86	0.002	A2	
	rs6675281=C * rs1872824=A							-1.43	0.24	0.004	A2	0.03
DISC1	rs821577	1	***CRH***	rs12721510	8	0.03	A1					
	rs821577=GG							-2.30	0.10	0.06	A1	
				rs12721510=CC				-1.80	0.17	0.09	A1	
	rs821577=GG * rs12721510=CC							2.63	13.91	0.04	A1	0.02
DISC1	rs821577	1	***CRH***	rs12721510	8	0.03	A2					
	rs821577=GG							-2.30	0.10	0.06	A2	
				rs12721510=CC				-1.54	0.21	0.15	A2	
	rs821577=GG * rs12721510=CC							2.64	14.0	0.04	A2	0.02
DISC1	rs821616	1	***TPH2***	rs1386483	12	0.02	A2					
	rs821616=A							1.37	3.92	0.02	A2	
				rs1386483= G				0.44	1.56	0.19	A2	
	rs821616=A * rs1386483= G							-1.61	0.2	0.008	A2	0.02
DISC1	rs980989	1	***CLOCK***	rs3805154	4	0.03	A2					
	rs980989=G							0.70	2.02	0.04	A2	
				rs3805154=C				0.98	2.68	0.007	A2	
	rs980989=G * rs3805154=C							-1.03	0.36	0.02	A2	0.03

DISC1	rs980989	1	***BDNF***	rs16917237	11	0.02	A2			
	rs980989=G							0.55	1.74	0.06	A2	
				rs16917237=G				0.78	2.17	0.01	A2	
	rs980989=G * rs16917237=G							-0.82	0.44	0.03	A2	0.02
CLOCK	rs3805154	4	***BDNF***	rs16917237	11	0.04	A1			
	rs3805154=C							0.78	2.18	0.02	A1	
				rs16917237=G				0.90	2.47	0.01	A1	
	rs3805154=C * rs16917237=G							-1.03	0.36	0.03	A1	0.03
				rs16917237=GG				1.72	5.58	0.01	A1	
CLOCK	rs3805154	4	***BDNF***	rs16917237	11	0.03	A2			
	rs3805154=C							0.68	1.98	0.03	A2	
				rs16917237=G				0.74	2.09	0.03	A2	
	rs3805154=C * rs16917237=G							-0.92	0.40	0.04	A2	0.02
				rs16917237=GG				1.68	5.39	0.007	A2	
CRH	rs12721510	8	***ANK3***	rs9804190	10	0.03	A1			
	rs12721510= C							0.85	2.34	0.11	A1	
				rs9804190=C				1.24	3.44	0.05	A1	
	rs12721510= C * rs9804190=C							-1.55	0.21	0.02	A1	0.02
CRH	rs12721510	8	***ANK3***	rs9804190	10	0.04	A2			
	rs12721510= C							0.95	2.60	0.07	A2	
				rs9804190=C				1.15	3.16	0.06	A2	
	rs12721510= C * rs9804190=C							-1.45	0.23	0.02	A2	0.02
SLC6A4	5-HTTLPR	17	***TPH2***	rs1386483	12	NS	A1			
	5-HTTLPR =LL							2.40	11.00	0.04	A1	
				rs1386483= GA				1.02	2.77	0.12	A1	
				rs1386483= GG				0.82	2.27	0.23	A1	
	5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA							-3.14	0.04	0.01	A1	
	5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG							-2.89	0.06	0.02	A1	0.04
SLC6A4	5-HTTLPR	17	***TPH2***	rs1386483	12	0.04	A2			
	5-HTTLPR =LL							2.70	14.87	0.02	A2	
				rs1386483= GA				0.92	2.52	0.12	A2	
				rs1386483= GG				0.75	2.12	0.21	A2	
	5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA							-3.08	0.05	0.01	A2	
	5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG							-3.11	0.05	0.01	A2	0.03

Summary

Affective disorders (AD) are among the most severe psychiatric conditions having great impact on normal life of the patients with high comorbid risk for suicide attempts and addiction behavior. They are recognized as global burden in the annual reports of the WHO. The detailed understanding of the etiology and pathology of AD is aiming development of more individualized treatment approach and improvement of patient's quality of life.

There are few hypothesis based mainly on the observed changes in neurotransmission, neuroplasticity, inefficient communication between neurons and regulation of some somatic functions. In the present study we investigated genetic variants in *TPH2* and *SLC6A4,* responsible for serotonin synthesis and transport and variants in *DRD2* candidate gene from the dopamine neurotransmission. Genetic variants in *BDNF* and *DISC1* genes, involved in genesis, survival and differentiation of neurons were investigate in relation to neuroplasticity changes.

Apart from inadequate neuroplasticity, the inefficient communication between neurons could be as well consequence from membrane transport changes. Moreover recent genome-wide association studies (GWAS) drew attention to variants in genes coding membrane channels and therefore we investigated variants in *CACNA1C* and *ANK3A* candidate genes.

Dysregulation of circadian rhythms and hypothalamic-pituitary axis are common in AD as well and variants in *CLOCK* and *CRH* genes were investigated.

Case control study, family association study and analysis of statistical epistasis were conducted. Two affection status definitions were considered, the narrow (A1) included subjects with Bipolar Disorder type I (BDI), BD II and schizoaffective disorder, bipolar type (SAD) while in the broad (A2) major depressive disorder (MDD) patients were included. The case control study consisted of 304 patients from A1, 414 from A2 and 205 healthy prescreened controls, matched by gender, ethnicity and age. The family sample consisted of 119 Bulgarian and 56 Roma families with 197 patients from A1 and 269 from A2 status definitions. All cases met DSM–IV criteria for AD and all participants provided written informed consent. Totally 1240 individuals with Bulgarian and 230 with Roma origin were genotyped.

Genomic DNA was extracted from venous blood and genotyping was performed with TaqMan™ method with call rate for 384 plates over 95%. Overall 24 SNPs situated in 9 AD candidate genes were investigated.

The results for *TPH2* are demonstrating small effect for the investigated polymorphisms in regards to AD susceptibility. Two preferentially transmitted haplotypes with the participation of previously associated with panic disorder allele T of rs4570625 and the associated with AD allele G of rs11178998 and allele A of rs4290270 were identified. Epistasis with variants in *DISC1* and *SLC6A4* genes were also observed.

Allele and genotype association for rs12150214 (*SLC6A4)* with higher frequency of allele C and genotypes containing it among patients was observed corresponding to dominant effect of this allele leading to high AD risk. No association of the functional promoter polymorphism but

protective effect of L variant only in the context of epistasis with the *TPH2* variant rs1386483 was noticed.

The relatively small effect of *DRD2* gene for AD susceptibility was confirmed with the identification of preferentially transmitted allele A of the situated in 5'UTR variant rs6589377 and transmission disequilibrium for few haplotypes (CG, CCG - over-transmitted; CCTG - under-transmitted). No involvement in statistical interactions of DRD2 polymorphisms is detected.

The important role of neuroplasticity and more specifically the impact of *DISC1* was supported with the identification of transmission disequilibrium of several haplotypes and the located in 3'UTR variant rs980989 as well as with the participation of *DISC1* variants in numerous interactions with different phenotype effect. Allele G of rs980989 and haplotype TGT were found to be more frequently transmitted while haplotypes ATT, ATTA, GAT and CGAT are under-transmitted.

Association for the situated in exon-intron boundaries rs16917237 in *BDNF* surviving Bonferroni correction was reported for first time. Homozygote and heterozygote presence of allele G was associated with high AD risk and several associated haplotypes were identified. Interactions with protective effect with variants in *DISC1* and *CLOCK* genes are also observed.

The hypothesis of influence of the investigated variants rs3805154 in *CLOCK,* rs12721510 in *CRH* and rs1006737 in *CACNA1C* on AD susceptibility cannot be rejected. Though no association or transmission disequilibrium was detected, interactions with various phenotype effect of the investigated *CLOCK* and *CRH* variants with *DISC1, BDNF* and *ANK3* variants were observed.

Preferential transmission of allele C of rs9804190 in *ANK3* and participation in protective epistasis with *CRH* variants were identified.

The lack of association for some of the investigated variants may be consequence of absence of impact in our sample, insufficient sample size for detection of small effect variants or influence only on certain endophenotype. Nevertheless the limitations of the statistical epistasis analysis, the obtained results could be further used in hypothesis generating and prioritization of approaches. Further studies in larger samples or in specific endophenotypes could provide more detailed information about the impact of the investigated variants.