ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Εκτίμηση νευροβιολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με κατάθλιψη σε άτομα με χρόνια σωματικά νοσήματα

ΜΕΓΑΠΑΝΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Εκτίμηση νευροβιολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με κατάθλιψη σε άτομα με χρόνια σωματικά νοσήματα

ΜΕΓΑΠΑΝΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Σταματάκης Αντώνιος , Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αντωνίου Αικατερίνη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ευθυμιόπουλος Σπυρίδων Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου-Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Σταματάκης Αντώνιος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α/ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1)ΕΙΣΑΓΩΓΗ

i. ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Η κατάθλιψη αποτελεί τη συχνότερη ψυχική διαταραχή με επιπτώσεις στο οικογενειακό, εργασιακό και κοινωνικό περιβάλλον. Ως νόσος, ανήκει σε ένα ευρύτερο σύνολο συναισθηματικών διαταραχών, οι οποίες είναι κατά βάση ψυχοπαθολογικές καταστάσεις που προέχει η διαταραχή του συναισθήματος. Παρά το γεγονός ότι συνυπάρχουν διαταραχές και από τις ανώτερες λειτουργίες όπως τη συγκέντρωση, την προσοχή, τη σκέψη και την αντίληψη, η διαταραχή του συναισθήματος είναι κυρίαρχη. Τα επεισόδια των συναισθηματικών διαταραχών μπορούν να είναι είτε μανιακά είτε μείζονα καταθλιπτικά. Βάσει του τύπου του επεισοδίου και την πορεία της νόσου, κυριαρχούν τρεις κλινικές μορφές συναισθηματικής διαταραχής: οι μείζονες καταθλιπτικές διαταραχές (μείζον καταθλιπτικό επεισόδιο, διαλείπουσα μονοπολική κατάθλιψη), οι διπολικές διαταραχές (κυκλοθυμική διαταραχή, διπολική διαταραχή τύπου I και II, διπολική διαταραχή με ταχεία εναλλαγή φάσεων) και η δυσθυμική διαταραχή. Η μείζονα καταθλιπτική διαταραχή χαρακτηρίζεται από την επανάληψη φάσεων κατάθλιψης. Η διπολική διαταραχή περιλαμβάνει εναλλαγές φάσεων μανίας και κατάθλιψης. Στη δυσθυμική διαταραχή κυριαρχούν φάσεις εξάρσεων και υφέσεων, με ηπιότερη αλλά και χρονιότερη πορεία από τη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή. Ο κίνδυνος εμφάνισης καταθλιπτικού επεισοδίου καθόλη τη διάρκεια της ζωής είναι 10-25% στις γυναίκες και 5-12% στους άνδρες.

Ως νόσος, χαρακτηρίζεται από πολυμορφία και ετερογένεια στις κλινικές της εκδηλώσεις, με συχνές τις λανθάνουσες μορφές. Η αιτιολογία της διαταραχής αυτής είναι πολυπαραγοντική με εμπλοκή κυρίως γενετικών, οικογενειακών και κοινωνικών συνιστωσών, συμπεριλαμβανομένων όμως και άλλων αιτιών, όπως ψυχοπιεστικά φαινόμενα, προδιαθεσικές καταστάσεις, σωματικά νοσήματα ή άλλες διαταραχές προσωπικότητας.

- *Γενετικοί παράγοντες*

Οι εμπλεκόμενοι γενετικοί παράγοντες έχουν προκύψει από τη μελέτη μοριακών και νευροχημικών μονοπατιών σε συνδυασμό με τη διερεύνηση της επίπτωσης της νόσου σε οικογένειες πασχόντων. Πιο συγκεκριμένα, οι οδοί της σεροτονίνης, της ντοπαμίνης, του άξονα του υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων όπως και η μελέτη των νευροτροφικών παραγόντων του εγκεφάλου (π.χ. Brain Derived Neurotrophic Factor-BDNF) σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με την κατάθλιψη, ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και φλεγμονώδη μόρια όπως οι κυτοκίνες.

- *Οικογενειακοί παράγοντες*

Σχετικά με τους οικογενειακούς παράγοντες, έχει βρεθεί ότι η οικογενειακή στέρηση τα πρώτα χρόνια της ζωής ή η κακή ποιότητα της γονικής φροντίδας σχετίζονται με την εμφάνιση της καταθλιπτικής διαταραχής. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυξημένη λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων έχει διαπιστωθεί σε καταθλιπτικούς ασθενείς-θύματα παιδικής κακοποίησης.

- *Ψυχοπιεστικά γεγονότα*

Η ύπαρξη στρεσσογόνων γεγονότων προδιαθέτει σημαντικά στην εκδήλωση της κατάθλιψης αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισής της έως και 6 φορές εντός του πρώτου εξαμήνου που ακολουθεί από την εμφάνιση μίας ψυχοπιεστικής εμπειρίας. Τέτοιες καταστάσεις περιλαμβάνουν την απώλεια ενός σημαντικού προσώπου ή τη δυσαρμονία με σημαντικά άτομα στη ζωή του υποκείμενου. Τις περισσότερες φορές ο ρόλος αυτών των γεγονότων είναι εκλυτικός, κυρίως στις πρώτες φάσεις μίας καταθλιπτικής ή δυσθυμικής διαταραχής.

- *Προδιαθεσικές συνθήκες*

Οι προδιαθεσικές καταστάσεις αναφέρονται στην ύπαρξη συνθηκών που προκαλούν ευαλωτότητα στο άτομο και μπορεί να προηγούνται κατά πολύ της εμφάνισης κατάθλιψης. Παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων αποτελούν η έλλειψη απασχόλησης εκτός οικίας, η αποστέρηση από τη μητέρα πριν από την ηλικία των 11 ετών, η έλλειψη ατόμων εμπιστοσύνης για διαπροσωπική επικοινωνία και/ή σωματική/λεκτική κακοποίηση.

- *Σωματικές νόσοι*

Η ύπαρξη ενός σοβαρού σωματικού νοσήματος όπως η κακοήθεια, ρευματολογικά νοσήματα (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου) και νευρολογικά νοσήματα (νόσος Parkinson) συνδέεται με την κατάθλιψη.

- *Λοιπές ψυχικές διαταραχές*

Άτομα με ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή προσωπικότητας ή συμπλεγματική συμπεριφορά μπορεί να εμφανίσουν σε μεγαλύτερο ποσοστό, από ό,τι οι υγιείς, κατάθλιψη [1], [2].

- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗΣ

Τα κύρια διαγνωστικά κριτήρια του DSM-Vγια το μείζον καταθλιπτικό επεισόδιο είναι τα ακόλουθα:

1. Καταθλιπτικό συναίσθημα για τη μεγαλύτερη διάρκεια της ημέρας, σχεδόν καθημερινά
2. Μείωση ενδιαφέροντος ή της άντλησης ευχαρίστησης από όλες ή σχεδόν όλες τις ασχολίες για το μεγαλύτερο διάστημα της ημέρας, που προηγουμένως ευχαριστούσαν τον ασθενή
3. Μείωση όρεξης και απώλεια σωματικού βάρους ή αυξημένη όρεξη με συνοδό αύξηση του σωματικού βάρους (μεταβολή του βάρους πάνω από 5% σε ένα μήνα)
4. Αϋπνία ή υπερυπνία
5. Ψυχοκινητική διέγερση (νευρικότητα) ή αντίθετα, ψυχοκινητική επιβράδυνση σχεδόν κάθε μέρα
6. Κόπωση ή απώλεια ενεργητικότητας
7. Αισθήματα απαξίας ή ενοχής (εν δυνάμει παραληρητικά)
8. Μειωμένη ικανότητα συγκέντρωσης ή σκέψης, αναποφασιστικότητα
9. Αυτοκαταστροφικός-αυτοκτονικός ιδεασμός χωρίς συγκεκριμένο σχέδιο αυτοκτονίας ή απόπειρα αυτοκτονίας

Πέντε ή περισσότερα από τα παραπάνω συμπτώματα θα πρέπει να υπάρχουν για μία συνεχή περίοδο 2 εβδομάδων και να αντιπροσωπεύουν μεταβολή από το προηγούμενο επίπεδο λειτουργικότητας. Τουλάχιστον ένα από αυτά θα πρέπει να είναι είτε η καταθλιπτική διάθεση ή η απώλεια ευχαρίστησης/ενδιαφερόντων. Επιπρόσθετα, θα πρέπει τα παραπάνω συμπτώματα να προκαλούν σημαντική δυσφορία ή διαταραχή στη λειτουργικότητα του ασθενούς, να μην οφείλονται σε σωματική νόσο(π.χ.υποθυρεοειδισμός) ή σε άμεση σωματική επίδραση ουσίας και τέλος, να μην οφείλονται σε πένθος [3].

- ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η κλινική εικόνα της καταθλιπτικής διαταραχής δεν είναι η ίδια για όλους τους ασθενείς. Στις τυπικές μορφές της νόσου, σημειώνεται σταδιακή έναρξη των συμπτωμάτων, χωρίς να αποκλείονται και οξείες εγκαταστάσεις αυτών. Συχνά, οι πρώτες εκδηλώσεις της κατάθλιψης μπορεί να είναι σωματικά ενοχλήματα που δυσχεραίνουν και τη διάγνωση της διαταραχής [4]. Αναλυτικότερα εμφανίζεται:

Καταθλιπτικό συναίσθημα

Ανηδονία

Άγχος

Διαταραχή στην εμφάνιση/συμπεριφορά

Διαταραχή ομιλίας

Διαταραχές σκέψεις

Μειωμένη ψυχοκινητική δραστηριότητα

Διαταραχή σε προσανατολισμό-μνήμη-προσοχή-συγκέντρωση

Σωματικά συμπτώματα

Διαταραχή αντίληψης

Αυτοκτονία

ii. ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ

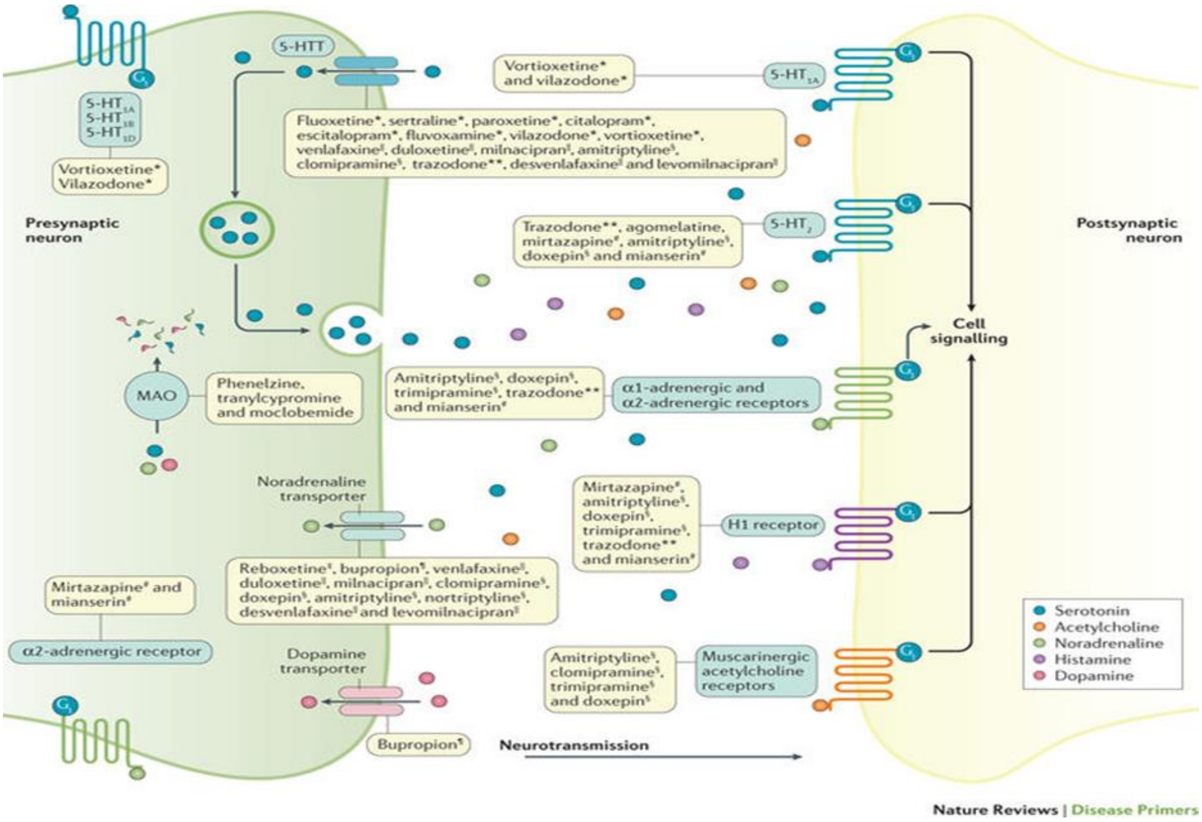
Η αρχική αντιμετώπιση της καταθλιπτικής διαταραχής αφορά στο συνδυασμό τόσο της ψυχοθεραπείας όσο και της φαρμακευτικής αγωγής. Μελέτες δείχνουν πως ο συνδυασμός αυτός είναι πιο αποτελεσματικός από ότι η ψυχοθεραπεία ή η φαρμακοθεραπεία μεμονωμένα. Οι επιλογές των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων [5] περιλαμβάνουν:

Δεύτερης γενιάς

- ⇛ Εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) όπως φλουοξετίνη, παροξετίνη, σιταλοπράμη, σερτραλίνη.
- ⇛ Εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψηςσεροτονίνης και νοραδρεναλίνης(SNRI) όπως βενλαφαξίνη, δουλοξετίνη.
- ⇛ Νοραδρενεργικό/ειδικό σεροτονινεργικό αντικαταθλιπτικό (NaSSA) όπως μιρταζαπίνη.
- ⇒ Αναστολέας επαναπρόσληψηςνοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης (NDRI) όπως η βουπροπιόνη.

Πρώτης γενιάς

- ⇛ Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά όπως αμιτριπτυλίνη.
- ⇒ Αναστολείς μονοαμινοξειδάσης όπως φαινελζίνη, τρανυλκυπρομίνη.



Εικόνα 1.Μηχανισμοί δράσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Otte C. et al, 2016)

iii. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ

Οι μελέτες σύνδεσης βασίζονται στην αρχή της κληρονόμησης μεγάλων τμημάτων DNA από κάθε γονέα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα εντοπισμού της κληρονομικότητας αυτών των τμημάτων σε κάθε απόγονο. Επομένως, τα τμήματα αυτά του γενετικού υλικού, που μπορεί να είναι εκατοντάδες, δύναται να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες και να μελετηθούν ως προς την κληρονόμησή τους από τους γονείς στους απογόνους με σκοπό τον έλεγχο του γονιδιώματος και τελικά την εντόπιση συγκεκριμένων περιοχών που μεταβιβάζονται από το πάσχον άτομο στον απόγονό του. Ο όρος σύνδεση αναφέρεται στην παρατήρηση ότι δυο γενετικοί τόποι που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο ίδιο χρωμόσωμα, τείνουν να κληρονομούνται μαζί πιο συχνά από το σύνηθες σε οικογένειες που πάσχουν από συγκεκριμένη νόσο. Οι δύο αυτοί τόποι θεωρούνται συνδεδεμένοι.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ

- ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ

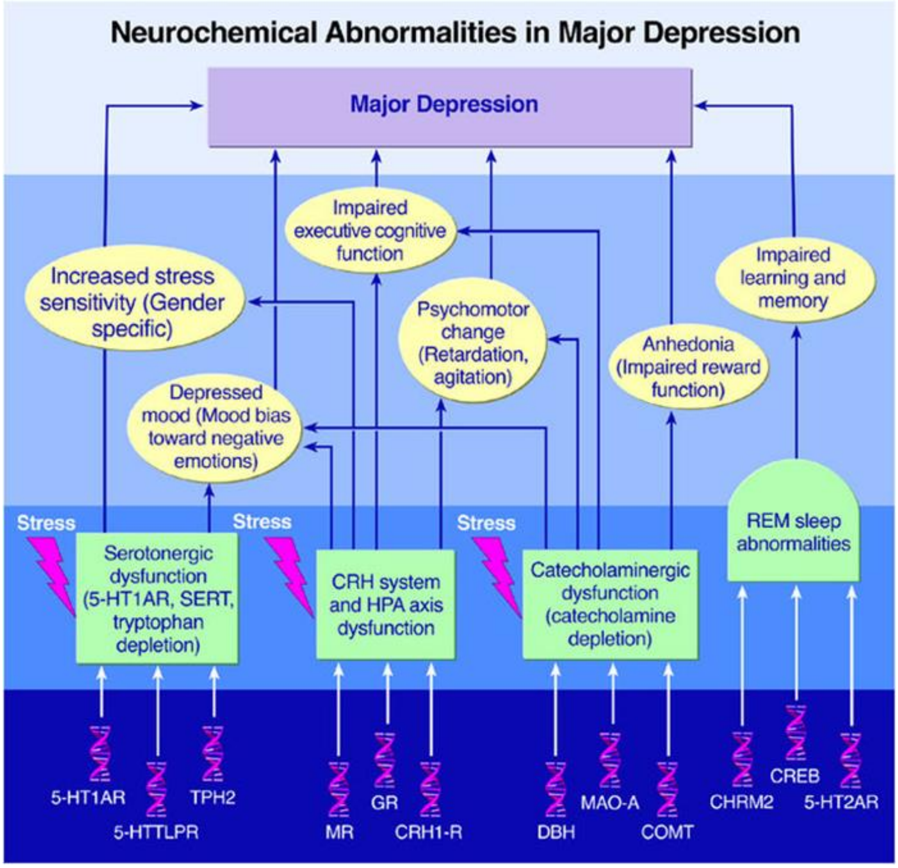
Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms–SNPs) αφορούν τους πολυμορφισμούς όπου γίνεται αντικατάσταση μίας και μόνο νουκλεοτιδικής βάσης από μία άλλη. Η ανάλυση των SNPs συμβάλλει στην κατανόηση της κληρονόμησης συγκεκριμένων ασθενειών ή στην αναγνώριση συγκεκριμένων μεταλλάξεων που σχετίζονται με προδιάθεση σε νόσους, διαφορετική απόκριση στη χορήγηση φαρμάκων-φαρμακογονιδιωματική και άλλα. Απαραίτητο στοιχείο για να συσχετισθεί ο πολυμορφισμός με συγκεκριμένη συμπεριφορά ή νόσο αποτελεί το να αναγνωριστεί αν αυτός είναι λειτουργικός, αν δηλαδή επηρεάζει τη λειτουργία ενός ή μίας ομάδας γονιδίων. Ως προς την εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής, έχουν βρεθεί διάφοροι πολυμορφισμοί της σεροτονινεργικής- ντοπαμινεργικής οδού, των νευροτροφινών και του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (Genome Wide Association Studies – GWAS)

Με την ταχεία ανάπτυξη των γενοτυπικών μεθόδων, δίνεται η δυνατότητα να βρεθούν ως και ένα εκατομμύριο SNPs. Οι μελέτες σάρωσης γονιδιώματος φέρουν το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται η προ-επιλογή συγκεκριμένων γονιδίων και προσφέρει τη δυνατότητα να βρεθούν νέα μονοπάτια αιτιοπαθογένειας των συναισθηματικών διαταραχών. Ενώ έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες σάρωσης γονιδιώματος με σκοπό την ανεύρεση στατιστικά σημαντικών για GWAS πολυμορφισμών, λίγες έχουν καταφέρει να εντοπίσουν σημαντικούς SNPs ως τώρα.

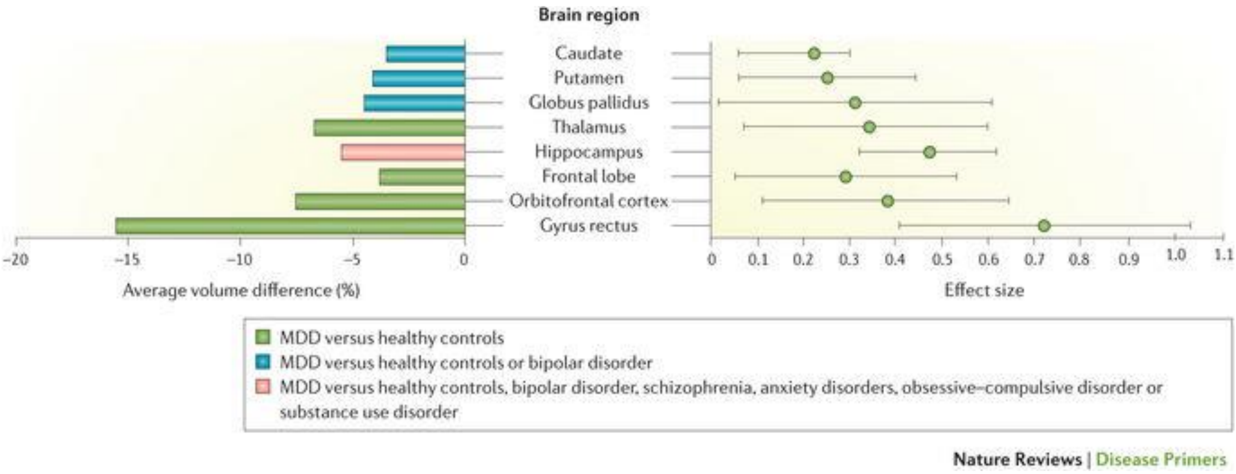
ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ (ΕΝΔΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ)

Ο όρος ενδοφαινότυπος χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει με σαφήνεια κάποια χαρακτηριστικά που βρίσκονται ανάμεσα του βιολογικού υποστρώματος του νοσήματος και στοιχείων του φαινοτύπου. Οι ενδιάμεσοι φαινότυποι περιλαμβάνουν ποσοτικοποιημένες μεταβλητές που βρίσκονται ανάμεσα του γονοτύπου και της διαταραχής. Αντιπροσωπεύουν πιο στοιχειώδη φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που μπορεί να σχετίζονται με μικρότερης επίδρασης γενετικές μεταβλητές [6], [7].



ΕΙΚΟΝΑ 2.Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού συσχέτισης νευροχημικών διαταραχών με υποψήφια γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής (Hasler G., 2004)

Ως προς την κατάθλιψη, ο ενδοφαινότυπος μπορεί να συνδέεται με μειωμένο μέγεθος του ιππόκαμπου με συνοδό μειωμένη νευρογένεση, σχετιζόμενη με μειωμένα επίπεδα αυξητικών παραγόντων όπως του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) που επηρεάζουν την πλαστικότητα του εγκεφάλου. Άτομα (υγιείς και ασθενείς) που έφεραν τη μετάλλαξη Val^{66}Met του BDNF είχαν μικρότερο μέγεθος ιππόκαμπου.



ΕΙΚΟΝΑ 3.Δομικές αλλαγές σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου σε ασθενείς με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (Otte C. et al, 2016)

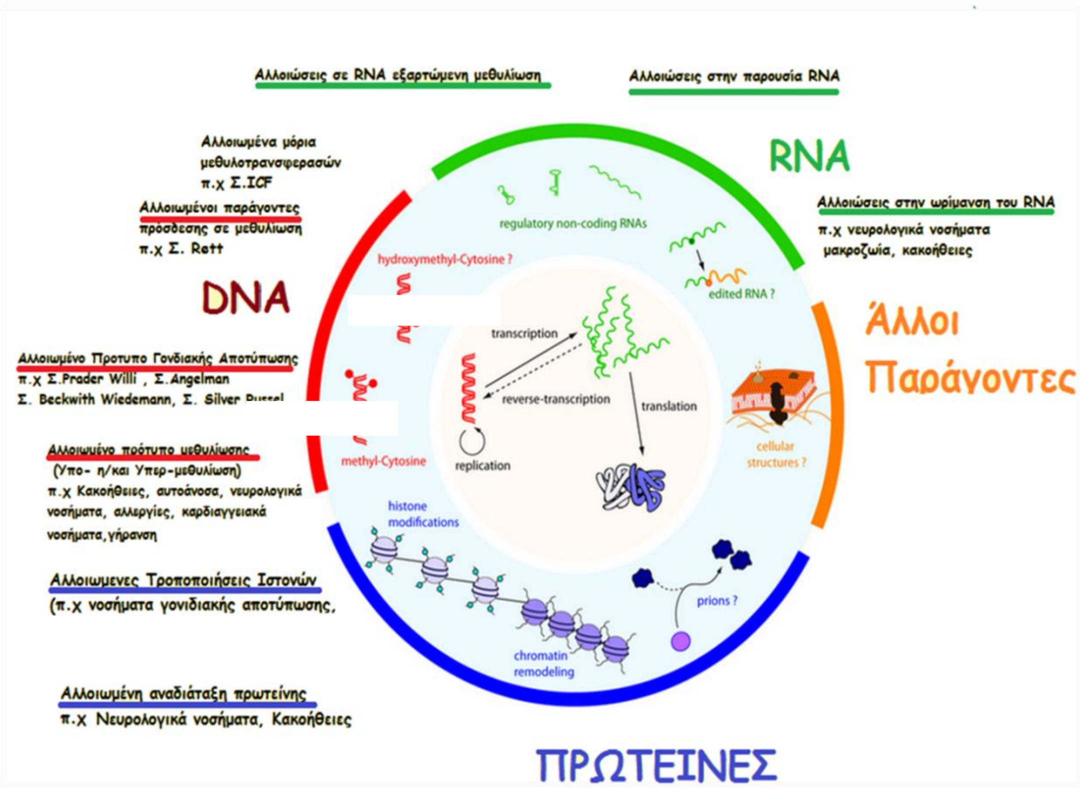
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Οι μελέτες οικογενειών, διδύμων και υιοθετημένων παιδιών αποτελούν σύνηθες εργαλείο εκτίμησης της κληρονομικότητας ενός φαινοτύπου. Σχετικά με τις μελέτες οικογενειών, ο κίνδυνος νόσησης από κατάθλιψη σε συγγενείς πρώτου βαθμού ενός ατόμου που πάσχει από την ασθένεια διπλασιάζεται. Στις μελέτες αυτές θα πρέπει να συνεκτιμάται εκτός από το κοινό γενετικό υπόβαθρο, και το κοινό περιβάλλον διαβίωσης των μελών της οικογένειας.

Από τις μελέτες διδύμων προκύπτει ότι για τη μονοπολική καταθλιπτική διαταραχή η συμπτωτικότητα στους μονοζυγωτικούς δίδυμους (φέρουν πανομοιότυπο γενετικό υλικό) είναι περίπου 54% ενώ στους διζυγωτικούς είναι 24% με μία μεγαλύτερη υπολογιζόμενη συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες (42%) από τους άντρες (29%).

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

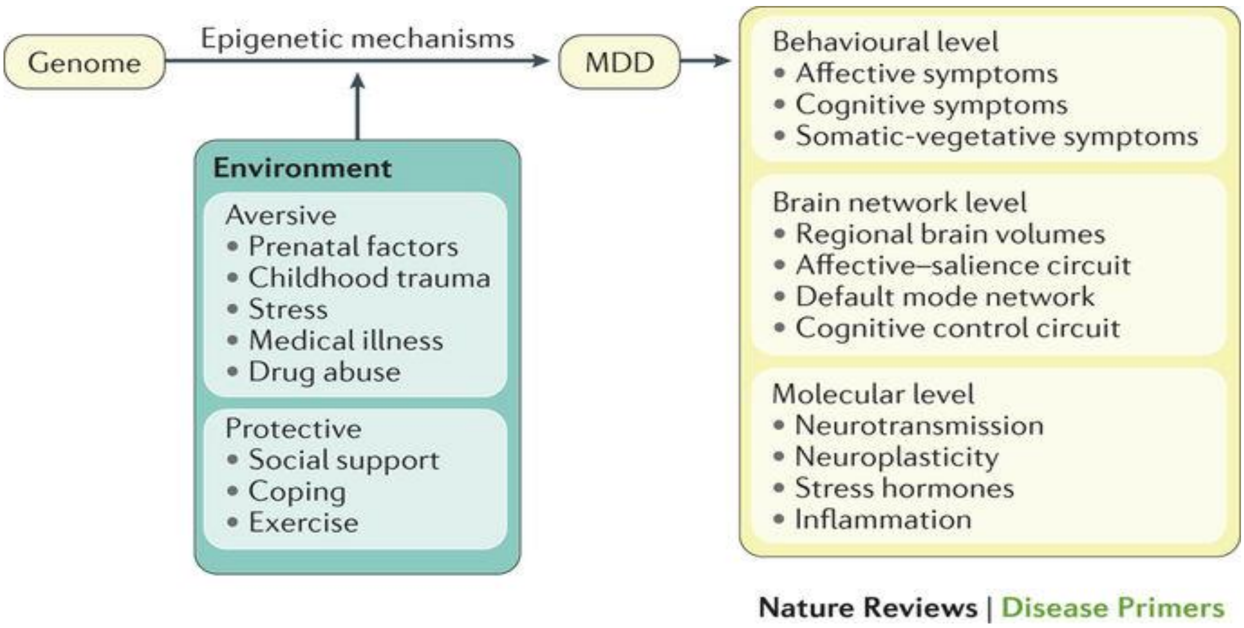
Η επιγενετική αναφέρεται σε κληρονομικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που είναι σταθερές κατά τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού, χωρίς όμως να τροποποιείται η αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές αλλαγές παρατηρούνται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και συχνά συμβαίνουν ως αντίδραση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το στρες, η επίδραση τοξικών ουσιών και άλλα. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί διαμορφώνουν τον επιγενετικό κώδικα (επιγονιδίωμα) και περιλαμβάνουν τροποποιήσεις του DNAκαι των ιστονών καθώς και την έκφραση μη κωδικοποιούντων RNAs (noncodingRNAs-ncRNAs/miRNAs) που τροποποιούν τη μεταγραφική διαδικασία σε ιστοειδικό ή κυτταροειδικό επίπεδο [8], [9].



ΕΙΚΟΝΑ 4. Μηχανισμοί-παραδείγματα επιγενετικών τροποποιήσεων (Ράγια Γ.)

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Οι μελέτες των ψυχιατρικών νοσημάτων λοιπόν δείχνουν ότι τα γονίδια συμβάλλουν έμμεσα στην εμφάνιση μιας διαταραχής μέσω επίδρασής τους σε φυσιολογικά μονοπάτια, αλλά δεν αποτελούν τη μόνη αιτία της ασθένειας. Η αλληλεπίδραση των γενετικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων ουσιαστικά συνιστά την παραδοχή ότι οι γενετικές συνιστώσες επιφέρουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κατάθλιψης μόνο υπό την έκθεση σε στρεσσογόνες και άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες, η επονομαζόμενη αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος (gene-environment interaction, QxE).



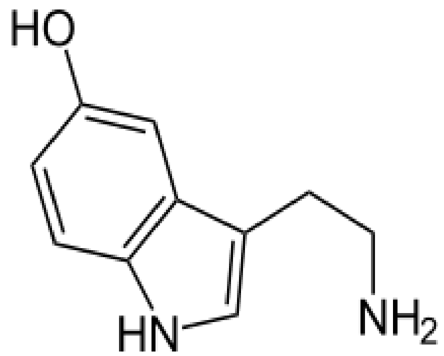
ΕΙΚΟΝΑ 5.Μοντέλο αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος που οδηγεί σε κατάθλιψη (Otte C.et al, 2016)

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

Οι μελέτες αυτές αφορούν τον έλεγχο της συνολικής γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο κυττάρου, ιστού, οργάνου ή οργανισμού μέσω της μελέτης σε επίπεδο πρωτεϊνών. Ερευνάται το σύνολο ή υποσύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών ενός κυτταρικού τύπου ή ιστού ελέγχοντας τα επίπεδα έκφρασής του, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τη δημιουργία συμπλόκων και την ενζυμική δραστηριότητα. Οι πρωτεομικές μελέτες αντικατοπτρίζουν τη σύνθετη σχέση των γονιδιακών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

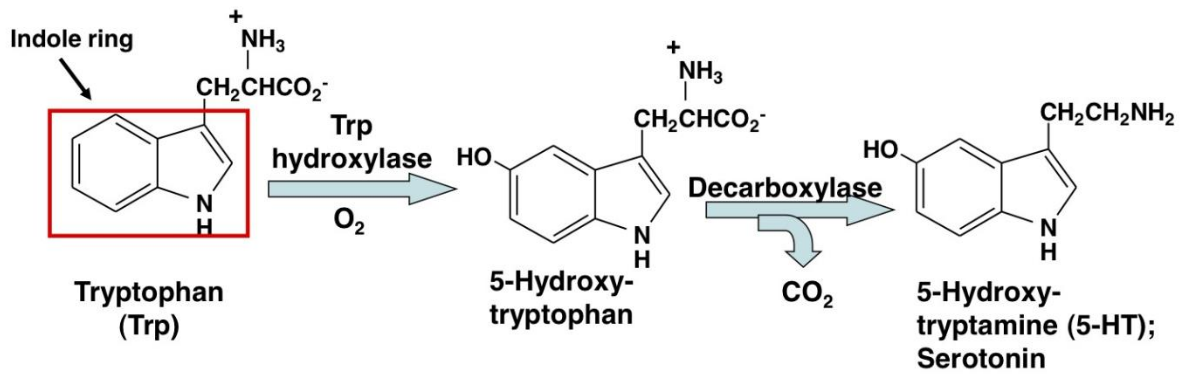
iv. ΣΕΡΤΟΝΙΝΗ ΚΑΙ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η σεροτονίνη (5-υδροξυπταμίνη, 5-HT) είναι η αρωματική οργανική ένωση 5-υδροξυ-αμινοαιθυλο-ινδόλιο. Αποτελεί την αμίνη του αμινοξέος 5-υδροξυτρυπτοφάνη, είναι από τα σημαντικότερα ινδολικά παράγωγα και ποσότητες αυτής εντοπίζονται και στα αιμοπετάλια και στα εντεροχρωμιόφιλα κύτταρα. Το μικρότερο ποσοστό της σεροτονίνης εντοπίζεται στον εγκέφαλο (1-2% της συνολικής ποσότητάς της στον οργανισμό).



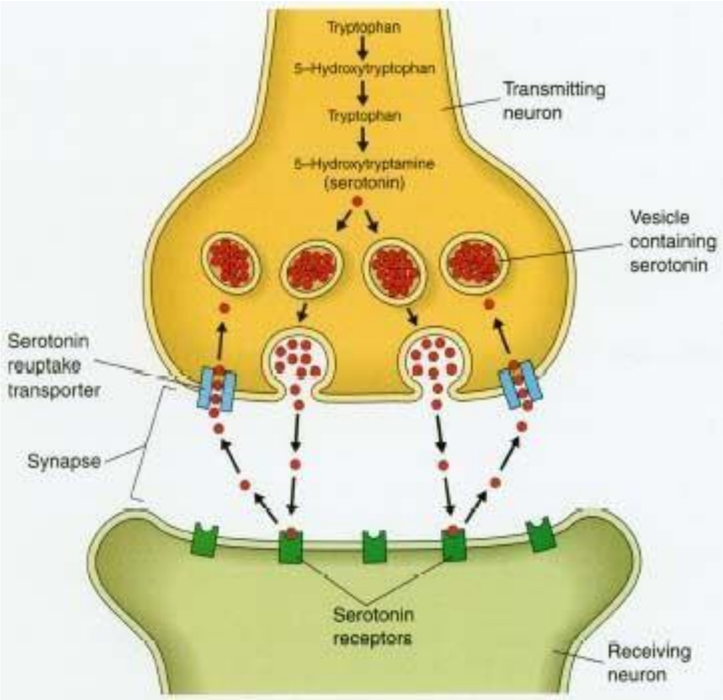
Σχήμα 1.Χημική δομή σεροτονίνης

Η 5-HT συντίθεται στους σεροτονινεργικούς νευρώνες από το αμινοξύ 5-υδροξυτρυπτοφάνη (5-HTP).



ΕΙΚΟΝΑ 7.Βιοσύνθεση σεροτονίνης (Elhwuegi A.S., 2004)

Η σεροτονίνη αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια στις νευρικές απολήξεις, όπως και οι κατεχολαμίνες. Η απελευθέρωσή της γίνεται με εξωκύττωση εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου, ενώ η επαναπρόσληψη συμβαίνει με ειδικό μηχανισμό από τους εκλεκτικούς μεταφορείς επαναπρόσληψης 5-HT (SERT). Η 5-HT μετατρέπεται σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA) από τη μονοαμινοξειδάση Α (MAO-A), τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια [10].

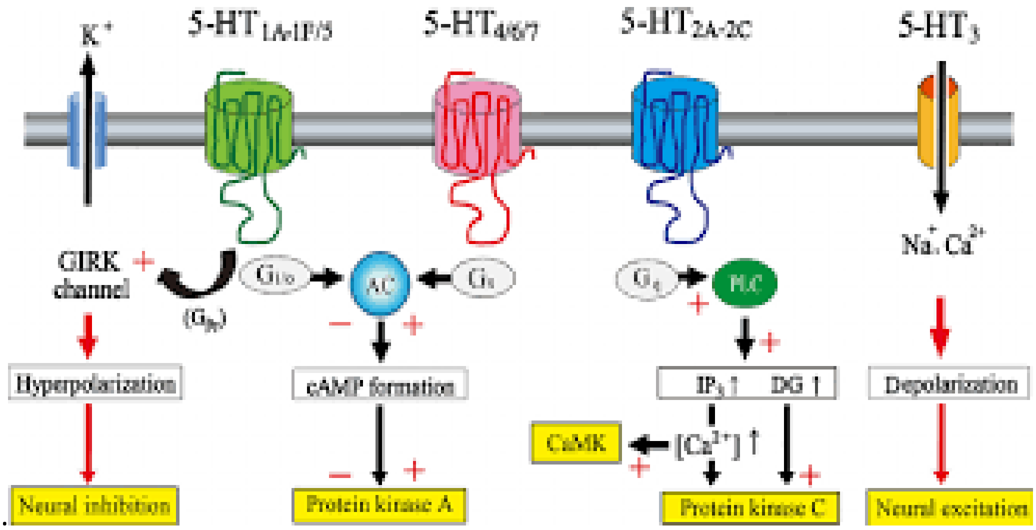


ΕΙΚΟΝΑ 8.Σχηματική απεικόνιση απελευθέρωσης-επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Madsen K., 2015)

Η επαναπρόσληψη της σεροτονίνης αποτελεί μηχανισμό τερματισμού της δράσης της συναπτικής σεροτονίνης ώστε να ρυθμίζεται η δράση και η ομοιοστασία του νευροδιαβιβαστή. Η επαναπρόσληψη επιτυγχάνεται μέσω ενός μεταφορέα της κυτταρικής μεμβράνης που μπορεί να μεταφέρει τη σεροτονίνη τόσο εντός όσο και εκτός κυττάρου, ανάλογα με τη συγκέντρωσή της. Φαίνεται πως μεταβολές της έκφρασης του μεταφορέα σχετίζονται με την εμφάνιση συναισθηματικών διαταραχών.

Το σεροτονινεργικό σύστημα παρουσιάζει μια σύνθετη ομάδα υποδοχέων. Έχουν ταυτοποιηθεί 7 τύποι υποδοχέων έως τώρα (5-HT_1–5-HT_7), ορισμένοι εκ των οποίων διακρίνονται περαιτέρω σε υποτύπους. Εμφανίζουν διαφορετικά στοιχεία ως προς τη λειτουργία τους, ενώ αξιοσημείωτο είναι πως και η 5-HT δεν έχει την ίδια χημική συγγένεια με όλους τους υποδοχείς της

[11].



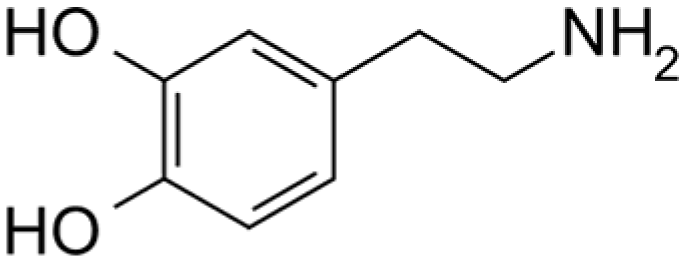
ΕΙΚΟΝΑ 9. Τύποι υποδοχέων σεροτονίνης (Elhwuegi A.S., 2004)

Στο εγκεφαλικό στέλεχος βρίσκονται 9 ομάδες σεροτονινεργικών κυττάρων (B1-B9) και κατανέμονται στη μέση γραμμή του στελέχους από τον προμήκη μυελό μέχρι το μεσεγκέφαλο.

Πολλές μελέτες εμπλέκουν το γονίδιο του διαλυτού μεταφορέα της σεροτονίνης της οικογένειας 6 μέλος 4 (SLC6A4) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q11.1-q12, στην εμφάνιση μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής. Ο πολυμορφισμός που αφορά την επανάληψη (ένθεση–long allele) ή μη (έλλειψη-short allele) [Insertion-Deletion, S/L πολυμορφισμός] 44 βάσεων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου 5-HTTLPR, επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης in vitro. Επειδή το γονίδιο του μεταφορέα κωδικοποιεί άμεσο στόχο της αντικαταθλιπτικής θεραπείας, επιχειρείται η συσχέτιση του πολυμορφισμού του με διαφορετική φαρμακολογική απόκριση. Ιδιαίτερα, η παρουσία του S αλληλομόρφου έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης κατάθλιψης σε συνθήκες στρες [4], [5], [12]. Παρομοίως, πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της σεροτονίνης 2A (HTR2A) (ένας εκ των οποίων rs9316233 με A/G αντικατάσταση βάσης) συνδέονται με ποικίλα φαρμακολογικά αποτελέσματα [10], [11]. Ακόμη, πολυμορφισμός του ενζύμου της υδροξυλάσης της τρυπτοφάνης και συγκεκριμένα της TPH2 ισομορφής που αποτελεί το ρυθμιστικό ένζυμο της σύνθεσης της 5-HT, σχετίζεται με την εμφάνιση κατάθλιψης. Το TPH2 γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q και ο πολυμορφισμός (Arg441His) οδηγεί σε απώλεια κατά 80% της παραγωγής σεροτονίνης. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ασθενείς που πάσχουν από μείζονα καταθλιπτική διαταραχή [10], [11].

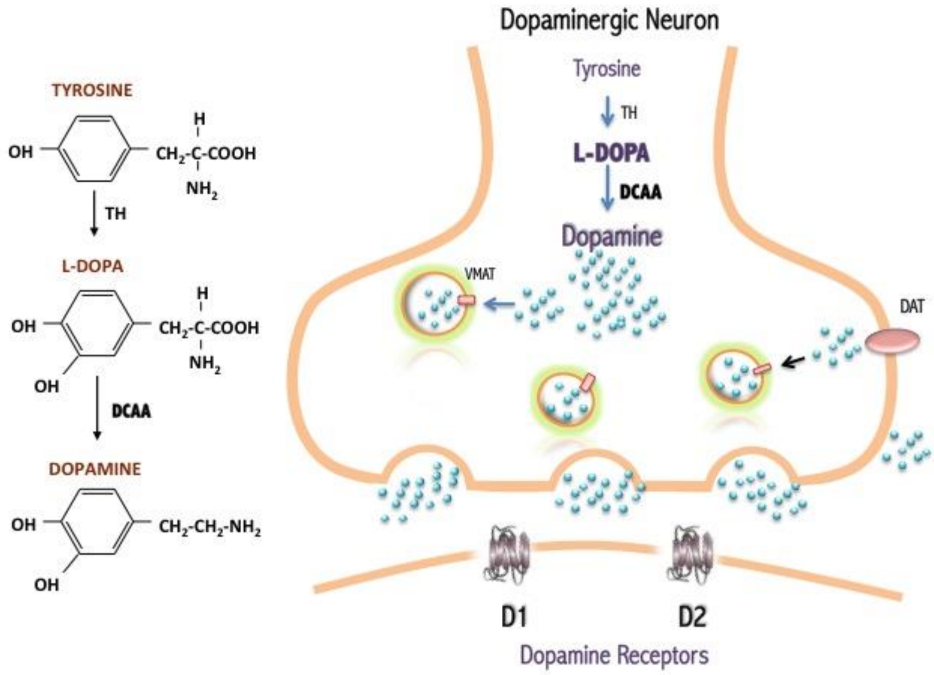
v. ΝΤΟΠΑΜΙΝΗ ΚΑΙ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η ντοπαμίνη ανήκει μαζί με την επινεφρίνη (αδρεναλίνη) και τη νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) στις κατεχολαμίνες. Οι κύριοι νευροδιαβιβαστές του κατεχολαμινεργικού συστήματος στον εγκέφαλο είναι η ντοπαμίνη και η νορεπινεφρίνη, ενώ στο περιφερικό νευρικό σύστημα κύριος νευροδιαβιβαστής είναι η επινεφρίνη.



Σχήμα 2. Χημική δομή ντοπαμίνης

Οι κατεχολαμίνες συντίθενται από μία πρόδρομη ουσία, την τυροσίνη. Το αμινοξύ αυτό υδροξυλιώνεται σε 3,4 διυδροξυφαινυλαλανίνη, γνωστή και ως L-Dopa μέσω του ενζύμου υδροξυλάσης της τυροσίνης. Στη συνέχεια, η L-Dopaμετατρέπεται σε ντοπαμίνη από την αποκαρβοξυλάση της ντοπαμίνης. Η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης στους νοραδρενεργικούς νευρώνες προσθέτει ένα υδροξύλιο στην ντοπαμίνη και τη μετατρέπει σε νορεπινεφρίνη.



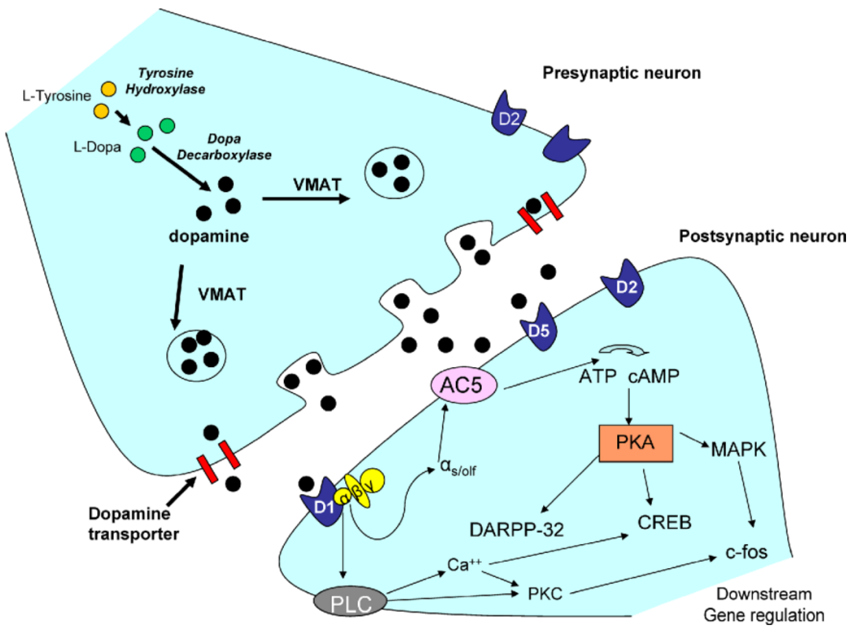
ΕΙΚΟΝΑ 10.Σύνθεση ντοπαμίνης (Cooper, Bloom, 1996)

Οι κατεχολαμίνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα αποθηκεύονται μέσω ενός μονοαμινικού φορέα σε μικρού μεγέθους συναπτικά κυστίδια. Μέσα στα κυστίδια αυτά βρίσκεται η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης –στους νοραδρενεργικούς νευρώνες- με αποτέλεσμα η ντοπαμίνη αφού μεταφερθεί εντός των κυστιδίων να μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη. Τα κυστίδια αυτά βρίσκονται κοντά στη σύναψη και είναι έτοιμα για σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη και εξωκύττωση.

Η απελευθέρωση των κατεχολαμινών μπορεί να γίνει με τη διαδικασία της εξωκύττωσης, που εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου και λαμβάνει χώρα στις συναπτικές απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευραξόνων. Επιπλέον, η απελευθέρωση μπορεί να συμβεί και με αναστροφή του κατεχολαμινικού μεταφορέα (όπως για παράδειγμα ο μηχανισμός δράσης της αμφεταμίνης). Ακόμη, οι κατεχολαμίνες δύναται να απελευθερωθούν από τα δενδριτικά κύτταρα με μη ασβέστιο-εξαρτώμενη απελευθέρωση.

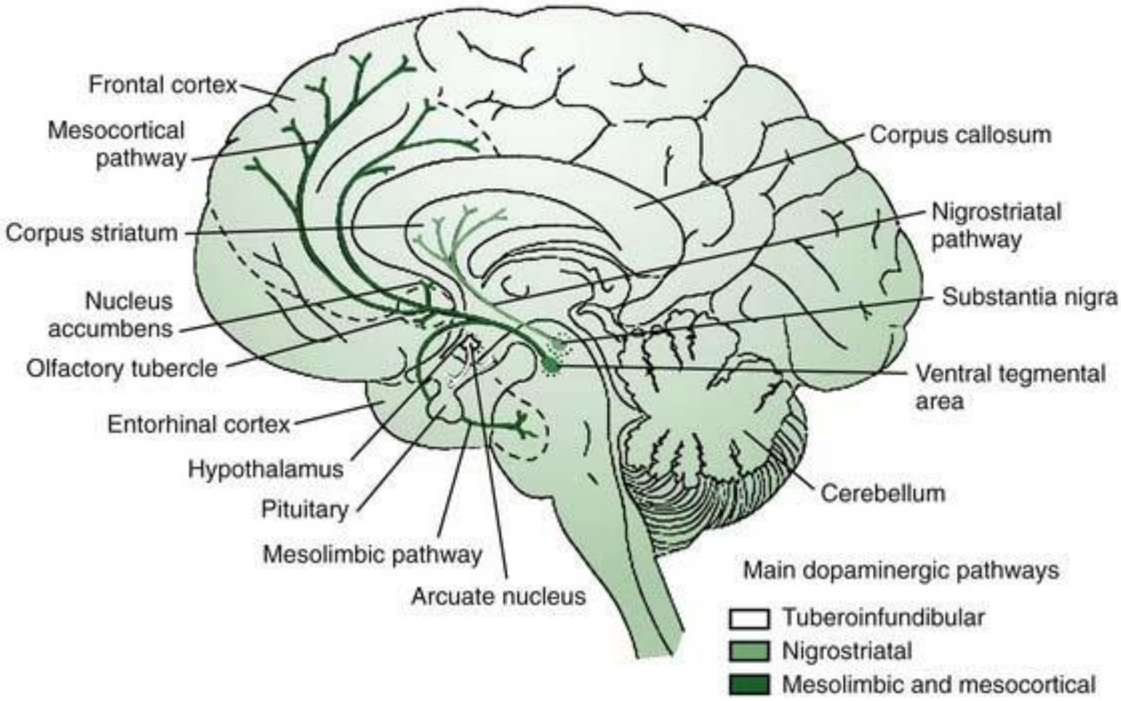
Η αποικοδόμηση των κατεχολαμινών γίνεται μέσω δύο κύριων ενζύμων: της μονοαμινοξειδάσης (Monoaminoxidase-MAO) και της κατεχολ-ο-μεθυλο-τρανσφεράσης (Catechol-o-methyltransferase -COMT). Η απομάκρυνση των κατεχολαμινών, και ειδικά της ντοπαμίνης, από τη σύναψη γίνεται μέσω επαναπρόσληψής της και επαναποθήκευσής της στα συναπτικά κυστίδια.

Οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς είναι μεταβολοτροπικοί και εντοπίζονται τόσο προσυναπτικά όσο και μετασυναπτικά.



ΕΙΚΟΝΑ 11.Μονοπάτια σηματοδότησης-ρύθμισης ενδοκυττάριων διαδικασιών μέσω ντοπαμινεργικών υποδοχέων (Knab and Lightfood, 2010)

Οι ντοπαμινεργικές οδοί προέρχονται από τρεις κύριες ομάδες κυττάρων που βρίσκονται στην περιοχή του στελέχους στον εγκέφαλο και είναι οι εξής: A8, A9 και A10. Οι ντοπαμινεργικές οδοί προβάλλουν από τα κυτταρικά σώματα σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου και διαμορφώνουν τέσσερις κύριες οδούς: τη μελαινοραβδωτή, τη μεσομεταιχμιακή, τη μεσοφλοιώδη, και τη φυματοχοανική.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Ντοπαμινεργικές οδοί (CrockerA., 1994)

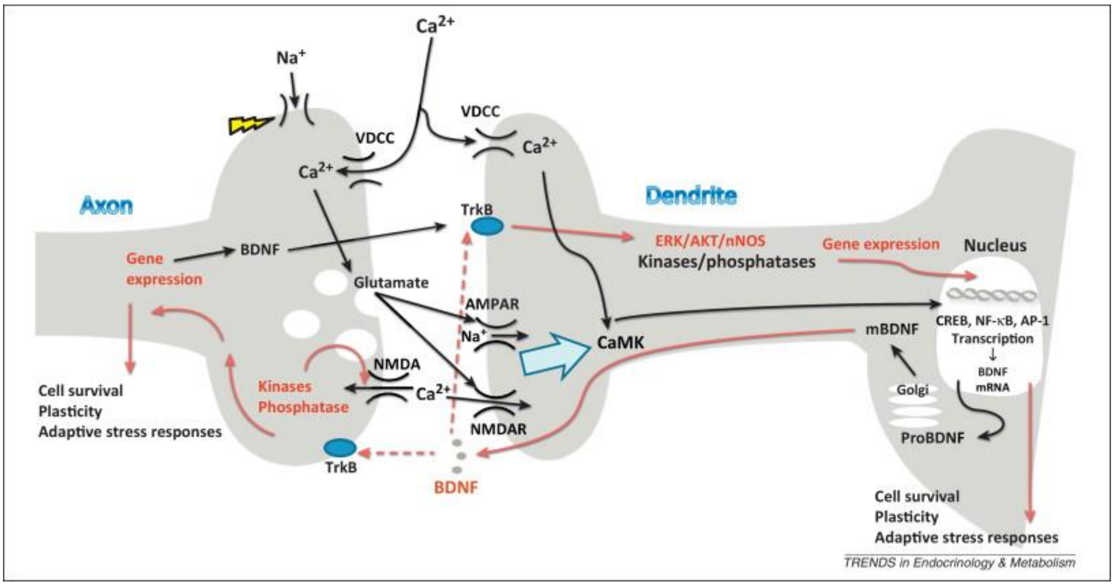
Έχουν μελετηθεί αρκετοί πολυμορφισμοί των υποδοχέων ντοπαμίνης σε σχέση με την εμφάνιση κατάθλιψης. Πιο ειδικά, ο πολυμορφισμός του υποδοχέα τύπου 2 (DRD2 11q22-23) ANKK1 TaqIA (rs1800497, $Glu^{713}Lys$) οδηγεί σε αντικατάσταση της γλυκίνης με σερίνη στην θέση 713 με αποτέλεσμα την εμφάνιση του A1/A2 αλληλίου. Αντικρουόμενα ερευνητικά δεδομένα συσχετίζουν τόσο το A1 όσο και το A2 αλλήλιο με την εμφάνιση κατάθλιψης. Επιπλέον, πολυμορφισμοί ποικίλου αριθμού εν σειρά επαναλήψεων (VNTR) μήκους περίπου 48 βάσεων στο γονίδιο του υποδοχέα 4 (DRD4-11p15.5) στο εξώνιο 3 οδηγεί στη δημιουργία 5 αλληλίων (με 2,3,4,5 και 7 επαναληπτικές μονάδες). Το αλλήλιο με τις 5 επαναλήψεις συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο κατάθλιψης, ενώ αντίθετα το αλλήλιο με τις 4 επαναλήψεις φαίνεται να δρα προστατευτικά [13]–[16]. Ακόμη, οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του μεταφορέα της ντοπαμίνης, που βρίσκεται στην θέση 5p15.3, ποικίλου αριθμού εν σειρά επαναλήψεων (VNTR) στο 3’ άκρο της μη κωδικοποιημένης περιοχής του εξωνίου 15 έχει ερευνηθεί περαιτέρω. Προκύπτουν 7 αλληλόμορφα με 3 έως 11 επαναλήψεις, με το αλληλόμορφο των 10 επαναλήψεων να συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης κατάθλιψης [14]. Επίσης, πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP) στο γονίδιο της COMT στο κωδικόνιο 158 οδηγεί σε αντικατάσταση της βαλίνης από μεθειονίνη ($Val^{158}Met$, rs4680) και τα ερευνητικά δεδομένα συσχετίζουν τόσο το Met αλλήλιο με την κατάθλιψη όσο και το Val αντίστοιχα με πρώιμης εμφάνισης καταθλιπτική διαταραχή [17].

vi. ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΕΣ ΚΑΙ BDNF

Η ανάπτυξη νέων νευρώνων από νευρικά αρχέγονα κύτταρα και η λειτουργική ενσωμάτωσή τους σε ώριμα νευρικά κυκλώματα μπορεί να συμβεί και σε ενήλικους εγκεφάλους. Αυτή η διαδικασία, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευρωνική και συναπτική πλαστικότητα. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες λαμβάνουν μέρος στη νευρογένεση επάγοντας την αύξηση, διαφοροποίηση, διατήρηση και επιβίωση των νευρώνων και των συνάψεών τους. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες συγκαταλέγονται και οι νευροτροφίνες. Οι νευροτροφίνες είναι μια οικογένεια αυξητικών παραγόντων, απαραίτητων για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνεται ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (Brain Derived Neurotrophic Factor- BDNF), η νευροτροφίνη 3 (Neurotrophin3, NT-3) και η νευροτροφίνη 4/5 (Neurotrophin 4/5 –NT4/5).

Νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο (Brain Derived Neurotrophic Factor- BDNF)

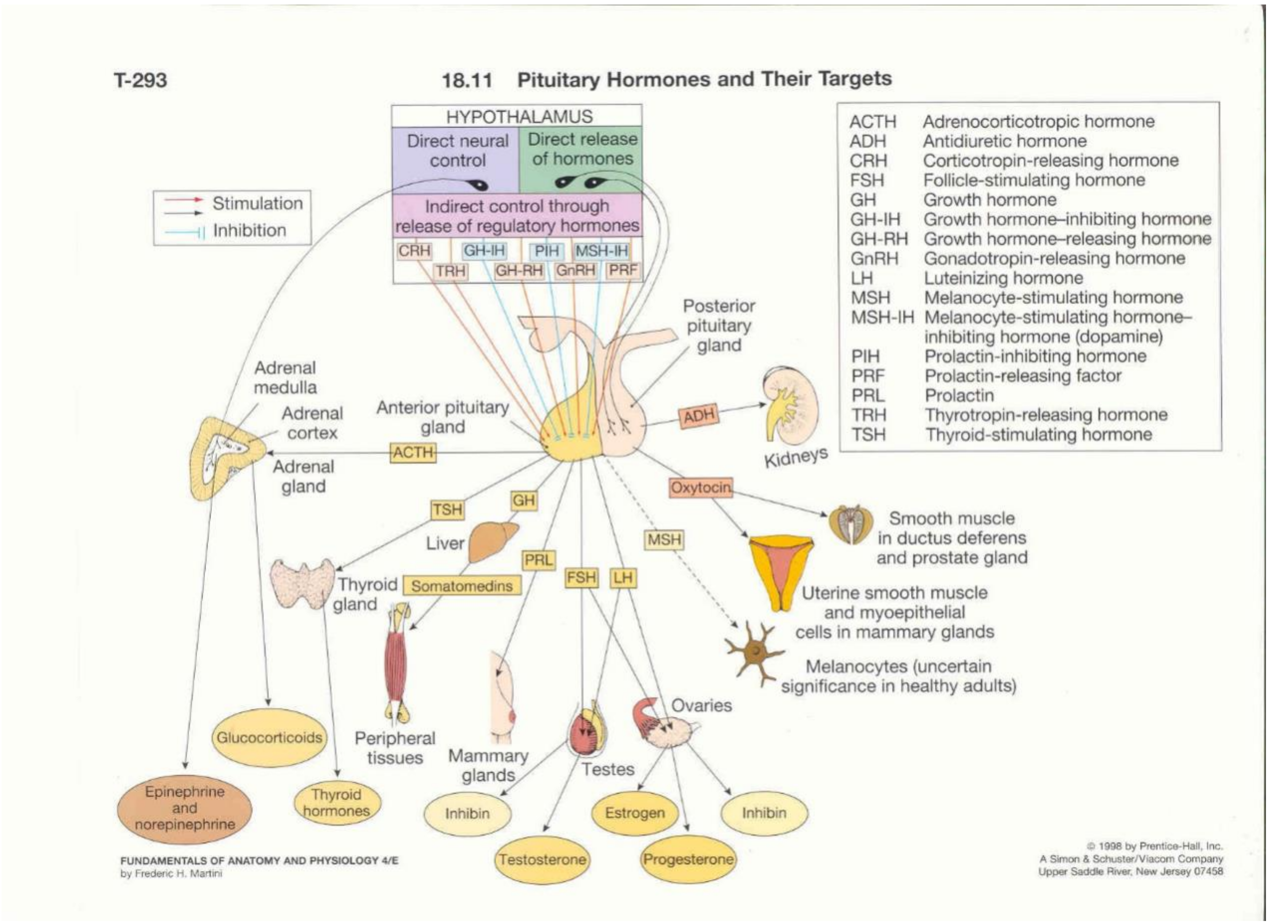
Ο BDNF είναι ένα ομοδιμερές πολυπεπτίδιο που εμφανίζει μεγάλη ομολογία (51 ίδια αμινοξέα) με τον αυξητικό παράγοντα των νεύρων (NGF). Το υπεύθυνο γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13 και η έκφρασή του οδηγεί στη σύνθεση μιας βασικής πρωτεΐνης 250 αμινοξέων που συμμετέχει στην ανάπτυξη, επιβίωση, αναγέννηση και διατήρηση της λειτουργίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Ο BDNF ευθύνεται για τη νευρωνική επιβίωση και πλαστικότητα των σεροτονινεργικών, χολινεργικών και ντοπαμινεργικών νευρώνων, και αλληλεπιδρά λειτουργικά με τους αντίστοιχους νευροδιαβιβαστές όπως και με το GABA. Ο πολυμορφισμός που αφορά την αντικατάσταση της βαλίνης από μεθειονίνη ($Val^{66}Met$) σε ένα ή και στα δύο αλλήλια του γονιδίου του BDNF, οδηγεί σε μειωμένη έκφρασή του και μειωμένη νευρογένεση [18].



ΕΙΚΟΝΑ 13.Σχηματική απεικόνιση των μοριακών μονοπατιών που επιδρά ο BDNF (Marosik., Mattson M.P., 2014)

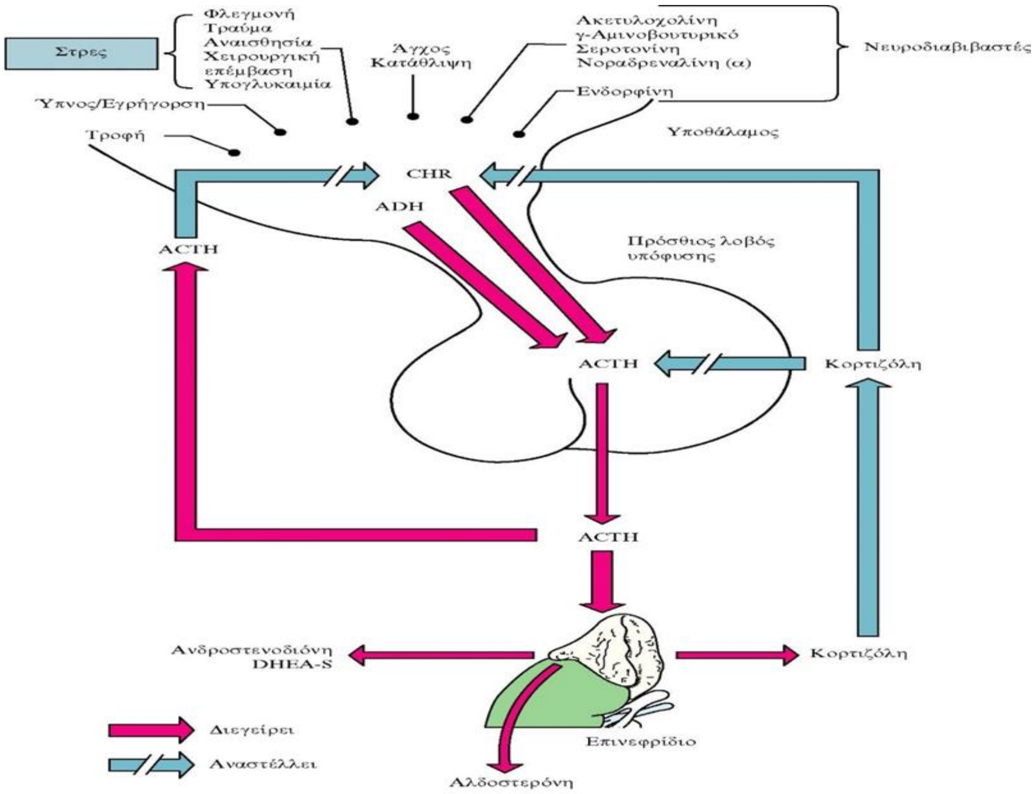
vii. ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ

Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων αποτελεί μία από τις βασικότερες οδούς έκκρισης και ρύθμισης των επιπέδων των ορμονών στον οργανισμό. Όπως δηλώνεται, ο άξονας αυτός περιλαμβάνει τον υποθάλαμο-τμήμα του διάμεσου εγκεφάλου στο έδαφος της τρίτης κοιλίας που επικοινωνεί με το μεταιχμιακό σύστημα και συνδέεται με το στέλεχος, τον πρόσθιο οπτικό θάλαμο, το μεταιχμιακό φλοιό και την ίδια την υπόφυση- η οποία διακρίνεται σε πρόσθια και οπίσθια ή νευροϋπόφυση (που εκκρίνει την ωκυτοκίνη και την αντιδιουρητική ορμόνη) και τα επινεφρίδια. Τα επινεφρίδια είναι ενδοκρινείς αδένες που βρίσκονται στους άνω πόλους των σύστοιχων νεφρών και αποτελούνται από φλοιό (που διακρίνεται περαιτέρω σε σπειροειδή, στηλιδωτή και δικτυωτή ζώνη εκκρίνοντας γλυκοκορτικοειδή/αλατοκορτικοειδή/στεροειδή του φύλου και το μυελό όπου εκκρίνονται σε μικρό ποσοστό οι κατεχολαμίνες). Ο υποθάλαμος συντελεί στη ρύθμιση της έκκρισης της πρόσθιας υπόφυσης μέσω της απελευθέρωσης εκκριτικών και ανασταλτικών ορμονών που μεταφέρονται σε αυτήν μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας, η οποία παροχετεύει στον υποφυσιακό μίσχο.



ΕΙΚΟΝΑ 14. Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης με τα όργανα στόχους και τους μηχανισμούς αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (Prentice-Hall, 1998)

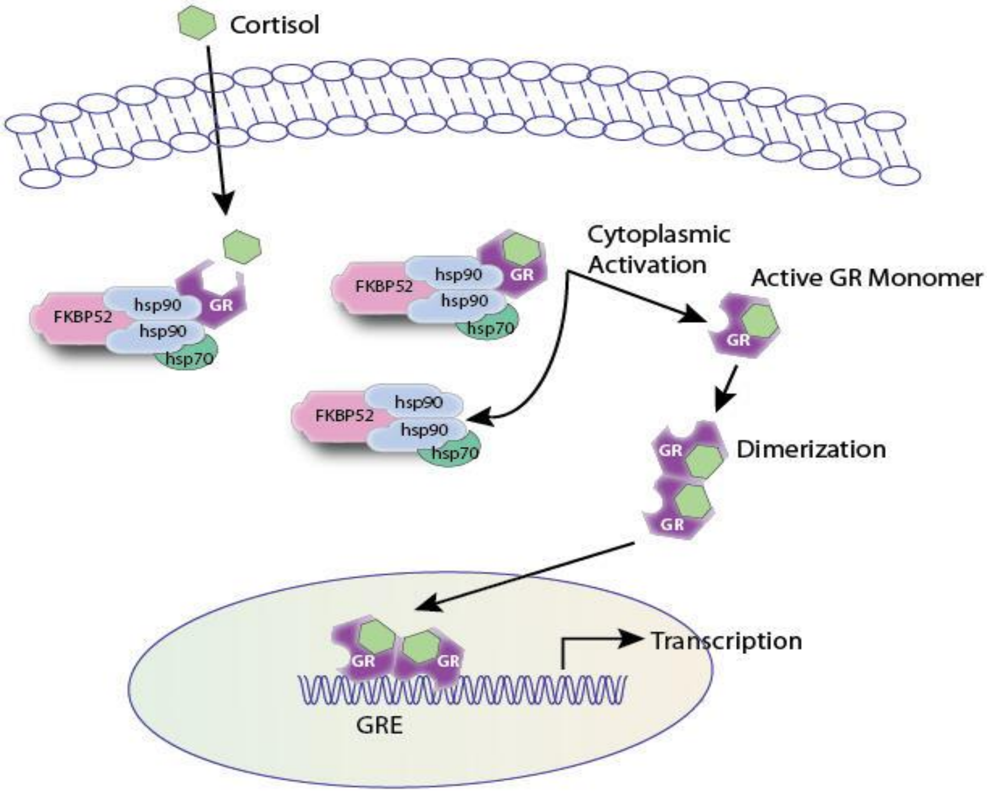
Η βάση της λειτουργίας του άξονα περιλαμβάνει την έκκριση ορμονών από την πρόσθια υπόφυση που απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία, επιδρούν στους ενδοκρινείς αδένες, και σηματοδοτούν την παραγωγή δεύτερων ορμονικών μορίων ασκώντας τελικά τη δράση τους σε όργανα στόχους. Το σύστημα αυτό ελέγχεται άμεσα από τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ορμονικών μορίων με τρόπο τέτοιο που αυξημένες ποσότητες αυτών ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση τόσο στην υπόφυση όσο και στον υποθάλαμο. Ο έλεγχος της έκκρισης των ορμονών των επινεφριδίων πραγματοποιείται από τον υποθάλαμο με διαμεσολάβηση σπλαχνικών νεύρων. Η αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη (Adrenocorticotrophic Hormone - ACTH) εκκρίνεται από την πρόσθια υπόφυση, ελέγχεται από τον υποθάλαμο μέσω της κορτικοτρόπου ορμόνης (Corticotrophin Releasing Hormone - CRH) και δρα στον φλοιό των επινεφριδίων διεγείροντας την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών, επινεφριδιακών ανδρογόνων και αδρεναλίνης. Το κυριότερο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη. Μεταβολές της έκκρισης ACTH και κορτιζόλης συμβαίνουν φυσιολογικά κατά κύματα καθημερινά λόγω του κιρκάδιου ρυθμού, σε σωματικό στρες, έντονη σωματική άσκηση, πυρετό, φλεγμονώδεις καταστάσεις και υπογλυκαιμία. Οι δράσεις της κορτιζόλης περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών (κυρίως καταβολική επίδραση και διάσπαση των πρωτεϊνών, με επαγωγή της γλυκονεογένεσης), των λιπιδίων (ενίσχυση της δραστηριότητας της λιπάσης, μείωση του περιφερικού λιπώδους ιστού με αύξηση του κοιλιακού και μεσοραχιαίου λίπους), των υδατανθράκων και των νουκλεϊκών οξέων. Επίσης, συμπεριλαμβάνονται αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω αναστολής της έκκρισης μεσολαβητών της φλεγμονής (εικοσανοειδή, σεροτονίνη, PAF, βραδυκινίνη) και φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF). Η κορτιζόλη ασκεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση με σύνδεση σε αντίστοιχους υποδοχείς της υπόφυσης, του υποθαλάμου και του υπομέλανα τόπου [19].



ΕΙΚΟΝΑ 15.Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίου (Harrison Ενδοκρινολογία, Ελληνική έκδοση, 2007)

Αναφορικά με τη συσχέτιση του άξονα με την καταθλιπτική διαταραχή, αυτή φαίνεται πως είναι ισχυρή. Υψηλό ποσοστό καταθλιπτικών ασθενών εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις κορτιζόλης, όπως επίσης και αυξημένα επίπεδα παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (Corticotrophin Releasing Factor–CRF) [8], [9], [20]. Η εκτίμηση της διαταραχής του άξονα γίνεται με δοκιμασίες καταστολής αυτού, που περιλαμβάνουν τη δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη (DST test) ή με συνδυασμό της με δοκιμασία καταστολής με παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (Corticotrophin Releasing Factor–CRF test). Ενώ σε φυσιολογικά άτομα η χορήγηση δεξαμεθαζόνης μειώνει τα επίπεδα της κορτιζόλης λόγω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης και μείωσης των επιπέδων της ACTH, σε καταθλιπτικούς ασθενείς η δοκιμασία είναι παθολογική και παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης [21], [22].

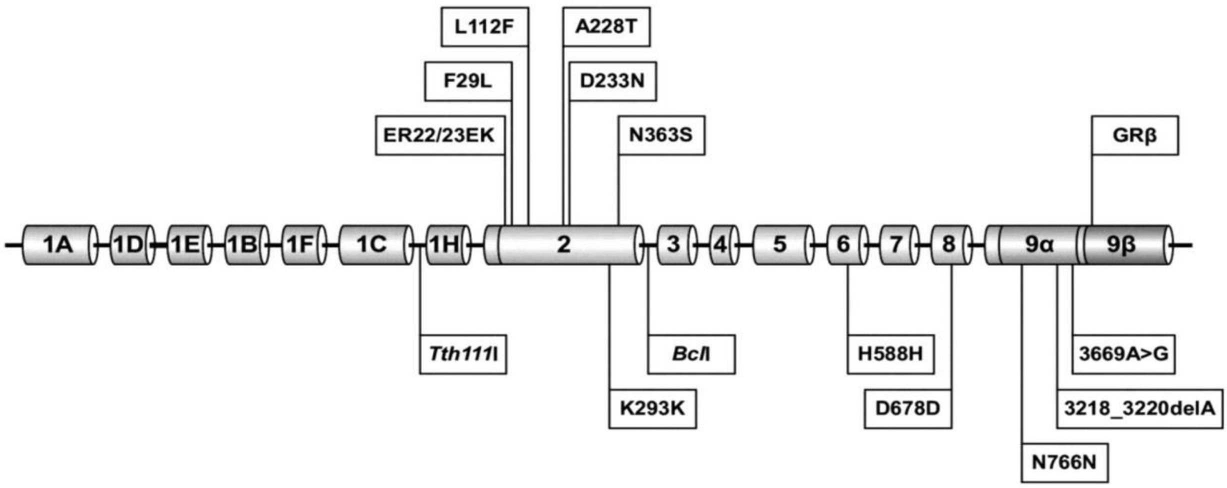
Η παθολογική απόκριση του άξονα συνεπώς φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, που ασκούν τις δράσεις τους μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα τους (GlucocorticoidReceptor–GR). Η σύνδεση αυτή επάγει το σχηματισμό συμπλόκων και τη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Εκεί παρατηρείται άμεση απάντηση με ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων στόχων μέσω άμεσης σύνδεσης στο DNA ή με αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [19].



ΕΙΚΟΝΑ 16.Μηχανισμός δράσης γλυκοκορτικοειδών (Harrison's Endocrinology, 2006)

Μελετήθηκαν λοιπόν πιθανές μεταβολές της έκφρασης των υποδοχέων με ανίχνευση πολυμορφισμών του υπεύθυνου γονιδίου. Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε βιβλιογραφικά προς περαιτέρω έρευνα για τους εξής λόγους: αρχικά, η παθοφυσιολογία της καταθλιπτικής διαταραχής περιλαμβάνει, όπως προαναφέρθηκε, τη δυσλειτουργία της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης του άξονα. Επιπλέον, διάφορες *in vivo* και *in vitro* μελέτες καταδεικνύουν τροποποιημένη ευαισθησία των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς με κατάθλιψη. Βρέθηκε ότι σε δείγματα περιφερικών ιστών καταθλιπτικών ατόμων, υπάρχει μειωμένη επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε μεταβολικές και ανοσολογικές λειτουργίες, που συσχετίζεται με ελαττωμένη ευαισθησία των υποδοχέων. Επιπρόσθετα, μελέτες σε πειραματικά μοντέλα γενετικά τροποποιημένα με μειωμένη έκφραση υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών που υποβλήθηκαν σε συνθήκες στρες, έδειξαν καταστολή του μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης και καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά.

Ειδικότερα, το γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 στη θέση 5q31-32, και αποτελείται από 9 εξώνια. Μέσω μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων και εναλλακτικού ματίσματος μπορούν να προκύψουν 5 πρωτεϊνικοί υπότυποι (GRα, GRβ,GRγ,GR-A,GR-P). Η κλασσική GRα ισομορφή μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία του υποδοχέα στα γλυκοκορτικοειδή, ενώ ο τύπος GRβ είναι μεταγραφικά ανενεργός και σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή.



ΕΙΚΟΝΑ 17.Δομή του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Panek M. et al, 2012)

Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών-GR είναι μέλη της υπεροικογένειας πυρηνικών υποδοχέων με παρόμοια δομική σύσταση και τρεις λειτουργικές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα, με την οποία ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Η περιοχή πρόσδεσης DNA είναι απαραίτητη για το σχηματισμό διμερών του υποδοχέα με τους εκκινητές των γονιδίων στόχων. Η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, πέραν από την πρόσδεση παίζει ρόλο τόσο στη μεταφορά του υποδοχέα στον πυρήνα όσο και στο σχηματισμό διμερών.

Διάφοροι πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί ως τώρα, που προκύπτουν ανάλογα με τη θέση τους στο γονίδιο (ER22/23EK, BclI, N363S) και σχετίζονται με διαταραχή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων [23]–[25].

Ειδικότερα, οι πολυμορφισμοί στο ιντρόνιο 2 BclI σχετίζονται με την εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής. Από τη βιβλιογραφία αναγνωρίζονται τρεις θέσεις πολυμορφισμού γύρω από το εξώνιο 3. Μία που βρίσκεται 392 ζεύγη βάσεων πάνω από το εξώνιο 2, μία που εντοπίζεται 646 ζεύγη βάσεων πάνω από το εξώνιο 2 και μία 2301 ζεύγη κάτω από το εξώνιο 2. Στη δεύτερη θέση βρέθηκε κατόπιν μελέτης πέψης με περιοριστικά ένζυμα (RFLP) πολυμορφική έκφραση με αλλαγή μιας βάσης (TGAT**C**A→TGAT**G**A) και προέκυψαν 2 αλληλόμορφα αντίστοιχα, C (wildtype) και G [26]. Η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού ήταν συχνότερη σε άτομα με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, συνδεόταν με αυξημένα επίπεδα ACTH και σχετιζόταν με χειρότερη ανταπόκριση στην αντικαταθλιπτική φαρμακευτική αγωγή. Φορείς του G αλληλομόρφου εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης μετά από δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή αυξημένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Από άλλα ερευνητικά δεδομένα, προκύπτει ότι άτομα με BclI G ομόζυγο γονότυπο παρουσιάζουν μέτρια απάντηση στην έκκριση κορτιζόλης σε συνθήκες ψυχοκοινωνικού στρες, συγκριτικά με άλλους πολυμορφισμούς του γονιδίου, ενώ σε δοκιμασίες καταστολής του άξονα με χορήγηση δεξαμεθαζόνης τα ετερόζυγα άτομα παρουσιάζουν μείωση της κορτιζόλης σε αντίθεση με τα ομόζυγα που εμφάνισαν ήπια αύξηση. Τα GG ομόζυγα άτομα συνδέονται με εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής [21]–[25], [27].

2)ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ ΣΕ ΧΡΟΝΙΩΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ

Η μείζονα καταθλιπτική διαταραχή εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα που πάσχουν από χρόνια νόσο. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την ισχυρή συσχέτιση των χρόνιων παθήσεων με την κατάθλιψη [28]–[33] . Πιο συγκεκριμένα, άτομα που πάσχουν από συστηματικές νόσους όπως καρδιακή ανεπάρκεια, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, άσθμα, χρόνια νοσήματα δέρματος, κακοήθειες, χρόνιες λοιμώξεις π.χ. HIV λοίμωξη, νευρολογικά νοσήματα π.χ. νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, σακχαρώδη διαβήτη και αυτοάνοσες παθήσεις όπως ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και ρευματοειδής αρθρίτιδα, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά κατάθλιψης σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [28]–[32], [34], [34]–[37]. Ως προς την εμφάνιση κατάθλιψης σε άτομα που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα, έχει βρεθεί αυξημένη επίπτωση [36] που σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται ως και διπλάσια από ότι στο γενικό πληθυσμό [35], [37]. Τα αυξημένα ποσοστά κατάθλιψης σε άτομα με ρευματοειδή αρθρίτιδα σχετίζονται με την ύπαρξη έντονου άλγους, την κόπωση, τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα, τη μειωμένη ποιότητα ζωής και την οικονομική επιβάρυνση που επιφέρει η χρόνια πάθηση στη ζωή του ασθενούς. Τα καταθλιπτικά άτομα με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρουσιάζουν περισσότερες μακροχρόνιες επιπλοκές συμπεριλαμβανομένων αυξημένων συννοσηροτήτων, μεγαλύτερου πόνου και αυξημένων ποσοστών θνητότητας [37]. Έχουν μελετηθεί διάφορες πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της κατάθλιψης και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι καταθλιπτικοί ασθενείς με χρόνια νοσήματα μεταξύ των οποίων και ρευματοειδή αρθρίτιδα, φέρουν τον 5-HTTLPR πολυμορφισμό του γονιδίου SLC6A4 που κωδικοποιεί το μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HTT), και συγκεκριμένα το S (short) αλληλόμορφο. Το S αλληλόμορφο είναι αυτό που σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στο στρες ενώ η ομοζυγωτία για το συγκεκριμένο αλληλόμορφο συνδέεται με μειωμένη δυνατότητα του ατόμου για προσαρμογή σε συνθήκες στρες, απαισιοδοξία και χαμηλή προσαρμοστικότητα [12]. Επιπλέον, φαίνεται πως η χρόνια φλεγμονή διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην παθοφυσιολογική συσχέτιση μεταξύ των δύο νοσημάτων. Η αυξημένη έκφραση παραγόντων φλεγμονής, όπως οι κυτοκίνες IL-1, IL-6 και ο TNF-a που έχουν πλειοτροπικές δράσεις συντελούν στην εμφάνιση κατάθλιψης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μελλοντικοί φαρμακευτικοί στόχοι. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες φαίνεται πως επάγουν την ανάπτυξη καταθλιπτικών χαρακτηριστικών όπως ανηδονία ή διαταραχή γνωστικών λειτουργιών, ενώ επηρεάζουν και την φυσική ανοσοαπόκριση [33], [36], [38]. Επιπλέον, η υπερδραστηριότητα του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων είναι από τα σημαντικότερα ευρήματα που απαντώνται βιβλιογραφικά σε καταθλιπτικούς ασθενείς [39]. Η ενεργοποίηση του άξονα συνδέεται με αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών. Τα μόρια αυτά αυξάνουν τα επίπεδα της CRH όπως και της κορτιζόλης, και προκαλούν συνακόλουθα αυξημένη αντίσταση στη δράση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών επηρεάζοντας την ευαισθησία των αντίστοιχων υποδοχέων. Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και η μειωμένη ευαισθησία των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών εμφανίζονται συνήθως σε ασθενείς με κατάθλιψη [38], [40]. Οι κύριοι προτεινόμενοι μηχανισμοί αντίστασης των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών σε καταθλιπτικούς ασθενείς περιλαμβάνουν τη μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα δευτεροπαθώς ως απάντηση στην υπερκορτιζολαιμία ή σε άλλα ερεθίσματα όπως οι κυτοκίνες και οι γενετικές τροποποιήσεις-πολυμορφισμούς του γονιδίου του υποδοχέα [39].

Β/ΣΚΟΠΟΣ

Οι προσπάθειες συσχέτισης ενός πολυπαραγοντικού νοσήματος με πολλές κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις, όπως είναι η κατάθλιψη με άλλες χρόνιες οργανικές παθήσεις μέσω διάφορων μελετών είναι εντατικές. Οι εστιασμένες μελέτες σε συγκεκριμένες ομάδες χρονίως πασχόντων συμβάλλουν ενδεχομένως στην καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών συνδέσεων μεταξύ της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής και της υποκείμενης οργανικής νόσου.

Σε αυτή την κατεύθυνση, εντάσσεται και η μελέτη ασθενών που πάσχουν από μία χρόνια αυτοάνοση πάθηση με μεγάλο επιπολασμό και επίπτωση, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η συνύπαρξη δύο χρόνιων παθήσεων που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ατόμου σε πολλά επίπεδα έχει αναμφίβολα πολλαπλές συνέπειες στην ποιότητα ζωής του ασθενούς (κοινωνικές, επαγγελματικές, οικονομικές επιπτώσεις) που οδηγούν στην εμφάνιση περισσότερων οργανικών επιπλοκών μέχρι και στην αυξημένη θνητότητα. Όπως προαναφέρθηκε, οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά κατάθλιψης και δυσλειτουργίας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Συνεπώς, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση διαφορών μεταξύ υγιών και ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ως προς τη συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων πολυμορφισμού του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Ειδικότερα, μελετήθηκε ο BclI πολυμορφισμός του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GR.

Γ/ ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1) ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ-ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα της παρούσας μελέτης, αποτελεί μέρος του ευρύτερου δείγματος που συγκεντρώθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος “ASSERT-DEP” του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το πρόγραμμα αυτό σχεδιάστηκε με στόχο τη μελέτη της επικράτησης της Μείζονος Καταθλιπτικής Διαταραχής (ΜΚΔ) σε ασθενείς με μακροχρόνιες παθήσεις (Σακχαρώδης Διαβήτης, Ρευματολογικά Νοσήματα, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια) και τον εντοπισμό των παραγόντων (γενετικών και ψυχοκοινωνικών) που συνδέονται με την ανθεκτικότητα στη ΜΚΔ. Συνολικά, συμμετείχαν 450 άτομα που χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες βάσει του βαθμού υποτιθέμενης ασθένειας-άγχους που βιώνουν: (α) ασθενείς με μακροχρόνιες παθήσεις που αναζητούν περίθαλψη στα ΤΕΠ του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων-υψηλά επίπεδα σχετιζόμενου με την ασθένεια άγχους, (β) ασθενείς με μακροχρόνια νοσήματα που παρουσιάζονται σε φροντίδα ρουτίνας κατά την παρακολούθησή τους-μέτρια επίπεδα αγωνίας σχετιζόμενη με το νόσημα και (γ) ομάδα ελέγχου που προέρχεται από το προσωπικό του νοσοκομείου με κριτήριο αποκλεισμού ένταξης στη μελέτη την ύπαρξη χρόνιας νόσου από τις τρείς που προαναφέρθηκαν. Για τις ανάγκες παρούσας μελέτης το δείγμα αφορούσε σε 157 συμμετέχοντες εκ των οποίων οι 55 ήταν ασθενείς με Ρευματοειδή αρθρίτιδα και οι 102 αφορούσαν στην ομάδα ελέγχου.

Ας σημειωθεί ότι οι συμμετέχοντες εκτιμήθηκαν μέσω ψυχιατρικής συνέντευξης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε η ελληνική έκδοση της Mini Διεθνούς Νευροψυχιατρικής Συνέντευξης (MINI). Επιπλέον, συμπληρώθηκε από τους συμμετέχοντες μια βασική γραμμή ερωτηματολογίων που περιλάμβανε δημογραφικά δεδομένα, οικονομική-εργασιακή-ασφαλιστική κατάσταση, ρυθμό αναπαραγωγής, σοβαρότητα ασθένειας, αντίληψη ασθένειας, αντίληψη επιπτώσεων τρέχουσας οικονομικής κρίσης, ιστορικό κατάθλιψης-άλλων ψυχικών ασθενειών, ζητήματα μετανάστευσης, χρήση υγειονομικής περίθαλψης, ψυχοκοινωνικό υπόβαθρο. Ακολούθως, και κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης, ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος προς γενετική ανάλυση.

2)ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Τα δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών και των μαρτύρων αποθηκεύτηκαν αρχικά στους -20^{0}C μέχρι την απομόνωση του γενετικού υλικού. Η απομόνωση έγινε χρησιμοποιώντας το Gene DNA Whole Blood Kit S (KURABO, cat.no.DB-S). Το Kit περιείχε: Πρωτεάση (Protease, EDB), Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer, LDB), Διάλυμα Έκπλυσης (Wash Buffer, CDB), Ειδικά Δοχεία (Cartridges, CA), Μικροσωληνάρια Συλλογής (CollectionTubes, CT), Καπάκια (Caps,CAP), και Μικροσωληνάρια Αποβλήτων (Waste Tubes, WT).

Protease	EDB	1 vial

Lysis Buffer	LDB	30 ml
Wash Buffer	WDB	160 ml
Elution Buffer	CDB	100 ml
Cartridges	CA	96
Collection Tubes	CT	96
Caps	CAP	96
Waste Tubes	WT	96

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Nucleic Acid Isolation System QuickGene-810 της εταιρείας KURABO.

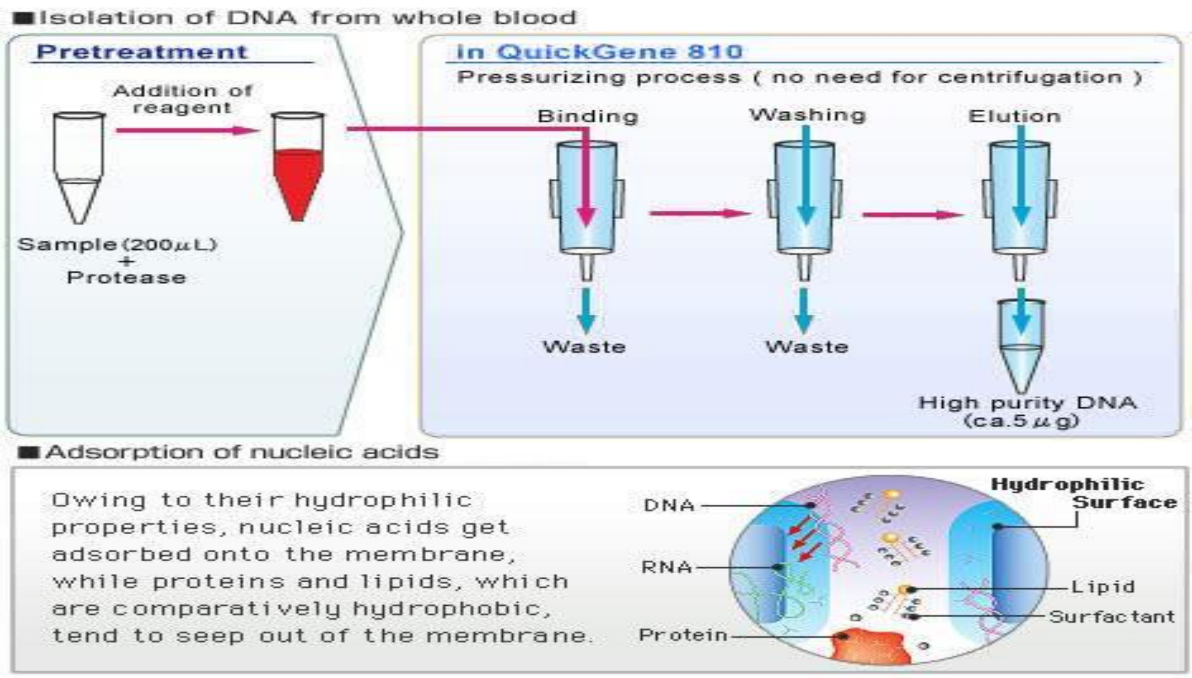
ΕΙΚΟΝΑ 18. Η συσκευή Nucleic Acid Isolation System QuickGene-810 της KURABO

Τα βήματα της απομόνωσης περιλαμβάνουν:

i. Προσθήκη σε μικροσωληνάριο 200μL του δείγματος αίματος, 30μL πρωτεάσης που απομακρύνει τις πρωτεΐνες του αίματος και 250μL διάλυμα λύσης.

ii. Ανάδευση έντονα ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων

iii. Ομογενοποίηση στη μέγιστη ταχύτητα για 15 δευτερόλεπτα και ακολούθως φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν όσες σταγόνες έχουν απομείνει στο καπάκι του σωληναρίου.
iv. Επώαση των δειγμάτων για 2 λεπτά στους 56^0C.
v. Προσθήκη στα δείγματα 250μL αιθανόλης (>99%) ώστε να καθιζάνει το DNAαπό το διάλυμα, ανάδευση έντονα για 15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια σύντομη φυγοκέντρηση.
vi. Μεταφορά του διαλύματος στα ειδικά δοχεία της συσκευής Nucleic Acid Isolation System QuickGene-810.
vii. Εκκίνηση του προγράμματος.
viii. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος και καταγραφή της ποσότητας DNA που απομονώθηκε, αυτό μεταφέρεται σε νέο μικροσωληνάριο όπου και αποθηκεύεται στους -20^0C.



ΕΙΚΟΝΑ 19. Βήματα απομόνωσης DNA (Quickgene 810)

3)PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*. Με τη μέθοδο αυτή, δε χρειάζεται να είναι γνωστή η αλληλουχία του στόχου, εάν είναι γνωστές οι αλληλουχίες που τον περιβάλλουν. Η PCR προϋποθέτει κυρίαρχα την προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων στο διάλυμα που περιέχει την αλληλουχία-στόχο: ένα ζεύγος εκκινητών που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTPs). Ο κύκλος PCR, σε περίπτωση δίκλωνου DNA, περιλαμβάνει:

(α) την αποδιάταξη των αλυσίδων με τη θέρμανση του διαλύματος στους 95^0C για 15 δευτερόλεπτα. Και οι δύο κλώνοι που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως μήτρα για τη σύνθεση νέων αλυσίδων.

(β) την προσθήκη των δύο εκκινητών που στοχεύουν αλληλουχίες εκατέρωθεν της πραγματικής αλληλουχίας στόχου. Κάθε ένας εκκινητής είναι συμπληρωματικός με μία συγκεκριμένη περιοχή αλυσίδας του DNA και προσδένεται σε αυτή με δεσμούς υδρογόνου. Το διάλυμα ακολούθως, ψύχεται απότομα στους 54^0C ώστε να δοθεί η ευκαιρία στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις θέσεις σύνδεσης στο DNA. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3’ άκρο της μίας αλυσίδας στόχου και ο άλλος στο 3’ άκρο της συμπληρωματικής προς τον στόχο αλυσίδας. Το ζεύγος των εκκινητών προστίθεται σε περίσσεια, για να αποφευχθεί η υβριδοποίηση του αρχικού DNAμε τον εαυτό του.

(γ)Στη συνέχεια, το διάλυμα θερμαίνεται στους 72^0Cκαι προστίθεται η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Το ένζυμο επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές με κατεύθυνση 5’→3’. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από έναν εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση σύνδεσης του άλλου εκκινητή, δημιουργώντας έτσι νέες θέσεις σύνδεσης σε κάθε κλώνο.

Η θέρμανση των αλυσίδων αποτελεί το σημείο εκκίνησης του επόμενου κύκλου περιλαμβάνοντας πάλι την αποδιάταξη των κλώνων, την υβριδοποίηση των εκκινητών και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Μετά από n κύκλους, η αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί θεωρητικά 2^n φορές. Οι παράγοντες που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου αφορούν:

i. Το μήκος και την αλληλουχία του προς πολλαπλασιασμό τμήματος DNA
ii. Τη DNA πολυμεράση (της οποίας όμως η απόδοση μειώνεται σε αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή σε αλληλουχίες υψηλής περιεκτικότητας σε G/C)
iii. Το ζεύγος των εκκινητών (με ιδανικά χαρακτηριστικά το βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις, την περιεκτικότητα σε βάσεις G/C 40-60%, την αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών με άλλες μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA, την αποφυγή επανάληψης των G/C στο 3’ άκρο και την θερμοκρασία υβριδισμού-η οποία εξαρτάται από την

περιεκτικότητα σε G/C των εκκινητών-που πρέπει να είναι παραπλήσια για τους δύο εκκινητές για να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά στην ίδια θερμοκρασία)

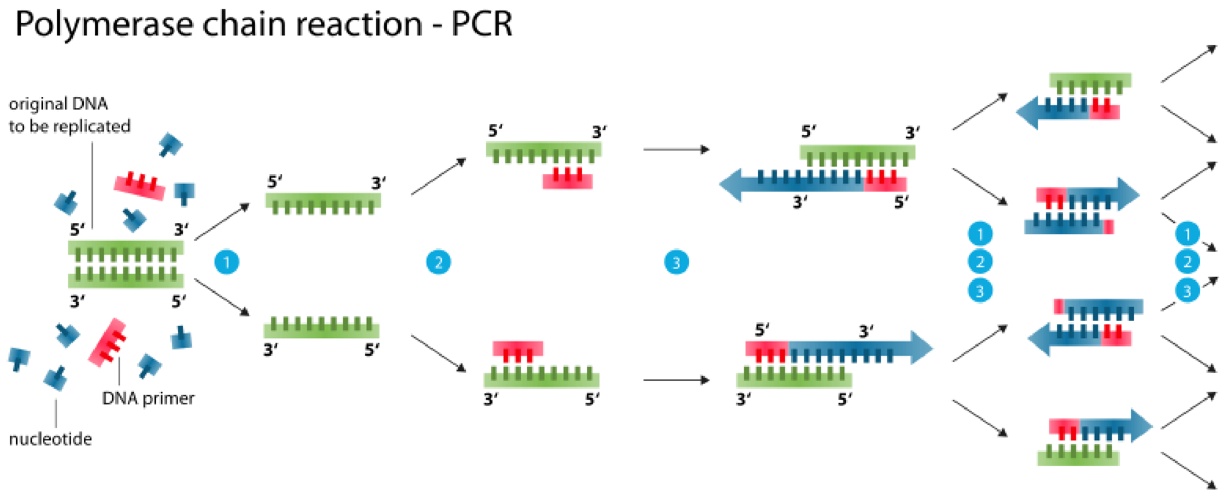
iv. Τη συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} (με βέλτιστη συγκέντρωση 1.5mM και αυξημένη επίδραση τόσο στην ειδικότητα όσο και στην ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης με τρόπο ώστε η περίσσεια του άλατος να αυξάνει την ποσότητα του μη ειδικού προϊόντος ενώ η έλλειψη να μειώνει την ποσότητα επιθυμητού προϊόντος)

v. Τη συγκέντρωση dNTPs (των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM, με υψηλότερες συγκεντρώσεις να επάγουν το σχηματισμό παραπροϊόντων). Τα dNTPs συνδέονται με τα Mg^{2+}και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει το ποσό ελεύθερου, διαθέσιμου Mg^{2+}.

vi. Την παρουσία ενισχυτών (γλυκερόλη, φορμαμίδιο) ή αναστολέων (χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την απομόνωση DNA/ιοντικά επιφανειοδραστικά)

vii. Τον αριθμό των κύκλων

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, μπορεί να επέλθει φάση κορεσμού που επάγεται από διάφορες αιτίες μεταξύ των οποίων είναι: η έλλειψη αρκετής ποσότητας αρχικού DNA, η ατελής σύνθεση νέων κλώνων, η εξάντληση των εκκινητών και των dNTPs, η καταστροφή ή απενεργοποίηση των συστατικών λόγω υψηλών θερμοκρασιών, η παρεμπόδιση της αντίδρασης από παραπροϊόντα, ο κορεσμός του ενζύμου ή/και η χαμηλή ενεργότητά του. Η εξειδίκευση επιτυγχάνεται με χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+}, dNTPs, DNA πολυμεράσης, χαμηλό αριθμό κύκλων, αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού, αυξημένο ρυθμό αυξομείωσης θερμοκρασίας.



ΕΙΚΟΝΑ 20. Ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αντιγράφων του DNA (Microbeonline, 2016)

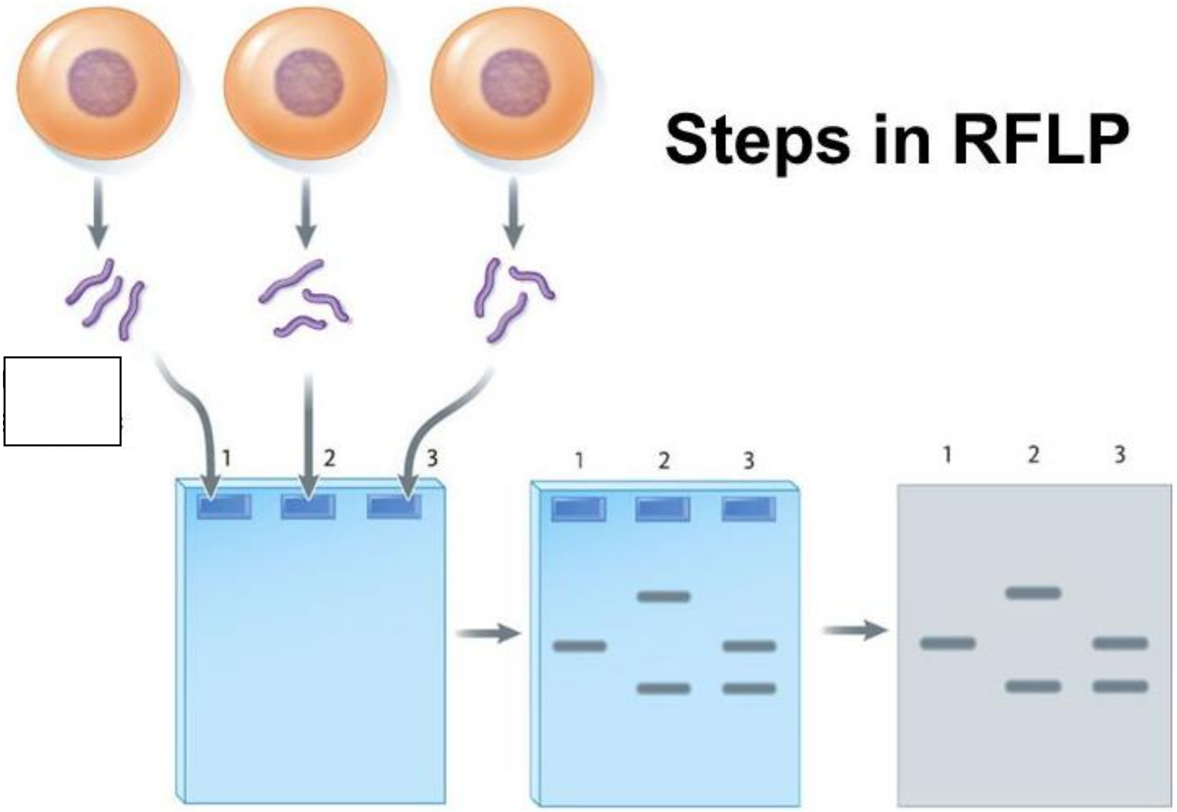
Θερμοσταθερές πολυμεράσες: η ανακάλυψη των πολυμερασών από θερμόφιλα βακτήρια οδήγησε στην αυτοματοποίηση της PCR, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλες τις θερμοκρασίες των διαδικασιών της μεθόδου χωρίς να καταστρέφονται. Πιο συγκεκριμένα, η DNA πολυμεράση του βακτηρίου *Thermusaquaticus* (Taq polymerase)-το οποίο ανακαλύφθηκε σε θερμή πηγή του Yellowstone Εθνικού Πάρκου (1969) και ανέχεται υψηλές θερμοκρασίες-είναι ένα ένζυμο που λειτουργεί σε βέλτιστη θερμοκρασία στους 75 ^{0}C προσθέτοντας 60 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο με συχνότητα λάθους 10^{-5} – 10^{-6} ανά βάση, αλλά δύναται να χρησιμοποιηθεί και στους 95^{0}C. Η Taq πολυμεράση έχει μόνο 5'→3' και όχι 3'→5' εξωνουκλεολυτική δράση και στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία 0.1 μL του ενζύμου χρησιμοποιούνταν για κάθε 25 μL αντίδρασης.

Για την εκτέλεση της μεθόδου απαιτείται απιονισμένο απεσταγμένο νερό (ddH_2O), ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$), μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs), το ζεύγος των εκκινητών (Takahashi forward-reverse primers), η Taq DNA πολυμεράση και το δείγμα DNA προς ενίσχυση σε τελικό όγκο 25μL. Το συνολικό κεντρικό μίγμα των αντιδραστηρίων, χωρίς όμως την ποσότητα DNA, μοιράζεται στα μικροφρεάτια και στη συνέχεια προστίθεται η ποσότητα DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Στη συνέχεια, γίνεται πέψη των PCR προϊόντων με ειδικό περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή αγαρόζης.

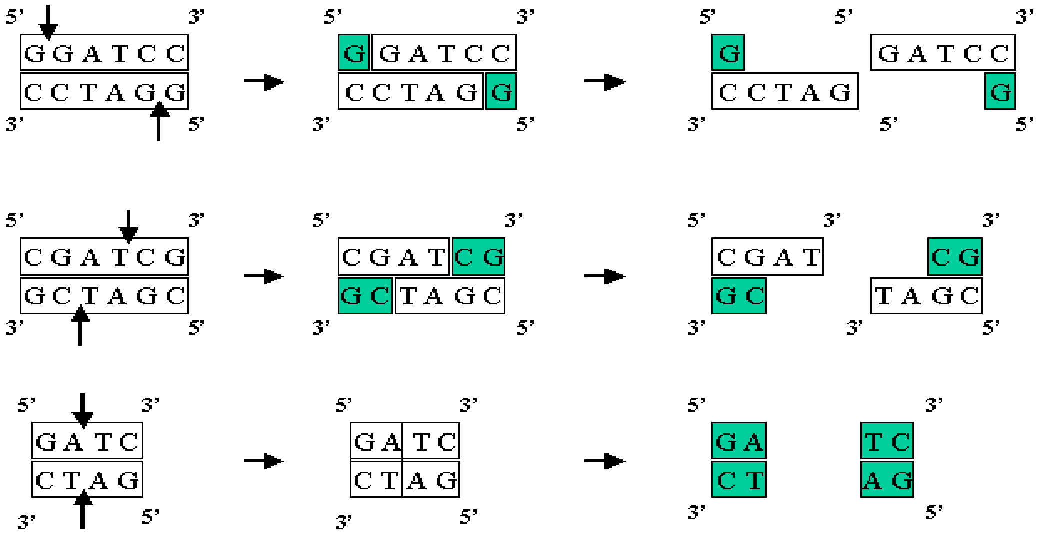
4) RFLP

Η μέθοδος πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Restriction Fragment Length Polymorphism), είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάδειξη πολυμορφισμών σε ομόλογες DNA αλληλουχίες. Αναφέρεται στην ποικιλομορφία ομόλογων αλληλουχιών DNA που προκύπτουν από τη δράση ενζύμων περιορισμού. Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις περιορισμού μεταβάλλουν το μέγεθος των περιοριστικών θραυσμάτων. Η μετάλλαξη που ανιχνεύεται μπορεί να οδηγεί η ίδια σε νόσο, ή να συνδέεται με άλλη που προκαλεί νόσο.



ΕΙΚΟΝΑ 21.Αδρή σχηματική απεικόνιση ερευνητικής διαδικασίας απομόνωσης DNA-RFLP-ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Cole E.)

Για την RFLP ανάλυση, οι κλώνοι του DNA υφίστανται πέψη από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που εντοπίζονται φυσιολογικά σε βακτήρια, και ο ρόλος τους συνίσταται στην προστασία του μικροοργανισμού από ιούς. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA και διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του γενετικού υλικού σε συγκεκριμένα σημεία αφήνοντας είτε τυφλά άκρα ή 5’/3’ ελεύθερα άκρα. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν είναι συνήθως μήκους τεσσάρων ή έξι ζευγών βάσεων και παλίνδρομες, με την έννοια ότι η αλληλουχία των βάσεων στο σημείο δράσης τους με κατεύθυνση ανάγνωσης 5’→3’ είναι ίδια και για τις δύο αλυσίδες. Σε περίπτωση που αλλάξει ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια στην αλληλουχία αναγνώρισης, το ένζυμο δε μπορεί να ασκήσει τη δράση του και άρα δημιουργείται τμήμα μεγαλύτερου μήκους. Αν υπάρχουν δύο διαφορετικοί πολυμορφισμοί (ένας για κάθε χρωμόσωμα) ενός γενετικού τόπου, τότε πρόκειται για ετεροζυγωτία ως προς τον συγκεκριμένο τόπο.



ΕΙΚΟΝΑ 22. Σημεία δράσης περιοριστικών ενδονουκλεασών (Καρβέλης Φ.)

Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αναγνώρισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων και του τρόπου κληρονόμησής τους. Όπως προαναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με αυτή τη μέθοδο δεν είναι απαραίτητο να προκαλούν οι ίδιες ασθένεια αλλά δύνανται να «ταξιδεύουν» μαζί με μετάλλαξη που οδηγεί σε νόσο. Κατόπιν της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση, τα τμήματα DNA που δημιουργούνται διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και μέσω της χρώσης αυτής με φθορίζουσες ουσίες όπως το βρωμιούχο αιθίδιο ή το gelred biotium, ανιχνεύονται με υπεριώδες φως.

Στην παρούσα μελέτη, μετά την αντίδραση PCR, ακολούθησε πέψη των προϊόντων με το ένζυμο περιορισμού BclI-R0160S. Ειδικότερα, 3μL DNA αναμιγνύονταν με 47 μL διαλύματος που περιείχε 0.3 μL του ενζύμου BclI-R0160S , 41.7 μL H_2O και 5μL NEbuffer.

Στη συνέχεια, λάμβανε χώρα επώαση του δείγματος στους 50^0C για 2 ώρες. Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στην πηκτή αγαρόζης.

5) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

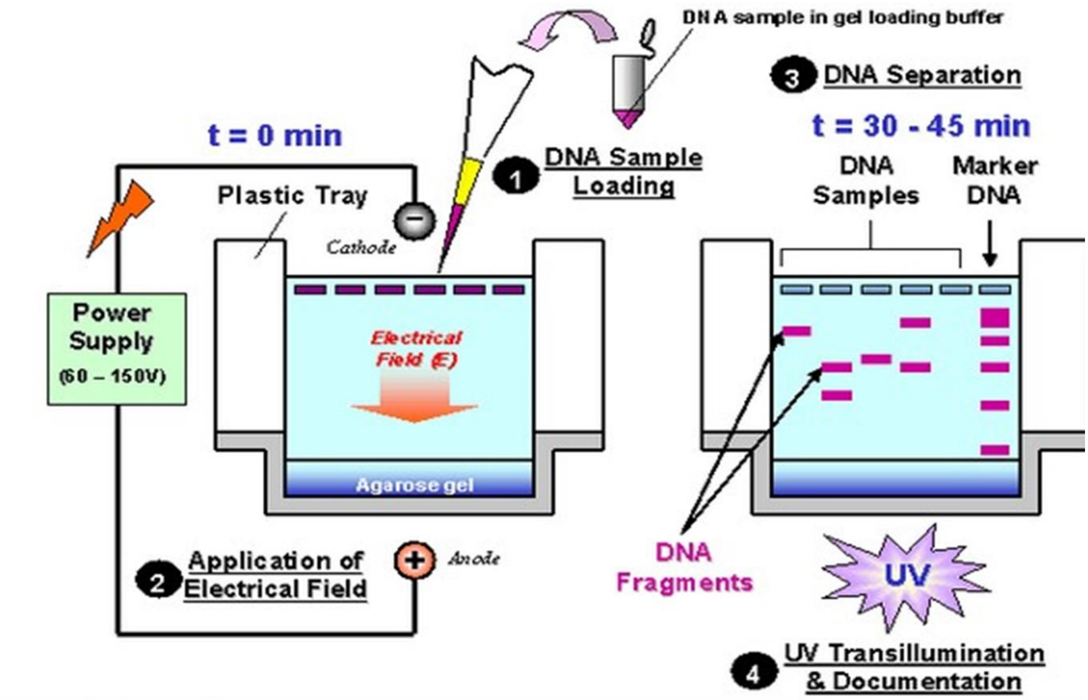
Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί μία σημαντική αναλυτική μέθοδο για τον διαχωρισμό ιονισμένων βιομακρομορίων, όπως το DNA. Η τεχνική βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων σε υγρό μέσο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα δίκλωνα τμήματα DNA, λόγω αρνητικού φορτίου, κινούνται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+) του ηλεκτρικού πεδίου.
Η τεχνική περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των δίκλωνων τμημάτων DNA, την απομόνωση και τελικά την αναγνώρισή τους μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους φωτός. Ο εντοπισμός του DNA στην πηκτή γίνεται με χρώση με χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμβαλλόμενων χρωστικών που φθορίζουν, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο ή το gelred biotium, που χρησιμοποιήθηκε εν προκειμένω.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από φύκη. Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό υλικό αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανόμενων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό πηκτής. Το διάλυμα αγαρόζης σε θερμοκρασία $\approx 100^0C$ πολυμερίζεται, δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45^0C. Η πηκτή αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πηκτή οριζόντιας διάταξης στην οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης και κατεύθυνσης. Η κίνηση τελικά του DNA εξαρτάται από το μέγεθός του, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το ρυθμιστικό διάλυμα, τη συγκέντρωση του πηκτώματος και την παρουσία χρωστικών που αλληλεπιδρούν με το DNA.

Η τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται επηρεάζει την κίνηση των τμημάτων του δίκλωνου DNA. Σε χαμηλές τάσεις, η κίνηση των τμημάτων είναι ανάλογη της τάσης που εφαρμόζεται. Όσο όμως, αυξάνεται η τάση του ηλεκτρικού πεδίου, μειώνεται η ικανότητα διαχωρισμού στην πηκτή.

Η συγκέντρωση πηκτώματος καθορίζει το σχηματισμό των πόρων και το μοριακό ηθμό με τρόπο ώστε υψηλές συγκεντρώσεις να εξασφαλίζουν μικρότερο μέγεθος πόρων. Αυτό οδηγεί και σε μικρότερο μέγεθος μακρομορίου που μπορεί να διέλθει.

Η παρουσία του gelred biotium στην πηκτή αγαρόζης, ως εναλλακτικό μέσο φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο, συγκεντρώνει τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτό με αποτέλεσμα να μειώνει το αρνητικό φορτίο του DNA και να αυξάνει το μήκος και την δυσκαμψία του. Αποτελεί μία εξαιρετικά ευαίσθητη, σταθερή και ασφαλή (σε αντίθεση με το τοξικό βρωμιούχο αιθίδιο) χρωστική που φθορίζει και γίνεται ορατή στο υπεριώδες φως.



ΕΙΚΟΝΑ 23. Αρχές ηλεκτροφόρησης DNAσε πηκτή αγαρόζης (Λιανίδου Ε., 2016)

Για τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει γλυκερόλη, bromophenolblue και ddH_2O που φιλτράρεται σε φίλτρο 0.45μm για την αποφυγή δημιουργίας ιζήματος. Το διάλυμα αυτό συμβάλλει στην αύξηση της πυκνότητας του διαλύματος και άρα στην ομοιόμορφη μετακίνηση των προϊόντων DNA στην πηκτή. Ειδικότερα, η γλυκερόλη βοηθά το δείγμα να καθηλωθεί στον πυθμένα του κάθε φρεατίου της πηκτής. Επιπλέον, προσθέτει χρώμα στο δείγμα, διευκολύνοντας έτσι την παρακολούθηση της κίνησης των τμημάτων DNA. Η σύσταση του διαλύματος φόρτισης περιλαμβάνει αναλυτικά:

Loading buffer

Glycerol	50%
Bromophenol blue	0.1%
ddH_2O	50%

Στο πείραμα μας, η σύνθεση της πηκτής αγαρόζης περιλαμβάνει 100 mLTBE 1X που αναμειγνύονται με 3g αγαρόζης και κατόπιν θέρμανσης σε μικροκύματα στους 150^0C για ≈3 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10μL gelred biotium και το διάλυμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (TBE-Tris/Borate/EDTA) προκύπτει από την αραίωση διαλύματος LTBE 10X που συντίθεται με την ανάμιξη:

- 108g Tris base
- 55g boric acid 40ml
- 0.5M EDTA (pH=8)

50 mL TBE 10X προστίθενται σε 450 ml ddH_2O οπότε και προκύπτει το τελικό ρυθμιστικό διάλυμα.

6) ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Στην εν λόγω μελέτη, το δείγμα DNAαπομονώθηκε από δείγματα περιφερικού αίματος. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης PCR ήταν 25μL. Το διάλυμα περιείχε ddH_2O 14.9 μL, ρυθμιστικό διάλυμα (KapaTaqBuffer) 5μL, διάλυμα $MgCl_2$ 2 μM, ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) 0.2μM, ζεύγος εκκινητών (Takahashi forward-reverse primers) από 0.5 μM, Taq πολυμεράση 0.5μL και γενωμικό DNA 1μL. Σε ένα μικροφρεάτιο κάθε αντίδρασης, το DNA αντικαθίστατο από 1μL H_2O για να αποκλειστεί η πιθανότητα επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων από ξένο DNA(τυφλό δείγμα).

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε 3% πηκτή αγαρόζης (3g αγαρόζης σε 100ml TBE 1X σημασμένου με gelred biotium 10μL). Σε όλα τα δείγματα, πριν τρέξουν στην πηκτή, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στο τελευταίο μικροφρεάτιο, τοποθετήθηκε ο κατάλληλος δείκτης με γνωστές συγκεντρώσεις DNA (DNA ladder).

7) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ BclI ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Η αναγνώριση του πολυμορφισμού BclI TGAT**C**A→TGAT**G**A της θέσης που βρίσκεται 646 βάσεις μετά το 3' άκρο του εξωνίου 2 του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και οδηγεί στη δημιουργία 2 αλληλομόρφων, πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που ακολουθήθηκε από τη μέθοδο RFLP και στη συνέχεια την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Η PCR ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 95^0C για 5 λεπτά. Ακολούθως, σειρά είχαν 35 κύκλοι που περιλάμβαναν τα εξής στάδια: 95^0C για 1 λεπτό (αποδιάταξη-διαχωρισμός αλυσίδων DNA), 60^0C για 30 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών) και 72^0C για 1 λεπτό (επιμήκυνση νέων κλώνων από την Taq πολυμεράση). Τέλος, ολοκληρώθηκε η τελική επιμήκυνση για ακόμη 10 λεπτά στους 72^0C.
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (Takahashi):
Πρόσθιος εκκινητής:5'-TGCTGCCTTATTTGTAAATTCG-3'
Ανάστροφος εκκινητής:5'-AAGCTTAACAATTTTGGCCATC-3'

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
ddH_2O	14.9 μl
Buffer	5μl
$MgCl_2$	1.5μl
DNTPs	0.5μl
Primer Ta Forward	1μl
Primer Ta Reverse	1μl
Taq polymerase	0.1μl
DNA	1μl

Στα προϊόντα της αντίδρασης έγινε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BclI (NewEnglandBiolabs). Συγκεκριμένα, τα 3μL από το προϊόν της PCR αντίδρασης αναμίχθηκαν με 0.3μL του ενζύμου, 5μL 1xNEbuffer (NewEnglandBiolabs) και 41.7μL νερού. Έγινε επώαση για 2 ώρες στους 50^0C. Στη συνέχεια από τα 50μL συνολικά του δείγματος που προέκυψε, τα 10μL αναμίχθηκαν με 2μL loading buffer και τελικά τοποθετήθηκαν 10μL στην πηκτή αγαρόζης προς ηλεκτροφόρηση.

Στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί πέψη, προέκυπτε ζώνη μήκους 334 ζευγών βάσεων. Στα δείγματα που προέκυψαν κατόπιν πέψης, η εικόνα της ηλεκτροφόρησης αφορούσε μία ζώνη στις 334 bp σε περίπτωση ομοζυγωτίας για το C αλληλόμορφο, 2 ζώνες στις 223 και στις 111 bp αντίστοιχα σε περίπτωση ομοζυγωτίας για το G αλληλόμορφο, και 3 ζώνες στις 334, 223 και 111 bpσε περίπτωση ετεροζυγωτίας (G και C αλληλόμορφο).

8) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν και εκτιμήθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας το SPSS 17.

Δοκιμασίες χ^2 χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των μαρτύρων που δεν έπασχαν από χρόνιο σωματικό νόσημα και αυτών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ως προς τη συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων και τη συσχέτισή τους με εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής.

Δ/ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. *Περιγραφή δείγματος ως προς την κατάθλιψη*

Συνολικά το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 102 μάρτυρες που δεν έπασχαν από κάποιο χρόνιο σωματικό νόσημα (102/157, 64.97%) και 55 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (55/157, 35.03%). Από τους 157 συμμετέχοντες στη μελέτη, αφαιρέθηκαν 6 από την ομάδα των μαρτύρων, λόγω έλλειψης αξιολόγησής τους ως προς την εμφάνιση κατάθλιψης με MINI interview. Το τελικό δείγμα της μελέτης συνεπώς αποτέλεσαν 151 άτομα, 96 εθελοντές μάρτυρες (96/151, 63.6%) και 55 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (55/151, 36.4%).

Συνολικά από τα άτομα αυτά, 28 εμφάνισαν κατάθλιψη (28/151, 18.5%). Αναλυτικότερα, 10 άτομα από την ομάδα ελέγχου (10/96, 10.4%) και 18 από τους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (18/55, 32.7%) εμφάνισαν κατάθλιψη (**Πίνακας 1**).

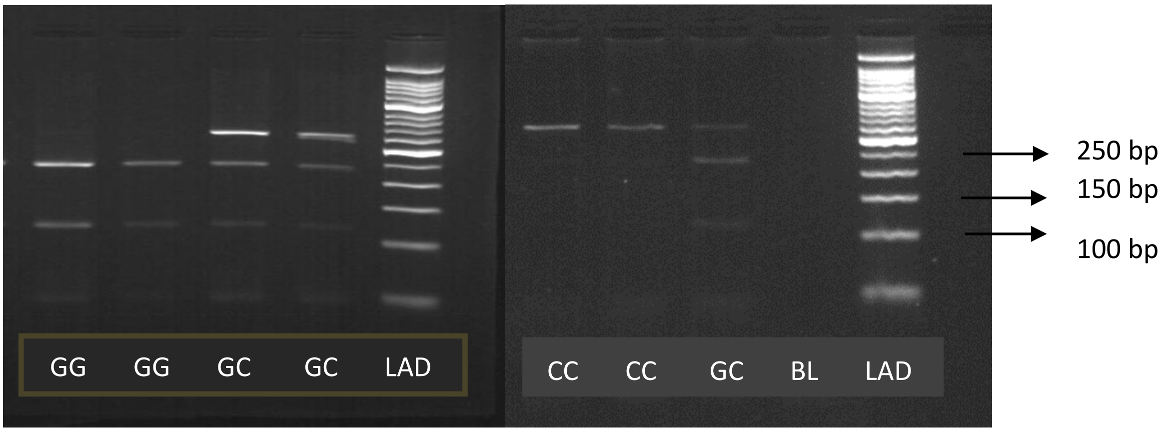
Πίνακας 1. Άτομα που εμφάνισαν κατάθλιψη με και χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα

Σύνολο ατόμων με κατάθλιψη	**Άτομα χωρίς ΡΑ**	**Άτομα με ΡΑ**
n=28	10 (32.72%)	18 (64.28%)

2. *Γενετική ανάλυση του δείγματος*

Από τη γενετική ανάλυση προκύπτουν τρεις διαφορετικοί γονότυποι που αντιστοιχούν στον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (TGAT**C**A→TGAT**G**A) BclI του ιντρονίου 2 στη θέση που βρίσκεται 646 ζεύγη βάσεων μετά το 3' άκρο του εξωνίου 2 του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Οι τρεις γονότυποι που προκύπτουν είναι οι ομοζυγώτες CC, οι ετεροζυγώτες GC και οι ομοζυγώτες GG.

Οι τρεις διαφορετικοί γονότυποι που αφορούν στον πολυμορφισμό BclI αποτυπώνονται στις παρακάτω εικόνες:



ΕΙΚΟΝΑ 24. Φωτογραφίες πηκτής αγαρόζης για τον προσδιορισμό BclI γονοτύπου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR όπου απεικονίζονται οι ομοζυγώτες (GG,CC) και οι ετεροζυγώτες (GC) μετά από πέψη με RFLP. Οι ομοζυγώτες για το Cαλληλόμορφο εμφανίζουν μια ζώνη στις 334 bp, οι ομοζυγώτες για το Gαλληλόμορφο έχουν μία ζώνη στις 223 και μία ζώνη στις 111 bp αντίστοιχα, ένω οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν τρεις ζώνες στις 334, 223 και 111 bp.

3.*<u>Κατανομή γονοτύπων στο δείγμα</u>*

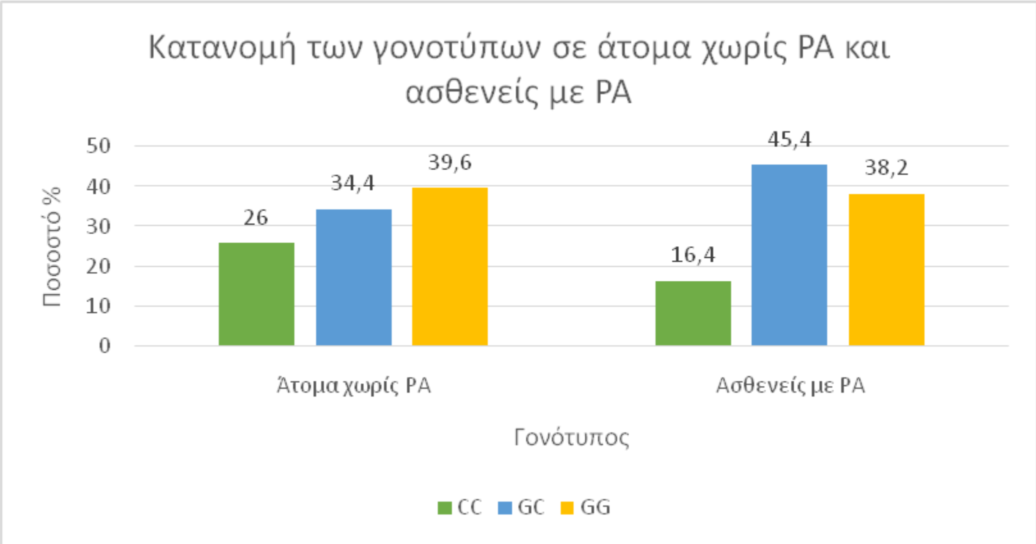
Αναφορικά με την κατανομή των γονοτύπων, ο γονότυπος CC εμφανιζόταν στο 22.5% (34/151) του δείγματος, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τους γονότυπους GCκαι GG ήταν 38.4% (58/151) και 39.1% (59/151).

Μεταξύ των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα το 16.4% (9/55) είχε γονότυπο CC, το 45.4% (25/55) GC και το 38.2% (21/55) GG. Από τους συμμετέχοντες που δεν έπασχαν από χρόνιο σωματικό νόσημα, 26% είχε CC γονότυπο, 34.3% GC και 39.6% GG. (**Πίνακας 2-Διάγραμμα 1**).

Πίνακας 2. Κατανομή των γονοτύπων σε άτομα χωρίς ΡΑ και ασθενείς με ΡΑ

Γονότυπος	Άτομα χωρίς ΡΑ	Ασθενείς με ΡΑ
CC	25 (26.0%)	9 (16.4%)
GC	33 (34.4%)	25 (45.4%)
GG	38 (39.6%)	21 (38.2%)

Διάγραμμα 1. Κατανομή των γονοτύπων σε άτομα χωρίς ΡΑ και ασθενείς με ΡΑ



Αναφορικά με το γονότυπο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ του γονοτύπου και της εμφάνισης ρευματοειδούς αρθρίτιδας [x^2 (2, 151)= 2.59, p=0.27 (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 0.26-0.28)].

Από τα άτομα που εμφάνισαν κατάθλιψη, 21.4% (6/28) είχε γονότυπο CC, 32.14% (9/28) είχε γονότυπο GC και 46.43% (16/28) είχε γονότυπο GG, ενώ από την ομάδα ατόμων χωρίς κατάθλιψη 22.76% (28/123) είχε CC, 39.83% (49/123) είχε GC και 37.41% (46/123) είχε GG γονότυπο (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3. Κατανομή των γονοτύπων σε άτομα με κατάθλιψη και τους υγιείς μάρτυρες

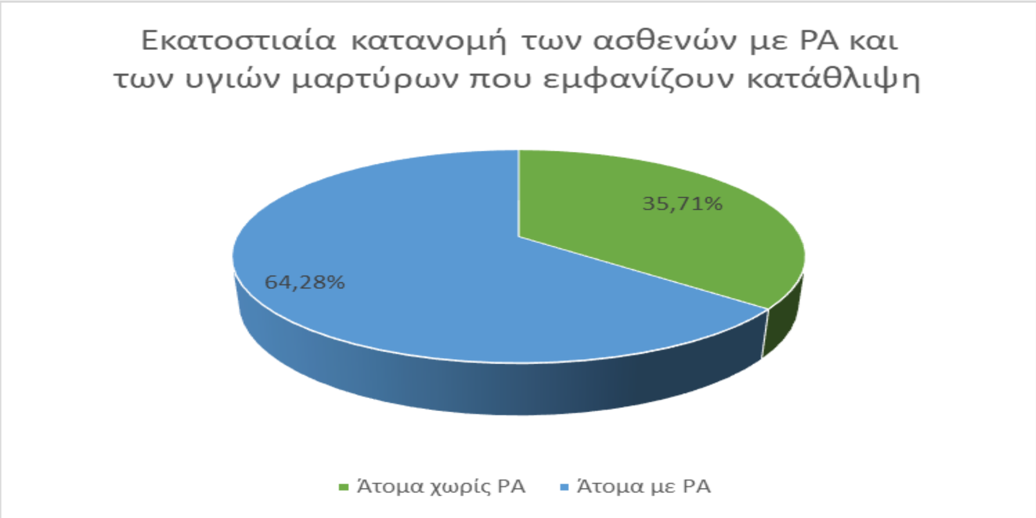
Γονότυπος	Άτομα χωρίς κατάθλιψη	Άτομα με κατάθλιψη
CC	28 (22.76%)	6 (21.43%)
GC	49 (39.83%)	9 (32.14%)
GG	46 (37.41%)	13 (46.43%)

4.<u>Σχέση ρευματοειδούς αρθρίτιδας με την εμφάνιση κατάθλιψης</u>

Συνολικά, ο αριθμός των ατόμων που έπασχαν από κατάθλιψη ήταν 28. Παρατηρείται πως από τα άτομα που δεν είχαν το συγκεκριμένο ρευματικό νόσημα συνολικά 10 είχαν κατάθλιψη, ενώ από τους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα 18 άτομα είχαν επίσης καταθλιπτική διαταραχή (**Διάγραμμα 2**).

Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της εμφάνισης κατάθλιψης σε αυτούς τους ασθενείς [x^2 (1, 151)= 11.52, p=0.001]. Οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντικότερα πιο συχνά κατάθλιψη (32.7%) από τους μάρτυρες (10.4%).

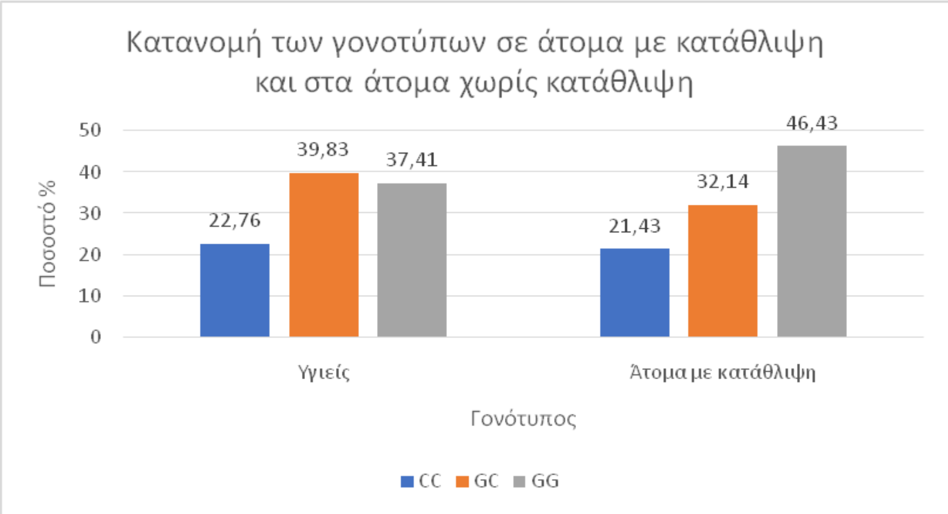
Διάγραμμα 2.Εκατοστιαία αναλογία των ατόμων με ρευματοειδή αρθρίτιδα και των μαρτύρων που εμφάνισαν κατάθλιψη



5. <u>Σχέση Γονότυπου (ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ρευματοειδούς αρθρίτιδας) με κατάθλιψη</u>

Συνολικά στο δείγμα, 34 άτομα έφεραν CC γονότυπο, 58 άτομα ήταν ετεροζυγώτες για το C αλληλόμορφο με GC γονότυπο και 59 ήταν ομοζυγώτες για το G αλλήλιο (**Διάγραμμα 3**). Στο σύνολο του δείγματος (μάρτυρες και ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα) δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ του γονοτύπου και της εμφάνισης κατάθλιψης [x^2 (2, 151)= 0.85, p=0.69 (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 0.68-0.70)].

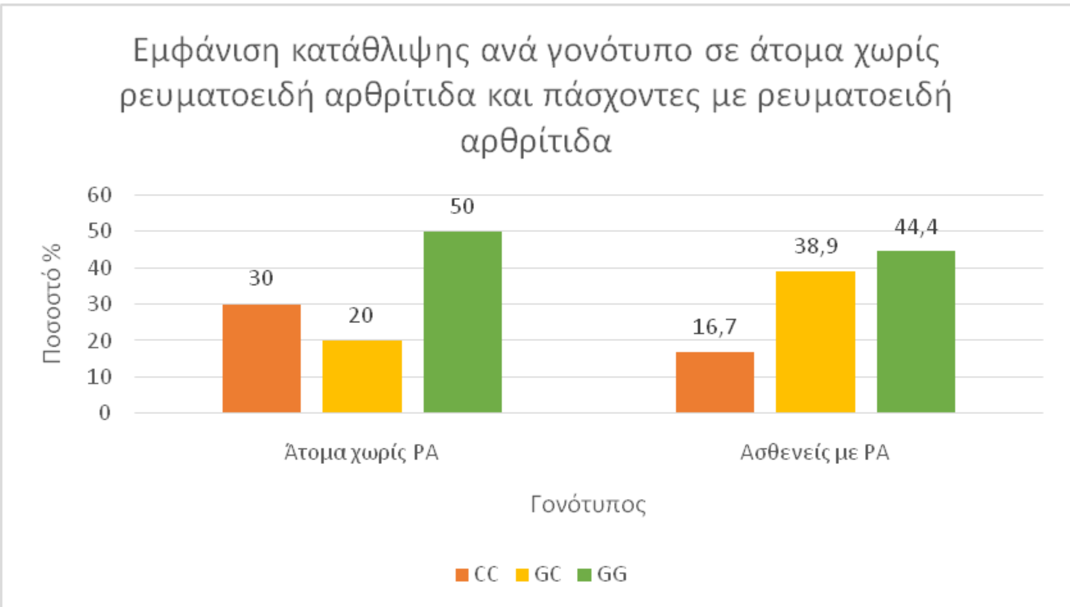
Διάγραμμα 3. Κατανομή των γονοτύπων σε άτομα με και χωρίς κατάθλιψη



6. <u>Αλληλεπίδραση γονότυπου με ΡΑ για εμφάνιση κατάθλιψης (σχέση γονότυπου με εμφάνιση κατάθλιψης χωριστά σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και στους μάρτυρες</u>)

Ως προς την εμφάνιση κατάθλιψης στα άτομα χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα ήταν 30%στους μάρτυρες με CC γονότυπο, σε αυτούς με GC γονότυπο ήταν 20% και στα άτομα με GG αλληλόμορφα ήταν 50%. Τα ποσοστά της κατάθλιψης στους πάσχοντες από ρευματοειδή αρθρίτιδα ήταν 16.7% στην ομάδα με CC γονότυπο, 38.9% σε αυτούς με GC αλληλόμορφα και 44.4% στους ασθενείς με GG γονότυπο (**Διάγραμμα 4, Πίνακας 4**).

Διάγραμμα 4. Εμφάνιση κατάθλιψης ανά γονότυπο σε άτομα χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα και πάσχοντες με ρευματοειδή αρθρίτιδα



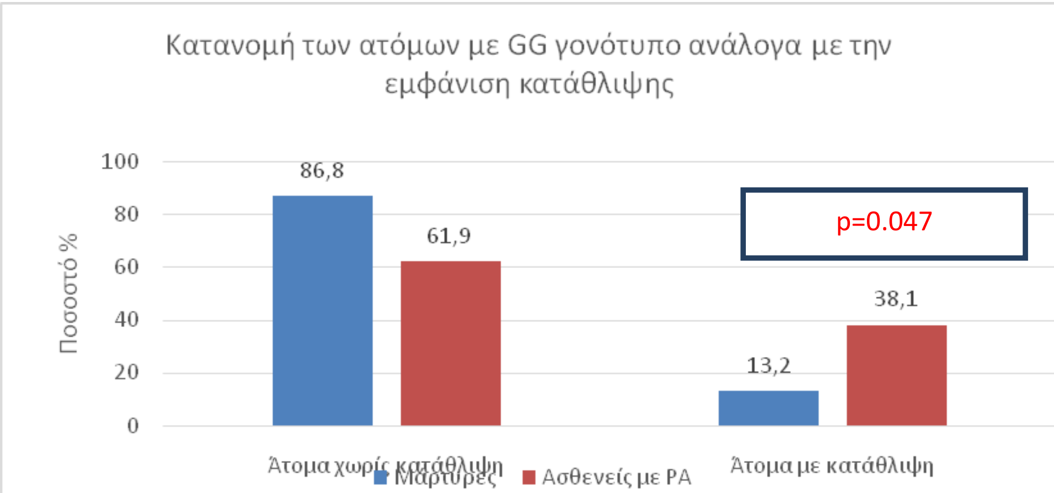
Πίνακας 4. Κατανομή των γονοτύπων σε άτομα που εμφάνισαν κατάθλιψη και έπασχαν από ρευματοειδή αρθρίτιδα

Σύνολο ατόμων με κατάθλιψη και ΡΑ	**CC**	**GC**	**GG**
n=18	3 (16.7%)	7 (38.9%)	8 (44.4%)

Κατά τη ταξινόμηση των ατόμων του δείγματος με κριτήριο το γονότυπο, βρέθηκε οριακή στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ κατάθλιψης και ρευματοειδούς αρθρίτιδας για τους ομοζυγώτες του G αλληλίου (GG) [x^2 (1, 59)= 4.90, p=0.047].

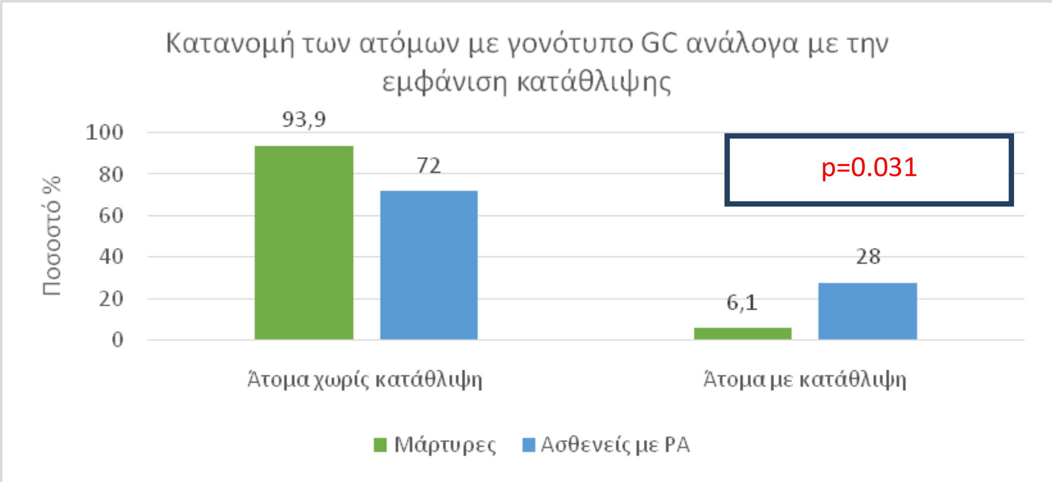
Πιο συγκεκριμένα, οι ομοζυγώτες GG ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφάνιζαν μεγαλύτερο ποσοστό κατάθλιψης (38.1%) από τους μάρτυρες ομοζυγώτες του G αλληλίου (GG) (13.2%), όπως παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 5**.

Διάγραμμα 5. Κατανομή των μαρτύρων και ασθενών με ΡΑ με γονότυπο GG ανάλογα με την εμφάνιση κατάθλιψης



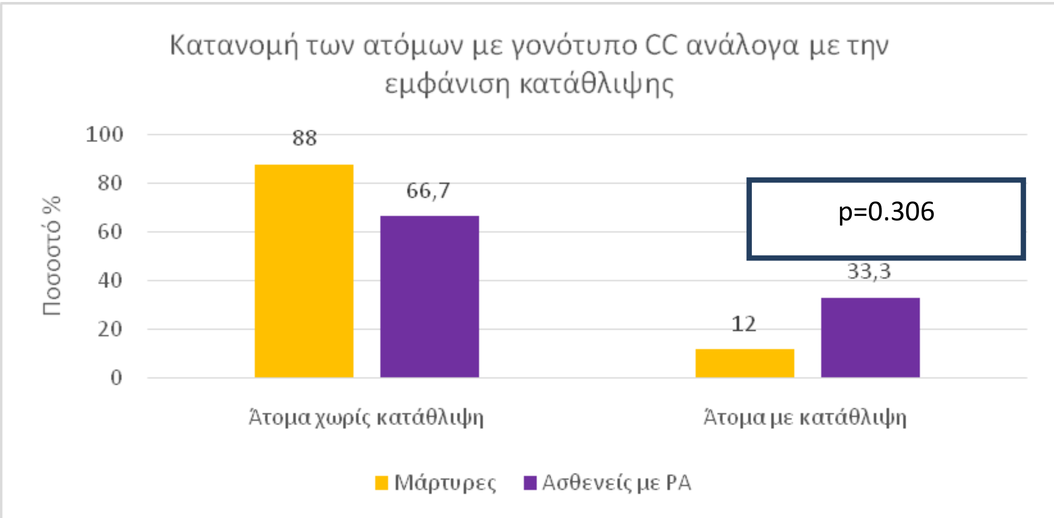
Στατιστικώς σημαντική σχέση [x^2 (1, 58)= 5.22, p=0.03] βρέθηκε και για τους ετεροζυγώτες (GC) πάσχοντες από ρευματοειδή αρθρίτιδα (28%), όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 6**, που παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά κατάθλιψης σε σύγκριση με τους μάρτυρες ετεροζυγώτες (GC) (6.1%).

Διάγραμμα 6. Κατανομή των μαρτύρων και ασθενών με ΡΑ με γονότυπο GC ανάλογα με την εμφάνιση κατάθλιψης



Αντίθετα η απουσία του αλληλόμορφου G (γονότυπος CC) φαίνεται ότι δε συνδέεται με την εμφάνιση κατάθλιψης [x^2 (1, 34)= 2.07, p=0.31] στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (33.3%) συγκριτικά με τους μάρτυρες ομοζυγώτες του αλληλίου C (CC) (12.0%), όπως επεξηγείται στο **διάγραμμα 7**.

Διάγραμμα 7. Κατανομή των μαρτύρων και ασθενών με ΡΑ με γονότυπο CC ανάλογα με την εμφάνιση κατάθλιψης



Ε/ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκε η συσχέτιση της ύπαρξης κατάθλιψης σε ασθενείς που έπασχαν από ρευματοειδή αρθρίτιδα συγκριτικά με τα άτομα που δεν έπασχαν από κάποιο χρόνιο νόσημα και επιχειρήθηκε η συσχέτιση εμφάνισης μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής με τον πολυμορφισμό BclI του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Εντοπίστηκε λοιπόν διαφορά ως προς την εμφάνιση της κατάθλιψης στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ενώ από την ομάδα των ασθενών συσχετίστηκε η παρουσία του πολυμορφισμού με τη συχνότητα εμφάνισης κατάθλιψης.

Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφάνιζαν συχνότερα κατάθλιψη από τους μάρτυρες. Η κατανομή των γονοτύπων στο συνολικό πληθυσμό δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική σχέση με την εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το κύριο εύρημα της μελέτης αφορά στη παρουσία του G αλληλομόρφου, είτε σε ομοζυγωτία ή σε ετεροζυγωτία, στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και στη συσχέτισή του με κατάθλιψη.

Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν την ισχυρή συσχέτιση του G αλληλομόρφου με την καταθλιπτική διαταραχή σε χρονίως πάσχοντες, χωρίς ωστόσο επαρκή δεδομένα για τους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [22], [24].

Αναφέρεται ακόμα ότι η παρουσία του G αλληλομόρφου και ιδιαίτερα σε ομοζυγωτία συνδέεται με αυξημένα ποσοστά μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής, με παρόμοια ευρήματα και σε ασθενείς που έπασχαν από άλλες μορφές κατάθλιψης [21], [23], [24].

Επιπλέον, μια ενδιαφέρουσα μελέτη έχει δείξει ότι οι ομόζυγοι για το G αλλήλιο καταθλιπτικοί ασθενείς με παθολογική δοκιμασία καταστολής του άξονα σημείωναν μεγαλύτερα ποσοστά υποτροπής και μη ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αντικαταθλιπτική αγωγή [21]. Μελέτες χρονίως πασχόντων που έφεραν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό και συγκεκριμένα ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο, οφθαλμοπάθεια νόσου Graves, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου και κυστική ίνωση, έδειξαν πως ανταποκρίνονταν διαφορετικά στην εξωγενή χορήγηση κορτικοστεροειδών, υποδηλώνοντας διαταραχή της απάντησης του άξονα [22]–[24], [26].

Γενικότερα και υπό το πρίσμα της δυσλειτουργικής σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών, η χορήγηση ανταγωνιστών όπως η μιφεπριστόνη φάνηκε πως φέρει ευεργετικές επιδράσεις σε ασθενείς με καταθλιπτική διαταραχή [23].

Ο υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακός άξονας έχει βρεθεί πως παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα σε πάσχοντες από καταθλιπτική διαταραχή [21], [27]. Η εκτίμηση του άξονα όπως ήδη έχει αναφερθεί, επιτελείται μέσω δοκιμασιών καταστολής, που στους καταθλιπτικούς ασθενείς ανιχνεύεται συχνά παθολογική. Το εύρημα αυτό αποκτά μεγαλύτερη σημασία όταν συνδυάζεται και με καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Μελέτες δείχνουν ότι η χρόνια φλεγμονή οδηγεί στην ενισχυμένη έκφραση και δράση φλεγμονωδών μορίων όπως κυτταροκίνες και ιδιαίτερα η IL-1, η IL-6 και ο TNF-a [9], [18], [38], [41]. Τα μόρια αυτά φαίνεται ότι φέρουν πλειοτροπικές δράσεις που αφορούν τόσο στη νευρογένεση και διαφοροποίση των αρχέγονων νευρικών κυττάρων, όσο και στην έκφραση των νευροτροφικών παραγόντων του εγκεφάλου και στην ενεργοποίηση του άξονα. Σύμφωνα λοιπόν με την υπόθεση της φλεγμονής, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες επάγουν την υπερ-ενεργοποίηση του άξονα με επακόλουθη αυξημένη παραγωγή CRH, ACTH και κορτιζόλης, μη ανταπόκριση στις δοκιμασίες καταστολής και μείωση του όγκου του ιππόκαμπου. Η αυξημένη δραστηριότητα του άξονα συνυπάρχει με μειωμένη ευαισθησία των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στη σύνδεση της κορτιζόλης. Επομένως, οι υποδοχείς αυτοί και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου τους σε άτομα με χρόνια φλεγμονή και κατάθλιψη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της πιθανής παθογενετικής σύνδεσης των δύο νοσημάτων.

<u>Συμπεράσματα-Μελλοντικοί στόχοι</u>

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της κατάθλιψης. Γενετικές προσεγγίσεις επιχειρούν να συμβάλλουν στην πολύπλοκη παθογένεια του νοσήματος που αποτελεί συνδυασμό τόσο περιβαλλοντικών όσο και οικογενειακών, κοινωνικών, και συνυπαρχόντων νοσολογικών παραγόντων. Εκτενέστερα ως τώρα έχουν μελετηθεί δείκτες της λειτουργίας του σεροτονινεργικού και ντοπαμινεργικού συστήματος. Γενετικές μελέτες συμπεριλαμβανομένων μελετών σύνδεσης, συσχέτισης αλληλομόρφων, επιγενετικής, σάρωσης γονιδιώματος και πρωτεομικής, έχουν αναδείξει το κυρίαρχο ρόλο αυτών των

νευροδιαβιβαστών στην παθογένεια της κατάθλιψης [4], [7], [41–44]. Οι συγκεκριμένες οδοί άλλωστε αποτελούν και το υπόστρωμα της σύγχρονης φαρμακευτικής θεραπευτικής στρατηγικής. Προστίθενται ωστόσο πλέον και νεότερα δεδομένα που αφορούν τους νευροτροφικούς αυξητικούς παράγοντες και ιδιαίτερα τον προερχόμενο από τον εγκέφαλο νευροτροφικό παράγοντα και την ισχυρή συσχέτισή του με την καταθλιπτική διαταραχή, όπως επίσης και τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων [9], [18], [27], [27].
Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη του πολυμορφισμού BclI του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε άτομα με ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε μάρτυρες, οι οποίοι αξιολογήθηκαν και ως προς την εμφάνιση μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής.

Οι πάσχοντες από ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφανίζουν συχνότερα κατάθλιψη από τους μάρτυρες και ο πολυμορφισμός BclI του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση κατάθλιψης στους συγκεκριμένους ασθενείς. Η περαιτέρω συσχέτιση του πολυμορφισμού με την παθολογική δραστηριότητα του άξονα στους ασθενείς με κατάθλιψη είναι αναγκαία. Θα μπορούσε να προταθεί η μέτρηση επιπέδων κορτιζόλης και CRH στον ορό των ασθενών ώστε να διευκρινιστεί αν η παρουσία του πολυμορφισμού συνδέεται με τη μειωμένη ευαισθησία στη δράση της κορτιζόλης.
Ακόμη, ο πολυμορφισμός που μελετήθηκε αφορά τη γενετική περιοχή του ιντρονίου 2 του γονιδίου του υποδοχέα. Συνεπώς, θα πρέπει να αναλυθούν οι διαφορετικοί απλότυποι που προκύπτουν από τους συνδυασμούς των πολυμορφισμών του γονιδίου των γλυκοκορτικοειδών με ενδεχομένως τροποποιημένες επιδράσεις τόσο στο μεταβολικό προφίλ των ασθενών όσο και στη δραστηριότητα του άξονα.
Η μελέτη μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος ασθενών που πάσχουν και από άλλα χρόνια νοσήματα όπως συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, χρόνιες λοιμώξεις όπως HIV/AIDS, νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπως νόσος Alzheimer ή νόσος Parkinson, σακχαρώδης διαβήτης, καρδιακή ανεπάρκεια και στεφανιαία νόσο, αναπνευστικές παθήσεις όπως άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, και κακοήθειες είτε αιματολογικές ή συμπαγών οργάνων είναι αναγκαία. Επίσης, η περαιτέρω ανάλυση πρόσθετων στοιχείων συμπεριλαμβανομένων ανεξάρτητων μεταβλητών (ηλικία, φύλο), οικογενειακής κατάστασης, επαγγελματικών και οικονομικών συνθηκών και άλλων συνοδών νόσων είναι απαραίτητη.

Συμπερασματικά, η καλύτερη κατανόηση του γενετικού υποστρώματος που εμπλέκεται στην εμφάνιση συγκεκριμένων ενδοφαινοτύπων θα οδηγήσει στην αποτελεσματικότερη και ακριβέστερη θεραπευτική αντιμετώπιση. Ο τελικός στόχος θα πρέπει να είναι η εξατομικευμένη θεραπεία με βάση τις συνυπάρχουσες παθήσεις του ασθενούς, τις γενετικές παραμέτρους και τα κλινικά χαρακτηριστικά του.

Η συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση νοσημάτων σχετιζόμενων με χρόνια φλεγμονή όπως επίσης και η συσχέτισή τους με την εμφάνιση καταθλιπτικής διαταραχής, συνδέεται με πολλές συνέπειες για τη ζωή των ασθενών. Ο χρόνιος πόνος, η μειωμένη λειτουργικότητα, η χαμηλότερη ποιότητα ζωής, οι οικονομικές επιπτώσεις και τελικά η χειρότερη πρόγνωση των αρρώστων που πάσχουν από τα νοσήματα αυτά αποτελούν σημαντικά προβλήματα που δυσκολεύουν την επιτυχή αντιμετώπισή τους. Επομένως, χρειάζεται να αναπτυχθούν εξειδικευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

ΣΤ/ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] E. Lykouras, D. Malliaras, and G. N. Christodoulou, “Disturbances of perception in depressive patients,” *Psychopathology*, vol. 17, no. 3, pp. 117–120, 1984.

[2] M. Margariti, D. Ploumpidis, M. Economou, G. N. Christodoulou, and G. N. Papadimitriou, “Quality of life in schizophrenia spectrum disorders: associations with insight and psychopathology,” *Psychiatry Res.*, vol. 225, no. 3, pp. 695–701, Feb. 2015.

[3] American Psychiatric Association and American Psychiatric Association, Eds., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*, 5th ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association, 2013.

[4] G. I. Papakostas, “Cognitive symptoms in patients with major depressive disorder and their implications for clinical practice,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 75, no. 1, pp. 8–14, Jan. 2014.

[5] *Second-generation antidepressants in the pharmacologic treatment of adult depression: an update of the 2007 comparative effectiveness review*. .

[6] I. I. Gottesman and T. D. Gould, “The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions,” *Am. J. Psychiatry*, vol. 160, no. 4, pp. 636–645, Apr. 2003.

[7] G. Hasler, W. C. Drevets, H. K. Manji, and D. S. Charney, “Discovering endophenotypes for major depression,” *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 29, no. 10, pp. 1765–1781, Oct. 2004.

[8] C. Otte *et al.*, “Major depressive disorder,” *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 2, p. 16065, 15 2016.

[9] J. J. Young, T. Silber, D. Bruno, I. R. Galatzer-Levy, N. Pomara, and C. R. Marmar, “Is there Progress? An Overview of Selecting Biomarker Candidates for Major Depressive Disorder,” *Front. Psychiatry*, vol. 7, p. 72, 2016.

[10] A. S. Elhwuegi, “Central monoamines and their role in major depression,” *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 28, no. 3, pp. 435–451, May 2004.

[11] R. A. Albright *et al.*, “Molecular basis of purinergic signal metabolism by ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases 4 and 1 and implications in stroke,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 6, pp. 3294–3306, Feb. 2014.

[12] F. Delis *et al.*, “Resilience Mediates the Influence of a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene on the Relationship between the Burden of Chronic Illness and Depression,” *Psychother. Psychosom.*, vol. 86, no. 5, pp. 305–307, 2017.

[13] K. M. Pearson-Fuhrhop *et al.*, “Dopamine Genetic Risk Score Predicts Depressive Symptoms in Healthy Adults and Adults with Depression,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, p. e93772, May 2014.

[14] E. M. Opmeer, R. Kortekaas, and A. Aleman, “Depression and the role of genes involved in dopamine metabolism and signalling,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 92, no. 2, pp. 112–133, Oct. 2010.

[15] E. Corrales, A. Navarro, P. Cuenca, and D. Campos, “Candidate gene study reveals DRD1 and DRD2 as putative interacting risk factors for youth depression,” *Psychiatry Res.*, vol. 244, pp. 71–77, Oct. 2016.

[16] “DRD2/ANKK1 Taq1A polymorphism (rs1800497) has opposing effects on D2/3 receptor binding in healthy controls and patients with major depressive disorder.”

[17] N. A. Kocabas, “Catechol-O-methyltransferase (COMT) pharmacogenetics in the treatment response phenotypes of major depressive disorder (MDD),” *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, vol. 11, no. 3, pp. 264–272, May 2012.

[18] M.-C. Audet and H. Anisman, “Interplay between pro-inflammatory cytokines and growth factors in depressive illnesses,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 68, 2013.

[19] T. R. Harrison and J. L. Jameson, Eds., *Harrison’s endocrinology*. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2006.

[20] M. Fakhoury, “New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders,” *Gen. Hosp. Psychiatry*, vol. 37, no. 2, pp. 172–177, Apr. 2015.

[21] J. P. Brouwer *et al.*, “Prediction of treatment response by HPA-axis and glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 31, no. 10, pp. 1154–1163, Nov. 2006.

[22] L. Manenschijn, E. L. T. van den Akker, S. W. J. Lamberts, and E. F. C. van Rossum, “Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1179, pp. 179–198, Oct. 2009.

[23] S. Claes, “Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1179, pp. 216–228, Oct. 2009.

[24] A. T. Spijker and E. F. C. van Rossum, “Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Focus on glucocorticoid sensitivity and neurocognitive functioning,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1179, pp. 199–215, Oct. 2009.

[25] S. Wüst, E. F. C. Van Rossum, I. S. Federenko, J. W. Koper, R. Kumsta, and D. H. Hellhammer, “Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 2, pp. 565–573, Feb. 2004.

[26] A. G. Moraitis, T. Block, D. Nguyen, and J. K. Belanoff, “The role of glucocorticoid receptors in metabolic syndrome and psychiatric illness,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 165, no. Pt A, pp. 114–120, 2017.

[27] K. Wingenfeld and O. T. Wolf, “HPA axis alterations in mental disorders: impact on memory and its relevance for therapeutic interventions,” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 17, no. 6, pp. 714–722, Dec. 2011.

[28] F. Teles, A. L. Amorim de Albuquerque, I. K. Freitas Guedes Lins, P. Carvalho Medrado, and A. Falcão Pedrosa Costa, “Quality of life and depression in haemodialysis patients,” *Psychol. Health Med.*, pp. 1–10, Apr. 2018.

[29] M. Raič, “Depression and Heart Diseases: Leading Health Problems,” *Psychiatr. Danub.*, vol. 29 Suppl 4, no. Suppl 4, pp. 770–777, Dec. 2017.

[30] S. M. Jang *et al.*, “Depression is a major determinant of both disease-specific and generic health-related quality of life in people with severe COPD,” *Chron. Respir. Dis.*, p. 1479972318775422, Jan. 2018.

[31] P. Keightley, R. E. Reay, P. Pavli, and J. C. Looi, “Inflammatory bowel disease-related fatigue is correlated with depression and gender,” *Australas. Psychiatry Bull. R. Aust. N. Z. Coll. Psychiatr.*, p. 1039856218772245, May 2018.

[32] K. R. R. Krishnan *et al.*, “Comorbidity of depression with other medical diseases in the elderly,” *Biol. Psychiatry*, vol. 52, no. 6, pp. 559–588, Sep. 2002.

[33] A. M. Rathbun, G. W. Reed, and L. R. Harrold, “The temporal relationship between depression and rheumatoid arthritis disease activity, treatment persistence and response: a systematic review,” *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 52, no. 10, pp. 1785–1794, Oct. 2013.

[34] M. Jafferany and P. Pastolero, “Psychiatric and Psychological Impact of Chronic Skin Disease,” *Prim. Care Companion CNS Disord.*, vol. 20, no. 2, Apr. 2018.

[35] T. Hyphantis, K. Kotsis, P. V. Voulgari, N. Tsifetaki, F. Creed, and A. A. Drosos, “Diagnostic accuracy, internal consistency, and convergent validity of the Greek version of the patient health questionnaire 9 in diagnosing depression in rheumatologic disorders,” *Arthritis Care Res.*, vol. 63, no. 9, pp. 1313–1321, Sep. 2011.

[36] T. O. Bruce, “Comorbid depression in rheumatoid arthritis: pathophysiology and clinical implications,” *Curr. Psychiatry Rep.*, vol. 10, no. 3, pp. 258–264, Jun. 2008.

[37] F. Matcham, L. Rayner, S. Steer, and M. Hotopf, “The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis,” *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 52, no. 12, pp. 2136–2148, Dec. 2013.

[38] B. Misiak *et al.*, “Cytokine alterations and cognitive impairment in major depressive disorder: From putative mechanisms to novel treatment targets,” *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 80, no. Pt C, pp. 177–188, Jan. 2018.

[39] C. M. Pariante and A. H. Miller, “Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment,” *Biol. Psychiatry*, vol. 49, no. 5, pp. 391–404, Mar. 2001.

[40] M. Timonen *et al.*, “Suicides in persons suffering from rheumatoid arthritis,” *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 42, no. 2, pp. 287–291, Feb. 2003.

[41] E. F. Morand and M. Leech, “Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 79, no. 4, pp. 395–399, Aug. 2001.

[42] N. Matosin, T. Halldorsdottir, and E. B. Binder, “Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model,” *Biol. Psychiatry*, Mar. 2018.

[43] N. R. Wray and P. F. Sullivan, “Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression,” p. , Jul. 2017.

[44] F. W. Lohoff, “Overview of the genetics of major depressive disorder,” *Curr. Psychiatry Rep.*, vol. 12, no. 6, pp. 539–546, Dec. 2010.

[45] T. Goltser-Dubner, E. Galili-Weisstub, and R. H. Segman, “Genetics of unipolar major depressive disorder,” *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.*, vol. 47, no. 1, pp. 72–82, 2010.