Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Lekarski

Józefina Rawska

Znaczenie genów: SLC6A4 i NPY w etiologii zaburzeń depresyjnych

Praca na stopień
doktora nauk medycznych

Promotor:
prof. dr hab. n. med. Piotr Gałecki

Łódź, 2022

I. STRESZCZENIE

Zaburzenia depresyjne należą do jednych z najczęściej diagnozowanych spośród chorób psychicznych jednostek chorobowych. Depresja jest objawem, który często współwystępuje i towarzyszy innym schorzeniom. Liczba osób ze zdiagnozowanymi i leczonymi zaburzeniami depresyjnymi od kilkunastu lat wzrasta nie tylko w Polsce, ale także w prawie wszystkich rozwiniętych krajach Europy. Wzrost ilości zachorowań jest wyraźny i postępujący. Zaburzenia afektywne skutkują poważnymi następstwami dla jednostki i społeczeństwa, dlatego stanowią bardzo ważny problem medyczny i społeczny.

Badania epidemiologiczne wskazują, że depresja jest zjawiskiem częstym wśród osób hospitalizowanych i leczonych ambulatoryjnie z powodu chorób somatycznych. Obserwuje się wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia i rozwoju zaburzeń depresyjnych u osób z chorobami somatycznymi. Konsekwencją współwystępowania depresji i chorób somatycznych są trudności związane z koniecznością współpracy w zakresie leczenia farmakologicznego oraz gorszym rokowaniem.

Choroby afektywne stanowią grupę zaburzeń psychicznych o nieznanej etiologii. Modele genetyczne próbują wyjaśnić znaczenie genów w chorobach psychicznych. Według aktualnej wiedzy geny nie stanowią jedynej, bezpośredniej przyczyny prowadzącej do wystąpienia choroby psychicznej. Dostrzega się raczej fakt, iż genetyczne zmiany molekularne mogą stwarzać ryzyko wystąpienia choroby psychicznej. Poszukuje się również zależności i analizuje dane w zakresie interakcji gen - środowisko. Aktualnie, w teorii neurorozwojowej, łączy się znaczenie czynników biologicznych, psychologicznych i środowiskowych.

Podstawowym celem i zadaniem badań genetycznych jest próba określenia udziału czynników genetycznych w patogenezie chorób afektywnych. Należy to do zadań genetyki populacyjnej, w zakres której wchodzą: badania rodzin, badania bliźniąt, badania dzieci adoptowanych. W genetyce wykorzystuje się badanie ekspresji genów na poziomie mRNA oraz badanie ekspresji genu poziomie białka.

Obraz kliniczny zaburzeń depresyjnych jest zróżnicowany. Dowiedziono, iż zmienność kliniczna jest związana z heterogennością genetyczną. Zmienność fenotypów w populacji jest zdeterminowana przez uzupełniające się czynniki, którymi są działanie środowiska

oraz czynnik informacji genetycznej i jego wpływ.

Nadal poszukuje się genów mogących być kandydatami i biorących udział w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Prace badawcze koncentrują się między innymi nad szukaniem przyczyn depresji w zaburzeniach regulacji układów neuroprzekaźnikowych z mózgu. Układy neuroprzekaźnikowe w obrębie centralnego układu nerwowego opisuje się w zależności od występującego klasycznego neuroprzekaźnika, który syntetyzują komórki nerwowe tego układu. Układy peptydergiczne wraz neuropeptydami mogą w licznych przypadkach odgrywać rolę neuroprzekaźników oraz hormonów.

Celem pracy badawczej jest ocena wpływu genów SLC6A4 i NPY na etiologię depresji. Szczegółowym zadaniem pracy była ocena ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów SLC6A4 i NPY u osób z zaburzeniami depresyjnymi bez chorób somatycznych, z zaburzeniami depresyjnymi z towarzyszącymi chorobami somatycznymi i porównanie z osobami zdrowymi. Kolejnym celem była ocena danych socjodemograficznych i medycznych oraz parametrów biochemicznych dla analizowanych genów w grupie osób zdrowych, w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi bez chorób somatycznych i w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi z chorobami somatycznymi.

Wybrane geny stanowią obiekt zainteresowań badaczy ze względu na możliwość ich udziału w patofizjologii zaburzeń depresyjnych.

W badaniu wzięło udział łącznie 184 osób, w tym 135 osób z rozpoznanymi zaburzeniami depresyjnymi pod postacią F32, F33, F06.3 według klasyfikacji ICD-10 oraz 49 osób zdrowych. Pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi podzielono na dwie grupy: osoby ze współwystępującymi schorzeniami somatycznymi i bez współwystępowania takich chorób. Wszyscy uczestnicy badania zostali poproszeni o wypełnienie ankiet zawierających dane socjodemograficzne. Stopień nasilenia depresji oceniano za pomocą wykonywanej dwukrotnie skali Hamiltona: w dniu włączenia do badania i w dniu zakończeniu badania. Od uczestników badania pobrano krew żylną dwukrotnie, w łącznej objętości 10 ml, w dniu włączenia do badania oraz po uzyskaniu odpowiedzi na leczenie. Pobrana krew posłużyła do badania oceny ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla analizowanych genów. Dokonano izolacji całkowitego RNA oraz analizę jakości wyizolowanego RNA. Do oceny ekspresji genów na poziomie mRNA wykorzystano metodę odwrotnej transkrypcji RT-PCR oraz reakcję Real-Time PCR; do oceny ekspresji genów na poziomie białka i oceny stężenia białka wykorzystano test immunoenzymatyczny (ELISA).

W celu wykazania istotności statystycznej różnic pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka dla wybranych genów w grupach badanych i w grupie kontrolnej wykonano analizę statystyczną. Opracowanie statystyczne i graficzne wykonano używając programu Statistica 13, za najniższy poziom istotności statystycznej przyjęto $p<0,05$. W pracy zastosowano nieparametryczny test U $_{\text{Manna-Whitneya}}$ do porównania grup badawczych oraz testy: nieparametryczny Anova (rang) Kruskala-Wallisa i test Dunna do porównania w grupach. Do oceny jednorodności wariancji zastosowano test Levenea. Analizę statystyczną badanych cech niemierzalnych wykonano w oparciu o nieparametryczny test Chi^2 $_{\text{Persona.}}$ W pracy zastosowano współczynnik korelacji kolejnościowej (rang) Spearmana.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, iż ekspresja analizowanych genów na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów SLC6A4 i NPY ma istotne znaczenie w etiologii zaburzeń depresyjnych.

Na postawie analizy otrzymanych wyników sformułowano wnioski, iż: ekspresja genów SLC6A4 i NPY ma istotne znaczenie w patofizjologii zaburzeń depresyjnych, w szczególności: ekspresja genu SLC6A4 jest wyższa w obu grupach badanych z depresją w porównaniu z grupą osób zdrowych, a ekspresja genu NPY jest niższa w obu grupach badanych z depresją w porównaniu z grupą osób zdrowych; ekspresja genu SLC6A4 na poziomie mRNA u osób z depresją ze współistniejącymi zaburzeniami somatycznymi jest zależna od płci; nasilenie epizodu depresji nie wpływa w sposób istotny na ekspresję genów SLC6A4 i NPY; wiek, wykształcenie, liczba epizodów dla genów SLC6A4 i NPY nie wpływa istotnie statystycznie na ekspresję genów zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka.

II. SUMMARY

Depressive disorders are one of the most frequently diagnosed mental illnesses. Depression is a symptom that often coexists with and accompanies other disorders. The number of people with diagnosed and treated depressive disorders has been increasing not only in Poland, but also in almost all developed European countries. The increase in the number of cases is clear and progressive. Affective disorders result in serious consequences for the individual and the society, therefore they constitute a very important medical and social problem.

Epidemiological studies indicate that depression is a frequent phenomenon among people hospitalized and treated in outpatient clinics for somatic diseases. There is a high probability of occurrence and development of depressive disorders in people with somatic diseases. The consequence of co-occurrence of depression and somatic diseases are difficulties with cooperation in pharmacological treatment and worse prognosis.

Affective disorders are a group of mental disorders of unknown etiology. Genetic models try to explain the importance of genes in mental illnesses. According to current knowledge, genes are not the only direct cause leading to mental illness. Rather, it is recognized that genetic molecular changes may pose a risk for mental illness. Current neurodevelopmental theory combines the importance of biological, psychological, and environmental factors.

The primary goal and task of genetic research is to try to determine the involvement of genetic factors in the pathogenesis of affective diseases. This belongs to the tasks of population genetics, which includes family studies, studies of twins, studies of adopted children. Genetics uses the study of gene expression at the mRNA level and the study of gene expression at the protein level

The clinical picture of depressive disorders varies. It has been proven that clinical variability is associated with genetic heterogeneity. The variability of phenotypes in a population is determined by complementary factors, which are environmental effects and genetic information factor and its influence.

The search for genes that may be candidates and involved in the development of depressive disorders continues. Among other things, research work focuses on looking

for causes of depression in dysregulation of neurotransmitter systems from the brain. Neurotransmitter systems within the central nervous system are described according to the classical neurotransmitter present, which is synthesized by the nerve cells of this system. Peptidergic systems along with neuropeptides can play the role of neurotransmitters as well as hormones in numerous cases.

The aim of this research study is to evaluate the influence of SLC6A4 and NPY genes on the etiology of depression. The specific task of this study was to evaluate the expression at the mRNA level and at the protein level for the SLC6A4 and NPY genes in subjects with depressive disorders without somatic diseases, with depressive disorders and associated somatic diseases and to compare with healthy subjects. Another aim was to evaluate sociodemographic and medical data and biochemical parameters for the analyzed genes in healthy subjects, in the group of depressive disorders without somatic diseases and in the group of depressive disorders with somatic diseases.

The selected genes are of interest to researchers because of their possible involvement in the pathophysiology of depressive disorders.

The study included a total of 184 individuals, including 135 those diagnosed with depressive disorders under the forms F32, F33, F06.3 according to ICD-10 classification and 49 healthy subjects. Patients with depressive disorders were divided into two groups: those with somatic comorbidities and those without such comorbidities. All study participants were asked to complete questionnaires containing sociodemographic data. The severity of depression was assessed using the Hamilton Rating Scale, performed twice: on the day of inclusion in the study and on the day the study is completed. Venous blood was drawn twice from the participants, in a total volume of 10 ml, on the day of inclusion in the study and after response to treatment. The collected blood was used to study the expression assessment at the mRNA level and at the protein level for the genes analyzed. Isolation of total RNA and quality analysis of the isolated RNA was performed. Reverse transcription RT-PCR and Real-Time PCR were used to assess gene expression at the mRNA level; immunoenzymatic assay (ELISA) was used to assess gene expression at the protein level and to evaluate protein concentration.

Statistical analysis was performed to demonstrate the statistical significance of differences between the expression at the mRNA level and at the protein level for selected genes in the study groups and in the control group. Statistical and graphical analysis was

performed using Statistica 13 program, $p<0.05$ was taken as the lowest level of statistical significance. Non-parametric Mann-Whitney U test was used in this study for comparison of study groups, as well as non-parametric Anova (rank) Kruskal Wallis test and Dunn's test for comparison within groups. Levenea test was used to assess homogeneity of variance. Statistical analysis of unmeasured characteristics was performed using Person's nonparametric Chi2 test. Spearman's rank order correlation coefficient was used in this study.

The study showed that the expression of the analyzed genes at the mRNA level and at the protein level for the SLC6A4 and NPY genes is significant in the etiology of depressive disorders.

Based on the analysis of the obtained results, it was concluded that: expression of SLC6A4 and NPY genes is important in the pathophysiology of depressive disorders, in particular: SLC6A4 gene expression is higher in both groups of depressed subjects compared to healthy subjects, and NPY gene expression is lower in both groups of depressed subjects compared to healthy subjects; SLC6A4 gene expression at the mRNA level in depressed subjects with comorbid somatic disorders is gender-dependent; the severity of the depressive episode does not significantly affect the expression of SLC6A4 and NPY genes; age, education, number of episodes for SLC6A4 and NPY genes does not statistically significantly affect gene expression at both mRNA and protein levels.