

Streszczenie

Rola stanu zapalnego w patogenezie zaburzeń depresyjnych

Depresja jest jedną z najczęściej diagnozowanych chorób psychicznych, dotykającą ponad 260 mln ludzi na całym świecie. Stanowi główny czynnik obciążenia globalnego chorobami, będąc jedną z najszcześniejszych przyczyn niepełnosprawności społecznej. Szerokie spektrum symptomów obejmujących uporczywy smutek, niepokój, wycofanie społeczno-behavioralne ogranicza prawidłowe funkcjonowanie chorego. Te oraz inne objawy, często stając się chroniczne lub nawracające, w skrajnych przypadkach bez odpowiedniej pomocy mogą prowadzić do prób samobójczych. Ponadto wysoki wskaźnik nawrotów oraz fakt, że ponad 30 procent chorych nie odpowiada na farmakoterapię stanowią jeden z głównych problemów związanych z depresją.

Depresja jest chorobą o wieloczynnikowym podłożu, które nie zostało do tej pory w pełni poznane. Coraz częściej, wśród wielu procesów przyczyniających się do rozwoju choroby upatruje się roli stanu zapalnego jako czynnika odgrywającego ważną rolę w jej etiologii. Według licznych doniesień u pacjentów z depresją obserwuje się wyższy poziom cytokin prozapalnych jak również innych markerów stanu zapalnego, w tym białek fazy ostrej, prostaglandyn, cząsteczek adhezyjnych i chemokin. Ponadto czynniki uwalniane podczas aktywacji układu immunologicznego działają jako neuromodulatory i mogą wyzwać kaskadę zmian neurochemicznych, neuroendokrynych i behawioralnych modulując wiele funkcji biologicznych, takich jak aktywacja osi HPA, metabolizm neurotransmiterów czy neuroplastyczność, których zaburzenia obserwuje się w rozwoju i progresji depresji. Ponadto przewlekły stan zapalny, znajduje odzwierciedlenie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), przyczyniając się do zaburzeń jego prawidłowego funkcjonowania.

Dlatego też, celem niniejszej dysertacji było określenie roli stanu zapalnego w molekularnym podłożu depresji. Jednym z założeń pracy było zdefiniowanie związku polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, zlokalizowanych w genach zaangażowanych w procesy zapalne (*IL1A*, *IL1B*, *TNFA*, *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1*, *IKBKB*) z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem depresji. Co więcej poddany ocenie został wpływ procedury chronicznego łagodnego stresu, stanowiącej zwierzęcy model depresji oraz terapii wenlafaksyną na poziom ekspresji oraz stopień metylacji regionów promotorowych genów *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1*, *IKBKB*.

Materiał badawczy do analizy rozkładu genotypów i alleli polimorfizmów stanowił genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją oraz od osób zdrowych, stanowiących kontrolę. Analiza została przeprowadzona z użyciem sond TaqMan za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*). Genotypowaniu poddano łącznie 11 polimorfizmów. W badaniu z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, materiał stanowiły DNA oraz RNA wyizolowane z krwi i struktur mózgowych szczurów poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu i terapii wenlafaksyną. Profil ekspresji badanych genów został określony za pomocą techniki *real-time PCR*, z wykorzystaniem sond TaqMan. Analiza stopnia metylacji sekwencji promotorowych wybranych genów została przeprowadzona za pomocą metody denaturacji DNA z wysoką rozdzielczością wrażliwej na metylację (MS-HRM, ang. *methylation sensitive – high resolution melting*).

Analiza rozkładu genotypów i alleli wykazała, że polimorfizmy *TGFA* – G > A (rs2166975), *IRF1* – C > A (rs2070729), *IKBKB* – G > T (rs5029748), *PTGS2* – C > T (rs4648308), *PTGS2* – A > G (rs5275) mogą modulować ryzyko rozwoju depresji. Ponadto polimorfizmy genów *IKBKB* – G > T (rs5029748), *IRF1* – C > A (rs2070729) oraz *TNFA* – C > T (rs1799964) mogą wpływać na efektywność terapii lekami przeciwdepresyjnymi z grupy inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny. Co więcej ciężkość nasilenia objawów epizodu depresyjnego również może być związana z obecnością polimorfizmów genów *IL1B* – C > G (rs1143623) oraz *TGFB* – A > G (rs1800469).

Wyniki otrzymane w toku badań z wykorzystaniem zwierzęcego modelu depresji wykazały, że zarówno procedura chronicznego łagodnego stresu jak i terapia wenlafaksyną wpływają na poziom ekspresji badanych genów oraz stopień metylacji regionu promotorowego. Procedura stresowania modulowała ekspresję genów *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1* oraz *IKBKB* zarówno w komórkach PBMCs jak i tkankach mózgowych. Podobny skutek spowodowała administracja wenlafaksyny. Co ciekawe, efekt wywołany przez CMS oraz terapię wenlafaksyną różnił się w zależności od badanej struktury mózgu. Analiza wpływu procedury CMS na stopień metylacji regionów promotorowych badanych genów w PBMCs wykazała istotną zmianę statusu jedynie w przypadku promotora genu *IKBKB*. W przypadku struktur mózgu, na skutek chronicznego łagodnego stresu zmianie uległ stopień metylacji regionów promotorowych genów *TGFA*, *IRF1*, *PTGS2*. Natomiast terapia wenlafaksyną wywołała zmiany metylacji sekwencji promotorowych genów *IKBKB*, *IRF1* oraz *TGFA*.

Podsumowując wyniki uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy doktorskiej wskazują na udział stanu zapalnego w molekularnym mechanizmie rozwoju depresji.

Katarzyna Białek

Summary

Depression is one of the most commonly diagnosed mental disorders, affecting more than 260 million people worldwide. It is a major contributor to the global burden of disease one of the most common causes of social disability. A wide spectrum of symptoms, including persistent sadness, anxiety, and socio-behavioral withdrawal limit patients proper functioning. These and other symptoms, often becoming chronic or recurrent, without adequate help can lead to suicide attempts. In addition, among the major problems associated with depression is the high rate of relapse and the fact that more than 30 percent of patients do not respond to pharmacotherapy.

Depression is a disease with multifactorial etiology, that has not been fully understood yet. Increasingly, among the many processes contributing to the development of the disease, the role of inflammation as a factor playing an important role in its etiology is perceived. According to numerous reports, patients with depression are characterized by higher levels of pro-inflammatory cytokines as well as other markers of inflammation, including acute phase proteins, prostaglandins, adhesion molecules and chemokines. In addition, the factors released during the activation of the immune system can act as neuromodulators triggering a cascade of neurochemical, neuroendocrine and behavioral changes, and thus modulating many biological functions, such as activation of the HPA axis, metabolism of neurotransmitters or neuroplasticity, which disruptions are observed in the development and progression of depression. Moreover, chronic inflammation could be reflected in the central nervous system (CNS), contributing to neuroinflammation and proper brain functioning.

Therefore, the aim of this dissertation was to determine the role of inflammation in the molecular basis of depression. One of the main goals of the study was to define the relationship between single nucleotide polymorphisms located in genes involved in inflammatory processes (*IL1A*, *IL1B*, *TNFA*, *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1*, *IKBKB*) with the risk of depression occurrence. Moreover, the influence of the chronic mild stress procedure, an animal model of depression, and venlafaxine therapy, on the expression level and the methylation status of the promoter regions of the *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1* and *IKBKB* genes was assessed.

Genomic DNA isolated from peripheral blood, obtained from patients with diagnosed depression and from healthy controls was used for analysis of the distribution of genotypes and alleles of selected polymorphisms. The analysis was performed with TaqMan probes using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). A total of 11 polymorphisms were genotyped. In the animal study, DNA and RNA were isolated from the blood and brain structures of rats

subjected to chronic mild stress and venlafaxine therapy. The expression profile of all studied genes was determined with TaqMan probes, using the real-time PCR technique. The analysis of the methylation status of the promoter regions of selected genes was carried out using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM).

Analysis of the genotypes and alleles distribution showed that polymorphisms *TGFA* – G > A (rs2166975), *IRF1* – C > A (rs2070729), *IKBKB* – G > T (rs5029748), *PTGS2* – C > T (rs4648308), *PTGS2* – A > G (rs5275) modulate risk of depression development. Moreover, *IKBKB* – G > T (rs5029748), *IRF1* – C > A (rs2070729) oraz *TNFA* – C > T (rs1799964) polymorphisms may affect the effectiveness of antidepressant therapy with serotonin reuptake inhibitors. Furthermore, the severity of depressive episode symptoms may also depend on the genotypes of *IL1B* – C > G (rs1143623) and *TGFB* – A > G (rs1800469).

Research on animal model of depression showed that both, the chronic mild stress procedure and venlafaxine therapy affect the expression level and methylation status of the promoter region of studied genes. The CMS procedure affects the expression of the *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1* and *IKBKB* genes in both PBMCs and brain tissues. Similar effect was observed after administration of venlafaxine. Interestingly, the effect induced by CMS and venlafaxine treatment depend on the tissue type as well as brain structure. Results indicate that CMS procedure caused significant change of methylation only in the case of the *IKBKB* gene promoter. In the case of brain structures, chronic mild stress changed the methylation of the *TGFA*, *IRF1* and *PTGS2* promoter regions. Venlafaxine affects methylation of the promoter regions of the *IKBKB*, *IRF1* and *TGFA* genes.

Concluding, the results obtained during the doctoral dissertation indicate the participation of inflammation in the molecular mechanism of depression development

Katarzyna Białek