

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Iva S. Lukić

**ANALIZA FOSFORILACIJE
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA
U LIMFOCITIMA ZDRAVIH LJUDI I
PACIJENATA SA AKUTNOM
EPIZODOM DEPRESIVNOG
POREMEĆAJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Iva S. Lukić

**ANALYSIS OF LYMPHOCYTE
GLUCOCORTICOID RECEPTOR
PHOSPHORYLATION IN HEALTHY
SUBJECTS AND PATIENTS WITH
CURRENT EPISODE OF DEPRESSIVE
DISORDER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Mentori

dr Miroslav Adžić, naučni saradnika Instituta za nuklearne nauke
„Vinča“ Univerziteta u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta i naučni savetnik
Instituta „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

dr Miroslav Adžić, naučni saradnika Instituta za nuklearne nauke
„Vinča“ Univerziteta u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta i naučni savetnik
Instituta „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

dr Marija Radojčić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“
Univerziteta u Beogradu

dr Nađa Marić-Bojović, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu

dr Danka Savić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica



Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u saradnji sa Klinikom za psihijatriju Kliničkog centra Srbije, pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića.

Zahvaljujem svom mentoru, dr Miroslavu Adžiću, za upoznavanje sa post-translacionim modifikacijama glukokortikoidnog receptora, prenešenom znanju i podstreku da ga dalje nadograđujem; zahvalna sam i na pomoći u eksperimentalnom radu, diskusijama rezultata i svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mariji Radojčić za ukazano poverenje što me je uvela u svoju laboratoriju i naučni rad uopšte, za podršku u teškim trenucima tokom naučnog rada kada nije sve išlo kako smo planirali, kao i za svo prenešeno znanje i svoje dugogodišnje iskustvo.

Zahvaljujem prof. dr Gordani Matić za uvođenje u bogati svet molekularne biologije i za sve korisne sugestije koje su mi pomogle tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem docentu dr Nadji Marić-Bojović na trudu da regrutuje učesnike ovog istraživanja, na idejama za dizajn samog istraživanja i pomoći u sagledavanju rezultata ove doktorske disertacije iz ugla psihijatra.

Zahvaljujem dr Danki Savić na zanimljivim razgovorima i pomoći u kritičkoj diskusiji rezultata ove doktorske teze.

Zahvaljujem dr Mariji Krstić-Demonacos za nesebično pruženu pomoć tokom izrade ove teze.

Zahvaljujem asistentu Ivanu Soldatoviću na pomoći u statističkoj obradi podataka ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem svom kolegi Milošu na pruženoj pomoći u eksperimentalnom radu, na zanimljivim naučnim i „nenaučnim“ diskusijama i podeli i lepih i teških trenutaka tokom laboratorijskog rada. Zahvaljujem starijim kolegicama Jeleni i Ani na svim savetima i pomoći, koji su mi naročito značili na početku mog naučnog rada. Zahvaljujem našoj mladoj kolegici Nataliji na pomoći u eksperimentalnom radu i svemu što sam od nje naučila.

Zahvaljujem svim kolegama sa Klinike za psihijatriju koji su testirali ispitanike regrutovane za izradu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem svojoj porodici na podršci i ljubavi koju mi uvek pružaju, a naročito svom dragom Nikoli, koji je uvek uz mene.

Analiza fosforilacije glukokortikoidnog receptora u limfocitima zdravih ljudi i pacijenata sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja

Rezime

Depresivni poremećaj (DP) je multifaktorijalno oboljenje, široko rasprostranjeno u svetu, i rasvetljavanje mehanizama koji su u osnovi ovog poremećaja predstavlja jedan od najvećih izazova biomedicinskih istraživanja današnjice. Narušena funkcija hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose, kao i signalizacija preko glukokortikoidnog receptora (GR), čest su nalaz kod pacijenata sa DP-om. Takođe, određeni stepen disfunkcije HHA ose i samog GR-a uočavaju se i kod zdravih ljudi i pretpostavlja se da to predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj kliničke depresije. S druge strane, uspešno lečenje pacijenata sa depresijom, praćeno je normalizacijom aktivnosti HHA ose i funkcije GR-a.

GR je ligand-zavisan transkripcioni faktor, koji nakon vezivanja glukokortikoida (krajnjih produkata aktivnosti HHA ose) prelazi iz citoplazme u jedro gde reguliše ekspresiju velikog broja gena. Važan način regulacije funkcije GR-a postiže se njegovom fosforilacijom koja je posredovana aktivnošću kinaza, koje se aktiviraju u odgovoru na različite ćelijske signale. Fosforilacija GR-a na serinu 211 (S211) stimuliše ulazak receptora u jedro i generalno se smatra biomarkerom njegove povećane transkripcione aktivnosti, dok je za fosforilaciju GR-a na serinu 226 (S226), koja je posredovana c-Jun N-terminalnim kinazama (eng. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK), pokazano da inhibira njegovu transkripcionu aktivnost i stimuliše izlazak GR-a iz jedra u citoplazmu.

Među genima stimulisanim glukokortikoidima su GILZ (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*, GILZ), važan posrednik anti-inflamatornih efekata GR-a, i FKBP5 (eng. *FK506 binding protein 5*, FKBP5), koji ima važnu ulogu u ograničavanju glukokortikoidne signalizacije u ćeliji, sprečavajući translokaciju GR-a iz citoplazme u jedro.

Imajući na umu prethodno pomenuto, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je sledeće: 1) da li postoje razlike u fosforilaciji GR-a između pacijenata sa akutnom epizodom depresije u odnosu na zdrave kontrole; 2) da li postoji povezanost između nivoa fosforilacije GR-a i nivoa trenutnih negativnih emotivnih stanja u okviru grupe zdravih kontrola; i 3) da li dolazi do promene u fosforilaciji GR-a tokom terapije pacijenata sa depresijom.

Kod zdravih kontrola i pacijenata sa akutnom epizodom DP-a analizirana je fosforilacija GR-a na S211 i S226 u limfocitima periferne krvi, a osim praćenja same fosforilacije GR-a, ispitani su i ukupni nivoi GR-a u citoplazmi i jedru, nivoi ukupne i aktivirane JNK1, kao i nivoi GILZ-a i FKBP5 u citoplazmi. Kod svih ispitanika izmeren je i nivo jutarnjeg kortizola, kao indikatora bazalne aktivnosti HHA ose. Nivoi trenutnih negativnih emotivnih stanja u okviru grupe kontrola određivani su Skalama depresije, anksioznosti i stresa. Takođe, parametri glukokortikoidne signalizacije za koje je bilo pokazano da su različiti između grupe zdravih subjekata i pacijenata sa akutnom epizodom depresije, analizirani su i kod grupe depresivnih pacijenata koje smo pratili tokom lečenja putem ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije (eng. *repetitive transcranial magnetic stimulation*, rTMS) kao adjuvantne metode uz redovno propisanu terapiju antidepresivima. Nivoi proteina su analizirani metodom *Western blot*. Svi podaci su obrađeni odgovarajućim statističkim testovima.

Kod pacijenta sa akutnom epizodom depresije nivo jutarnjeg kortizola bio je povišen u odnosu na kontrole ukazujući na narušenu aktivnost HHA ose. Kod depresivnih pacijenata pokazan je povišen nivo fosforilacije GR na S226, i u manjoj meri na S211, što je rezultiralo manjim odnosom fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru limfocita, u poređenju sa kontrolama. Ovaj rezultat je ukazivao da izmenjena fosforilacija GR-a može doprinositi smanjenoj funkciji receptora kod pacijenata sa DP-om. Iako nisu postojale razlike u nivoima jedarnog GR-a, depresivni pacijenti su imali povećan nivo GR-a u citoplazmi u odnosu na kontrole, što je ukazivalo na smanjenu translokaciju GR-a u jedro. Povišen nivo GR-a u citoplazmi kod pacijenta sa DP-om pozitivno je korelisao sa nivoom fosfo-GR-S226 u jedru, sugerišući da bi izmenjena fosforilacija GR na S226 mogla bar delimično doprineti povećanoj translokaciji GR-a iz jedra u citoplazmu.

Iako promene u fosforilaciji GR-a na S226 kod pacijenta sa DP-om nisu bile statistički značajno povezane sa promenama u nivou aktivirane JNK1 (fosfo-JNK1) u jedru, naše analize su pokazale da su pacijenti sa depresijom imali smanjen nivo ukupne JNK1 i trend povećanja aktivirane JNK1 u jedru limfocita.

Nivo FKBP5 u citoplazmi limfocita bio je značajno viši kod pacijenata sa depresijom, uprkos smanjenom odnosu fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru. Takođe, nivo FKBP5 je pozitivno korelisao sa nivoom GR-a u citoplazmi, što je ukazivalo na to da pored fosforilacije GR-a, FKBP5 bi mogao biti još jedan faktor koji doprinosi smanjenoj translokaciji GR-a u jedro i narušenoj glukokortikoidnoj signalizaciji kod pacijenata sa DP. Promene u nivou GILZ proteina nisu bile uočene.

U okviru grupe kontrolnih ispitanika, kod žena je uočena pozitivna povezanost između nivoa jedarnog GR-a fosforilisanog na S226 u limfocitima periferne krvi i nivoa trenutnih samoprocenjenih simptoma depresije, anksioznosti i stresa, kao i negativna povezanost između odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru i nivoa simptoma depresije. Ovo je sugerisalo da određen stepen izmenjene fosforilacije GR-a može postojati i kod klinički zdravih ljudi, sa povećanjem nivoa negativnih emotivnih stanja, i predstavljati povećan rizik za oboljevanje od depresije, barem kod žena.

U grupi pacijenata praćenih tokom lečenja rTMS-om, sa poboljšanjem depresivne simptomatologije došlo je do povećanja odnosa izoformi fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru, a smanjenja nivoa FKBP5 u citoplazmi limfocita periferne krvi, što je ukazivalo na oporavak funkcije GR-a paralelno sa izlečenjem od depresije.

Rezultati ove doktorske teze govore u prilog tome da izmenjena fosforilacija GR-a može doprineti boljem razumevanju narušene funkcije GR-a u depresivnom poremećaju. Takođe, ovi rezultati predlažu fosforilaciju GR-a na S226 i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 kao potencijalne biomarkera za lakše postavljanje dijagnoze DP-a, a takođe i za otkrivanje osoba pod rizikom za DP (barem kod žena), kao i za praćenje oporavka od depresije.

Ključne reči: depresivni poremećaj; fosforilacija glukokortikoidnog receptora; JNK; FKBP5; GILZ; simptomi depresije, anksioznosti i stresa kod zdravih ljudi.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija psihijatrijskih poremećaja

UDK broj: 577.25:[611/612-056.32+616.895.4](043.3)

Analysis of lymphocyte glucocorticoid receptor phosphorylation in healthy subjects and patients with current episode of depressive disorder

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is a multifactorial illness that affects people across the globe and understanding mechanisms underlying this disorder represents a major challenge of biomedical research today. One of the most consistent findings among patients with MDD is dysfunctional hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, caused by altered function of the glucocorticoid receptor (GR). In healthy population, individuals with impaired HPA axis and GR function are also observed, and these features are believed to represent increased risk factors for depression. On the other hand, successful antidepressant treatments ameliorate many of the neuroendocrine disturbances observed in depression.

The GR is ligand-activated transcriptional factor that upon glucocorticoid binding (glucocorticoids are end products of HPA axis activity) translocate from the cytoplasm to the nucleus where it modulates the expression of wide variety of genes. Phosphorylation of the GR, mediated by activity of diverse cellular kinases, is important way of regulating GR function. The GR phosphorylation at S211 promotes GR translocation to the nucleus and enhances its transcriptional activity, while GR phosphorylation at S226, mediated by c-Jun N-terminal kinases (JNK), inhibits its transcriptional activity and promotes GR nuclear export.

Some of myriad of genes whose expression is stimulated by the GR are glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), an important mediator of glucocorticoid anti-inflammatory actions, and FK506 binding protein 5 (FKBP5), which is a part of an intracellular ultra-short negative feedback loop for GR activity.

Bearing in mind the previously mentioned, the aims of this doctoral dissertation were to analyse the following: 1) a possible differences in the GR phosphorylation between currently depressed patients and controls; 2) a possible relations of the GR phosphorylation with current reports of negative affective states in healthy subjects; and

3) possible changes in the GR phosphorylation during the follow-up of treatment of depressed patients.

In patients with current MDD episode and controls, the phosphorylations of GR at S211 (phospho-GR-S211) and S226 (phospho-GR-S226) were analyzed in lymphocytes of peripheral blood, along with total levels of GR in the cytoplasm and the nucleus, total and activated levels of JNK1, as well as levels of GILZ and FKBP5 in the cytoplasm. In all patients, the morning cortisol levels were analysed as well. The current reports of negative affective states in healthy subjects were assessed by Depression Anxiety Stress Scale (DASS). Additionally, parameters that were shown to differ between the healthy and subjects with current depressive episode were also analyzed in small group of patients followed up during the repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) as an adjuvant method along with their regular antidepressant therapy. The levels of desired proteins were measured using Western blot technique. All data were analysed by corresponding statistical tests.

The morning cortisol levels were higher in MDD patients indicating impaired negative feedback of HPA axis. The patients with current depressive episode showed significantly higher phosphorylation of lymphocyte nuclear GR at S226, and to lower extent at S211, and consequently lower phospho-GR-S211/phospho-GR-S226 ratio compared to the healthy subjects. This result was implying that reduced function of GR found in MDD patients could be a consequence of altered GR phosphorylation. Although there were no differences in the levels of total nuclear GR, the levels of GR in the cytoplasm were higher in depressed patients compared to controls suggesting reduced GR translocation to the nucleus. The increased cytosolic GR levels could be at least partly related to elevated phosphorylation of the GR at S226 which contributes to GR export from the nucleus to the cytoplasm.

Although the alterations of GR phosphorylation at S226 were not significantly related to alterations in levels of activated JNK1, the depressed patients in our sample had reduced lymphocyte nuclear JNK1 levels and a trend of increased levels of activated JNK1 (phospho-JNK1).

The levels of lymphocyte cytosolic FKBP5 were significantly higher in the patients' group, although the nuclear phospho-GR-S211/phospho-GR-S226 ratio was lower. Also, the levels of FKBP5 positively correlated with levels of cytosolic GR,

implying that increased FKBP5 could be one more factor, besides GR phosphorylation, contributing to the reduced GR translocation in patients' lymphocytes and impaired GR signalization. Regarding the levels of GILZ protein, there were no differences between the patients and controls.

Concerning the healthy group, in women, there was a positive correlation between levels of lymphocyte nuclear phospho-GR-S226 and all DASS scores (i.e. symptoms of depression, anxiety and stress), while phospho-GR-S211/phospho-GR-S226 ratio was negatively correlated with reports of depression. These findings suggested that impaired GR phosphorylation may also be observed in healthy population, in relation to their negative affective states, and represent a risk factor for later MDD, at least in women.

In the follow-up study of patients treated with rTMS, it was shown that improvement of depressive symptomatology was accompanied by elevation of nuclear phospho-GR-S211/phospho-GR-S226 ratio and decrease of cytoplasmic FKBP5 levels in lymphocytes suggesting that recovery from depression is accompanied by improvement of the GR signalling.

In conclusion, the results of this doctoral dissertation support the assumption that altered GR phosphorylation could contribute to impaired GR function related to the pathophysiology of MDD. Also, these findings propose the GR phosphorylation at S226 and the ratio of phospho-GR-S211/phospho-GR-S226 as promising candidate biomarkers for easier diagnosis of patients with current depressive episode, as well as identification of individuals at MDD risk (at least females) and the follow-up of improvement in depressive symptoms during antidepressant treatment.

Keywords: major depressive disorder; phosphorylation of glucocorticoid receptor; JNK; GILZ; FKBP5; symptoms of depression, anxiety and stress in healthy subjects.

Research area: Biology

Research field: Molecular biology of psychiatric disorders

UDC number: 577.25:[611/612-056.32+616.895.4](043.3)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Depresivni poremećaj	1
1.1.1. Kliničke karakteristike	1
1.1.2. Dijagnoza i klasifikacija depresivnog poremećaja	3
1.1.3. Epidemiologija depresivnog poremećaja	7
1.1.4. Biološka osnova patogeneze depresivnog poremećaja	8
<i>1.1.4.1. Genetička osnova depresivnog poremećaja</i>	9
<i>1.1.4.2. Epigenetičke promene vezane za patogenezu depresivnog poremećaja</i>	9
<i>1.1.4.3. Monoaminska hipoteza depresivnog poremećaja</i>	10
<i>1.1.4.4. Promene u funkciji hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose vezane za patogenezu depresivnog poremećaja</i>	11
<i>1.1.4.5. Promene u neuronskoj plastičnosti vezane za patogenezu depresivnog poremećaja</i>	16
<i>1.1.4.6. Promene u imunskom sistemu vezane za patogenezu depresivno poremećaja</i>	18
<i>1.1.4.7. Regioni mozga čija je aktivnost izmenjena u depresivnom poremećaju</i>	20
<i>1.1.4.8. Biološka osnova polnih razlika u sklonosti prema depresivnom poremećaju</i>	22
1.1.5. Terapija depresivnog poremećaja	24
1.2. Glukokortikoidni receptor – važan igrač u patogenezi depresivnog poremećaja	27
1.2.1. Molekularni mehanizmi signalizacije preko glukokortikoidnog receptora	27
<i>1.2.1.1. Regulacija funkcije glukokortikoidnog receptora putem fosforilacije</i>	31
1.2.2. Izmenjena glukokortikoidna signalizacija kod pacijenata sa depresivnim poremećajem	33
<i>1.2.2.1. Uticaj citokina i drugih signala na funkciju glukokortikoidnog receptora u depresiji</i>	35
1.2.3. Uticaj antidepresiva na funkciju glukokortikoidnog receptora	37

1.3. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK) – podfamilija <i>c-Jun</i> N-terminalnih kinaza (JNK), učesnica u fosforilaciji glukokortikoidnog receptora	40
1.4. Glukokortikoidima indukovani leucinski rajsferšlus (GILZ) – posrednik anti-inflamatornih efekata glukokortikoida	42
1.5. FK506-vezujući protein 5 (FKBP5) – košaperon glukokortikoidnog receptora	45
2. Cilj rada	48
3. Materijal i metode	50
3.1. Odabir i karakterizacija učesnika u studiji	50
3.1.1. Pacijenti sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja	50
3.1.2. Kontrolni ispitanici	51
3.1.3. Pacijenti praćeni tokom lečenja ponovljenom transkranijalnom magnetnom stimulacijom kao adjuvantnom terapijom	52
3.2. Upitnici korišćeni u studiji	53
3.3. Procedura uzimanja uzoraka krvi	54
3.4. Priprema uzoraka limfocita	54
3.4.1. Izdvajanje limfocita iz krvi u gradijentu gustine	54
3.4.2. Priprema citoplazmatičnih i jedarnih frakcija limfocita	55
3.4.3. Određivanje koncentracije proteina u citoplazmatičnim i jedarnim frakcijama limfocita	56
3.5. Detekcija proteina u citoplazmatičnoj i jedarnoj frakciji limfocita	57
3.5.1. Separacija proteina metodom elektroforeze na SDS-poliakrilamidnom gelu	57
3.5.2. Analiza proteina <i>Western blot</i> -om	58
3.5.3. Kvantifikacija signala	59
3.6. Statistička analiza podataka	59
4. Rezultati	61
4.1. Analiza razlika u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima između pacijenata sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja u odnosu na zdrave kontrole	61
4.1.1. Demografske i kliničke karakteristike kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom	61

4.1.2. Analiza glukokortikoidnog receptora i njegovih fosfo-izoformi u limfocitima kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom	63
4.1.3. Analiza ukupne i fosforilisane JNK u limfocitima kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom	67
4.1.4. Analiza GILZ proteina u citoplazmi limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom	69
4.1.5. Analiza FKBP5 proteina u citoplazmi limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom	70
4.2. Analiza povezanosti glukokortikoidne signalizacije u limfocitima sa nivoima negativnih afektivnih stanja kod kontrolnih ispitanika	73
4.2.1. Demografske i psihometrijske karakteristike kontrolnih ispitanika	73
4.2.2. Analiza glukokortikoidne signalizacije u limfocitima i njene povezanosti sa negativnim afektivnim stanjima kod kontrolnih ispitanika	74
4.3. Analiza promena u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima tokom lečenja pacijenata primenom ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije kao adjuvantne terapije	79
5. Diskusija	83
5.1. Razlike u glukokortikoidnoj signalizaciji između pacijenata sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja u odnosu na zdrave kontrole	84
5.2. Povezanost promena u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima i negativnim afektivnim stanjima kod zdravih ispitanika	91
5.3. Promene u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima tokom lečenja pacijenata primenom ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije kao adjuvantne terapije	94
5.4. Ograničenja studije	99
6. Zaključak	101
Literatura	103
Biografija autora	137
Prilozi	138

SKRAĆENICE

- ACC – anteriorni cingulatni korteks (eng. *anterior cingulate cortex*)
- ACTH – adrenokortikotropni hormon (eng. *adrenocorticotrophic hormone*)
- AF – transaktivirajući domen (eng. *activation function*)
- AP-1 – protein aktivator 1 (eng. *activator protein-1*)
- ATF2 – aktivirajući transkripcijski faktor 2 (eng. *activating transcription factor 2*)
- ATP – adenzin trifosfat (eng. *adenosine-triphosphate*)
- BDNF – neurotrofni moždani faktor (eng. *brain derived neurotrophic factor*)
- cAMP – ciklični adenzin monofosfat (eng. *cyclic adenosine monophosphate*)
- CBP – protein koji se vezuje za CREB (eng. *cyclic-AMP response element binding protein*)
- CDK – ciklin-zavisna kinaza (eng. *cyclin dependent kinase*)
- CREB – eng. *cAMP response element-binding*
- CRH – kortikotropni oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormone*)
- DASS – Skale depresije, anksioznosti i stresa (eng. *Depression, anxiety and stress scales*)
- DBD – domen zadužen za vezivanje za DNK (eng. *DNA binding domain*)
- DEX – deksametazon (eng. *dexamethasone*)
- DLPFC – dorzolateralni prefrontalni korteks (eng. *dorsolateral prefrontal cortex*)
- DP – depresivni poremećaj
- DSM – Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
- DST – test supresije deksametazonom (eng. *dexamethasone suppression test*)
- EKT – elektrokonvulzivna terapija (eng. *electroconvulsive therapy*)
- ERK – kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*)
- FKBP4 – FK506-vezujući protein 4 (eng. *FK506 binding protein 4*)
- FKBP5 – FK506-vezujući protein 5 (eng. *FK506 binding protein 5*)
- FoxO3 – eng. *forkhead box O3*
- GEE – eng. *generalized estimating equations*

GILZ – glukokortikoidima indukovani leucinski rajsferšlus (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*)

GLM – opšti linearni model (eng. *general liner model*, GLM)

GR – glukokortikoidni receptor (eng. *glucocorticoid receptor*)

GRE – sekvence u DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. *glucocorticoid responsive elements*)

HAMD – Hamiltonova skala za depresiju (eng. *Hamilton Rating Scale for Depression*)

HHA – hipotalamo-hipofizno-adrenalna

HSF-1 – eng. *heat shock factor protein 1*

hsp – protein toplotnog šoka (eng. *heat shock protein*)

ICD – Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema (eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*)

IL-1 β – interleukin 1 *beta* (eng. *interleukin 1 beta*)

IL-6 – interleukin 6 (eng. *interleukin 6*)

INF- α – interferonom *alpha* (eng. *interferon alpha*)

IRU – interni referentni uzorak

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (eng. *c-Jun N-terminal kinases*)

LBD – domen zadužen za vezivanje liganda (eng. *ligand-binding domain*)

LOPFC – lateralno orbitalni prefrontalni korteks (eng. *lateral orbital prefrontal cortex*)

LSM – medijum za razdvajanje limfocita (eng. *Lymphocyte Separation Medium*)

M.I.N.I. – eng. *Mini-International Neuropsychiatric Interview*

MAPK – proteinske kinaze aktivirane mitogenima (eng. *mitogen-activated protein kinases*)

MAPKK – kinaza MAPK-a (eng. *MAPK kinase*)

MAPKKK – kinaza kinaze MAPK-a (eng. *MAPK kinase kinase*)

MDR PGP – membranski steroidni transporter (eng. *multiple drug resistance p-glycoprotein*)

MED14 – eng. *mediator complex subunit 14*

NCOR1 – eng. *nuclear receptor co-repressor 1*

NF κ B – jedarni faktor *kappa B* (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

nGRE – sekvence u DNK koje su negativno regulisane glukokortikoidima (eng. *negative glucocorticoid response element*)

NMDA – *N*-metil-D-aspartat

NTD – *N*-terminalni domen (eng. *N-terminal domain*),

PKA – protein kinazu A (eng. *protein kinase A*)

PP5 – proteinska fosfataza 5 (eng. *protein phosphatase 5*)

rTMS – ponovljena transkranijalna magnetna stimulacija (eng. *repetitive transcranial magnetic stimulation*)

SAPK – stresom aktivirane proteinske kinaze (eng. *stress-activated protein kinases*)

SNP – poimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotid polymorphism*)

SNS – simpatički nervni sistem

SRC-1 – koaktivator steroidnih receptora 1 (eng. *steroid receptor coactivator 1*)

SSRI – selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitor*)

STAT – eng. *signal transducer and activator of transcription*

TCA – triciklični antidepresiv (eng. *tricyclic antidepressant*)

TMS – transkranijalna magnetna stimulacija (eng. *transcranial magnetic stimulation*)

TNF- α – faktor nekroze tumora *alpha* (eng. *tumor necrosis factor alpha*)

TPR – tetratrikopeptidni ponovak (eng. *tetratricopeptide repeat*)

TSC-22 – eng. *TGF- β -stimulated clone 22*

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

VMPFC – ventromedijalni prefrontalni korteks (eng. *ventromedial prefrontal cortex*)

1. Uvod

1.1. Depresivni poremećaj

Depresivni poremećaj (DP) (nazivi su još i depresija, klinička depresija, unipolarna depresija, veliki depresivni poremećaj) bio je prepoznat još u antičko doba, a prvi ga je imenovao Hipokrit kao “melanholija” (što u prevodu sa grčkog znači “crna žuč”) oko 400 god. p.n.e. (Nestler i sar., 2002). Većina glavnih simptoma depresije bila je još tada prepoznata i pripisana kako unutašnjoj predispoziciji osobe, tako i spoljašnjim faktorima, slično onome kako i danas vidimo ovu bolest (Nestler i sar., 2002).

1.1.1. Kliničke karakteristike

Na DP možemo gledati kao na krajnost sa negativne strane kontinuuma raspoloženja (Fava i Kendler, 2000). DP se manifestuje različitim simptomima i klinička slika može značajno varirati od pacijenta do pacijenta, kao i tok bolesti i uspešnost lečenja. To sve sugeriše da je depresija pre skup više bolesnih stanja razičite etiologije, nego jedna bolest (Berton i Nestler, 2006).

Simptomi depresije mogu biti emocionalni (npr. loše raspoloženje), fizički (narušeno spavanje, apetit, libido) ili kognitivni (osećaj krivice, pesimizam, razmišljanje o samoubistvu). Opis najvažnijih simptoma depresije je sledeći (prema Lam i Mok, 2008):

- **Depresivno raspoloženje** – Depresivno raspoloženje je dominantan znak bolesti i ovaj osećaj je kvalitativno različit od osećaja tuge i žaljenja koji svi ponekad osećaju. Bolesnik često ima bolno zamišljeno lice, potišten je i pognutog držanja. Neki imaju napade plača, neki se osećaju kao da bi zaplakali, a neki imaju osećaj emotivne praznine.

- **Gubitak zadovoljstva (anhedonija)** – Gubitak interesovanja i zadovoljstva za aktivnosti i socijalne interakcije koje su pre pričinjavale zadovoljstvo je jedan od glavnih karakteristika depresije.
- **Problemi sa spavanjem** – Većina depresivnih pacijenata imaju probleme sa spavanjem, koji mogu da se ispolje kao insomnija (nesanica) ili hipersomnija (preterano spavanje). Insomnija može da se manifestuje kao teškoće pri uspavlivanju, buđenje u toku noći ili rano jutarnje buđenje. S druge strane, nekad se javlja i potreba za preteranim spavanjem, tj. hipersomnija.
- **Gubitak energije** – Pacijenti sa depresijom često se žale na smanjenje energije i zamor. Kod teških depresija, pacijent nema snage čak ni za obavljanje svakodnevne higijene i aktivnosti. Kao krajnja forma može da se javi i depresivni stupor gde je bolesnik lišen voljne aktivnosti, ukočen, nema potrebu za uzimanjem hrane i komunikacijom.
- **Osećaj krivice** – Osećanje bezvrednosti i krivice često okupira misli osobe tokom depresive epizode. Negativno mišljenje o sebi može dovesti i do otuđenja od realnosti, tj. pojave sumanutih ideja.
- **Teškoće sa koncentracijom** – Depresivni pacijenti imaju često probleme sa koncentracijom, pažnjom i donošenjem odluka. Pažnja bolesnika je usmerena na samog sebe, na tužno raspoloženje i ideje koje okupiraju bolesnika.
- **Problemi sa apetitom** – Gubitak apetita može dovesti i do značajnih gubitaka u težini. S druge strane, kod nekih pacijenata sa DP-om javlja se pojačana potreba za hranom, što može dovesti do gojaznosti i metaboličkog poremećaja.
- **Izmenjena psihomotorna aktivnost** – Kod pacijenata je česta psihomotorna retardacija koju karakterišu usporeni pokreti tela, duga latencija u odgovoru, a u krajnjem slučaju može da se javi katatoni stupor (bolesnik je ukočen, nema potrebu za uzimanjem hrane, komunikacijom). S druge strane, nekada kod bolesnika može da se javi psihomotorna agitacija, tj. brzo pričanje, nemir, nemogućnost da se mirno sedi.
- **Samoubistvo** – Kod oko dve trećine pacijenata javlja se bar neka ideja o samoubistvu, ali većina pacijenata nema energije i motivacije da to zaista i učini. Ipak, oko 2 % pacijenata sa DP-om na kraju počinu samoubistvo.

- **Ostali simptomi** – Anksioznost je često prisutna u depresiji. Mogu biti prisutne dnevne promene raspoloženja pri čemu je depresija teža ujutro. Kao simptom depresije takođe se javlja i fizički bol, npr. glavobolje, bolovi u leđima i dr.

1.1.2. Dijagnoza i klasifikacija depresivnog poremećaja

Dijagnoza depresije je u velikoj meri subjektivna, i zasnovana na prisustvu određenih simptoma, koji su, kao što je već napomenuto, vrlo varijabilni, i koji traju određeno vreme. Nikakav objektivni dijagnostički test za depresiju, zasnovan na poznavanju patogeneze bolesti, još uvek ne postoji.

Dva najpoznatija i najčešće upotrebljavana kriterijuma za dijagnozu depresije su Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje IV (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV*) koji se koristi u Sjedinjenim Američkim Državama i Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema 10 (eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10*) koja je u upotrebi u Evropi.

U DSM-IV klasifikaciji, depresivni poremećaj se nalazi u okviru grupe poremećaja raspoloženja (zajedno sa bipolarnim poremećajem¹) u delu *Axis I* u kome su svrstana glavna psihijatrijska oboljenja. DSM-IV kriterijum koristi izraz „veliki depresivni poremećaj“ (eng. *major depressive disorder*) koga karakteriše postojanje jedne ili više epizoda depresije. Kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode po DSM-IV nalaze se u Tabeli 1.

Prema ICD-10 klasifikaciji, depresivni poremećaj je takođe svrstan u grupu poremećaja raspoloženja u okviru „F“ klase oboljenja, tj. psihijatrijskih poremećaja. Ovde se koriste izrazi „depresivna epizoda“ (za prvu epizodu depresije) i „rekurentni depresivni poremećaj“ (koji podrazumeva najmanje dve depresivne epizode). Kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode po ICD-10 nalaze se u Tabeli 2 i vrlo su slični onima prema DSM-IV klasifikaciji.

¹ Bipolarni poremećaj se karakteriše pojavom depresivnih epizoda i bar jedne epizode manije.

Tabela 1. Dijagnoza depresivnog poremećaja prema DSM-IV. Adaptirano na osnovu Lam i Mok (2008).

Kriterijumi za dijagnozu velike depresivne epizode	
A.	<p>Pet (ili više) od sledećih kriterijuma treba da su bili prisutni najmanje 2 nedelje i barem jedan od simptoma je 1. depresivno raspoloženje ili 2. smanjeno interesovanje ili zadovoljstvo.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Depresivno raspoloženje tokom većine dana. 2. Uočljivo smanjenje zainteresovanosti ili zadovoljstva za sve, ili skoro sve, aktivnosti tokom većine dana. 3. Značajan dobitak ili gubitak na težini (više od 5% telesne mase mesečno). 4. Insomnija ili hipersomnija svakog (ili skoro svakog) dana. 5. Motorna agitacija ili retardacija svakog (ili skoro svakog) dana. 6. Zamor ili gubitak energije svakog (ili skoro svakog) dana. 7. Osećaj bezvrednosti i preterane krivice (što može prerasti i u sumanute ideje) svakog (ili skoro svakog) dana. 8. Smanjena sposobnost mišljenja ili koncentracije, ili neodlučnost svakog (ili skoro svakog) dana. 9. Razmišljanja o smrti ili samoubistvu.
B.	Simptomi ne ispunjavaju kriterijume za mešovitu epizodu.
C.	Simptomi uzrokuju značajnu uznemirenost i narušavaju socijalno, profesionalno ili druga područja funkcionisanja.
D.	Simptomi nisu posledica uzimanja psihouktivnih supstanci ili opšteg zdravstvenog stanja.
E.	Simptomi nisu posledica gubitka bliske osobe.
Kriterijumi za težinu depresivne epizode	
Blaga	<ol style="list-style-type: none"> 1. depresivno raspoloženje ili smanjeno interesovanje/zadovoljstvo + 4 druga simptoma 2. Manja narušenost socijalnog /profesionalnog života
Srednje teška	<ol style="list-style-type: none"> 1. depresivno raspoloženje ili smanjeno interesovanje/zadovoljstvo + 4 ili više drugih simptoma 2. Promenljiva narušenost socijalnog /profesionalnog života
Teška	<ol style="list-style-type: none"> 1. depresivno raspoloženje ili smanjeno interesovanje /zadovoljstvo + 4 ili više drugih simptoma 2. Značajna narušenost socijalnog /profesionalnog života – ili sa psihotičnim simptomima

Tabela 2. Dijagnoza depresivnog poremećaja prema ICD-10. Adaptirano na osnovu Lečić Toševski i sar. (2011).

Simptomi depresivne epizode	Depresivne epizode prema težini
<p>Tipični simptomi:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. depresivno raspoloženje 2. gubitka interesovanja i zadovoljstva 3. smanjenje energije, povećan zamor i umanjena aktivnosti. <p>Drugi česti simptomi/ostali simptomi:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. oštećenje koncentracije i pažnje 2. smanjeno samopoštovanje i samopouzdanje 3. osećanje krivice i bezvrednosti (čak i u blažem tipu depresije) 4. sumoran i pesimističan pogled na budućnost; 5. ideje o samopovređivanju ili samoubistvu 6. poremećaj sna 7. poremećaj apetita 	<p>Blaga depresivna epizoda 2 tipična + 2 od ostalih simptoma</p> <p>Umereno jaka depresivna epizoda 2 tipična + 3-4 ostalih simptoma</p> <p>Teška depresija bez psihotičnih simptoma 3 tipična + 4 ili više ostalih simptoma</p> <p>Teška depresija bez psihotičnih simptoma 3 tipična + 4 ili više ostalih simptoma + psihotični simptomi (sumanute ideje: bede, krivice, hipohondrije; halucinacije; depresivni stupor)</p>
Trajanje simptoma najmanje 2 nedelje	

Obe klasifikacije, i DSM-IV i ICD-10, razlikuju tri stepena težine depresivne epizode: blagu, srednje tešku i tešku (Tabele 1 i 2). Takođe, DSM-IV klasifikacija razlikuje nekoliko podtipova depresivnog poremećaja na osnovu različitih kliničkih simptoma. Ovi podtipovi i njihove glavne karakteristike su nabrojani u Tabeli 3.

Tabela 3. Podtipovi depresivnog poremećaja prema DSM-IV. Adaptirano na osnovu Lam i Mok (2008).

Podtipovi velikog depresivnog poremećaja po DSM - IV	
Podtipovi	Ključne karakteristike
Melanholična depresija	Nemogućnost da se reaguje na prijatan stimulus, anhedonija, gubitak apetita i težine, preterano osećanje krivice, simptomi su teži ujutro, rano jutarnje buđenje, psihomotorna retardacija ili agitacija.
Atipična depresija	Mogućnost osobe da oseti zadovoljstvo kada se nešto dobro desi, hipersomnija, povećan apetit i dobitak na težini, osećaj težine sopstvenog tela, preterana osetljivost na odbacivanje od strane drugih ljudi.
Psihotična depresija	Halucinacije ili sumanute ideje
Katatona depresija	Sa katatonim karakteristikama ¹ (retka u kliničkoj praksi).
Hronična depresija	Traje dve ili više godina i ispunjeni su svi kriterijumi za depresivnu epizodu.
Sezonski depresivni poremećaj	Regularan početak depresivne epizode s početkom određenog godišnjeg doba (obično jeseni/zime).
Postpartalna depresija	Početak depresivne epizode u periodu do 4 nedelje nakon porađaja.
¹ Katatoni sindrom je poremećaj psihomotorike, pretežno ekstrapirmidnog karaktera. Podrazumeva spajanje hiperkineznih i stuporoznih simptoma: negativizam, mutizam, katepsija, eholalija, ehopraksija, stereotipija, impulsivne radnje.	

Simptomi depresije, onako kako su definisani DSM-IV ili ICD-10 kriterijumima, takođe se mogu javiti u kontekstu mnogih drugih oboljenja kao što su endokrini poremećaji (hiper- ili hipokortizolemija, hiper- ili hipotiroidizam), kardiovaskularne bolesti, Parkinsonova bolest, određeni tipovi raka, dijabetes, imunološka oboljenja itd. (Nestler i sar., 2002).

1.1.3. Epidemiologija depresivnog poremećaja

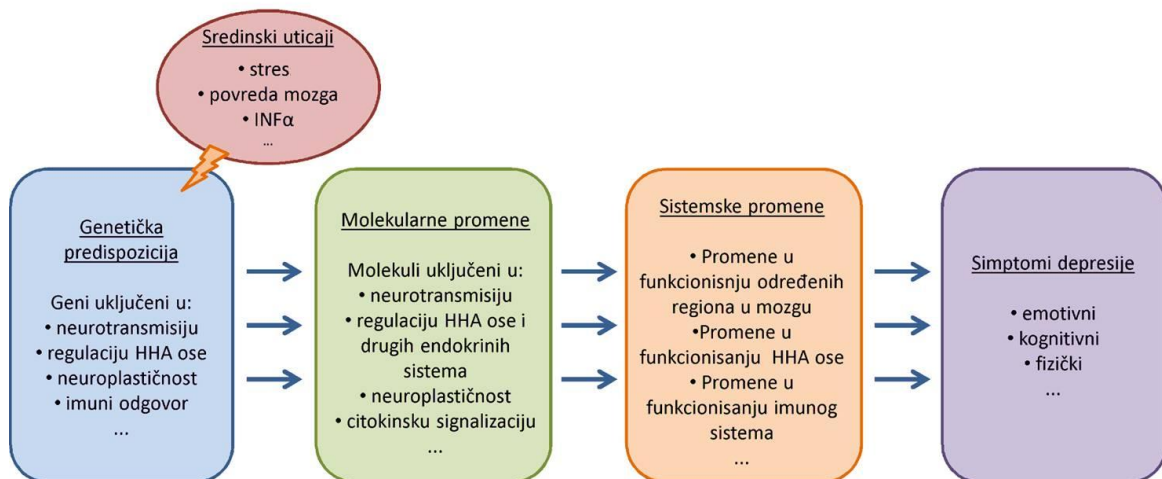
Depresivni poremećaj smatra se jednim od najvećih problema današnjice od javnog značaja, i to iz više razloga: 1) visoke prevalence – depresija je najčešći mentalni poremećaj u opštoj populaciji (oko 15%); 2) težine posledica – u najvećem broju slučajeva su rekurentne, tj. imaju hroničan tok; 3) značajno narušavaju kvalitet života; 4) relativno često se završavaju samoubistvom (2%); 5) često se javljaju sa drugim telesnim i mentalnim bolestima i povećavaju ukupnu smrtnost ovih oboljenja (Bostwick i Pankratz, 2000; Spijker i sar., 2004; Ustun i sar., 2004; Paykel, 2006; Lečić Toševski i sar., 2011).

Prema podacima svetske zdravstvene organizacije procenjuje se da je depresija četvrti uzrok narušene radne sposobnosti i opšteg kvaliteta života danas, a da će do 2020. biti na drugom mestu (Murray i Lopez, 1996). Prevalenca za DP varira u različitim zemljama i studijama, a u proseku je oko 15% u opštoj populaciji. Među zemlje sa niskim prevalencama spadaju npr. Češka (1%) i Japan (6.6%), a među zemlje sa najvišim prevalencama spadaju Sjedinjene Američke Države (19%) i Holandija (18%) (Kessler i sar., 2003; Kessler i Bromet, 2013). Takođe, generalno gledajući, prevalencije ove bolesti više su u visoko razvijenim zemljama nego u onim srednje i nisko razvijenim (Kessler i Bromet, 2013).

Od sociodemografskih faktora, epidemiološke studije pokazuju da pol, godine i ekonomsko stanje imaju najveći uticaja na razvoj depresije (Kessler i sar., 2003; Kessler i Bromet, 2013). Poznato je da žene oko dva puta češće oboljevaju od depresije od muškaraca (Kessler, 2003). Životna dob u kojoj je najveći rizik za dobijanje prve epizode depresije je kasna adolescencija (tj. sredina 20-ih godina) do sredine 40-ih godina. (Kessler i Bromet, 2013). Takođe, oni nižeg obrazovanja, kao i oni koji žive u siromašnim uslovima, imaju veću verovatnoću oboljevanja od depresije (Kessler i sar., 2003). Ponovna pojava depresivne epizode kod ljudi koji su već imali prvu epizodu veoma je često (67%) (Kennedy i sar., 2004).

1.1.4. Biološka osnova patogeneze depresivnog poremećaja

Opšte je prihvaćeno da je DP heterogeno oboljnje koje proizilazi iz kompleksne interakcije genetičke predispozicije individue i faktora spoljašnje sredine, naročito stresnih životnih situacija (kako onih u ranom detinjstvu, tako i onih kasnije u životu) (Nestler i sar., 2002), ali i drugih sredinskih uticaja kao što su virusne infekcije (Bode i sar., 1996), povreda mozga (Jorge i sar., 2004), ili različiti agensi (npr. terapija interferonom α (eng. *interferon α* , INF- α)) (Bonaccorso i sar., 2001; Musselman i sar., 2001). Dosadašnji rezultati genetičkih, molekularnih i neuroimidžing studija dosta su doprenili našem razumevanju biološke osnove ovog premećaja, ali ipak još uvek nedovoljno da bismo unapredili dijagnostiku, podelu na podtipove i uspešnost lečenja depresije. Šematski prikaz bioloških mehanizama koji imaju ulogu u patogenezi DP-a prikazan je na Slici 1. Sve ove brojne biološke promene, za koje je pokazano da su povezane za DP-om, ne deluju odvojeno – naime, neke od ovih promene predstavljaju paralelne procese, neke se dešavaju serijski, pri čemu različiti putevi mogu voditi sličnim biološkim abnormalnostima koje su u osnovi fizičkih, emotivnih i kognitivnih simptoma depresije.



Slika 1. Šematski prikaz bioloških mehanizama koji imaju ulogu u patogenezi depresivnog poremećaja. HHA osa – hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa.

1.1.4.1. Genetička osnova depresivnog poremećaja

Iako je procenjena heritabilnost DP-a relativno visoka, 40% (Sullivan i sar., 2000), dosadašnje studije nisu uspele da sa sigurnošću pokažu povezanost DP-a ni sa jednom genetičkom varijantom. Razlog ovih neuspeha verovatno leži u tome što DP, kao i druga kompleksna oboljenja, ima poligensku osnovu, pri čemu važan uticaj imaju interakcije između različitih gena, kao i interakcija između genskih varijanti i sredinskih faktora. Upravo iz ovog razloga, studije vezanosti nisu dale velikog uspeha (Shyn i Hamilton, 2010). Analize gena kandidata su najvećim delom bile usmerene na gene vezane za neurotransmisiju, neuroplastičnost i stresni odgovor, na primer na gene za: glukokortikoidni receptor (eng. *glucocorticoid receptor*, GR) (van Rossum i sar., 2006), receptor za kortikotropni oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) (Liu i sar., 2006; Bradley i sar., 2008), monoamin oksidazu A (Schulze i sar., 2000), triptofan hidroksilazu 2 (Zill i sar., 2004; Zhang i sar., 2005), neurotrofni moždani faktor (eng. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) (Schumacher i sar., 2005; Frodl i sar., 2007) itd. Verovatno je da određeni aleli, bar kod nekih individua, doprinose većem riziku za nastanak depresije, ali ni za jednu genetičku varijantu nije nedvosmisleno potvrđeno da predstavlja faktor rizika za razvoj DP-a. Studije koje su analizirale polimorfizme kroz ceo genom (eng. *genome-wide association studies*) takođe su dale nekonzistentne rezultate i pokazano je da su uticaji pojedinačnih polimorfizama mali (Wray i sar., 2010).

1.1.4.2. Epigenetičke promene vezane za patogenezu depresivnog poremećaja

Epigenetičke promene predstavljaju jedan od mogućih mehanizama putem kojih sredinski faktori mogu interagovati sa genetičkim materijalom individue i tako dovesti do promena u ekspresiji gena i funkciji proteina i time doprineti povećanoj sklonosti za oboljevanje od DP-a.

Na primer, u pacovskom modelu majčinske brige o potomstvu, pokazano je da su mladunci majki koje su pokazivale smanjenu brigu u ranom postnatalnom periodu imali i smanjenu ekspresiju GR-a u hipokampusu, kao i veću reaktivnost na stresne događaje u odraslom dobu, u poređenju sa potomcima brižnih majki (Liu i sar., 1997;

Francis i sar., 1999). Kasnije je pokazano da su ove promene u ekspresiji GR-a i posledičnoj reaktivnosti na stresore, posredovane metilacijom egzona 17 promotorskog regiona GR-a (Weaver i sar., 2004). Takođe, pokazano je da su ove epigenetičke promene reverzibilne i da se injeciranjem histon deacetilaze, metilacija GR17 kod potomaka manje brižnih majki može smanjiti i time eliminisati efekat smanjene materinske brige na ekspresiju GR-a i reaktivnost na stres (Weaver i sar., 2004). Ovo je bila prva studija koja je pokazala kako sredinski efekti preko epigenetičkog programiranja mogu imati dugotrajan uticaj na ponašanje tokom života. Kasnije je i na *postmortem* uzorcima hipokampusa osoba koje su počinile samoubistvo i bile zlostavljane u detinjstvu, pronađena veća metilacija gena za GR, u odnosu na osobe koji nisu bile zlostavljane (McGowan i sar., 2009). Takođe, u životinjskim modelima pokazana je i povećana metilacija gena za vazopresin i BDNF kao posledica rano doživljenog stresa, što bi takođe moglo imati potencijalnog značaja u patogenezi DP-a (Murgatroyd i sar., 2009; Roth i sar., 2009).

Epigenetički mehanizmi bi takođe mogli imati ulogu i u ostvarivanju tarapeutskih efekata antidepresiva. Na primer, pokazano je da je acetilacija histona u promotoru gena za *bdnf* potrebna da bi antidepresiv imipramin ostvarivario svoj tarapeutski učinak u životinjskom modelu hroničnog stresa (Tsankova i sar., 2006).

1.1.4.3. Monoaminska hipoteza depresivnog poremećaja

Prema „monoaminskoj hipotezi“, depresija je uzrokovana smanjenom funkcijom monoamina (naročito serotonina i noradrenalina) u mozgu (Krishnan i Nestler, 2008). Ova hipoteza je postavljena pre oko 50-ak godina i zasnovana je na ranim slučajnim otkrićima da dve supstance (iproniazid i imipramin) napravljene za potrebe lečenja drugih oboljenja, imaju antidepresivan efekat i dovode do povećanja serotoninske ili noradrenalinske transmisije u mozgu (Nestler i sar., 2002). Međutim, ova teorija nije objašnjavala zašto postoji odloženo tarapeutsko dejstvo antidepresivnih lekova (za dve do tri nedelje) budući da navedeni lekovi deluju trenutno na povećanje monoamina u sinapsi. Danas se zna da antidepresivi dovode do molekularnih promena nizvodno od njihovog direktnog dejstva na monoaminske sisteme što se smatra zaslužnim za njihov

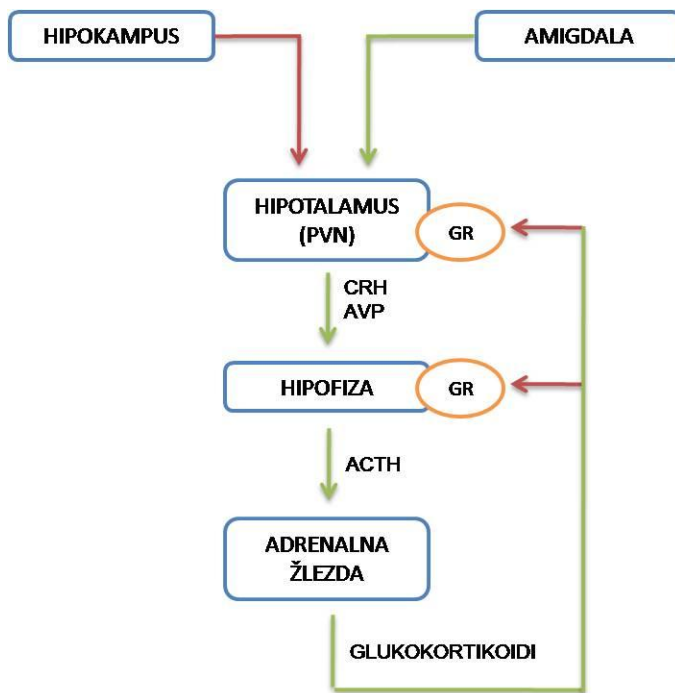
tarapeutski učinak (Krishnan i Nestler, 2008; Pittenger i Duman, 2008) (videti i ostala poglavlja u okviru 1.1.4., kao i poglavlje 1.1.5.).

Mnogobrojne neuroimidžing i *postmortem* studije uočile su narušenost monoaminske signalizacije kod pacijenata sa DP-om (analizirane su promene u ekspresiji i sposobnosti vezivanja liganda različitih monoaminskih receptora u različitim delovima mozga), mada su dobijeni rezultati često bili oprečni (Anisman i sar., 2008). To sugeriše da određeni faktori, kao što su uticaj stresora, određene genske varijante, pol, utiču na poseban način na uočene promene, tako da su neophodna dalja istraživanja u cilju rasvetljavanja uticaja ovih faktora (Anisman i sar., 2008).

Jedno od mogućih objašnjenja kako se narušava funkcija monoaminskih sistema moglo bi biti sledeće: tokom stresa dolazi do oslobađanja monoamina u različitim regionima mozga važnim za odgovor organizma na stres (hipotalamus, prefrontalni korteks, amigdala, hipokampus), a u uslovima hroničnog stresa, neprekidna aktivacija neurona ovim neurotransmiterima može dovesti do smanjenja broja njihovih receptora i istrošenosti monoaminskih sistema, kao i njihovih nizvodnih signalnih puteva, što dalje može odvesti u bolest, uključujući i depresiju (Anisman i sar., 2008). Takođe, kod oko 80% pacijenata sa melanholičnom depresijom pronađeno je da je nivo anti-serotoninskih antitela viši nego kod zdravih ljudi (Maes i sar., 2012). Ovo pokazuje da bi i autoimuni odgovor mogao imati značajnu ulogu u smanjenoj serotoninskoj transmisiji, zapaženog bar kod nekih pacijenata sa DP-om.

1.1.4.4. Promene u funkciji hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose vezane za patogenezu depresivnog poremećaja

Iako je još pre više od 100 godina uočeno da pacijenti sa depresijom imaju povećan nivo hormona stresa (kortizola) u krvi, ovim promenama nije pridavana važnost i isprva su smatrane kao epifenomen (Holsboer, 2000). Tokom sledećih decenija, nagomilali su se mnogi dokazi koji su devedesetih godina prošlog veka doveli do formiranja „glukokortikoidne hipoteze“ depresije, koja pretpostavlja da narušena glukokortikoidna signalizacija i aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose predstavljaju uzrok nastanka depresije, a da terapija antidepresivima dovodi do normalizacije ovog stanja (Holsboer i Barden, 1996).



Slika 2. Šematski prikaz regulacije HHA ose. Zelene strelice označavaju stimulatorne uticaje, a crvene strelice inhibitorne uticaje. Slika adaptirana na osnovu Juruena i sar. (2004).

stimuliše aktivnost HHA ose (De Kloet i sar., 1998). Kod ljudi, glavni glukokortikoid je kortizol, dok je kod pacova i miševa to kortikosteron. Glukokortikoidi utiču na mnogobrojne procese u organizmu: stimulišu glukoneogenezu u jetri, lipolizu u masnom tkivu, suprimiraju imuni odgovor, utiču na procese učenja i formiranja memorije u mozgu, raspoloženje, itd. (Charmandari i sar., 2005). Osim toga, glukokortikoidi negativno regulišu i samu aktivnost HHA ose, inhibirajući sintezu i lučenje CRH i vazopresina u hipotalamusu i ACTH u hipofizi (Charmandari i sar., 2005). S obzirom da su liposolubilni, glukokortikoidi slobodno difunduju kroz membranu ćelije i vezuju se za svoje receptore u ćeliji, GR i mineralnokortikoidni receptor (eng. *mineralocorticoid receptor*, MR), preko kojih ostvaruju svoje efekte. Za razumevanje patogeneze depresije, važno je napomenuti da MR ima veći afinitet za glukokortikoide i ima ulogu u regulaciji HHA ose u bazalnim uslovima, dok je GR važniji u regulaciji HHA ose u uslovima povećanog lučenja kortizola, stanje kakvo nalazimo kod pacijenata sa depresijom (videti ispod) (De Kloet i sar., 1998).

Aktivnost HHA ose (Slika 2.) je pod kontrolom CRH i vazopresina, koji se luče iz paraventricularnog jedra (eng. *paraventricular nucleus*, PVN) hipotalamusa i stimulišu sekreciju adrenokortikotropnog hormona (eng. *adrenocorticotrophic hormone*, ACTH) iz hipofize. ACTH se luči u sistemske cirkulaciju i podstiče koru adrenalnih žlezdi na sekreciju glukokortikoida, krajnjeg produkta aktivnosti HHA ose. Takođe, i drugi regioni mozga mogu uticati na aktivnost HHA ose – npr. hipokampus ima inhibitorno dejstvo, dok amigdala

Glukokortikoidna hipoteza je postavljena na osnovu sledećih kliničkih nalaza kod pacijenata sa depresijom: 1) povećani nivoi ACTH i kortizola u krvi, kao i povećani nivo kortizola u pljuvački i urinu (Rubin i sar., 1987; Maes i sar., 1998; Swaab i sar., 2005); 2) povećan nivo CRH u cerebrospinalnoj tečnosti (Nemeroff i sar., 1984); 3) povećan broj i aktivnost neurona koji luče CRH, kao i sinteza mRNK za CRH (Raadsheer i sar., 1994); 4) uvećanje adrenalne žlezde i hipofize (Krishnan i sar., 1991; Nemeroff i sar., 1992); 5) izmenjen odgovor u neuroendokrinim funkcionalnim testovima (npr. test supresije deksametazonom (eng. *dexamethasone*, DEX; eng. *dexamethasone suppression test*, DST) i DEX/CRH test²) koji ukazuju na smanjenu supresiju lučenja kortizola (Carroll, 1982; Heuser i sar., 1994). Dakle, disfunkcija HHA ose javlja se kod većine, mada ne svih pacijenata sa depresijom - tačnije, kod najmanje 50% osoba sa umerenom depresijom i kod oko 80% osoba sa teškom depresivnom epizodom sa ili bez psihotičnih crta (Anacker i sar., 2011). Treba napomenuti i to da je povećana aktivnost HHA ose povezana sa simptomima melanholične depresije, dok su simptomi atipične depresije ili depresije kombinovane sa post-traumatskim stresnim sindromom, povezani sa smanjenom funkcijom HHA ose (Gold i sar., 1996; Oquendo i sar., 2003).

Smatra se da je povećana aktivnost HHA ose kod depresivnih pacijenata bar delimično posledica narušene negativne povratne sprege posredovane glukokortikoidima, a naročito narušene funkcije GR-a (tzv. "glukokortikoidna rezistencija") (Holsboer, 2000; Pariante i Miller, 2001; Pariante, 2006). Na smanjenu funkcionalnost GR-a u gašenju HHA ose kod pacijenata sa depresijom ukazuju izmenjeni odgovori u DST-u i DEX/CRH testu (Holsboer, 2000). Takođe, miševi koji imaju nefunkcionalan GR u hipofizi ili hipokampusu pokazuju hiperaktivnost HHA ose i depresivno ponašanje, što potvrđuje važnost funkcije GR-a u ovim strukturama za normalno funkcionisanje HHA ose i patogenezu depresije (Boyle i sar., 2005; Schmidt i sar., 2009). Narušena funkcija GR-a pokazana je i u perifernim tkivima, npr. limfocitima periferne krvi i fibroblastima pacijenata sa DP-om (videti poglavlje 1.2.2.)

² U testu supresije DEX-om, (DST), osobama se uveče (23h) daje određena doza DEX-a, sintetičkog glukokortikoida, selektivnog agoniste GR-a. DEX je moćan supresor HHA ose i dovodi do smanjenja lučenja prirodnih glukokortikoida, a svoj efekat ostvaruje na nivou hipofize supresijom lučenja ACTH, s obzirom da ne prolazi krvno-moždanu barijeru. Kod pacijenata sa DP-om supresija lučenja kortizola nakon administracije DEX-a je smanjena. U DEX/CRH testu, osobama se prvo uveče (23h) daje DEX, a zatim sutradan (15h) CRH. Administracija DEX-a trebalo bi da dovede do supresije lučenja kortizola, a kasnija primena CRH da ponovo stimuliše HHA osu na lučenje kortizola. Kod pacijenata sa DP-om, verovatno zbog smanjene supresije kortizola posle administracije DEX-a, nakon ponovne stimulacije HHA ose sa CRH-om, nivo kortizola je veći u poređenju sa kontrolama. (Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.)

(Pariante i Miller, 2001; Pariante, 2006). Ipak, treba napomenuti i to da je u depresiji u nekim tkivima funkcija GR očuvana. Na primer, kod pacijenta sa DP-om pokazano je povećanje visceralnih masti i znaci osteoporoze, a ove funkcije su posredovane povećanom signalizacijom preko GR-a, što sugerise da u depresiji ustvari postoji „lokalizovana glukokortikoidna rezistencija“ (Pariante i Miller, 2001; Gold i Chrousos, 2002). Što se tiče MR-a, neke studije ukazuju da je njegova funkcija povećana u depresiji, verovatno u cilju kompenzacije narušene funkcije GR-a (Young i sar., 2003).

Posledice narušene regulacije HHA ose i hronično povišenog lučenja kortizola su mnogostruke i odražavaju se kako na mozak tako i na periferna tkiva. Samo povećano lučenje CRH u mozgu, nezavisno od regulacije HHA ose, ima ulogu u razvoju simptoma depresije, kao što su problemi sa spavanjem, smanjen apetit i seksualni nagon, psihomotorna retardacija, povećana anksioznost (Gold i Chrousos, 2002; Swaab i sar., 2005). Takođe, povišen nivo kortizola može dovesti do neurodegeneracije u hipokampusu (Pittenger i Duman, 2008) (videti poglavlje 1.1.4.5. i 1.1.4.7.), a na periferiji, kao što je već napomenuto, doprineti stvaranju masnih naslaga, razvoju osteoporoze, insulinske rezistencije i povećanom riziku za oboljevanje od kardiovaskularnih bolesti (Gold i Chrousos, 2002).

Uspešno lečenje antidepresivima i stabilno poboljšanje depresivnih simptoma praćeno je normalizacijom aktivnosti HHA ose i funkcije GR-a, dok su parametri koji ukazuju na još uvek narušenu aktivnost HHA ose i GR-a, povezani sa negativnim odgovorom na terapiju i/ili povratkom depresivnih simptoma (Holsboer, 2000).

Studije na životinjskim modelima, kao i klinička istraživanja, ukazuju na značajan uticaj stresa doživljenog tokom ranog detinjstva na programiranje reaktivnosti HHA ose i pojavu DP-a kasnije u životu. Na primer, odvajanje tek rođenih mladunaca pacova od majki u kritičnom periodu razvoja mozga, dovelo je do programiranja reaktivnosti HHA ose koje se odžavalo i u odraslom dobu (Heim i sar., 2004). Ovakvi pacovi imali su povećanu sintezu CRH, povećano lučenje ACTH i kortikosterona u odgovoru na različite stresore, kao i probleme sa spavanjem, smanjen apetit, anksioznost, kognitivne probleme – simptome koje vidimo i kod pacijenata sa DP-om (Plotsky i Meaney, 1993; Ladd i sar., 2000; Heim i sar., 2004). Slične promene su pokazane i kod primata u modelu ranog životnog stresa (Sanchez i sar., 2001). Što se tiče kliničkih studija, pokazano je, na primer, da su žene koje su u detinjstvu bile fizički

ili seksualno zlostavljane, u odraslom dobu ispoljavale više simptoma depresije i anksioznosti (McCauley i sar., 1997) i četiri puta veći rizik za oboljevanje od kliničke depresije od onih koje nisu bile zlostavljane (Mullen i sar., 1996). Takođe, žene sa istorijom zlostavljanja u detinjstvu, u odgovoru na laboratorijske stresore, pokazivale su veću sekreciju ACTH, iako trenutno nisu imale depresiju, dok one sa akutnom epizodom DP-a, pokazivale su još veće lučenje ACTH, kao i povišen kortizol (Heim i sar., 2000). I muškarci u depresiji sa doživljenim traumama u detinjstvu pokazivali su hiperaktivnost HHA ose u DEX/CRH testu, u odnosu na kontrole i one muškarce koji nisu doživeli traume u ranom detinjstvu (Heim i sar., 2008).

Jedan od mehanizama koji bi mogao posredovati u uticaju ranih stresnih događaja na aktivnost HHA ose jeste epigenetička modifikacija gena za GR ili vazopresin (Weaver i sar., 2004; Murgatroyd i sar., 2009) (videti poglavlje 1.1.4.2.). Takođe, treba napomenuti i to da rani stresni događaji mogu uticati na aktivnost i programiranje i drugih sistema u organizmu, npr. serotoniniskog (Gardner i sar., 2005) i imunog sistema (Pace i sar., 2006), koji povratno opet mogu uticati na HHA osu, i doprinosti sklonosti ka kasnijem razvoju depresije.

Osim uticaja ranih stresnih događaja na programiranje funkcije HHA ose, pokazan je i uticaj genetičkih faktora na funkciju HHA ose i, posledično, na sklonost ka depresiji. Naime, osobe kod kojih nije bila dijagnostifikovana klinička depresija, ali su pripadale porodicama sa visokom učestalošću depresije, takođe su pokazivale povećano lučenje kortizola u DEX/CRH testu u odnosu na zdrave osobe iz porodica bez genetičkog opterećenja za depresiju, ali su imale niže vrednosti kortizola u odnosu na pacijente sa akutnom epizodom depresije (Holsboer i sar., 1995; Modell i sar., 1998). Ove promene su se pokazale konstantnim tokom vremena i pretpostavlja se da odražavaju genetičku sklonost ka povećanoj aktivnosti HHA ose, kao i oboljevanju od depresije, pre nego efekat ranih stresnih događaja (Modell i sar., 1998; Holsboer, 2000).

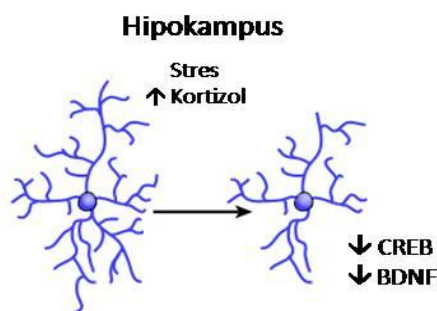
Takođe, odavno je uočeno da stresni događaji tokom života, naročito u hroničnom toku, povećavaju rizik za pojavu depresivne epizode (Kessler, 1997; Kendler i sar., 1999; Miller i sar., 2007). Pri tome, treba napomenuti, da postoji i genetička predispozicija da se osobe izlažu stresnim situacijama (Plomin i sar., 1990; Kendler i sar., 1999). Razvijeni su mnogi životinjski modeli u kojima se koriste različiti tipovi akutnih ili hroničnih stresora u ispitivanju mehanizama koji doprinose razvoju depresije

(Deussing, 2006; Krishnan i Nestler, 2011). Naročito, različite paradigme izlaganja životinja hroničnom stresu dovode do promena u ponašanju i molekularnoj signalizaciji sličnim onima zapaženim kod pacijenata sa depresijom, a takođe povoljno odgovaraju i na dugotrajan tretman antidepresivima (Deussing, 2006; Krishnan i Nestler, 2011).

Dakle, navedeni rezultati iz različitih životinjskih i kliničkih istraživanja govore u prilog tome da određene abnormalnosti u funkcionisanju HHA ose, kao posledice genetičke predispozicije i/ili rano doživljenog stresa, verovatno postoje i pre razvoja samog DP-a, a u izazovu na novi stresni događaj, mogu biti pogoršane i dovesti do precipitacije depresivne epizode.

1.1.4.5. Promene u neuronskoj plastičnosti vezane za patogenezu depresivnog poremećaja

Sve je veći broj podataka koji ukazuju na to da je plastičnost nervnog sistema narušena kod pacijenata sa DP-om. Pretpostavlja se da je posrednik ovih promena hronično visok nivo glukokortikoida, u prilog čemu govore i životinjski modeli hroničnog stresa i tretmana glukokortikoidima (Pittenger i Duman, 2008). Tretmani antidepresivima dovode do ublažavanja ovih promena. Uočene promene na strukturnom i molekularnom nivou neuronske plastičnosti u životinjskim modelima u velikoj meri odgovaraju promenama u funkciji i strukturi mozga zapaženim u neuroimidžing i *postmortem* studijama pacijenata sa depresijom i verovatno predstavljaju njihovu molekularnu osnovu (videti poglavlje 1.1.4.7.).



Slika 3. Šematski prikaz strukturnih i molekularnih promena na nivou plastičnosti neurona u hipokampusu tokom stresa.

Plastičnost nervnog sistema je najviše proučavana u regionu hipokampusa (Slika 3.). Na strukturnom nivou, pokazano je da hroničan stres, kao i hronično visok nivo glukokortikoida, u životinjskim modelima dovode do atrofije i povlačenja apikalnih dendrita piramidalnih neurona hipokampusa (Woolley i sar., 1990; Watanabe i sar., 1992; Magarinos i sar., 1996; McEwen, 1999), kao i do smanjene neurogeneze u dentatnom girusu hipokampusa (Gould i sar.,

1992; Duman, 2004; Dranovsky i Hen, 2006). Ove promene slične su onima uočenim u hipokampusu na *postmortem* uzorcima pacijenata sa depresijom (Stockmeier i sar., 2004). Takođe, hroničan stres dovodi do regresije dendritske mreže piramidalnih neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu (Cook i Wellman, 2004; Radley i sar., 2004), a ove promene opet odgovaraju onima uočenim na *postmortem* uzorcima pacijenata sa DP-om (Rajkowska i sar., 1999).

Na molekularnom nivou, hroničan stres, kao i hronično visok nivo glukokortikoda, u hipokampusu dovode do narušene aktivnosti CREB-a (eng. *cAMP response element-binding*, CREB) (Focking i sar., 2003; Pardon i sar., 2005; Lee i sar., 2006), smanjene ekspresije neurotrofičkih faktora kao što su BDNF (Schaaf i sar., 2000; Rasmusson i sar., 2002; Franklin i Perrot-Sinal, 2006) i VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Heine i sar., 2005), kao i drugih molekula koji posreduju u sinaptičkoj plastičnosti (Pittenger i Duman, 2008). Takođe, na *postmortem* uzorcima depresivnih pacijenata uočena je smanjena ekspresija CREB-a (Dwivedi i sar., 2003; Yamada i sar., 2003), a u serumu osoba sa DP-om smanjena koncentracija BDNF-a (Karege i sar., 2002; Shimizu i sar., 2003).

Antidepresivi ostvaruju povoljan efekat na promene u plastičnosti nervnog sistema uzrokovane hroničnim stresom i depresijom. Tačnije, hroničana terapija antidepresivima u hipokampusu dovodi do povećanja broja sinapsi (Hajszan i sar., 2005), zaustavljanja smanjenja kompleksnosti dendritske mreže prouzrokovane hroničnim stresom (Magarinos i sar., 1999), kao i povećanja neurogeneze (Malberg i sar., 2000; Nakagawa i sar., 2002). Ovi efekti su bar delimično posredovani uticajem antidepresiva na aktivaciju CREB-a i povećanje ekspresije neurotrofičkih faktora (kao što je BDNF) (Chen i sar., 2001; Nakagawa i sar., 2002; Sairanen i sar., 2005).

Ipak treba napomenuti da pomenuti rezultati koji se tiču kako uticaja stresa na neurogenezu, tako i poboljšanja nakon tretmana antidepresivima, nisu uvek konzistentni i jednoznačni, i verovatno zavise, s jedne strane, od životinjskih modela koji se koriste u studiji, a s druge strane, od vrste i dužine primene antidepresiva (Krishnan i Nestler, 2008; Pittenger i Duman, 2008). Takođe, ograničenja „hipoteze neuroplastičnosti“ je i to što stres i depresija nisu uvek povezani sa smanjenjem, a terapija antidepresivima sa povećanjem neuroplastičnosti u svim regionima mozga. Na primer, pokazano je da je depresivno ponašanje kod životinja povezano sa povećanom aktivnošću CREB-a u

nucleus accumbens-u (Pliakas i sar., 2001), dok njegova inhibicija ima antidepresivan efekat (Newton i sar., 2002). Takođe, hroničan stres i visok nivo glukokortikoida dovodi do povećanja dendritske mreže i broja sinapsi u amigdali, što pre doprinosi depresivnom stanju kod životinja, nego što ima antidepresivan efekat (Pittenger i Duman, 2008). Ovu regionalnu specifičnost neuroplastičnih promena treba imati u vidu pri razvoju novih tarapeutskih supstanci čije delovanje je usmereno na elemente plastičnosti.

1.1.4.6. Promene u imunskom sistemu vezane za patogenezu depresivnog poremećaja

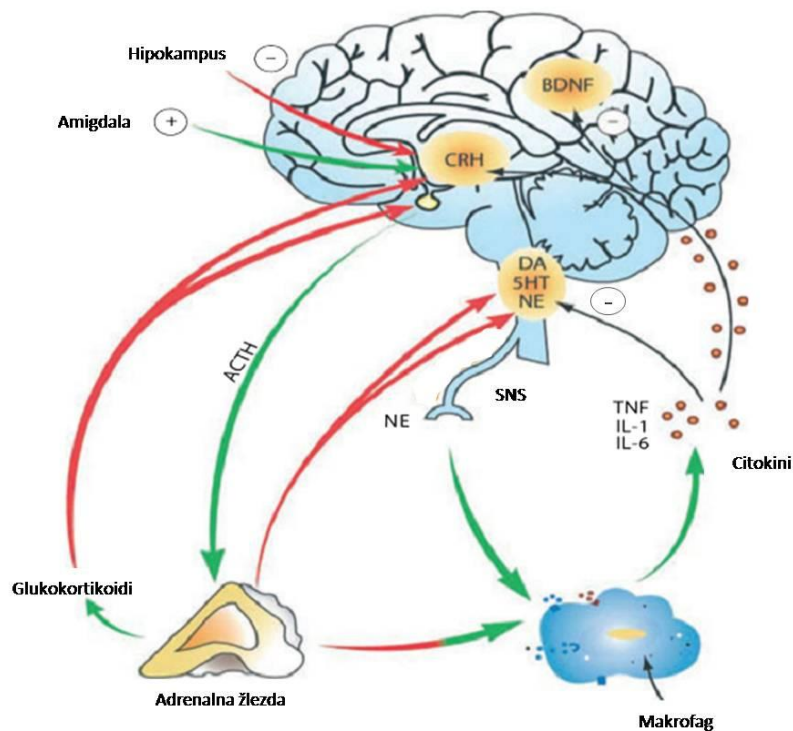
Veliki broj podataka pokazuje da inflamatorni medijatori igraju važnu ulogu u patogenezi depresije. Aktivacija inflamatornih puteva kod pacijenta sa depresijom, koji su inače medicinski zdravi, ispoljava se kroz povećanu produkciju pro-inflamatornih citokina (naročito interleukina 6 (eng. *interleukin 6*, IL-6), interleukina 1 β (eng. *interleukin 1 β* , IL-1 β), faktora nekroze tumora α (eng. *tumor necrosis factor α* , TNF- α)) kako u perifernoj krvi, tako i u cerebrospinalnoj tečnosti, zatim akutnih faznih proteina (npr. C-reaktivnog proteina), hemokina i adhezivnih molekula (Maes, 1999; Danner i sar., 2003; Alesci i sar., 2005; Raison i sar., 2006). S druge strane, kod oko 50% pacijenta koji boluju od kancera ili hepatitisa C i primaju terapiju INF- α , javljaju se simptomi depresije koji se mogu otkloniti uzimanjem antidepresiva (Musselman i sar., 2001; Capuron i sar., 2002). Takođe, aktivacija inflamatornog odgovora u životinjskim modelima dovodi do tzv. "bolesnog ponašanja" (eng. „*sickness behaviour*“) koje se karakteriše anhedonijom, smanjenim unosom hrane, problemima sa spavanjem, psihomotornom usporenošću – tj. simptomima koje nalazimo i u depresiji (Besedovsky i del Rey, 1996; Anisman i sar., 2008). Ipak, treba napomenuti da iako veliki broj studija podržava hipotezu da inflamatorni procesi doprinose patogenezi depresije, postoje istraživanja koja nisu uspele da pronađu vezu između ovih procesa (Miller i sar., 2009). Ovakva raznolikost rezultata ukazuje na to da inflamatorni procesi mogu imati ulogu u razvoju depresije u nekim, mada ne u svim slučajevima. U skladu sa ovim su i nalazi koji pokazuju vezu između pojedinih simptoma depresije - smanjenja energije, nesanice i kognitivnih problema, s jedne strane, i markera inflamacije, s druge, što sugeruje da su

samo određeni simptomi depresije povezani sa inflamacijom (Meyers i sar., 2005; Motivala i sar., 2005).

Mehanizmi kojima pro-inflamatorni citokini mogu doprineti razvoju simptoma depresije su mnogostruki: preko svog dejstva na neurotransmiterske sisteme, neurogenezu, kao i aktivnost HHA ose (Barrientos i sar., 2003; Dantzer i sar., 2008; Miller i sar., 2009) (Slika 4). Iako je još uvek pitanje da li aktivacija inflamatornih procesa u depresiji primarno potiče sa periferije ili/i nastaje u centralnom nervnom sistemu, periferni inflamatorni signali mogu da dospeju do mozga različitim putevima i utiču na njegove funkcije (Miller i sar., 2009).

Jedan od najranije uočenih efekata citokina kojima bi mogli doprineti razvoju depresije jeste njihov uticaj na HHA osu. Dok akutno povećanje citokina dovodi do povećanja CRH, ACTH i kortizola, hroničan tretman citokinima je povezan sa promenom u cirkadijalnom ritmu lučenja kortizola (Besedovsky i del Rey, 1996; Harbuz i sar., 2003; Raison i sar., 2008). Mehanizmi kojima bi citokini mogli uticati na aktivnost HHA ose jeste preko njihovog dejstva na GR. Kao što je već pomenuto, glukokortikoidna rezistencija je jedna od glavnih karakteristika DP-a, a signalni putevi aktivirani citokinima mogu da inhibiraju funkciju GR-a (Pace i sar., 2007) (videti poglavlje 1.2.2.1.).

Izvor inflamacije u slučajevima pojave depresije kod inflamatornih bolesti ili administracije citokina ili drugih supstanci koje dovode do aktivacije imunog odgovora je očigledan. Ipak, još uvek je pitanje šta je izvor inflamacije kod pacijenata sa DP-om, koji su inače medicinski zdravi. Objašnjenje bi moglo biti sledeće (Slika 4): u stresu dolazi do aktiviranja simpatičkog nervnog sistema (SNS) i HHA ose; kateholamini, produkti SNS-a, delujući preko svojih α - i β -adrenergičkih receptora mogu dovesti do povećene sinteze pro-inflamatornih citokina, kako na periferiji tako i u mozgu (Bierhaus i sar., 2003; Johnson i sar., 2005); s druge strane, anti-inflamatorno dejstvo glukokortikoida, krajnjih produkata aktivacije HHA ose, u kontekstu hroničnog stresa, može biti kompromitovano, zbog nastanka glukokortikoidne rezistencije (Miller i sar., 2008); s obzirom na uočenu ulogu stresa i narušene aktivnosti HHA ose u patogenezi depresije, prethodno opisani mehanizmi bi zajedno mogli doprineti povećanoj aktivnosti inflamatorne signalizacije u DP-u (Miller i sar., 2009).



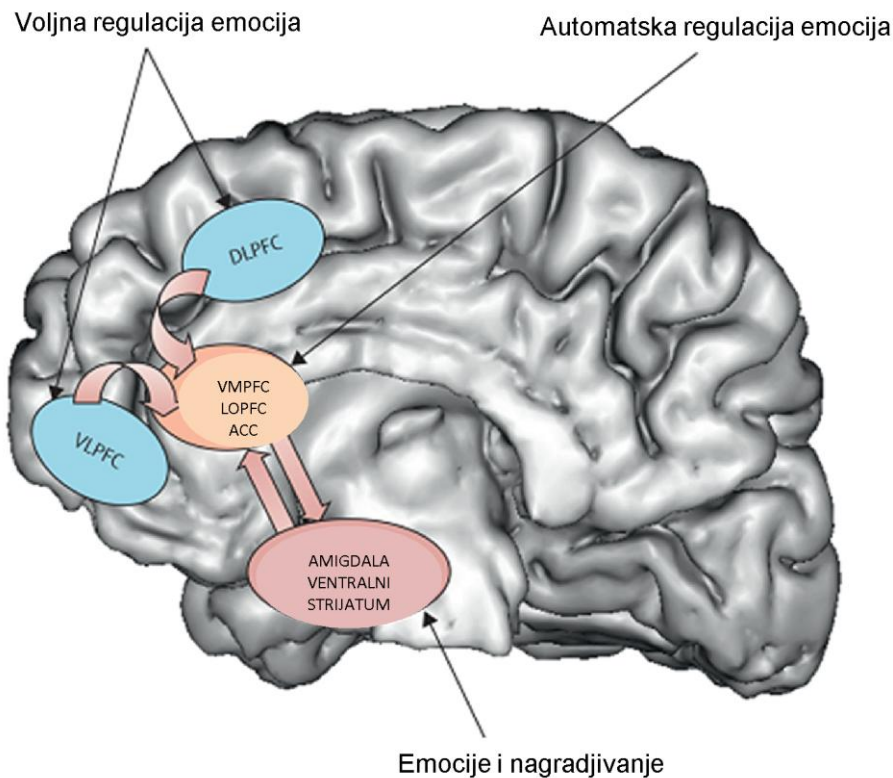
Slika 4. Šematski prikaz procesa narušenih u depresiji – interakcije imunog sistema, neurotransmitterskih sistema, HHA ose i SNS-a. Zelene strelice označavaju stimulatorne efekte, a crvene inhibitorne efekte. Videti objašnjenje u tekstu. Slika adaptirana na osnovu Maletic i sar. (2007).

Takođe, treba napomenuti i to da pokazatelji inflamacije mogu potencijalno služiti kao biomarkeri za praćenje efekta lečenja pacijenata. Na primer, pokazano je da su pacijenti koji nisu uspešno odgovorili na antidepresive, imali i dalje povećan nivo IL-6 u perifernoj krvi, dok je povoljan ishod lečenja bio povezan sa samnjenjem pro-inflamatornih medijatora u krvi (Maes i sar., 1997; Raison i sar., 2008; Cattaneo i sar., 2013).

1.1.4.7. Regioni mozga čija je aktivnost izmenjena u depresivnom poremećaju

Neuronski sistemi koji su važni za razumevanje simptoma depresije obuhvataju one koji imaju ulogu u emotivnom reagovanju, nagrađivanju i kogniciji. Pokazano je da su u DP-u narušeni sledeći sistemi: subkortikalni sistemi uključeni u regulaciju emocija i nagrađivanja (amigdala i ventralni striatum), regioni uključeni u obradu emocija i automatsku regulaciju emotivnih reakcija (određeni regioni prefrontalnog korteksa i

anteriorni cingulatni korteks (eng. *anterior cingulate cortex*, ACC)), regioni uključeni u kogniciju i voljnu kontrolu emocija (lateralni prefrontalni korteks), kao i hipokampus, region važan u procesima formiranja memorije (Kupfer i sar., 2012) (Slika 5).



Slika 5. Regioni mozga uključeni u patogenezu depresivnog poremećaja. VLPFC – ventrolateralni prefrontalni korteks; ostale skraćenice videti u tekstu. Slika adaptirana na osnovu Kupfer i sar. (2012).

Što se tiče regiona mozga uključenih u regulaciju emocija i nagradjivanja, u neuroimaging studijama pokazana je hiperaktivnost amigdale i ventralnog striatuma na negativne emotivne stimuluse, a hipoaktivnost ventralnog striatuma u odgovoru na pozitivne emotivne stimuluse i dobijanje nagrade (Schumacher i sar., 2005; Epstein i sar., 2006; Pizzagalli i sar., 2009). Ovi nalazi govore u prilog tome da kod pacijenata sa DP-om postoji sklonost ka negativnim emocijama, a udaljavanje od pozitivnih.

Zatim, kod pacijenata sa DP-om uočena je hiperaktivnost u ventromedijalnom prefrontalnom korteksu (eng. *ventromedial prefrontal cortex*, VMPFC) i lateralnom orbitalnom prefrontalnom korteksu (eng. *lateral orbital prefrontal cortex*, LOPFC), a hipoaktivnost u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu (eng. *dorsolateral prefrontal*

cortex, DLPFC) (Drevets, 1998). Povišena aktivnost u regionima VMPFC-a i LOPFC-a, mogla bi biti povezana sa povećanom osetljivošću na bol, anksioznošću, depresivnim razmišljanjima i napetošću kod depresivnih pacijenata (s obzirom da ovi regioni imaju ulogu u osetljivosti na bol i automatskoj regulaciji emotivnog ponašanja) (Maletic i sar., 2007). S druge strane, hipoaktivnost DLPFC-a mogla bi posredovati u smanjenoj pažnji i radnoj memoriji, kao i motornoj retardaciji kod pacijenata sa DP-om (s obzirom da DLPFC ima ulogu u održavanju voljne pažnje, procesima radne memorije i egzekutivnim funkcijama) (Maletic i sar., 2007).

Postmortem i imidžing studije pokazuju da je hipokampus naročito osetljiv u DP-u. Meta-analize pokazuju da je zapremina hipokampusa značajano smanjena kod pacijenata sa DP-om (Videbech i Ravnkilde, 2004; McKinnon i sar., 2009), a stepen njegovog smanjenja je proporcionalan broju i trajanju neležanih depresivnih epizoda (Sheline i sar., 2003). Atrofija hipokampusa mogla bi posredovati u simptomima DP-a kao što su teškoće u koncentraciji, problemi sa pamćenjem i narušena regulacija stresnog odgovora, s obzirom da hipokampus ima važnu ulogu u ovim procesima (Pittenger i Duman, 2008).

Ipak, treba imati u vidu da se promene u pomenutim regionima ne zapažaju kod svih pacijenata i još uvek nije sigurno koje promene se mogu smatrati specifičnim za samu depresiju (Maletic i sar., 2007). Takođe, ograničenja ovih studija su i to što postoji pojednostavljanje lokalizacije funkcija u odrađenim moždanim regionima, kao i to što neuroimidžing tehnike zaključuju o aktivnosti određenih regiona mozga na osnovu posrednih markera aktivnosti neurona (Krishnan i Nestler, 2008).

1.1.4.8. Biološka osnova polnih razlika u sklonosti prema depresivnom poremećaju

Kao što je već napomenuto, široko je primećeno da žene oko 2 puta češće obolevaju od depresije nego muškarci (Kessler, 2003; Kessler i sar., 2003). Polna razlika se ogleda i u odgovoru na antidepresivne lekove, npr. pokazano je da žene bolje odgovaraju na selektivne inhibitore ponovnog preuzimanja serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) od muškaraca (Kornstein i sar., 2000; Joyce i sar., 2004). Moguće objašnjenje za postojanje polnih razlika u sklonosti ka depresiji moglo

bi se ogleđati u tome što polni hormoni, kako je pokazano, mogu uticati na procese neurotransmisije, aktivnost HHA ose i imunog sistema (Fink i sar., 1996; Klink i sar., 2002; Kudielka i Kirschbaum, 2005). Interakcije ovih sistema zajedno mogu da igraju važnu ulogu u većoj predispoziciji žena da obole od depresije nego muškarci.

Što se tiče efekata polnih hormona na aktivnost HHA ose, pokazano je da estrogeni, s jedne strane, stimulišu sekreciju CRH, a sa druge, smanjuju ekspresiju GR-a u regionima mozga važnim za funkciju HHA ose (hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi) (Swaab i sar., 2005). To je verovatno razlog zašto se u životinskim modelima često zapaža da ženke imaju viši kako bazalni nivo glukokortikoida, tako i onaj u odgovoru na stres (Kudielka i Kirschbaum, 2005). Što se tiče ljudi, rezultati su neujednačeni, i zavise od vrste primenjenog stresora, faze menstrualnog ciklusa, korišćenja kontraceptivnih sredstava i starosti (Kudielka i Kirschbaum, 2005; Kajantie i Phillips, 2006).

Do sada nema konzistentnih nalaza da se žene i muškarci razlikuju u osetljivosti na depresogeni efekat stresnih životnih događaja, ali je pokazano da se razlikuju po tome šta su za njih stresni događaji: na primer, žene su osetljivije na probleme sa ljudima iz njihovog bliskog okruženja, dok su muškarci osetljiviji na razvod i probleme na poslu (Kendler i sar., 2001). Ipak, neki radovi ukazuju da žene imaju negativniju sliku o sebi i emotivnije reaguju tokom adaptacije na stresne događaje što može doprinosti njihovoj većoj sklonosti ka depresiji (Nolen-Hoeksema, 2001; Matud, 2004).

Što se tiče uloge polnih hormona u aktivnosti imunog sistema, pokazano je da su žene, u poređenju sa muškarcima, manje podložne mnogim infekcijama, imaju pojačanu imunoreaktivnost i češće oboljevaju od autoimunih bolesti (Cannon i St Pierre, 1997; Ahmed i sar., 1999). Takođe, pokazano je i to da u odgovoru na psihološki stresor, osetljivost pro-inflamatornih citokina na supresorne efekte glukokortikoida je manja kod žena nego kod muškaraca (Rohleder i sar., 2001). Ovi rezultati sugerišu na produženu sistemsku inflamaciju kod žena u odnosu na muškarce nakon izlaganja stresu (Euteneuer i sar.; Rohleder i sar., 2001).

Na kraju ovog poglavlja, 1.1.4., treba napomenuti i to da je u depresiji uočena narušena funkcija i drugih sistema i ćelijskih procesa u organizmu koji ovde nisu detaljnije opisani, kao na primer: povećan oksidativni stres u ćelijama, narušena

funkcija mitohondrija, promene u sekreciji peptida hipotalamusa zaduženih za regulaciju ishrane, promene u cirkadijalnim ritmovima i funkciji suprahijazmatičkog jedra i dr., što sve svedoči o kompleksnosti ovog oboljenja (Berton i Nestler, 2006; Anisman i sar., 2008; Krishnan i Nestler, 2011; Moylan i sar., 2013).

1.1.5. Terapija depresivnog poremećaja

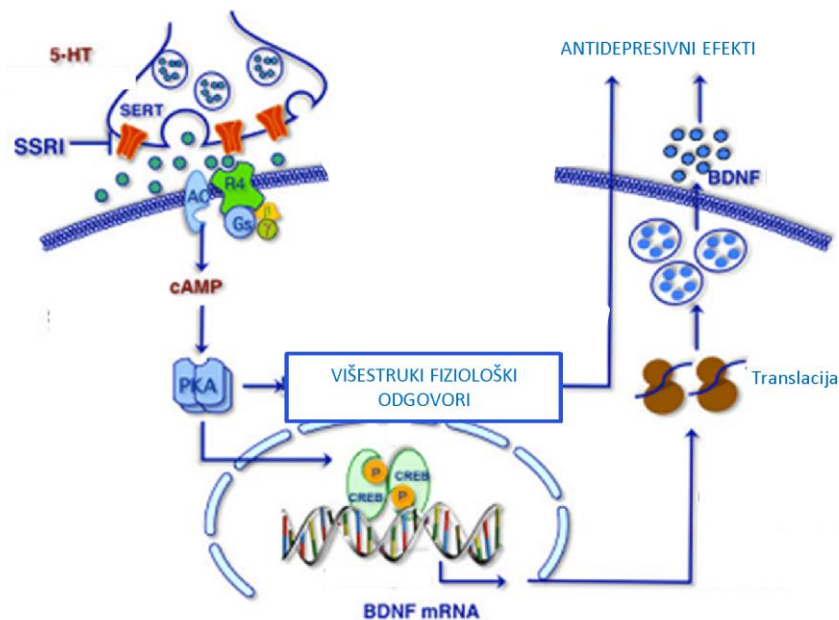
U terapiji depresije koristi se nekoliko pristupa: farmakoterapija, psihoterapija i somatski tretmani (npr. elektrokonvulzivna terapija (EKT) i transkranijalna magnetna stimulacija (TMS)). I pored postojanja različitih vrsta lečenja, terapija DP-a i dalje ostaje suboptimalana – oko 50% pacijenata biva potpuno izlečeno, dok oko 80% pokazuje delimičan odgovor na lečenje (Nestler i sar., 2002).

Svi dosadašnji antidepresivni lekovi odobreni od Administracije za hranu i lekove deluju tako što povećavaju količinu monoamina u sinaptičkoj pukotini (Fava i Kendler, 2000). Njihova podela po mehanizmu delovanja i najznačajniji predstavnici prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Podela antidepresivnih lekova po mehanizmu delovanja (Kupfer i sar., 2012).

Grupa antidepresiva	Lekovi	Mehanizam delovanja
Selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina (SSRI)	citalopram, sertalin, fluoksetin, paroksetin	selektivno blokiranje ponovno preuzimanje serotonina
Triciklični antidepresivi (TCA)	imipramin, amitriptilin, dezipramin	neselektivni inhibitori ponovnog preuzimanja monoamina - serotonina, noradrenalina i dopamina
Inhibitori ponovnog preuzimanja noradrenalina (NRI)	bupropion, reboksetin, maprotilin	selektivno blokiraju preuzimanje noradrenalina, a neki i dopamina
Selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina (SNRI)	venlafaksin, duloksetin	selektivno blokiraju ponovno preuzimanje serotonina i noradrenalina
Serotoninski modulatori	nefazodon, trozodon	antagonisti serotoninskih 5-HT ₂ receptora
Noradrenalinski i serotoninski modulatori	mitrazapin	antagonisti noradrenergičnih α -2 i serotonergičnih 5-HT _{2C} receptora
Serotoninski riaptejk inhibitori i 5-HT _{1A} parcijalni agonisti	vilazodon	selektivno blokiranje ponovno preuzimanje serotonina i deluju kao parcijalni agonist 5-HT _{1A} serotoninskih receptora
MAO inhibitori (MAOI)	izokarboksazid, fenilzin	neselektivni inhibitori enzima monoamin oksidaze (MAO) uključenih u razgradnju monoamina - serotonina, dopamina i noradrenalina

Iako antidepresivi dovode do trenutnog povećanja monoamina u sinapsi, za postizanje tarapeutskog učinka potrebno je najmanje dve nedelje, a tek nakon šest nedelja mogu se videti puni efekti. Smatra se da je hroničan tretman potreban da bi došlo do adaptivnih promena u nizvodnoj ćelijskoj signalizaciji i ekspresiji gena uključenih u različite ćelijske procese. Pretpostavljeni mehanizam tarapeutskog efekta dugotrajne terapije antidepresivima bi ukratko mogao biti sledeći (Slika 6): povećanje serotoninske i noradrenalinske transmisije dovodi do povećanja sekundarnih glasnik (kao što je npr. cAMP (eng. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP)) i aktiviranja nizvodnih kinaza (cAMP aktivira protein kinazu A (eng. *protein kinase A*, PKA)), što dalje može voditi aktiviranju različitih transkripcionih faktora (npr. PKA aktivira CREB) zaslužnih za regulaciju ekspresije različitih gena, uključujući i neurotrofičke faktore (npr. CREB stimuliše ekspresiju BDNF-a); s druge strane, povećana aktivnost PKA može povećati i aktivnost GR-a, a inhibirati citokinsku signalizaciju, što sve zajedno može doprineti obnavljanju moždanih funkcija narušenih depresijom (Maletic i sar., 2007; Duman i Voleti, 2012) (takođe videti i poglavlje 1.2.3.).



Slika 6. Šematski prikaz signalnih puteva regulisanih hroničnim tretmanom antidepresivnim lekovima. 5-HT - serotonin; SERT – serotoninški transporter. Slika adaptirana na osnovu Duman i Voleti (2012).

Pri odabiru antidepresiva treba imati u vidu neželjena dejstva ovih lekova i njihove interakcije sa drugim lekovima. Neželjena dejstva zavise od neurotransmiterskog sistema na koji deluju, a mogu uključivati: tahikardiju, opstipaciju, vrtoglavicu, kognitivne probleme, mučninu, povraćanje, nemir, nesanicu, smanjen seksualni nagon, povećanje apetita, rizik od samoubistva.

Psihoterapija kao metod lečenja se koristi kod blazih i srednje teških depresija, često u kombinaciji sa antidepresivima (Kupfer i sar., 2012).

EKT se primenjuje kod pacijenata sa psihotičnim tipom DP-a i kod onih koji ne odgovaraju povoljno na lečenje antidepresivnim lekovima (Fava i Kendler, 2000; Little, 2009). EKT je efikasna u akutnom lečenju, a dugotrajni efekti još uvek nisu potvrđeni (Little, 2009). Neželjene posledice ove vrste terapije su teškoće sa učenjem i memorijom (Little, 2009).

TMS se primenjuje kod srednje teških depresija i kod pacijenata koji ne odgovaraju povoljno na tretman antidepresivima (Kim i sar., 2009). Može se primenjivati samostalno ili kao adjuvantni metod sa farmakoterapijom (Klein i sar., 1999; O'Reardon i sar., 2007). U većini slučajeva pacijenti je dobro tolerišu i neželjeni efekti su vrlo retki. Najčešće se primenjuje na region DLPFC-a (Kim i sar., 2009).

Bolje razumevanje biološke osnove DP-a otvorilo je mogućnosti za razvoj novih tarapeutskih supstanci koje bi poboljšale uspešnost lečenja ovog oboljenja. Iako su prva istraživanja vezana za antidepresivan efekat antagonista receptora za CRH bila obećavajuća, kasnija ispitivanja nisu potvrdila njihov tarapeutski uspeh, a pokazana je i hepatotoksičnost ispitivanih supstanci (Bosker i sar., 2004; Li i sar., 2005). Takođe, kako antagonisti, tako i agonist GR-a pokazali su u različitim studijama antidepresivne efekte, pri čemu je mifepriston, antagonist GR-a, za sada dao najbolje rezultate (Berton i Nestler, 2006; Pariante, 2006; Watson i sar., 2012). Novija istraživanja usmerena su ka ispitivanju antidepresivnih efekata selektivnih modulatora GR-a koji istovremeno mogu delovati i kao agonisti i kao antagonisti u zavisnosti od tkiva i gena, pa se smatra da bi se na ovaj način mogli biti razdvojeni korisni od štetnih efekata glukokortikoida (Zalachoras i sar., 2013). Mete novih strategija u lečenju depresije takođe obuhvataju mogućnosti selektivnog uticaja na epigenetičke promene na genima, antagoniste NMDA (*N*-metil-D-aspartat, NMDA) receptora (kao što je ketamin), antagoniste receptora za supstanciju P, ispitivanja selektivnog uticaj na signalne proteine kao što su

učesnici u signalizaciji PKA, itd. (Berton i Nestler, 2006; Schroeder i sar., 2010; Duman i Voleti, 2012).

1.2. Glukokortikoidni receptor – važan igrač u patogenezi depresivnog poremećaja

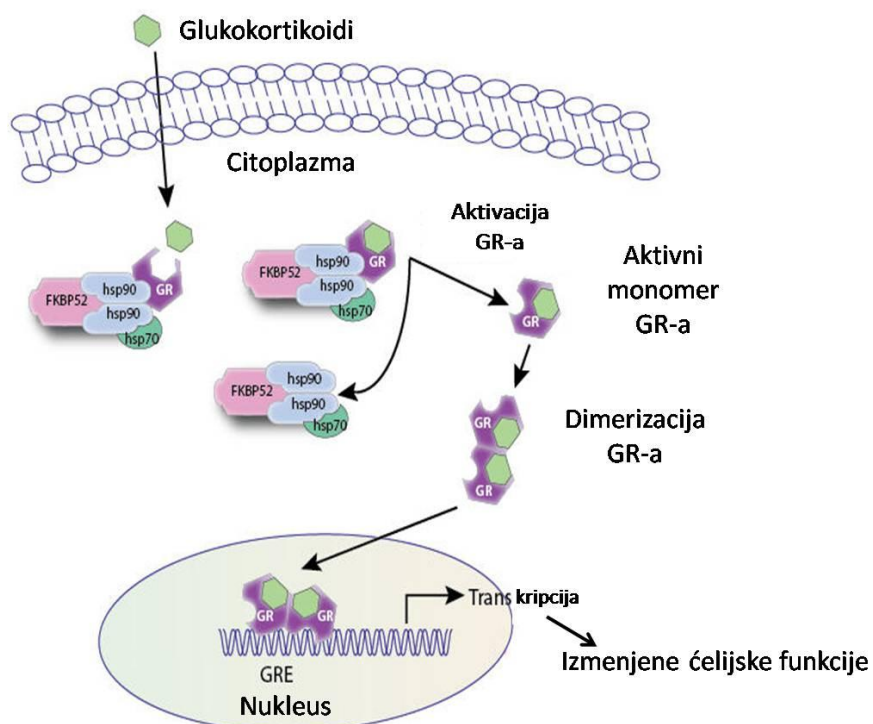
1.2.1. Molekularni mehanizmi signalizacije preko glukokortikoidnog receptora

GR pripada filogenetski konzerviranoj superfamiliji jedarnih receptora, u koje spadaju i receptori za mineralokortikoide, androgene, progestogene, estrogene, vitamin D, tireoidne hormone itd. (Robinson-Rechavi i sar., 2001). Kao i drugi članovi ove familije, GR ima modularnu strukturu i sastoji se iz tri domena: N-terminalnog domena (eng. *N-terminal domain*, NTD), domena zaduženog za vezivanje za DNK (eng. *DNA binding domain*, DBD) i domena zaduženog za vezivanje liganda (eng. *ligand-binding domain*, LBD). NTD sadrži snažan transaktivirajući domen AF-1 (eng. *activation function*, AF-1), u okviru koga se nalaze nekoliko mesta za fosforilaciju, što predstavlja mehanizam kojim drugi signalni putevi mogu uticati na aktivnost GR-a i na taj način, preko post-translacionih modifikacija GR-a, uticati na glukokortikoidnu signalizaciju (Hollenberg i Evans, 1988; Duma i sar., 2006) (videti poglavlje 1.2.1.1.). Centralni, visoko očuvan domen, DBD, sadrži dva motiva cinkanih prstiju, koji interaguju sa sekvencama u DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. *glucocorticoid responsive elements*, GRE) (Umesono i Evans, 1989). Takođe, DBD sadrži i domen za dimerizaciju GR-a i signal za lokalizaciju u jedro. U okviru LBD, osim mesta za vezivanje steroida, nalazi se i drugi slabiji transaktivirajući domen AF-2, drugi slabiji signal za lokalizaciju u jedro, kao i aminokiseline važne za dimerizaciju receptora (Picard i Yamamoto, 1987; Duma i sar., 2006).

U odsustvu liganda, GR je predominantno lociran u citoplazmi, u okviru multiproteinskog kompleksa (Slika 7). Sazrevanje ovog heterokompleksa je dinamičan proces koji zahteva energiju ATP-a, a uključuje višestruke korake vezivanja i disocijacije GR-a i molekularnih šaperona, tj. proteina toplotnog šoka (eng. *heat shock protein*, hsp) hsp40, hsp70 i hsp90, i košaperona, kao što su hip (eng. *hsp70-interacting*

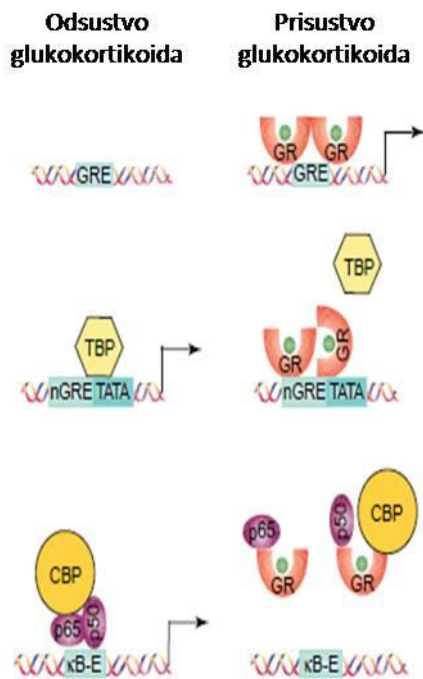
protein, hip) i hop (eng. *hsp70/hsp90-organising protein*, hop) (Pratt i Toft, 1997; Cheung i Smith, 2000). Zreli multiproteinski kompleks GR-a sastoji se iz dva molekula hsp90, proteina stabilizatora kompleksa p23 i bar jednog od imunofilina (FKBP5, FKBP4 ili ciklofilin 40) (Pratt i Toft, 1997; Cheung i Smith, 2000). Naročito je važna interakcija GR-a sa šaperonima hsp90, koji drže receptor u konformaciji visokog afiniteta za glukokortikoide. Odnos šaperona i košaperona tokom sazrevanju GR-a može uticati na krajnju sposobnost receptora da veže ligand, i stoga, na mogućnost ćelije da odgovori na glukokortikoide (Holsboer, 2000).

Nakon vezivanja liganda, dolazi do konformacione promene GR-a, disocijacije receptora od ostalih proteina multiproteinskog kompleksa i njegove translokacije u jedro (Slika 7). Ipak, ovaj proces je dinamičan, pa i sama translokacija receptora, kao i njegova funkcija u jedru, takođe zavise od šaperona i imunofilina (Grad i Picard, 2007; Heitzer i sar., 2007) (takođe videti poglavlje 1.5.). Takođe, treba napomenuti i to da aktivacija GR-a stimuliše njegovu degradaciju, kao mehanizam obuzdavanja odgovora na glukokortikoide (Wallace i Cidlowski, 2001; Avenant i sar, 2010).



Slika 7. Šematski prikaz aktivacije GR-a.

U jedru, aktivirani GR može ili pojačavati, ili suprimirati ekspresiju ciljnih gena (Slika 8). Regulacija genske ekspresije GR-om je vrlo kompleksna i pokazuje kako tkivnu, tako i gensku specifičnost. Pozitivnu regulaciju ekspresije gena, GR ostvaruje formiranjem dimera koji se potom vezuju za palindromske sekvence GRE u promotorskim regionima ciljnih gena (tzv. „transaktivacija“) i dovode do regrutovanja koaktivatora (npr. SRC-1 (eng. *steroid receptor coactivator 1*, SRC-1) i CBP (eng. *cyclo-AMP response element binding protein*, CBP)) koji zatim regrutuju osnovnu transkripcionu mašineriju i dolazi do sinteze iRNK (Glass i Rosenfeld, 2000; Lu i Cidlowski, 2006). Supresiju genske ekspresije, GR može da vrši na nekoliko načina: vezivanjem dimera za GRE i regrutovanjem korepresora (npr. NCOR1 (eng. *nuclear receptor co-repressor 1*, NCOR1)) (Stevens i sar., 2003), vezivanjem dimera za negativne GRE (eng. *negative glucocorticoid response element*, nGRE) i interakcijom monomera GR-a sa drugim transkripcionim faktorima sprečavajući tako njihovu stimulaciju genske ekspresije (tzv. „transrepresija“). Represija putem nGRE uočena je u nekoliko gena, uključujući i gen za proopiomelanokortin (prekursor ACTH) i CRH (Drouin i sar., 1993; Malkoski i Dorin, 1999), pa izgleda da je ovaj mehanizam važan za gašenje HHA ose. Ekspresija najvećeg broja pro-inflamatornih gena suprimirana je mehanizmom transrepresije, tj. međuproteinskim interakcijama GR-a sa AP-1 (eng. *activator protein-1*, AP-1) i/ili NFκB (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NFκB), transkripcionim faktorima aktiviranim u odgovoru na pro-inflamatorne signale (Jonat i sar., 1990; McKay i Cidlowski, 1998). Treba napomenuti i to da ovakvim protein-protein interakcijama nije smanjena samo transkripciona aktivnost transkripcionih faktora sa kojima GR interaguje, već i samog GR-a (McKay i Cidlowski, 1998; Duma i sar., 2006). Dakle, postoji veliki broj mogućnosti kojim GR može uticati na transkripciju gena, koja zavisi kako od sekvenci u DNK s kojima interaguje, tako i od dostupnih transkripcionih faktora, koaktivatora ili korepresora, koju treba imati u vidu kada se razmišlja o odgovoru ćelije na glukokortikoide.

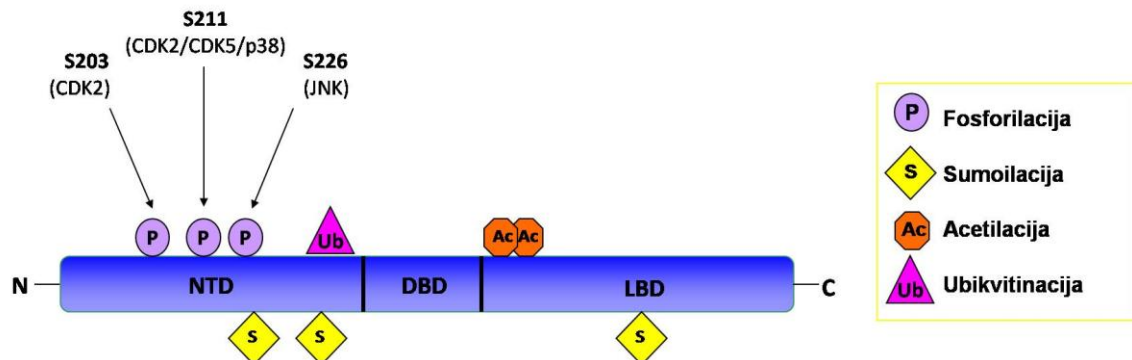


Slika 8. Mogući mehanizmi regulacije transkripcije putem GR-a. Objašnjenja videti u tekstu. TBP – eng. TATA box binding proteins; p65 i p60 – subjedinice NFκB. Slika adaptirana na osnovu Lu i Cidlowski (2006).

Postoji veći broj izoformi GR-a, koje pokazuju specifičnost kako za određene vrste, tako i za određena tkiva. Klasična izoforma GR-a koja je označena kao GR α , sastoji se od 777 amino kiselina, ima molekulska masu od 94 kDa i eksprimirana je u gotovo svim tkivima organizma. Alternativnom obradom primarnog transkripta GR-a kod ljudi mogu nastati izoforme označene kao: GR β , GR γ , GR-A i GR-P, koje su eksprimirane u manjoj meri od GR α , pokazuju tkivnu specifičnost i razlike u transkripcionoj aktivnosti (Krett i sar., 1995; Sousa i sar., 2000; Beger i sar., 2003). Pored izoformi GR-a koje nastaju alternativnom obradom primarnog transkripta, postoji još bar osam izoformi GR-a koje nastaju alternativnom inicijacijom translacije i koje se razlikuju po dužini svog N-terminalnog regiona, transkripcionoj aktivnosti i genskoj specifičnosti (Lu i Cidlowski, 2005). Imajući u vidu raznolikost izoformi GR-a, njihova različita zastupljenost u ćeliji takođe može doprinosti tkivno-specifičnoj osetljivosti na glukokortikoide.

Još jedan važan nivo regulacije glukokortikoidne signalizacije može se postići post-translacionim modifikacijama GR-a - fosforilacijom, sumoilacijom, ubikvitinacijom, metilacijom i acetilacijom (Slika 9). Post-translacione modifikacije GR-a utiču na njegovu stabilnost, unutar-ćelijsku distribuciju, interakcije sa drugim proteinima, transkripcionu aktivnost i stoga na krajnji odgovor ćelije na glukokortikoide

(Duma i sar., 2006). Najviše proučavana post-translaciona modifikacija GR-a je fosforilacija.



Slika 9. Šematski prikaz najvažnijih post-translacionih modifikacija GR-a.

1.2.1.1. Regulacija funkcije glukokortikoidnog receptora putem fosforilacije

Fosforilacija GR-a, kao i drugih proteina, je dinamičan proces i uključuje naizmenične cikluse fosforilacije (posredovane kinazama) i defosforilacije (posredovane fosfatazama) čime se omogućava brza regulacija proteinske funkcije u odgovoru na signale koji dolaze do ćelije. Na pojedinim epitopima, GR može biti fosforilisan i u odsutvu liganda, dok vezivanjem liganda njegova fosforilacija je naročito podstaknuta.

Humani GR može biti fosforilisan na nekoliko epitopa: serinima 45, 113, 141, 203, 211, 226 i 404, i svi su lokalizovani u NTD (Almlof i sar., 1995; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Ova mesta fosforilacije pokazuju visoki stepen očuvanosti tokom evolucije, što svedoči o njihovoj važnosti za funkciju GR-a, i ortologi epitopi mogu se naći u GR-u pacova i miša (Almlof i sar., 1995; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Fosforilacija jednog epitopa može uticati na fosforilaciju drugog, i u ćeliji istovremno mogu postojati molekuli GR-a sa različitim obrascima fosforilacije. Do sada najbolje proučene fosforilacije GR-a su na serinima 203 (S203), 211 (S211) i 226 (S226), lokalizovane u AF-1 regionu NTD-a (Slika 9).

Određeni bazalni nivo fosforilacije GR-a na S203 postoji i u odsustvu hormona, a nakon vezivanja liganda još više je podstaknuta (Wang i sar., 2002; Chen i sar., 2008). Kinaza koja posreduje u fosforilaciji GR-a na S203 je ciklin-zavisna kinaza 2 (eng. *cycclin dependent kinases 2*, CDK2) u kompleksu sa ciklinima A i E (Krstic i sar.,

1997). Izoforma GR-a fosforilisana na S203 isključivo je pronađena u citoplazmi i nema transkripcionu aktivnost (Wang i sar., 2002; Blind i Garabedian, 2008). Takođe, fosforilacija GR-a na S203, stimuliše fosforilaciju S211, ali smanjuje fosforilaciju S226, kao i suprotno – fosforilacija S226, sprečava fosforilaciju na S203 (Wang i sar., 2007). Moguće objašnjenje za ovakav uzajamni uticaj mesta fosforilacije mogao bi biti postojanje sternih smetnji i nemogućnost pristupa kinaze da fosforiliše drugi epitop i/ili stimulacija regrutovanja fosfataza nakon fosforilacije jednog od epitopa (Ismaili i Garabedian, 2004).

Fosforilacija GR-a na S211 posredovana je kompleksom ciklina A sa CDK2, kao i CDK5 (koja je eksprimirana u mozgu i nema ulogu u ćelijskom ciklusu) i kinazom p38 (Krstic i sar., 1997; Miller i sar., 2005; Kino i sar., 2007). Fosforilacija GR-a na S211 je zavisna od vezivanja liganda, stimuliše prelazak GR-a u jedro, kao i njegovu transkripcionu aktivnost (Wang i sar., 2002; Wang i sar., 2007). Tačnije, pokazano je da fosforilacija GR-a na S211 povećava efikasnost³ GR-a, mada ne utiče na njegovu potentnost⁴ (Avenant i sar., 2010). Takođe, transkripciona aktivnost GR-a je veća što je odnos GR-a fosforilisanog na S211 veći u odnosu na GR fosforilisan na S226 (Chen i sar., 2008). Fosforilacija na S211 dovodi do konformacione promene GR-a, što stimuliše njegovu interakciju sa koaktivatorom MED14 (eng. *mediator complex subunit 14*, MED14), a potom i regrutovanje osnovne transkripcione mašinerije (Chen i sar., 2008). Ipak, u neuronima je pokazano da fosforilacija S211 može smanjiti transkripcionu aktivnost GR-a na pojedinim genima, što ukazuje da je efekat fosforilacije ćelijski i genski specifičan (Kino i sar., 2007). Takođe, fosforilacija na S211 smanjuje efikasnost GR-a u transrepsiji AP-1 i NFκB proteina (Avenant i sar., 2010).

Iako određeni bazalni nivo fosforilacije na S226 može da postoji u pojedinim tipovima ćelija i u odsustvu hormona, fosforilacija GR-a na ovom epitopu stimulirana je vezivanjem liganda (Blind i Garabedian, 2008; Chen i sar., 2008). Fosforilacija GR-a na S226 posredovana je c-Jun N-terminalnim kinazama (eng. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK) i dovodi do smanjenja njegove transkripcione aktivnosti (Krstic i sar., 1997;

³ Efikasnost receptora podrazumeva maksimalan odgovor receptora.

⁴ Potentnost receptora označava koncentraciju liganda potrebnu za polovinu njegovog maksimalnog odgovora.

Rogatsky i sar., 1998; Chen i sar., 2008). Tačnije, fosforilacije na S226 smanjuje efikasnost GR-a, ali ne utiče na potentnost receptora (Avenant i sar., 2010). Takođe, nakon pada hormona, fosforilacija GR-a na S226 stimuliše eksport receptora iz jedra u citoplazmu (Itoh i sar., 2002). Iako većina literature ukazuje na to da fosforilacija S226 smanjuje transkripcionu aktivnost GR-a, postoje podaci koji pokazuju da se fosfo-GR-S226 ipak regrutuje na promotore nekih gena sa GRE, ali se njena tačna uloga na ovim promotorima za sada još uvek ne zna (Blind i Garabedian, 2008). Što se tiče uticaja fosforilacije S226 na efikasnost GR-a u transrepsiji, pokazano je da ima sličan efekat kao i fosforilacija na S211, tj. sprečava interakciju GR-a sa AP-1 i NFκB (Avenant i sar., 2010).

Uloga fosfataza u regulaciji fosforilacije GR-a manje je ispitivana u odnosu na ulogu kinaza. Na primer, pokazano je da je proteinska fosfataza 5 (eng. *protein phosphatase 5*, PP5) preko hsp90 vezana za C kraj GR-a i ima ulogu u održavanju bazalne fosforilacije (u odsustvu liganda) na niskom nivou (Wang i sar., 2007). Nakon vezivanja glukokortikoida, hsp90 i PP5 se oslobađaju, što dovodi do povećanja fosforilacije serina na N-kraju GR-a (Wang i sar., 2007). Takođe, pokazana je i uloga fosfataza (PP1 i PP2A) u prelasku receptora iz jedra u citoplazmu nakon stimulacije hormonom (DeFranco i sar., 1991).

Dakle, fosforilacija GR-a bitno utiče na njegovu funkciju i predstavlja način na koji glukokortikoidi, kao i drugi signali koji dolaze do ćelije, mogu zajednički delovati na transkripcionu aktivnost GR-a i, stoga, na krajnji odgovor ćelije na spoljašnje stimulse.

1.2.2. Izmenjena glukokortikoidna signalizacija kod pacijenata sa depresivnim poremećajem

S obzirom na gore opisanu kompleksnost signalizacije preko GR-a, vidimo da postoje mnogi koraci koji bi mogli biti narušeni, što konačno može rezultirati izmenjenom funkcijom GR-a i regulacijom HHA ose glukokortikoidima, koje zapažamo kod pacijenata sa depresijom.

Proučavanja narušene aktivnosti GR-a kod pacijenata sa depresijom počela su još pre više od 25 godina, sprovedena su kako u *in vivo* tako i u *in vitro* uslovima, a bila su

usmerena ka analizi broja receptora sposobnih da vežu hormon, promenama u ekspresiji gena za GR, u šaperonima važnim za funkciju GR-a (videti i poglavlje 1.5.), u ćelijskim funkcijama za koje je poznato da su regulisane glukokortikoidima, dok su predmet novijih istraživanja i promene u ekspresiji gena regulisanih GR-om. U najvećem broju istraživanja, funkcija GR-a je proučavana u perifernim ćelijama (limfocitima, ukupnim ćelijama krvi, fibroblastima), zbog njihove lake dostupnosti.

Ispitivanja broja molekula GR-a u lizatima celih ćelija limfocita, koristeći eseje vezivanja liganda za receptor, pokazala su da ili nema razlika, ili je smanjen broj GR-a sposobnih da vežu ligand kod pacijenata sa DP-om u odnosu na kontrole (Pariante i Miller, 2001; Calfa i sar., 2003). Slični rezultati su dobijeni i analiziranjem broja molekula GR-a iz citosola limfocita (Pariante i Miller, 2001). Ipak, studije koje određuju broj molekula GR-a esejima vezivanja liganda za receptor ne mogu reći da li je do smanjenja broja GR-a došlo usled smanjene ekspresije GR-a, ili zbog neadekvatne interakcije GR-a sa njegovim šaperonima. Takođe, u studijama koje su analizirale citosolne frakcije, do smanjenja broja GR-a moglo je doći i usled povećane translokacije GR-a u jedro.

Najveći broj studija, koje su ispitivale ćelijske funkcije regulisane glukokortikoidima, bile su fokusirane na dobro poznate sposobnosti ovih hormona da inhibiraju proliferaciju limfocita nakon stimulacije mitogenima. Ova istraživanja su uglavnom bila ujednačena po svojim rezultatima pokazujući smanjen odgovor limfocita depresivnih pacijenata nakon stimulacije mitogenima (Pariante i Miller, 2001).

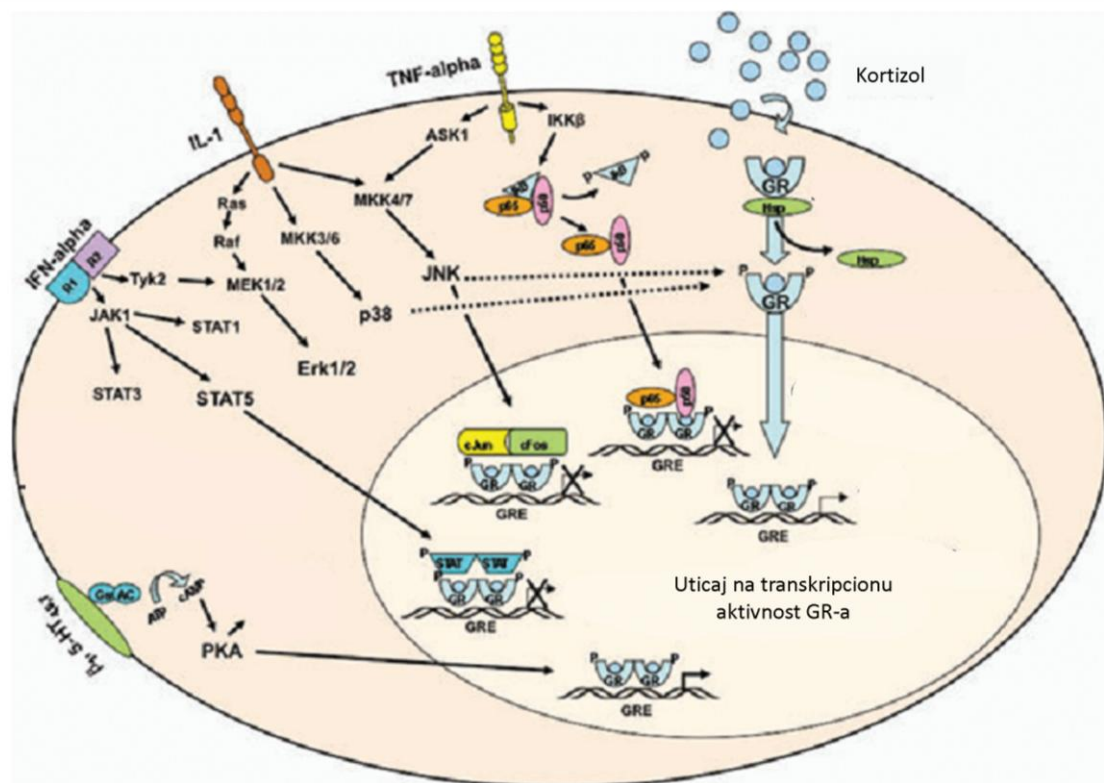
Što se tiče ekspresije gena za GR, studije na ćelijama pune krvi pokazale su ili da nema promene (Frodl i sar., 2012) ili je smanjenu količinu iRNK za ovaj receptor kod pacijenata sa depresijom (Cattaneo i sar., 2013; Matsubara i sar., 2006). Tačnije, jedna studija je pokazala smanjenu ukupnu količinu iRNK za GR (Cattaneo i sar., 2013), a druga, smanjenje iRNK za GR α , ali ne i za GR β izoformu, čime je pokazano i to da izmenjen odnos ovih izoformi GR-a takođe može doprineti narušenom odgovoru na glukokortikoide kod depresivnih pacijenata (Matsubara i sar., 2006). Slični rezultati su pronađeni i na *postmortem* uzorcima tkiva hipokampusa i prefrontalnog korteksa, pri čemu je smanjena ekspresija GR-a uočena ne samo kod pacijenata sa depresijom, već i kod pacijenata sa drugim psihijatrijskim poremećajima, tj. bipolarnim poremećajem i šizofrenijom (Webster i sar., 2002).

Takođe je ispitivana i razlika u funkciji GR-a između pacijenata koji imaju izmenjen odgovor u neuroendokrinim testovima (DST-u i DEX/CRH testu) od onih koji nemaju. Na primer, jedna studija je pokazala da kod depresivnih pacijenta kod kojih nije došlo do supresije kortizola nakon DST-a, broj GR-a sposobnih da vežu ligand u limfocitima nakon davanja DEX-a je bio nepromenjen, ali kod onih koji su suprimirali lučenje kortizola nakon DST-a, broj GR-a je bio smanjen (Gormley i sar., 1985). U drugoj studiji nađeno je da kod pacijenata sa depresijom, bez obzira na njihove razlike u odgovoru na DST, nije bilo promene u broju GR-a sposobnih da odgovore na ligand nakon DST-a (Wassef i sar., 1990). Ove, kao i druge studije, pokazale su da narušena funkcija GR-a ne mora uvek biti udružena sa narušenom aktivnošću HHA ose, što možda ukazuje na različita stanja narušenosti funkcije GR-a i HHA ose ili različite tačke razvoja glukokortikoidne rezistencije tokom patogeneze depresije (Juruena i sar., 2004).

Novija istraživanja pokazuju da promene u ekspresiji gena regulisanim GR-om u ćelijama periferne krvi nakon stimulacije DEX-om može biti obećavajući biomarker za klasifikaciju pacijenta kao depresivnih ili ne, koji je osetljiviji od samog DST-a (Menke i sar., 2012).

1.2.2.1. Uticaj citokina i drugih signala na funkciju glukokortikoidnog receptora u depresiji

Iako prethodno razmatrana literatura ukazuje da bi jedan od mehanizama glukokortikoidne rezistencije mogao biti smanjena ekspresija gena za GR, kao posledica povećanja glukokortikoida (Webster i sar., 2002; Matsubara i sar., 2006; Cattaneo i sar., 2013), to ne objašnjava sve nalaze vezane za narušenu funkciju GR-a u depresiji. Prethodno opisana kompleksnost signalizacije preko GR-a ukazuje da postoje i drugi mehanizmi, nezavisno od glukokortikoida, koji mogu uticati na funkciju GR-a i doprineti njegovoj narušenoj aktivnosti u depresiji. Zaista, mnoštvo literature pokazuje da citokini, čiji je nivo povećan u depresiji (videti poglavlje 1.1.4.6.), kao i drugi signali, preko aktiviranja svojih signalnih puteva u ćeliji, utiču na funkciju GR-a (Pace i sar., 2007) (Slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz interakcija citokina i drugih signalnih puteva sa GR-om. Objašnjenja videti u tekstu. *c Jun* i *c Fos* – subjedinice AP-1; *p65* i *p60* – subjedinice NF κ B. Slika adaptirana na osnovu Pace i sar. (2007).

U modelu hroničnog socijalnog stresa kod miševa, pokazana je rezistencija na glukokortikoide u limfocitima slezine, koja je podrazumevala smanjenu translokaciju GR-a iz citoplazme u jedro, a ovi efekti su bili eliminisani kod miševa nokauta za gen receptora IL-1 (Quan i sar., 2003; Engler i sar., 2008). Druge studije u kulturi ćelija pokazale su da su inhibitorni efekti IL-1 α na funkciju GR-a bar delimično posredovani aktivacijom p38 kinaze (Pariante i sar., 1999; Wang i sar., 2004). Inhibitorni efekti TNF- α na transkripcionu aktivnost GR-a takođe su posredovani aktivacijom p38 kinaze (indirektnim dejstvom na GR), kao i JNK-a (verovatno preko fosforilacije GR-a na S226) (Szatmary i sar., 2004). Citokini mogu uticati na funkciju GR-a i preko aktivacije transkripcionih faktora NF κ B, AP-1 ili STAT (eng. *signal transducer and activator of transcription*, STAT), koji zatim preko protein-protein interakcija mogu smanjiti transkripcionu aktivnost GR-a (Biola i sar., 2001; Raddatz i sar., 2001). Ovi radovi nam pružaju uvid u mehanizam preko koga stresom-indukovna citokinska signalizacija može uticati na funkciju GR-a.

Pokazan je uticaj i PKA na funkciju GR-a (Miller i sar., 2002; Pace i sar., 2007). Na primer, agonisti β -adrenergičkih receptora podstiču translokaciju GR-a iz citoplazme u jedro i povećavaju njegovu transkripcionu aktivnost, a ovi efekti su bar delimično posredovani aktivacijom PKA (Eickelberg i sar., 1999). Da narušenost ovog signalnog puta može doprinositi rezistenciji na glukokortikoide u depresiji, potkrepljeno je nalazima o smanjenoj kako bazalnoj tako i cAMP-om stimulisanjoj aktivnosti PKA iz fibroblasta kože pacijenata sa DP-om u odnosu na kontrole (Shelton i sar., 1996). Takođe je pokazano da PKA može povećati vezivanje GR-a za DNK u odgovoru na glukokortikoide, delujući na njegov DBD (Rangarajan i sar., 1992).

Od značaja su i rezultati dobijeni u našoj laboratoriji koji su pokazali da je depresivno ponašanje kod mužjaka pacova izloženih stresu socijalne izolacije udruženo sa promenama u fosforilaciji GR-a na S232 (ortolog humanog S211) i S246 (ortolog humanom S226), kao i aktivnosti uzvodnih kinaza (CDK5 i JNK), u hipokampusu i prefrontalnom korteksu ovih životinja (Adzic i sar., 2009; Djordjevic i sar., 2012). Ovi nalazi takođe potvrđuju važnost i drugih signala (koji aktiviraju kinaze CDK5 i JNK) u regulaciji funkcije GR-a, a koji su relevantni za razumevanje patogeneze depresije (Adzic i sar., 2009).

1.2.3. Uticaj antidepresiva na funkciju glukokortikoidnog receptora

Još jedna potvrda hipoteze da narušena funkcija GR-a igra važnu ulogu u patogenezi depresije jesu rezultati istraživanja koja ukazuju da antidepresivi utiču na funkciju GR-a i aktivnost HHA ose. Međutim, još uvek nije potpuno jasno na koji način oni ostvaruju ove efekte.

Studije na životinjskim modelima pokazale su da kako kratkotrajna tako i dugotrajna terapija antidepresivima može dovesti do promene u broju GR-a sposobnih da vežu ligand, kao i količine njegove iRNK, u strukturama mozga važnim za funkciju HHA ose (hipotalamusu i hipokampusu). U najvećem broju studija, dejstvo TCA dovelo je do povećanja iRNK za GR kao i broja molekula GR-a sposobnih da vežu ligand, u mozgu eksperimentalnih životinja, što je bilo praćeno i oporavkom regulacije HHA ose (Peiffer i sar., 1991; Pepin i sar., 1992; Rossby i sar., 1995; Lopez i sar., 1998). S druge strane, u najvećem broju studija u kojima je korišćen neki od SSRI-a, nije pokazan

uticaj na ekspresiju GR-a (Brady i sar., 1992; Rossby i sar., 1995; Lopez i sar., 1998; Mitic i sar., 2013). Ipak, jedna studija je pokazala da ova klasa antidepresiva može dovesti do smanjenja lučenja glukokortikoida (Brady i sar., 1992), što ukazuje da neki drugi mehanizmi, izuzimajući regulaciju ekspresije gena za GR, mogu posredovati u oporavku aktivnosti HHA ose nakon dejstva SSRI.

Mnogobrojne studije rađene na kulturama ćelija, u kojima su ispitivani mehanizmi delovanja antidepresiva na GR, dale su takođe raznolike rezultate, u zavisnosti od primenejnih eksperimentalnih uslova. Naime, pokazano je da antidepresivi mogu povećati, nemati efekat ili čak smanjiti ekspresiju i/ili funkciju GR-a, sve u zavisnosti od primenjenog antidepresiva, od dužine tretmana, od prisustva ili odsustva glukokortikoida, kao i od tipa proučavanih ćelija (Pepin i sar., 1992; Vedder i sar., 1999; Budziszewska i sar., 2000; Pariante i sar., 2001; Pariante i sar., 2003; Pariante i sar., 2003). Dakle, antidepresivi mogu povećati funkciju GR-a, ali taj efekat zavisi od načina tretmana antidepresivima i ispitivanih ćelijskih tipova, što sugerise na važnost drugih mehanizama u ćeliji, modulisanih antidepresivima, u njihovom efektu na funkciju GR-a.

Pretpostavlja se da efekti antidepresiva na funkciju GR-a i posledično HHA osu predstavljaju mesto sučeljavanja različitih molekularnih mehanizama pokrenutih različitim klasama antidepresiva, dok direktan efekat antidepresiva na GR dosada nije pokazan i veruje se da ne postoji (Anacker i sar., 2011). Pokazano je nekoliko mehanizama putem kojih antidepresivi mogu da ostavare svoj efekat na GR, i oni uključuju aktivaciju različitih kinaznih puteva, kao i regulaciju funkcije membranskog steroidnog transportera (eng. *multiple drug resistance p-glycoprotein*, MDR PGP).

Kao što je prethodno navedeno, literatura pokazuje značajnu ulogu PKA u aktivnosti GR-a. Takođe, i stimulatorni efekti antidepresiva na funkciju GR-a mogu biti posredovani aktivacijom PKA signalizacije (Miller i sar., 2002; Pace i sar., 2007). Na primer, pokazano je da je pozitivan efekat sertralina na neurogenezu ćelija hipokampusu u kulturi posredovan mehanizmima zavisnim od GR-a, a koji uključuju aktivnost PKA i fosforilaciju GR-a (Anacker i sar., 2011). S druge strane, studije u našoj laboratoriji pokazale su da hroničan tretman fluoksetinom dovodi do normalizacije ponašanja pacova izloženih stresu hronične izolacije, a za ove efekte je bar delom zaslužan uticaj fluoksetina na signalizaciju posredovanu JNK-om i CDK5 što je uticalo i na

fosforilaciju GR-a u hipokampusu, pri čemu su neki od ovih efekta bili polno-specifični (Mitic i sar., 2013).

Istraživanja Parientea i saradnika pokazala su da antidepresivi svoj efekat na funkciju GR-a mogu ostvariti i preko dejstva na MDR PGP, nezavisno od svog efekta na monoaminske sisteme. MDR PGP aktivno izbacuje iz ćelije kortizol i DEX, ali ne i kortikosteron, i tako učestvuje u regulaciji koncentracije steroida u ćeliji (Ueda i sar., 1992). Ovaj protein je pronađen u mnogim ćelijama organizma, uključujući i endotelne ćelije krvno-moždane barijere, neurone, kao i limfocite (Cordon-Cardo i sar., 1989; Gupta i Gollapudi, 1993; Pariente i sar., 2003). Pomenuta grupa naučnika prvo je pokazala da različite klase antidepresiva blokiraju funkciju MDR PGP-a u kulturama ćelija, što je dovelo do povećanja količine glukokortikoida u ćeliji i doprinelo poboljšanju funkcije GR-a (Pariente i sar., 2001; Pariente i sar., 2003; Pariente i sar., 2003), a zatim su i u *in vivo* modelu potvrdili važnost MDR PGP-a za ostvarivanje efekata antidepresiva na funkciju GR-a (Yau i sar., 2007).

Mali broj studija je pratio promenu funkcije GR-a kod pacijenata sa depresijom tokom terapije antidepresivima. Naime, pokazano je da dugotrajan tretman različitim klasama antidepresiva dovodi do povećanog broja GR-a sposobnih da vežu ligand u limfocitima periferne krvi (Calfa i sar., 2003), kao i povećane količine iRNK za GR u ukupnim ćelijama krvi, pri čemu je ovo povećanje bilo nezavisno od oporavka pacijenata od depresije (Cattaneo i sar., 2013).

Skupa gledano, prethodno izneseni rezultati govore u prilog važnosti uloge GR-a kako u patogenezi depresije, tako i za ostvarivanje tarapeutskih efekata antidepresiva, ali, s obzirom na kompleksnost signalizacije ovog receptora, dalja istraživanja su potrebna radi dobijanja potpunije slike o mogućim uticajima različitih faktora na njegovu funkciju u depresiji i tokom lečenja.

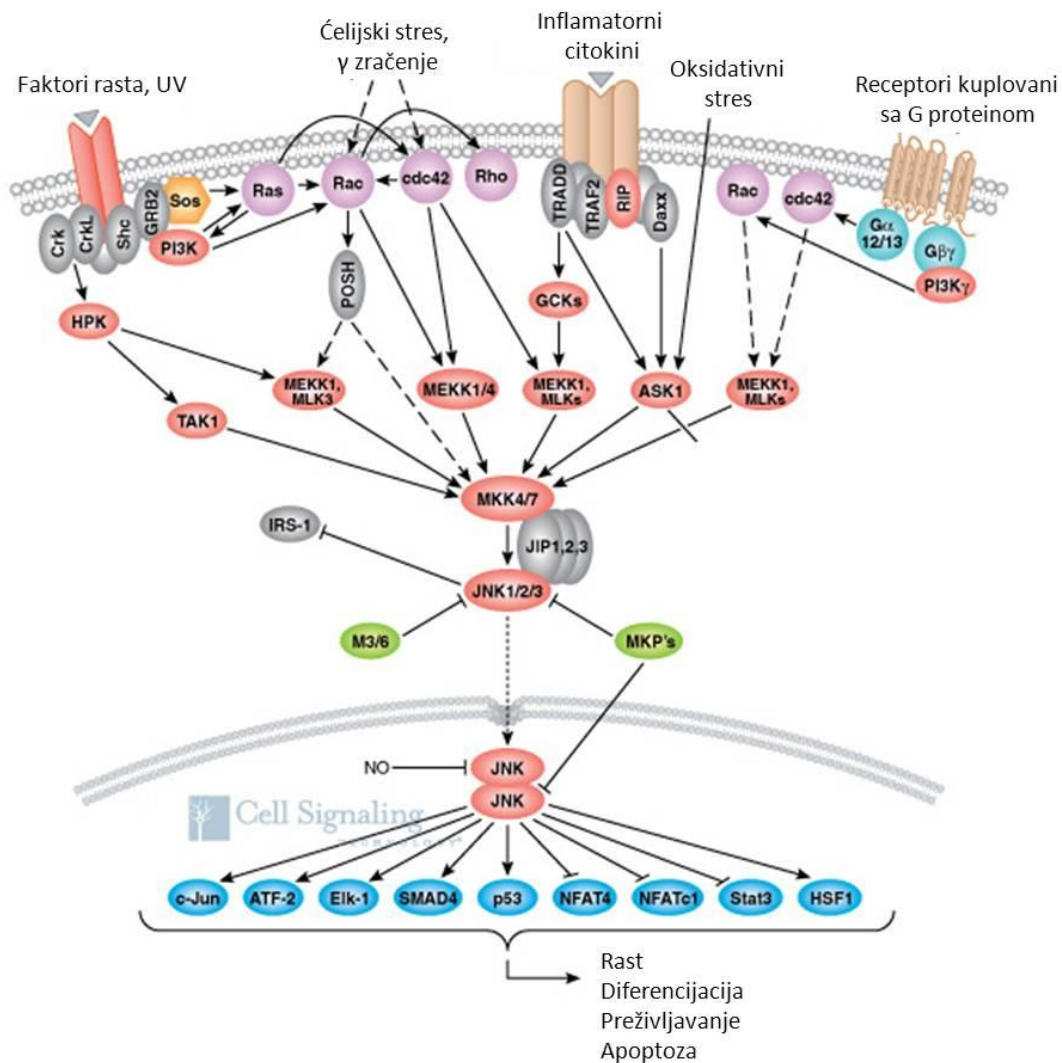
1.3. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK) – podfamilija c-Jun N-terminalnih kinaza (JNK), učesnica u fosforilaciji glukokortikoidnog receptora

MAPK su familija proteinskih kinaza koje učestvuju u prenosu vanćelijskih signala i regulišu mnoštvo ćelijskih procesa u rasponu od ćelijske diferencijacije, deobe, metabolizma, apoptoze i ćelijskog kretanja (Chen i sar., 2001; Johnson i Lapadat, 2002). One fosforilišu specifične serine ili treonine u ciljnim proteinima čime aktiviraju ili inaktiviraju njihovu funkciju. MAPK su deo kaskadnog sistema od tri grupe kinaza: kinaza kinaze MAPK-a (eng. *MAPK kinase kinase*, MAPKKK), kinaza MAPK-a (eng. *MAPK kinase*, MAPKK) i MAPK, od kojih svaka grupa aktivira sekvencijalno sledeću kinazu u nizu, pri čemu su MAPK poslednje u nizu (Johnson i Lapadat, 2002).

Kod višćelijskih organizama postoje tri dobro okarakterisane podfamilije MAPK-a: kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK), p38 kinaze i JNK. ERK se aktiviraju u odgovoru na različite stimulse uključujući faktore rasta, citokine, virusne infekcije, ligande koji se vezuju za receptore kuplovane sa G proteinom, a uključene su u regulaciju procesa mitoze, mejoze i ćelijske diferencijacije (Chen i sar., 2001). Podfamilija kinaza p38 je važna za regulaciju imunog odgovora i aktivira se na mnoge pro-inflamatorne citokine, ali i druge ćelijske stimulse, kao na primer osmotski ili toplotni šok (Chen i sar., 2001).

JNK se nazivaju još i stresom aktivirane proteinske kinaze (eng. *stress-activated protein kinases*, SAPK), s obzirom da igraju važnu ulogu u odgovoru ćelije na različite stresore (Kyriakis i sar., 1994). Svoje ime c-Jun-N terminalne kinaze duguju tome što su prepoznate kao kinaze koje se vezuju i fosforilišu N-kraj c-Jun proteina čime povećavaju njegovu transkripcionu aktivnost (c-Jun je komponenta AP-1 transkripcionog kompleksa) (Johnson i Lapadat, 2002). JNK se aktiviraju u odgovoru na različite stresore: UV radijaciju, supstance koje interferiraju sa sintezom DNK i proteina, oksidativni stres, ali i citokine (npr., TNF i IL-1), faktore rasta, ligande koji se vezuju za receptore kuplovane sa G proteinom (Davis, 2000; Chen i sar., 2001) (Slika 11). Uključene su u regulaciju inflamacije, i uopšte, funkciju imunog sistema, zatim, u

regulaciju apoptoze, a važne su i u procesima diferencijacije neurona (Chen i sar., 2001; Qi i Elion, 2005).



Slika 11. Šematski prikaz signalnog puta JNK-a.

Regulacija signalnog puta JNK-a je vrlo kompleksna i pod kontrolom velikog broja uzvodnih MKKK-a koje se aktiviraju u odgovoru na različite stimulse, kao što je prethodno nabrojano. Aktivaciju JNK-a vrše MKK4 i MKK7 i to dvojnomo fosforilacijom treonina (Thr183) i tirozina (Tyr185) u okviru tripeptidnog motiva Thr-Pro-Tyr (Chen i sar., 2001). JNK su kodirane sa tri gena: *jnk1*, *jnk2* i *jnk3*, pri čemu se *jnk1* i *jnk2* eksprimiraju u većini tkiva, a *jnk3* u mozgu, srcu i testisima (Davis, 2000). Alternativnom obradom primarnih transkripata sa ova tri gena nastaje bar 10 izoformi JNK-a: svaki od gena daje izoforme od 46 kDa i 54 kDa, dok *jnk1* i *jnk2* daju još po dve

izoforme (Gupta i sar., 1996; Davis, 2000). Uočena je tkivna specifičnost u ekspresiji različitih izoformi, kao i specifičnost za supstrate (Gupta i sar., 1996). U ćeliji, JNK se nalaze kako u citoplazmi tako i u jedru, a nakon aktivacije, stimulisan je njihov prelazak u jedro (Chen i sar., 2001). Supstrati JNK-a su brojni, i uključuju citoplazmatične, citoskeletne, membranske i jedarne proteine. U jedru, JNK fosforilišu mnoštvo transkripcionih faktora uključujući c-Jun, ATF2 (eng. *activating transcription factor 2*, ATF2), HSF-1 (eng. *heat shock factor protein 1*, HSF-1), STAT3, kao i GR, kako je prethodno već napomenuto (Pulverer i sar., 1991; Ip i Davis, 1998; Rogatsky i sar., 1998; Dai i sar., 2000). Takođe, osim što JNK utiče na funkciju GR-a, pokazano je da interakcija JNK-a i GR-a može inhibirati aktivnost JNK-a, sprečavajući interakciju JNK-a sa MKK7 (Bruna i sar., 2003).

Podaci o ulozi JNK-a u odgovoru organizma na psihološke stresore, kao i o njihovoj ulozi u patogenezi depresije nisu veliki. Pokazano je, na primer, da akutni stres forsiranog plivanja dodovodi do povećane fosforilacije JNK-a u različitim regionima mozga eksperimentalnih životinja (Shen i sar., 2004). S druge strane, hronični nepredvidivi stres doveo je do smanjene fosforilacije JNK-a u hipokampusu životinja (Li i sar., 2009). Takođe, rezultati iz naše laboratorije pokazuju da hronični stres izolacijom dovodi do smanjenja fosforilacije JNK-a u hipokampusu i prefrontalnom korteksu mužjaka pacova, što je bilo praćeno i smanjenjem fosforilacije GR-a na S246 (Adzic i sar., 2009). Što se tiče istraživanja na ljudima, nađena je smanjena ukupna količina JNK-a u limfocitima pacijenata sa bipolarnim poremećajem u akutnoj depresivnoj epizodi (Spiliotaki i sar., 2006). Dalja ispitivanja vezana za promene u signalizaciji JNK-a verovatno mogu pomoći u boljem razumevanju narušenih ćelijskih procesa u stresu i depresiji, kao i same glukokortikoidne signalizacije.

1.4. Glukokortikoidima indukovani leucinski rajsferšlus (GILZ) – posrednik anti-inflamatornih efekata glukokortikoida

Glukokortikoidima indukovani leucinski rajsferšlus (eng. *glucocorticoid-induced leucine zipper*, GILZ) je prvi put indentifikovan 1997. godine tokom sistematske pretrage gena stimulisanih glukokortikoidima u mišjim timocitama (D'Adamio i sar., 1997). GILZ je član familije TSC-22 (eng. *TGF- β -stimulated clone*

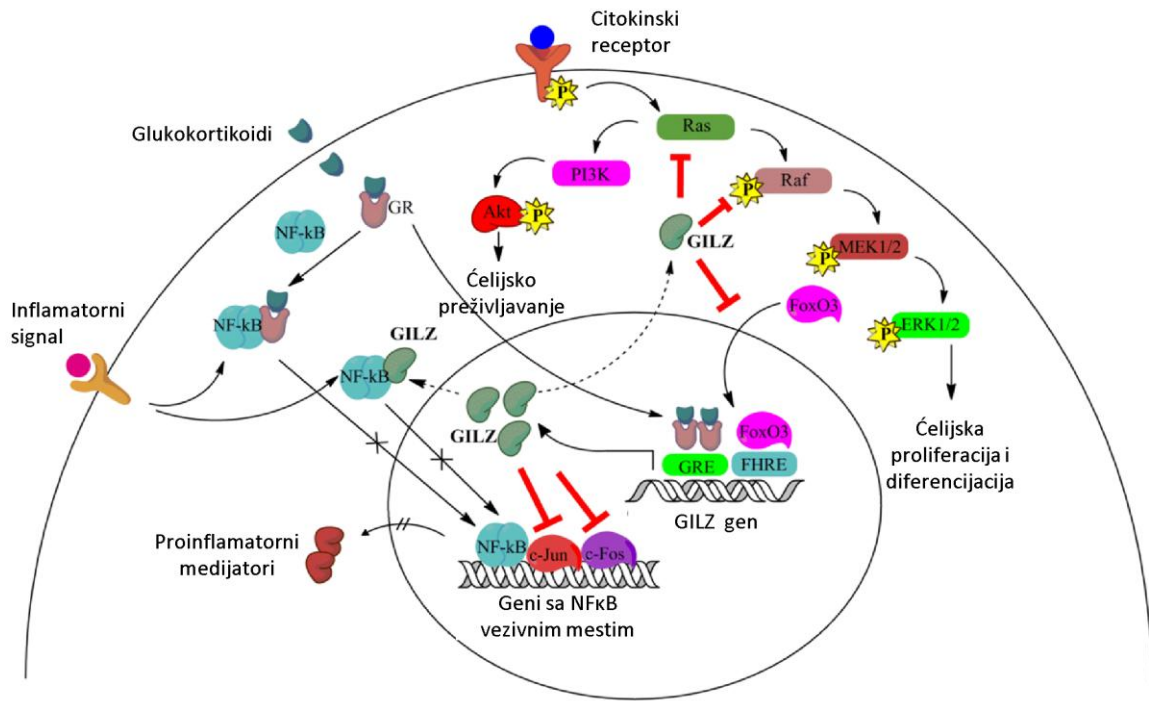
22, TSC-22) proteina sa leucinskim rajsferšlusom i po ovoj terminologiji naziva se TCS22D3 (Fiol i sar., 2007). Do danas je identifikovano četiri izoforme GILZ-a koje nastaju alternativnom obradom primarnog transkripta sa *tsc22d* gena i označene su sa GILZ1-4, po redosledu otkrivanja (Soundararajan i sar., 2007). Stimulacija ekspresije GILZ-a glukokortikoidima posredovana je vezivanjem GR-a za bar tri GRE sekvenci u okviru promotorskog regiona ovog gena, a maksimalna ekspresija postiže se vezivanjem i transkripcionog faktora FoxO3 (eng. *forkhead box O3*, FoxO3) za svoje konsenzusne sekvence (Wang i sar., 2004; Asselin-Labat i sar., 2005). Osim glukokortikoida, ulogu u modulaciji ekspresije GILZ-a imaju i drugi faktori kao što su hipoksija i razni citokini (npr. IL-10 i TGF- β stimulišu ekspresiju GILZ-a, dok je IL-2 suprimira) (Wang i sar. 2012; Berrebi i sar., 2003; Ayroldi i Riccardi, 2009).

GILZ se eksprimira u velikom broju tkiva: u imunim ćelijama, ćelijama mozga, epitelnim ćelijama bubrega, ćelijama kostiju, mišića itd. (Soundararajan i sar., 2007; Ayroldi i Riccardi, 2009).

Prvo otkrivena i najviše proučavana uloga GILZ-a je u posredovanju imunosupresivnih i anti-inflamatornih efekata glukokortikoida (Ayroldi i sar., 2001; Delfino i sar., 2004; Ayroldi i Riccardi, 2009). Ipak, dalja istraživanja su dala uvid i u druge važne fiziološke uloge ovog proteina. Na primer, GILZ stimuliše ekspresiju epitelijalnog Na⁺ kanala u bubrezima i na taj način povećava transport Na⁺, zatim GILZ utiče na diferencijaciju progenitorskih ćelija koštane srži, kao i eritroidnih progenitorskih ćelija (Kolbus i sar., 2003; Muller i sar., 2003; Soundararajan i sar., 2005; Shi i sar., 2007). Ove raznovrsne funkcije GILZ ostvaruje posredstvom mnoštva međuproteinskih interakcija u različitim tipovima ćelija.

Anti-inflamatorne efekte GILZ ostvaruje na nekoliko načina (Slika 12). GILZ se vezuje za p65 subjedinicu NF κ B-a, sprečava njen prelazak u jedro, i na taj način suprimira ekspresiju pro-inflamatornih gena regulisanih ovim transkripcionim faktorom (Ayroldi i sar., 2001). Takođe, GILZ sprečava aktivnost drugog važnog transkripcionog faktora posrednika inflamatornog i imunog odgovora, AP-1, interagujući sa njegovim subjedinicama c-Jun i c-Fos (Mittelstadt i Ashwell, 2001). GILZ interaguje sa Ras i Raf-1 proteinima utičući tako na nizvodnu ERK signalizaciju, pa i na taj način može da učestvuje u regulaciji imunog odgovora (Ayroldi i sar., 2002; Ayroldi i sar., 2007). Interakcija GILZ-a sa proteinima Ras i Raf, takođe inhibira i Akt signalni put, čime

može da utiče na preživljavanje i proliferaciju imunih ćelija (Ayroldi i sar., 2007). Dakle, indukcija GILZ-a glukokortikoidima je još jedan važan način na koji ovi hormoni ostvaruju svoje imunosupresivne i anti-inflamatorne efekte.



Slika 12. Šematski prikaz uloge GILZ-a kao posrednika anti-inflamatornih efekata glukokortikoida.

S obzirom na pomenutu vezu između patogeneze depresije i povećanja pro-inflamatornih medijatora, mali broj radova je istraživao ulogu GILZ-a u ovoj bolesti. Ipak, jedna skorašnja studija je pokazala da kod miševa izloženih hroničnom socijalnom stresu dolazi do povećane inflamacije u mozgu koje je praćeno i smanjenjem ekspresije GILZ-a (Wohleb i sar., 2011). U drugoj studiji, kod pacijenata sa depresijom pokazano je da postoji povezanost između smanjenja hipokampusa i smanjene ekspresije GILZ-a u ćelijama periferne krvi (Frodl i sar., 2012). S obzirom na pomenute rezultate, vidimo da ispitivanja vezana za GILZ mogu pomoći u boljem razumevanju uloge imunog sistema u patogenezi depresije.

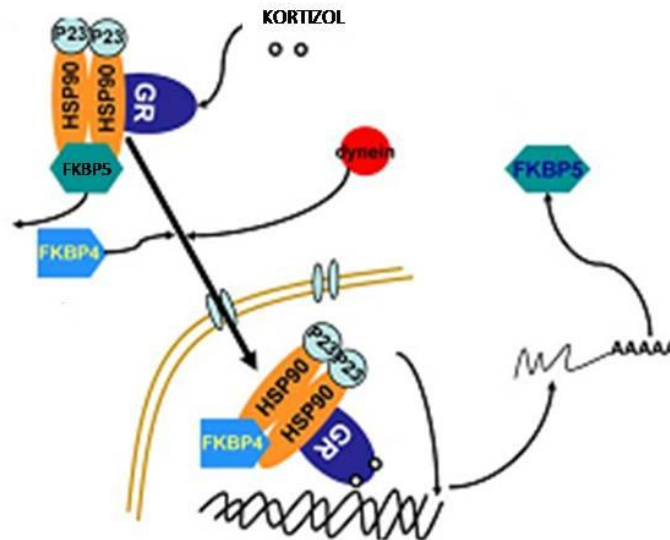
1.5. FK506-vezujući protein 5 (FKBP5) – košaperon glukokortikoidnog receptora

FK506⁵-vezujući protein 5 (eng. *FK506 binding protein 5*, FKBP5 ili eng. *FK506 binding protein 51*, FKBP51) je otkriven pre oko 20-ak godina kao deo kompleksa receptora za steroidne hormone (Smith i sar., 1990). Ovaj protein pripada superfamiliji peptidil prolil izomeraza i imunofilina koji sadrže tetratrikopeptidni ponovak (eng. *tetratricopeptide repeat*, TPR), a ima košaperonsku ulogu hsp-a 90 u kompleksu sa steroidnim receptormi (Schiene-Fischer i Yu, 2001). Tokom sazrevanja multiproteinskog kompleksa GR-a, FKBP5 se vezuje za hsp90 preko svog domena TPR, i ovakav receptorski kompleks ima mali afinitet za kortizol (Storer i sar., 2011). U prisustvu hormona, FKBP5 disosuje od kompleksa, a vezuje se drugi imunofilin koji sadrži TPR domen, FK506-vezujući protein 4 (eng. *FK506 binding protein 4*, FKBP4 ili eng. *FK506 binding protein 52*, FKBP52) i takav kompleks ima visok afinitet za steroid (Davies i sar., 2002; Storer i sar., 2011) (Slika 13). Takođe, FKBP4 interaguje sa dineinom čime omogućava kompleksu GR-a da se transportuje kroz citoplazmu do jedarne pore, a olakšava i sam transport GR-a u jedro, interakcijom sa proteinima kompleksa jedarne pore (Davies i sar., 2002; Schaaf i Cidlowski, 2003; Wochnik i sar., 2005). S druge strane, prekomerna ekspresija FKBP5 smanjuje afinitet GR-a za kortizol, kao i njegovu translokaciju u jedro (Wochnik i sar., 2005). Važnost uloge FKBP5 za signalizaciju GR-a *in vivo* prvo je uočena kod majmuna Novog sveta koji imaju povišen nivo kortizola u krvi, viši od svih drugih primata uključujući i čoveka, a ne pokazuju štene efekte hiperkortizolemije, što je bar delimično ostvareno povećanom ekspresijom FKBP5 (Denny i sar., 2000; Scammell i sar., 2001; Westberry i sar., 2006).

Ekspresija FKBP5 je stimulisana steroidima, uključujući i glukokortikoide, kao deo kratke negativne povratne sprege aktivnosti GR-a (Vermeer i sar., 2003) (Slika 13). Gen *fkbp5* sadrži više GRE sekvence u intronskim i intergenskim regionima, kao i intronske sekvence koje odgovaraju na androgene i progesteron (Hubler i Scammell, 2004; Magee i sar., 2006; Paakinaho i sar., 2011). Povećana ekspresija FKBP5 stimulisana steroidima trebalo bi za uzvrat da smanji translokaciju GR-a u jedro i osetljivost ćelije na glukokortikoide. Pretpostavlja se da je ovakav efekat

⁵ FK506 (takođe su nazivi i *tacrolimus* i *fujimycin*) je imuno-supresivni lek.

glukokortikoida na ekspresiju *fkbp5* važan i za regulaciju signalizacije GR-a u mozgu, tj. regulaciju HHA ose. Na primer, pokazano je da kod miševa nakon administracije DEX-a dolazi do povećanja iRNK za FKBP5 u različitim moždanim strukturama važnim za funkciju HHA ose (hipokampusu, hipotalamusu i prefrontalnom korteksu) (Binder, 2009).



Slika 13. Šematski prikaz uloge FKBP5 u signalizaciji GR-a. Objašnjenja videti u tekstu. Slika adaptirana na osnovu Binder (2009).

S obzirom na važnost FKBP5 za funkciju GR-a, nije neobično što se ovaj protein dosta istražuje u vezi sa odgovorom HHA ose u stresnim situacijama, kao i u bolestima povezanim sa stresom, kao što je depresija. Nekoliko polimorfizama u jednom nukleotidu (eng. *single nucleotid polymorphisms*, SNP) u okviru *fkbp5* gena povezano je sa povećanom ekspresijom ovog proteina u limfocitima periferne krvi ili povećanom indukcijom njegove ekspresije u odgovoru na glukokortikoide (Binder i sar., 2004). Zdrave osobe homozigoti za ove SNP-ove, pokazivale su znake glukokortikoidne rezistencije u DST-u i DEX/CRH testu (Binder i sar., 2004; Binder i sar., 2008), kao i sporiji oporavak i veći nivo simptoma anksioznosti nakon izlaganja psihosocijalnim stresorima (Ising i sar., 2008). Takođe, ovi aleli su povezani sa većim rizikom za oboljevanje od depresije i post-traumatskog stresnog sindroma kod osoba zlostavljanih u detinjstvu (Binder i sar., 2008; Xie i sar., 2010; Zimmermann i sar., 2011), kao i boljim odgovorom na antidepresive kod depresivnih pacijenata (Binder i

sar., 2008; Lekman i sar., 2008). Iako na prvi pogled izgleda kontradiktorno kako isti polimorfizmi, koji dovode do veće ekspresije FKBP5, su povezani s jedne strane sa većim rizikom od depresije, a s druge strane sa boljim odgovorom na antidepresive, objašnjenje bi moglo biti sledeće: naime, depresivni pacijenti nosioci ovih alela, za razliku od kontrola, pokazivali su povećanu osetljivost GR-a u DEX/CRH testu u poređenju sa pacijentima koji nisu imali ove alele, što je možda doprinelo bržem oporavku funkcije HHA ose i bržem odgovoru na tretman antidepresivima (Binder, 2009). Ova promena u osetljivosti GR-a na glukokortikoide kod depresivnih pacijenata nosioca pomenutih SNP-ova u odnosu zdrave, mogla bi sugerisati na postojanje interakcije genotipa i sredine koja doprinosi funkcionalnoj promeni uticaja ovih polimorfizama na signalizaciju GR-a (Binder, 2009).

Takođe, povećana ekspresija FKBP5 uočena je u *postmortem* uzorcima frontalnog korteksa depresivnih bolesnika (Tatro i sar., 2009), kao i u ćelijama periferne krvi pacijenata sa DP-om (Cattaneo i sar., 2013), a smanjenje njegove ekspresije bilo povezano sa uspešnim odgovorom na antidepresive (Cattaneo i sar., 2013).

S obzirom na sve gore pomenuto, vidimo koliko je FKBP5 bitan za regulaciju glukokortikoidne signalizacije tokom stresa i u depresiji, a dalja ispitivanja bi trebalo da daju još jasniju sliku njegove uloge u ovim procesima.

2. Cilj rada

Imajući u vidu važnu ulogu glukortikoida u patogenezi DP-a, kao i to da fosforilacija GR-a bitno utiče na njegovu funkciju, glavni cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uloga fosforilacije GR-a u patogenezi depresije, kao i to da li bi fosforilacija GR-a mogla biti jedan od potencijalnih biomarkera⁶ kako za lakšu dijagnostiku i praćenje lečenja samog DP-a, tako i za otkrivanje ljudi koji su pod povećanim rizikom za oboljevanje od kliničke depresije. Idući ka ovom cilju, u ovoj doktorskoj tezi analizirano je sledeće:

1. da li postoje razlike u fosforilaciji GR-a između pacijenata sa akutnom epizodom depresije u odnosu na zdrave kontrole;
2. da li postoji povezanost između nivoa fosforilacije GR-a i trenutnih nivoa negativnih emotivnih stanja (simptoma depresije, anksioznosti i stresa) u okviru grupe zdravih kontrola;
3. da li dolazi do promene u fosforilaciji GR-a tokom terapije pacijenata sa depresijom.

S obzirom na to da je narušena funkcija GR-a uočena i u perifernim ćelijama krvi pacijenata sa DP-om i s obzirom na laku dostupnost ovih ćelija, fosforilacija GR-a je analizirana u limfocitima preiferne krvi ispitanika. Osim praćenja same fosforilacije GR-a, praćene su i promene u njegovoj uzvodnoj i nizvodnoj signalizaciji. Konkretno, kod zdravih kontrola i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom, ispitivali smo sledeće parametre:

1. koncentraciju jutarnjeg kortizola u serumu, kao indikator aktivnosti HHA ose;
2. nivo fosforilacije jedarnog GR-a na S211 i S226, s obzirom da fosforilacije na ovim epitopima bitno utiču na transkripcionu aktivnost GR-a;
3. nivo ukupnog GR-a u jedru i u citosolu, radi dobijanja uvida o translokaciji GR-a, s obzirom da fosforilacija GR-a utiče na njegovu ćelijsku lokalizaciju;

⁶ Pod biomarkerom se podrazumeva biološka karakteristika organizma koja se može objektivno meriti i koja predstavlja indikator normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili odgovor na farmakološki tretman (Atkinson i sar., 2001).

4. nivo ukupne i aktivirane (fosforilisane) forme JNK-a u jedru i citoplazmi, s obzirom da JNK učestvuje u fosforilaciji GR-a na S226;
5. nivo GILZ-a u citoplazmi, s obzirom da je ekspresija ovog proteina stimulisana glukokortikoidima, kao i to da je GILZ važan je medijator u ostvarivanju anti-inflamatornih efekata GR-a;
6. nivo FKBP5 u citoplazmi, s obzirom da je ekspresija ovog proteina stimulisana glukokortikoidima, kao i to da je FKBP5 važan deo kratke negativne povratne sprege u regulaciji funkcije GR-a.

Kod grupe depresivnih pacijenata koju smo pratili tokom lečenja putem ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije (eng. *repetitive transcranial magnetic stimulation*, rTMS) kao adjuvantne metode uz redovno propisanu terapiju antidepresivnim lekovima, pratili smo one parametare glukokortikoidne signalizacije za koje je prethodno bilo pokazano da se razlikuju između grupe zdravih i pacijenata sa akutnom epizodom depresije.

3. Materijal i metode

3.1. Odabir i karakterizacija učesnika u studiji

Ova studija je odobrena od Medicinskog etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije. Svi učesnici u studiji, pacijenti sa DP-om i kontrolni ispitanici, pre ulaska u studiju su bili upoznati sa procedurom i ciljem istraživanja i dali su svoj pismeni pristanak za učestvovanje u istoj.

3.1.1. Pacijenti sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja

Za studiju je odabrano trideset pacijenta sa Klinike za psihijatriju Kliničkog centra Srbije. Dijagnoza aktuelne depresivne epizode potvrđena je primenom strukturisanog intervjua za psihijatrijske bolesti prema ICD-10 i DCM-IV kriterijumima (eng. *Mini-International Neuropsychiatric Interview - M.I.N.I.*) (Sheehan i sar., 1998). Pacijenti koji su ušli u studiju imali su sledeće dijagnoze: 296.20-26 – jedna epizoda velikog depresivnog poremećaja i 296.30-36 – rekurentni veliki depresivni poremećaj, po DSM-IV kriterijumu, ili F32-x – depresivna epizoda i F33.x – rekurentni depresivni poremećaj, po ICD-10 kriterijumu. Dijagnoza je potvrđena saglasnošću između dva psihijatra na osnovu odvojenih intervjua. Svi pacijenti sem jednog su bili sa rekurentnim DP-om, tačnije, jedan pacijent je imao prvi put depresivnu epizodu, tri pacijenta su imali drugu epizodu i ostali s bili sa tri ili više depresivnih epizoda. Nijedan od pacijenata nije imao neurološko ili neko drugo medicinsko oboljenje, mada je određeni broj pacijenata imao simptome anksioznosti. Niko od pacijenata nije nikada tretiran EKT-om. Takođe, nijedan od pacijenata u poslednjih 12 meseci nije zloupotrebljavao alkohol ili druge psihoaktivne supstance i nije patio od poremećaja uzrokovanih zloupotrebom psihoaktivnih supstanci. Intenzitet depresivne simptomatologije procenjen je od strane ispitivača korišćenjem Hamiltonove skale za depresiju (eng. *Hamilton Rating Scale for Depression, HAMD-17*) (Hamilton, 1960). Rekrutovani pacijenti su imali srednje tešku (HAMD 14-18) (8 pacijenata), tešku (HAMD 19-22) (4

pacijenta), do vrlo tešku deresiju (HAMD \geq 23) (18 pacijenata), a srednja vrednost HAMD skorova se nalazi u Tabeli 11. Takođe, svaki od pacijenata ispunio je i sociodemografski upitnik i kao i Skale depresije, anksioznosti i stresa (eng. *Depression, anxiety and stress scales – DASS*) za samoprocenu negativnih emocija, tj. simptoma depresije, anksioznosti i stresa u poslednjih 14 dana.

Svi pacijenti su bili na terapiji u trenutku ulaska u studiju, koja je prikazana u Tabeli 5. Najveći broj pacijenata imao je kombinovanu terapiju koja se sastojala od antidepresiva i benzodiazepina, dok su nekima bile prepisane i niske doze antipsihotika za umirenje, ili stabilizatora raspoloženja za poboljšanje tarapeutskog učinka. Pacijenti su bili na pomenutoj terapiji najmanje 1 nedelju pre ulaska u eksperiment. Prethodna izloženost antidepresivima i drugim lekovima za lečenje DP-a bila je varijabilna, u trajanju od nekoliko meseci do nekoliko godina.

Tabela 5. Rezime terapije pacijenata sa akutnom epizodom depresije.

Terapija	pacijenti sa DP-om (%)	
antidepresivi	88.5 %	SSRI – 48% TCA – 25% novi antidepresivi ⁷ – 15% ostali
benzodiazepini	96.2 %	
stabilizatori raspoloženja	30.8 %	
antipsihotici	50 %	

3.1.2. Kontrolni ispitanici

Trideset pet kontrolnih ispitanika regrutovano je putem lokalnih reklama u različitim firmama iz Beograda. Kriterijum za uključivanje u studiju podrazumevao je one bez trenutnih ili prošlih medicinskih poremećaja, kao i one bez ikakve terapije, bilo hronične bilo akutne. Svi učesnici su prvo prošli kroz intervju sa treniranim psihijatrom koji je na osnovu M.I.N.I. kriterijuma isključio prisustvo nekog od mentalnih poremećaja, a zatim su ispunili sociodemografski upitnik i DASS. Svi kontrolni ispitanici su imali normalne do umerene skorove na sve tri skale DASS-a (depresije,

⁷ Ovde spadaju SNRI, NRI, serotoniniski i serotoniniski/noradrenaliniski modulatori (videti Tabelu 4.).

anksioznosti i stresa), i s obzirom da nijedan ispitanik nije ispunio M.I.N.I. kriterijume za trenutni ili nekadašnji mentalni poremećaj, simptomi mereni DASS-om smatrani su subkliničkim i/ili prolaznim (što je u saglasnosti sa dimenzionalnim pristupom psihopatologije (Regeer i sar., 2006)).

3.1.3. Pacijenti praćeni tokom lečenja ponovljenom transkranijalnom magnetnom stimulacijom kao adjuvantnom terapijom

U ovaj deo istraživanja uključeno je četiri pacijenta Klinike za psihijatriju Kliničkog centra Srbije. Aktuelna epizoda depresivnog poremećaja potvrđena je na osnovu ICD-10 i DCM-IV kriterijuma (M.I.N.I.) (Sheehan i sar., 1998), a težina depresivne simptomatologije procenjen je na osnovu HAMD-17, pri čemu su regrutovani pacijenti imali tešku (HAMD 19-22) do vrlo tešku deresiju (HAMD \geq 23) (Tabela 6). Dodatni preduslovi za uključanje u studiju bili su i to da nije ustanovljeno nijedno drugo psihijatrijsko oboljenje, da nema somatskih oboljenja ili stanja koja predstavljaju kontraindikaciju za primenu rTMS (npr. prisustvo mentalnog implantata u telu, epilepsije, tumorskih lezija u mozgu, deprivacije spavanja, alkoholizma, ozbiljnog srčanog oboljenja, trudnoće, uzimanja medikamenata koji snižavaju konvulzivni prag bez istovremene primene lekova koji štite od pojave konvulzija) (Rossi i sar., 2009), kao i da je nalaz na elektroencefalogramu, urađen pre uključivanja u program rTMS stimulacije, bez odstupanja od fiziološkog nalaza. Regrutovani pacijenti su već bili na terapiji antidepresivima u odgovarajućoj dozi, minimum tri nedelje pre početka primene rTMS-a. Farmakoterapijski protokol se nije menjao tokom perioda trajanja rTMS-a (prve 3 nedelje praćenja), a nakon završenog protokola rTMS-a, terapija antidepresivima je nastavljena. Osnovni sociodemografski podaci i farmakoterapija pacijenata praćenih tokom rTMS-a prikazani su u Tabeli 6.

Terapija rTMS-om je rađena na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Magnetna stimulacija je sprovedena korišćenjem magnetnog stumulatora (eng. *Rapid Transcranial Magnetic Stimulator, Magstim Co, UK*). Protokol stimulacije je podrazumevao primenu rTMS frekvence od 10Hz, intenziteta 120% od unapred određenog motornog praga, nad levim DLPFC-om. Terapija je trajala ukupno 15 dnevnih sesija, u toku tri nedelje (svakim radnim danom, uz pauzu za vikend). Pre

početka stimulacije svakom ispitaniku je određivan prag aktivacije (eng. „*motor threshold*“) po predloženom protokolu.

Tabela 6. Osnovni sociodemografski podaci i farmakoterapija pacijenata pracenih tokom rTMS-a, kao adjuvantne terapije.

Pacijenti	Pol	Starost	Antidepresivi
1	M	38	SSRI
2	Ž	37	SSRI
3	Ž	56	TCA
4	Ž	46	NRI

Uzimanje krvi pacijenata za molekularno biološke analize, kao i psihometrijska evaluacija (HAMD-om i DASS-om) vršene su u tri tačke: pre početka rTMS terapije, u trećoj nedelji nakon početka primene protokola (tj. nakon završetka rTMS-a) i u dvanaestoj nedelji nakon prvog uzorkovanja.

3.2. Upitnici korišćeni u studiji

Hamiltonovu skalu za procenu depresije (HAMD) razvio je Maks Hamilton sa ciljem da se ustanovi težina depresivne simptome i prati oporavak pacijenta (Hamilton, 1960). Ovim upitnikom stručno lice procenjuje težinu depresije na osnovu prisustva sledećih simptoma: depresivnog raspoloženja, osećanja krivice, ideja o samoubistvu, nesanice, narušene radne sposobnosti, motorne retardacije, agitacije, anksioznosti, somatskih simptoma, gubitka težine. Smanjenje HAMD skora za 50% ili više smatra se znakom značajnog kliničkog poboljšanja, dok HAMD skor ≤ 7 je indikator remisije, tj. oporavka od depresije. Iako su kasnije prepoznate određene mane ove skale, HAMD se smatra zlatnim standardom u kliničkim studijama i najčešće je korišćen upitnik u istraživanjima vezanim za depresiju (Cusin i sar., 2009).

Skale depresije, anksioznosti i stresa (DASS) je upitnik za samoprocenu negativnih emotivnih stanja u poslednjih četrnaest dana, na kome se odgovori daju na četvorostepenoj skali Linkerovog tipa (Lovibond i Lovibond, 1995; Lovibond i Lovibond, 1995). Ovaj upitnik pogodan je za merenje negativnih emotivnih stanja kako u zdravoj populaciji, tako i u kliničkim istraživanjima (Lovibond i Lovibond, 1995;

Crawford i Henry, 2003). DASS-ova skala depresije meri: nerazpoloženje, osećaj beznačajnosti i besmislenosti života, samo-omalovažavanje, nezainteresovanost, anhedonju i bezvoljnost. DASS-ova skala anksioznosti procenjuje: znake aktiviranja simpatičkog nervnog sistema, efekte na skeletnim mišićima, situacionu anksioznost i subjektivni doživljaj anksioznog afekta. DASS-ova subskala stresa meri stepen hroničnog nespecifičnog uzbuđenja: teškoću opuštanja, nervozu, uznemirenost, razdražljivost i nestrpljivost. Svaka od ovih subskala određuje i opštiju dimenziju psihološkog distresa (Henry i Crawford, 2005). Individualni rezultati za svaku pojedinačnu DASS skalu dobijeni su sabiranjem odgovora na odgovarajuća pitanja.

3.3. Procedura uzimanja uzoraka krvi

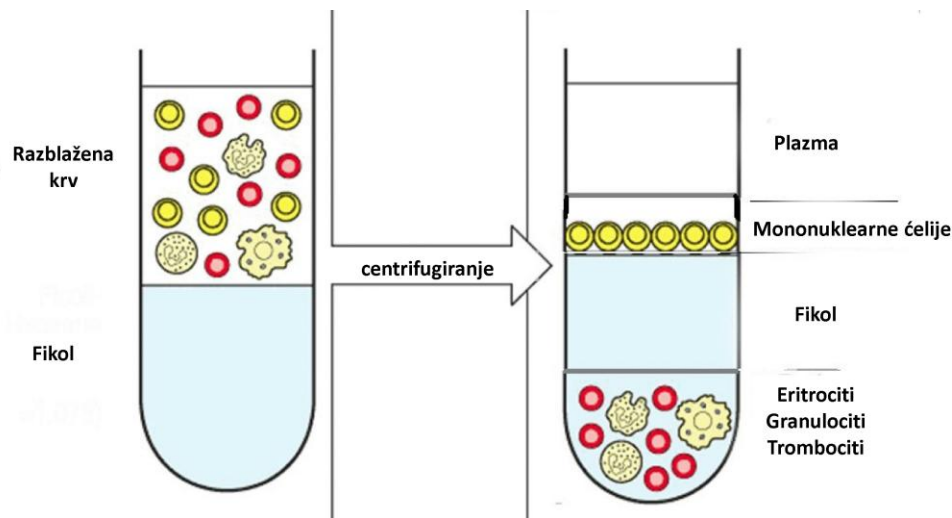
Svim učesnicima istraživanja, krv za pripremu uzoraka limfocita za molekularno biološke analize i merenje koncentracije kortizola, uzimana je ujutro, u periodu između 8:00 i 9:00. Koncentracija kortizola merena je u biohemijskoj laboratoriji korišćenjem hemiluminiscentne metode (*DPC Immulite*).

3.4. Priprema uzoraka limfocita

3.4.1. Izdvajanje limfocita iz krvi u gradijentu gustine

Za molekularno biološke analize u limfocitima, uzimano je 10 ml krvi u Na₂EDTA BD vakutaner tubama, da bi se sprečila koagulacija krvi. Limfociti iz periferne krvi izdvajani su korišćenjem LSM-a (eng. *Lymphocyte Separation Medium*, LSM) po uputstvima proizvođača uz male izmene. Krv je prvo bila razblažena hladnim fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl), zatim naslojena na LSM i centrifugirana na 400 xg. Glavna komponenta LSM-a je polisaharid fikol, pa se na osnovu razlike u gustini, prilikom centrifugiranja, razdvajaju različite komponente krvi (Slika 14.). U sloju ćelija između plazme i LSM-a, tzv. eng. „*buffy coat*“-u, nalazile bi se mononuklearne ćelije periferne krvi (od čega su 70-90% limfociti, a ostatak su monociti/makrofagi). Ovaj sloj bi se izdvajao i ispirao tri puta u hladnom PBS-u (eng. *phosphate buffered saline*, PBS) na 260 xg, na +4⁰C. Nakon poslednjeg ispiranja, PBS je bio odliven, talog limfocita

nakratko osušen na vazduhu, i odmah zatim zamrznut u tečnom azotu i skaladišten na -80°C do dalje obrade.



Slika 14. Šematski prikaz razdvajanja različitih komponenti krvi korišćenjem LSM-a.

3.4.2. Priprema citoplazmatičnih i jedarnih frakcija limfocita

Priprema subćelijskih frakcija limfocita urađena je na osnovu protokola Schreiber i saradnika (1989) uz određene modifikacije. Talozi limfocita resuspendovani su u $500\ \mu\text{l}$ hladnog pufera A (sastav pufera A je prikazan u Tabeli 7), a zatim inkubirani na ledu uz snažno ljuljanje 30 min. Nakon toga, u svaki uzorak je dodavano $75\ \mu\text{l}$ 10% rastvora *Tween 20*, uzorci su vorteksovani 20 s i centrifugirani na $10000\ \text{xg}$ 10 min, na $+4^{\circ}\text{C}$. Dobijeni supernatant je odliven i služio je kao frakcija citosoplazme, a talog u kome su se nalazila jedra, nakratko je osušen i resuspendovan u $150\ \mu\text{l}$ hladnog pufera C (sastav pufera C prikazan je u Tabeli 8). Uzorci su inkubirani na ledu uz snažno ljuljanje 30 min, a zatim centrifugirani na $10000\ \text{xg}$ 10 min, na $+4^{\circ}\text{C}$. Dobijeni supernatant korišćen je kao jedarna frakcija limfocita.

Tabela 7. Sastav pufera A.

Pufer A
10 mM HEPES pH 7.9
10 mM KCl
0.1 mM Na ₂ EGTA
0.1 mM Na ₂ EDTA
1 mM DTT
proteazni inhibitori:
0.15 mM spermine
0.15 mM spermidine
1 mM PMSF
5 µg/ml antipain
5 µg/ml leupeptin
5 µg/ml aprotinin
10 µg/ml tripsin inhibitor
3 mM benzamidine
fosfatazni inhibitori:
20 mM β-glycerophosphate
5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O
2 mM Na ₃ VO ₄
25 mM NaF

Tabela 8. Sastav pufera C.

Pufer C
20 mM HEPES pH 7.9
400 mM NaCl
1 mM Na ₂ EGTA
1 mM Na ₂ EDTA
1 mM DTT
proteazni inhibitori:
0.15 mM spermine
0.15 mM spermidine
1 mM PMSF
5 µg/ml antipain
5 µg/ml leupeptin
5 µg/ml aprotinin
10 µg/ml tripsin inhibitor
3 mM benzamidine
fosfatazni inhibitori:
20 mM β-glycerophosphate
5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O
2 mM Na ₃ VO ₄
25 mM NaF

3.4.3. Određivanje koncentracije proteina u citoplazmatičnim i jedarnim frakcijama limfocita

Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je kolorimetrijskom metodom zasnovanom na korišćenju BCA (eng. *bicinchoninic acid*, BCA), prema uputstvima proizvođača za standardni protokol (*Serva*), budući da ovaj metod ne interferira sa komponentama pufera upotrebljenim za lizu ćelija. Koncentracije proteina u uzorcima određene su na osnovu standardne krive i izmerenih absorbanci za svaki uzorak. Za standardnu krivu korišćene su poznate koncentracija BSA (eng. *Bovine serum albumine*, BSA) proteina u opsegu od 0.025 mg/ml do 1 mg/ml. Svi uzorci jedarne frakcije bili su razblaženi 10 puta, a uzorci citoplazme 15 puta da bi ušli u opseg standardne krive. Koncentracija proteina u svim uzorcima bila je merena u duplikatu i izračunavane su srednje vrednosti za svaki uzorak.

3.5. Detekcija proteina u citoplazmatičnoj i jedarnoj frakciji limfocita

3.5.1. Separacija proteina metodom elektroforeze na SDS-poliakrilamidnom gelu

Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su pomešani sa denaturišućim puferom prema Lemliju (Laemmli, 1970) (Tabela 9) i kuvani 5 min. na 100°C.

Tabela 9. Pufer za denaturaciju uzoraka prema Lemliju.

Pufer za denaturaciju uzoraka (finalne koncentracije)
62.5 mM Tris HCl pH 6.8
10% Glicerol
2% SDS
0.005% BFB (<i>Bromfenol Blue</i>)
2% β -merkaptoetanol

Nakon kuvanja, uzorci su ohlađeni i skladišteni na -20°C do dalje upotrebe. Proteini su razdvajani na 7.5% ili 12% poliakrilamidnim gelovima u zavisnosti od molekulske mase proteina koji su se analizirali, tačnije: 7.5% gel je korišćen za razdvajanje GR-a i JNK, dok 12% gel je korišćen za analizu GILZ i FKBP5 proteina. Na gel je nanošeno 60 μ g proteina. Elektroforeza na denaturišućem SDS (eng. *Sodium dodecil sulphat*, SDS) - poliakrilamidnom gelu rađena je po modifikovanom Lemlijevom protokulu za gel (Tabela 10), u puferu za elektroforezu koji je sadržao 0.25 M Tris, 1.92 M glicin i 0.1% SDS, pH=8.3, pri konstantnom naponu od 100V.

Tabela 10. Sastav gelova za koncentrovanje i razdvajanje.

Gel za razdvajanje		Gel za koncentrovanje
7.5% Akrlamid/bisakrlamid (30:1)	12% Akrlamid/bisakrlamid (30:1)	5% Akrlamid/bisakrlamid (30:1)
375 mM Tris pH 8.95	375 mM Tris pH 8.95	125 mM Tris pH 6.95
2mM EDTA	2mM EDTA	2mM EDTA
0.1% SDS	0.1% SDS	0.1% SDS
0.06% APS	0.06% APS	0.1% APS
0.06% TEMED	0.06% TEMED	0.1% TEMED

3.5.2. Analiza proteina *Western blot*-om

Posle razdvajanja proteina elektroforezom, proteini su prebačeni na PVDF (polivinilidendifluorid, PVDF) membranu (*Immobilon-P membrane, Millipore*) korišćenjem blot sistema *Transblot (BioRad)*. Membrane su potom inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje, PBS-u ili TBS-u (eng. *Tris-buffered saline, TBS*) koji je sadržao 5% nemasno mleko ili BSA (TBS sa 5% BSA korišćen je za blokiranje membrana kada bi se detektovao fosforilisani GR, a u ostalim slučajevima korišćen je PBS sa 5% nemasnim mlekom).

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u primarnom antitelu preko noći na 4°C. Za detekciju proteina korišćena su sledeća primarna antitela: M-20 ili H-300 antitela (*Santa Cruz Biotechnology*) za detekciju ukupnog GR-a (razblaženje 1:500); *phospho-GR (Ser211) (Cell Signaling)* antitelo za detekciju GR-a fosforilisanog na S211 (razblaženje 1:500); *phospho-GR (Ser226) (Abcam)* antitelo za detekciju GR-a fosforilisanog na S226; antitela *SAPK/JNK* i *phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling)* za detekciju ukupne i fosforilisane JNK (razblaženja 1:500); GILZ D-2 (*Santa Cruz Biotechnology*) za detekciju GILZ proteina (razblaženje 1:500); FKBP5 H-100 (*Santa Cruz Biotechnology*) za detekciju FKBP5 proteina (razblaženje 1:500). β -aktin (*β -actin*) je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel i detektovan je specifičnim antitelom (*Abcam*) (razblaženje 1:5000).

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u PBST-u ili TBST-u (PBS/TBS sa 0.1% *Tween 20*) puferu. Nakon poslednjeg ispiranja membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima, anti-zečijim ili anti-mišjim HRP (eng. *Horseradish peroxidase, HRP*) -konjugovanim antitelom (*Amersham*), 2 h na +4°C. Posle inkubacije sa sekundarnim antitelima, ponovljeno je ispiranje membrane 3 puta po 10 min u PBST-u ili TBST-u. Signali su detektovani korišćenjem Pico ili Femto hemiluminescentnog supstrata (*Thermo Scientific Pierce*), i izlaganjem membrane radiografskom filmu.

Nakon detekcije signala za željeni protein, membrane su stripovane u cilju detektovanja drugog željenog proteina sa iste membrane. Stripovanje membrana je vršeno 20 min na 50°C u puferu za stripovanje koji je sadržao: 62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS i 100 mM β -merkaptotanol.

3.5.3. Kvantifikacija signala

Za denzitometriju proteinskih traka sa radiografskog filma korišćen je *Image J* program. Od svakog *Western blot*-a odabrano je po 2 reprezentativna filma. Jačine traka za svaki protein podeljne su sa intenzitetom trake za β -aktin istog uzorka sa istog gela. Potom su nivoi proteina u svim uzorcima izražavani relativno u odnosu na interni referentni uzorak (IRU), tj. kao procenat od jačine signala IRU-a za odgovarajući protein sa istog gela. Naime, IRU je puštan na svakom gelu u cilju smanjenja variranja uslova između različitih *Western blot*-ova i radi poređenja uzoraka sa različitih gelova, a dobijen je mešanjem alikvota uzoraka iz same studije. Računati su i odnosi: fosfo-GR-S211/GR, fosfo-GR-S226/GR, fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 i fosfo-JNK/JNK, koji su takođe izraženi kao procenat od odgovarajućeg odnosa istih proteina dobijenog za IRU sa istog gela.

Svi uzorci su nanošeni na gel barem 2 puta, a kad je bilo dovoljno uzorka, bar 3 puta. Zatim su računane srednje vrednosti za nivoe proteina za svaki uzorak. Ukoliko su vrednosti nivoa proteina između dva ponavljanja istog uzorka bile izrazito različite, vrednosti nivoa tog proteina za taj uzorak bile su izbačene iz dalje statističke analize.

3.6. Statistička analiza podataka

Za analizu razlika između grupe pacijenata i kontrola korišćeni su t-test za kontinualne varijable i χ^2 za kategoričke varijable. S obzirom da je t-test parametrijski test, pre njegove primene provereno je da li podaci podležu normalnoj raspodeli. Varijable koje nisu pokazivale normalnu raspodelu transformisane su na pogodan način (dekadnim logaritmovanjem). Dodatno, opštim linearnim modelom (eng. *general liner model*, GLM), ispitani su efekti bolesti i potencijalnih kovarijata: pola, starosti i drugih varijabli na ispitivane molekulske parametre.

Za analizu razlika između muškaraca i žena u okviru kontrolne grupe korišćen je neparametrijski Man-Vitnjev U test zbog male veličine uzorka i kontrole autlejera.

Za analizu povezanosti između dve željene varijable u celom uzorku korišćene su Pirsonove korelacije, ili Spirmanove korelacije, u okviru grupe kontrola, zbog male veličine uzorka i kontrole autlejera.

Kod pacijenata praćenih tokom lečenja rTMS-om, korelacije između promena u simptomima depresije i ispitivanih molekulskih parametara u vremenu, analizirane su generalizovanim linearnim modelom, tačnije, korišćen je GEE (eng. *generalized estimating equations*, GEE). GEE je semiparametrijska regresiona statistička metoda koja je pogodna za obradu podataka u longitudinalnim studijama.

Vrednosti p manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim, a p vrednosti između 0.1 i 0.05 smatrane su statističkim trendom i takođe su obeležene u rezultatima. Statistička obrada podataka urađena je u programu SPSS (eng. *Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS).

4. Rezultati

4.1. Analiza razlika u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima između pacijenata sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja u odnosu na zdrave kontrole

Prvo smo želeli da analiziramo da li između pacijenata sa akutnom epizodom depresije i zdravih kontrola postoje razlike u fosforilaciji GR-a, ukupnim nivoima GR-a u jedru i citoplazmi, kao i signalizaciji vezanoj za JNK i nivoima proteina regulisanim GR-om, GILZ-u i FKBP5, važnim posrednicima efekata glukokortikoidne signalizacije.

4.1.1. Demografske i kliničke karakteristike kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

Osnovne sociodemografske i kliničke karakteristike kontrolnih ispitanika i pacijenata sa DP-om prikazane su u Tabeli 11. Grupa pacijenata bila je nešto starija od grupe kontrola. Da bismo isključili uticaj starosti na molekulske parametre koje smo kasnije ispitivali u studiji, u daljim analizama, starost je smatrana jednim od kovarijata. Što se tiče distribucije polova, nije bilo razlike između kontrolne grupe i pacijenata sa DP-om. Takođe, treba napomenuti i to da su svi ispitanici bili evropeidnog porekla, a žene su bile pomešane u odnosu na faze menstrualnog ciklusa i korišćenje kontraceptivnih pilula.

Tabela 11. Osnovne sociodemografske i kliničke karakteristike kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom. Podaci u tabeli su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (standardna devijacija) ili kao procenat. Poređenje između grupa vršeno je t-testom za kontinualne varijable (date su t vrednosti i odgovarajuće p vrednosti) ili χ^2 testom za kategoričke varijable (date su χ^2 vrednosti i odgovarajuće p vrednosti).

Karakteristike	Kontrole	DP	Vrednosti testa
Starost (godine)	39.49 \pm 9.64	44.77 \pm 7.58	t=-2.423; p=0.018
Pol (muškarci/žene)	16/19	13/17	$\chi^2=0.037$; p=0.847
DASS - depresija	6.17 \pm 6.63	26.67 \pm 10.88	t= -9.507; p<0.001
DASS - anksioznost	5.83 \pm 6.06	20.47 \pm 10.72	t=-7.478; p<0.001
DASS - stres	10.97 \pm 5.76	25.10 \pm 11.16	t=-7.354; p<0.001
HAM-D	-	23.83 \pm 7.14	-
kortizol (nmol/l)	348 \pm 144	469 \pm 157	t=-1.921; p=0.059
pušanje (% pušača)	31.40 %	70.00 %	$\chi^2=9.615$; p=0.002

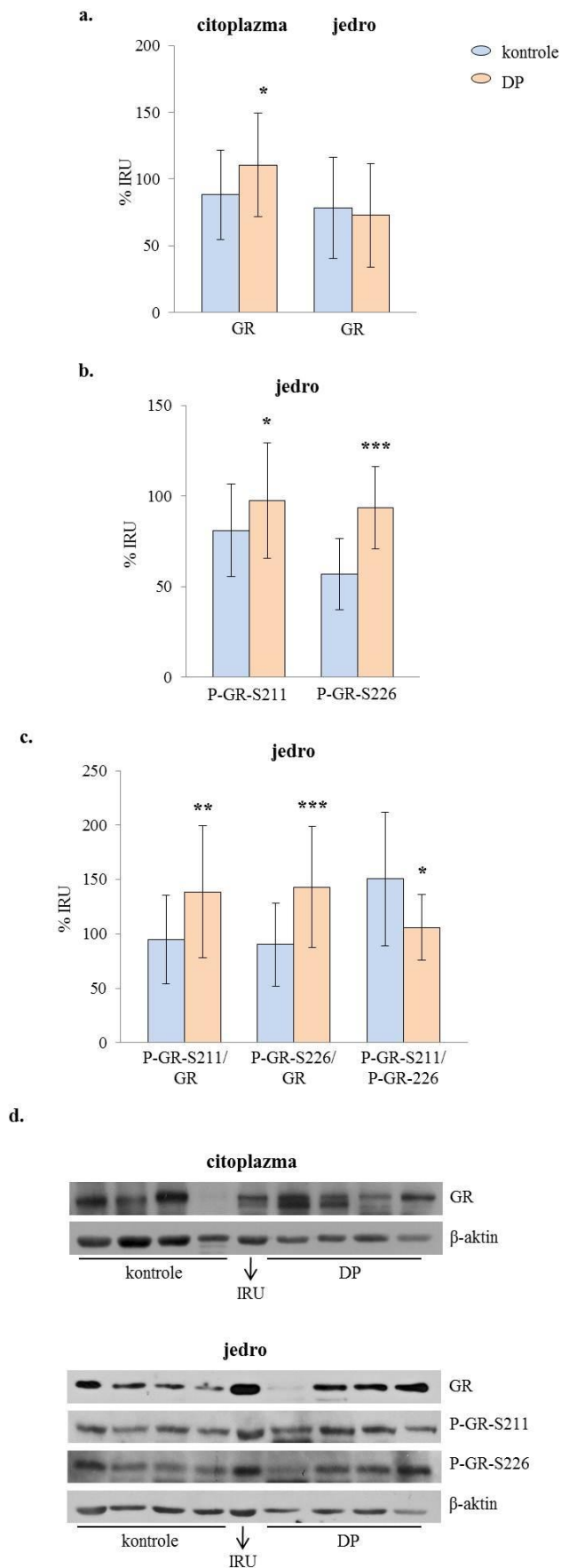
Pacijenti su pokazali značajno više skorove na skalama depresije, anksioznosti i stresa u poređenju sa zdravim kontrolama. Takođe, koncentracija kortizola u krvi je bila viša kod pacijenata sa DP-om u odnosu na kontrole, mada samo kao trend. S obzirom da je u nekim studijama uočen porast koncentracije kortizola sa starošću (Asnis i sar., 1981; Halbreich i sar., 1984; Sher i sar., 2004), korišćenjem statističkih analiza pokazano je da u našoj studiji razlike u koncentraciji kortizola nisu bile vezane za razlike u godinama između grupe pacijenata i kontrola, već za prisustvo, odnosno odsustvo same bolesti (Tabela 12). Kod pacijenata je takođe bio veći procenat pušača nego u kontrolnoj grupi. Zbog razlika u koncentraciji kortizola i procentu pušača između grupa kontrola i pacijenata, ove varijable su uzete kao kovarijati u daljem istraživanju.

Tabela 12. Uticaj starosti na koncentraciju kortizola u krvi. Prikazan je Pirsonov korelacioni koeficijent između starosti i koncentracije kortizola u krvi, kao i rezultati GLM-a u kome je analiziran uticaj DP-a na koncentraciju kortizola u krvi, kontrolisano za starost.

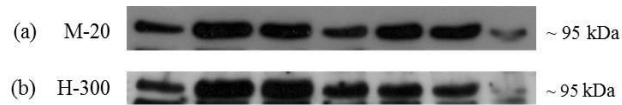
Korelacije	
Starost <i>versus</i> kortizol	$r=0.053; p=0.678$
GLM –uticaj DP-a na koncentraciju kortizola u krvi, kontrolisano za starost	
Uticaj starosti	$F=0.010; p=0.919$
Uticaj DP-a	$F=3.462; p=0.068$

4.1.2. Analiza glukokortikoidnog receptora i njegovih fosfo-izoformi u limfocitima kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

Kod svih uzoraka kvantifikovana je izoforma GR α od ~ 95 kDa (u daljem tekstu GR). Razlike između kontrola i pacijenata sa akutnom depresijom u nivoima ukupnog GR-a u citoplazmi i jedru limfocita, kao i jedarnih fosfo-izoformi GR-a, prvo su ispitivane t-testom, što je prikazano na Slici 15. Pokazano je da su pacijenti imali značajno viši nivo citosolnog GR-a ($t=-2.551; p<0.05$), dok nije bilo razlika u nivou jedarnog GR-a. Treba napomenuti i to da je ukupan GR u uzorcima detektovan M-20 antitelom, ali, s obzirom da su neki radovi (Sarabdjitsingh i sar., 2010) pokazali različitu specifičnost različitih antitela za GR, razlike u nivoima ukupnog GR-u potvrđene su i korišćenjem H-300 antitela (Slika 16).



Slika 15. Nivoi ukupnog GR-a u citoplazmi i jedru, kao i njegovih fosfo-izoforni u jedru limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom. (a.) Relativni nivoi ukupnog GR-a (GR) u citoplazmi i jedru; (b.) nivo jedarnih fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S211) normalizovani u odnosu na β -aktin; (c.) nivoi fosforilisanog jedarnog GR-a na S211 i S226 normalizovano u odnosu na ulupni jedarni GR (P-GR-S211/GR i P-GR-S226/GR), kao i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226); (d.) reprezentativan Western blot. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kontrola – kontrolna grupa, DP – grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Statistička značajnost iz *t*-testa: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU – interni referentni uzorak.



Slika 16. Nivoi ukupnog GR-a detektovanog sa dva različita antitela M-20 i H-300. Predstavljen je isti Western blot, pri čemu je GR detektovan sa dva različita antitela, M-20 i H-300. Vidimo da su razlike između signala različitih uzoraka približno iste, bez obzira na upotrebljeno antitelo.

Što se tiče jedarnih fosfo-izofrmi GR-a, prvo su računati ukupni nivoi pojedinačnih fosfo-izofrmi (relativno u odnosu na β -aktin), što je označeno kao fosfo-GR-S211 i fosfo-GR-S226. Zatim su računati i nivoi pojedinačnih fosfo-izofrmi relativno u odnosu na ukupan jedarni GR, kao mera promene u fosforilisanosti dostupnog GR-a, što je označeno kao fosfo-GR-S211/GR i fosfo-GR-S226/GR. Rezultati t-testa su pokazali da su pacijenti imali više nivoje kako fosfo-GR-S211 ($t=-2.468$; $p<0.05$) i fosfo-GR-S226 ($t=-6.955$; $p<0.001$), tako i fosfo-GR-S211/GR ($t=-3.265$; $p<0.01$) i fosfo-GR-S226/GR ($t=-4.038$; $p<0.001$) u odnosu na kontrole. Takođe je računat i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u cilju poređenja promena u fosforilaciji GR-a na ova dva epitopa. Pokazano je da su pacijenti imali niži nivo fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u odnosu na kontrole ($t=3.533$; $p<0.01$).

U daljoj statističkoj analizi upotreбили smo GLM koji omogućava ispitivanje potencijalnog uticaja kovarijata na dobijene razlike u nivoima različitih formi GR-a između kontrola i pacijenata (Tabela 13). Nakon uzimanja u obzir kovarijata (pol, starost, koncentracija kortizola u krvi i pušenje), razlike u različitim formama GR-a između kontrolnog uzorka i pacijenata sa DP-om su ostale vrlo slične onima dobijenim korišćenjem t-testa. Koverijati pol, starost, kortizol i pušenje nisu pokazali statistički značajan uticaj ni na jedan od analiziranih parametara. Vrednosti η^2 su pokazale da je uticaj bolesti bio najveći na fosforilaciju GR-a na S226, a nešto manji na fosforilaciju GR-a na S211, odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, kao i na nivo ukupnog GR-a u citoplazmi ($\eta^2>0.138$ - veliki uticaj; $0.06<\eta^2<0.138$ - srednji uticaj) (Cohen, 1988).

Tabela 13. Rezultati GLM-a. Uticaj DP-a na nivoe ukupnog GR-a (GR) u citoplazmi i jedru limfocita, nivoe jedarnih izoformi fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) normalizovanih u odnosu na β -aktin i ukupni jedarni GR, kao i na odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226); kontrolisano za uticaj pola, starosti, kortizola i pušenja. Predstavljene su vrednosti testa (F), statistička značajnost (p) i veličina efekta (η^2).

Uticaj DP-a	citoplazma	jedro					
	GR	GR	P-GR-S211	P-GR-S266	P-GR-S211/GR	P-GR-S226/GR	P-GR-S211/P-GR-S266
Model 1 (bez kovarijata)	F=7.583 p=0.009 $\eta^2=0.159$	F=0.046 p=0.831 $\eta^2=0.001$	F=5.862 p=0.020 $\eta^2=0.128$	F=29.792 p<0.001 $\eta^2=0.427$	F=6.835 p=0.013 $\eta^2=0.146$	F=13.477 p=0.001 $\eta^2=0.252$	F=9.326 p=0.004 $\eta^2=0.189$
Model 2 (kovarijati pol i starost)	F=10.641 p=0.002 $\eta^2=0.219$	F=0.013 p=0.912 $\eta^2=0.065$	F=5.247 p=0.028 $\eta^2=0.121$	F=30.524 p<0.001 $\eta^2=0.396$	F=6.865 p=0.013 $\eta^2=0.153$	F=10.095 p=0.003 $\eta^2=0.241$	F=8.614 p=0.006 $\eta^2=0.185$
Model 3 (kovarijati: pol, starost i kortizol)	F=11.006 p=0.002 $\eta^2=0.229$	F=0.076 p=0.785 $\eta^2=0.002$	F=5.105 p=0.030 $\eta^2=0.121$	F=20.471 p<0.001 $\eta^2=0.356$	F=5.765 p=0.021 $\eta^2=0.135$	F=10.682 p=0.002 $\eta^2=0.224$	F=6.396 p=0.016 $\eta^2=0.147$
Model 4 (kovarijati: pol, starost i pušenje)	F=8.928 p=0.005 $\eta^2=0.194$	F=0.160 p=0.692 $\eta^2=0.004$	F=4.531 p=0.040 $\eta^2=0.109$	F=18.048 p<0.001 $\eta^2=0.328$	F=4.872 p=0.034 $\eta^2=0.116$	F=8.308 p=0.007 $\eta^2=0.183$	F=4.980 p=0.032 $\eta^2=0.116$

S obzirom da je pokazano da fosforilacija GR-a na S226 stimuliše eksport receptora iz jedra (Itoh i sar., 2002), ispitali smo da li je povećanje GR-a u citoplazmi limfocita pacijenata sa depresijom, povezano sa povećanjem njegove fosforilacije na S226 u jedru. Zaista, pokazana je srednje jaka pozitivna korelacija između nivoa fosforilacije GR-a na S226 u jedru i nivoa GR-a u citoplazmi (fosfo-GR-S226/GR vs. GR: $r=0.433$, $p<0.001$; fosfo-GR-S226 vs. GR: $r=0.240$, $p=0.061$).

Takođe, budući da je poznato da aktivacija GR-a ligandom dovodi do njegove down-regulacije (Kalinyak i sar., 1987; Wallace i Cidlowski, 2001; Avenant i sar, 2010), kao i da stimuliše fosforilaciju receptora (Gallier-Beckley i Cidlowski, 2009), ispitali smo i uticaj koncentracije kortizola iz krvi na ukupan nivo GR-a u citoplazmi i jedru, i na promene u njegovoj fosforilaciji (Tabela 14.). Pokazano je da postoji srednje jaka statistički značajna povezanost između fosforilacije jedarnog GR-a na S226 i koncentracije kortizola iz istih uzoraka krvi. Za ostale merene forme GR-a nije pronađena značajna povezanost sa koncentracijama kortizola u krvi.

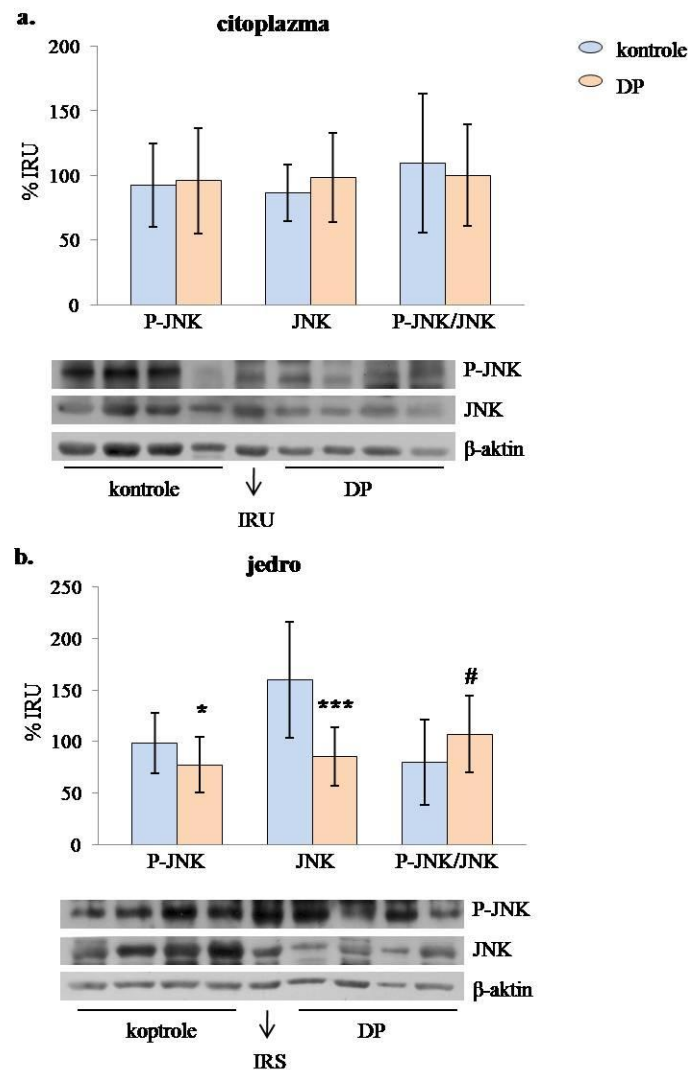
Tabela 14. Povezanost nivoa kortizola u serumu i različitih formi GR-a u limfocitima: nivoa ukupnog GR-a (GR) u citoplazmi i jedru, nivoa jedarnih izoformi fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) normalizovanih u odnosu na β -aktin i ukupni jedarni GR, kao i odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226), u uzorku kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Prikazani su Pirsonovi korelacioni koeficijenti i odgovarajuće statističke značajnosti: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Korelacije	citoplazma	jedro					
	GR	GR	P-GR-S211	P-GR-S266	P-GR-S211/GR	P-GR-S226/GR	P-GR-S211/P-GR-S266
Kortizol	0.138	-0.120	-0.025	0.250*	0.159	0.372**	-0.214

Dalje je analizirana i povezanost između težine depresije kod pacijenata (merene HAMD skalom) i ukupnog nivoa GR-a u citoplazmi ili jedru, ili nivoa fosforilacije GR-a, ali nisu pronađene statistički značajne korelacije.

4.1.3. Analiza ukupne i fosforilisane JNK u limfocitima kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

S obzirom da je poznato da JNK fosforiliše GR na S226 (Krstic i sar., 1997; Rogatsky i sar., 1998), u daljim eksperimentima želeli smo da analiziramo nivoe ukupne i fosforilisane (na Thr183 i Tyr185) JNK u limfocitima ispitanika. U uzorcima smo detektovali JNK1 (46 kDa). Poređenjem grupe pacijenata sa akutnom epizodom depresije i kontrola (t-test, Slika 17) pokazano je da su pacijenti imali niže nivoe jedarne ukupne JNK1 ($t=5.512$; $p < 0.001$), kao i fosforilisane JNK1 (fosfo-JNK1) ($t=2.816$; $p < 0.01$), a postojao je statistički trend većeg relativnog odnosa fosforilisane u odnosu na ukupnu JNK1 (fosfo-JNK1/JNK1) što predstavlja meru aktivirane JNK ($t=-1.844$; $p=0.077$). S druge strane, nije bilo razlika u nivoima ukupne i fosforilisane JNK1 u citoplazmi, između kontrolne grupe i pacijenata sa DP-om.



Slika 17. Nivoi ukupne i fosforilisane JNK1 u citoplazmi i jedru limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom. (a.) Relativni nivoi ukupne JNK1 (JNK), fosfo-JNK1 (P-JNK) i njihovog odnosa (P-JNK/JNK) u citoplazmi, kao i reprezentativan Western blot; (b.) relativni nivoi ukupne JNK1 (JNK), fosfo-JNK1 (P-JNK) i njihovog odnosa (P-JNK/JNK) u jedru, kao i reprezentativan Western blot. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kontrole – kontrolna grupa, DP – grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Statistička značajnost iz t-testa: # $0.1 > p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU – interni referentni uzorak.

U daljoj statističkoj analizi, koristeći GLM, ispitali smo uticaj bolesti (tj. DP-a) na promene u JNK signalizaciji uz kontrolisanje za potencijalne kovarijate: pol, starost i pušenje (Tabela 15). Kao i t-testom, pokazan je značajan efekat DP-a na nivo ukupne jedarne JNK1 i taj efekat je bio veliki ($\eta^2 > 0.138$). S druge strane, nakon korekcije za pol, starost i pušenje, razlike između pacijenata i kontrola u nivoima jedarne fosfo-

JNK1 i odnosa fosfo-JNK1/JNK1 nisu više bile statistički značajne, i uticaj DP-a na ove varijable bio je srednji ($0.06 < \eta^2 < 0.138$) ili mali ($\eta^2 < 0.06$). Nijedan od analiziranih kovarijata (pol, starost i pušenje) nije pokazao statistički značajan efekat ni na jedan analiziran parametar JNK signalizacije.

Tabela 15. Rezultati GLM-a. Uticaj DP-a na nivoe ukupne JNK1, fosfo-JNK1 (P-JNK) i odnosa fosfo-JNK1/JNK1 (P-JNK/JNK) u citoplazmi i jedru limfocita, kontrolisano za efekat pola, starosti i pušenja. Predstavljene su vrednosti testa (F), statistička značajnost (p) i veličina efekta (η^2).

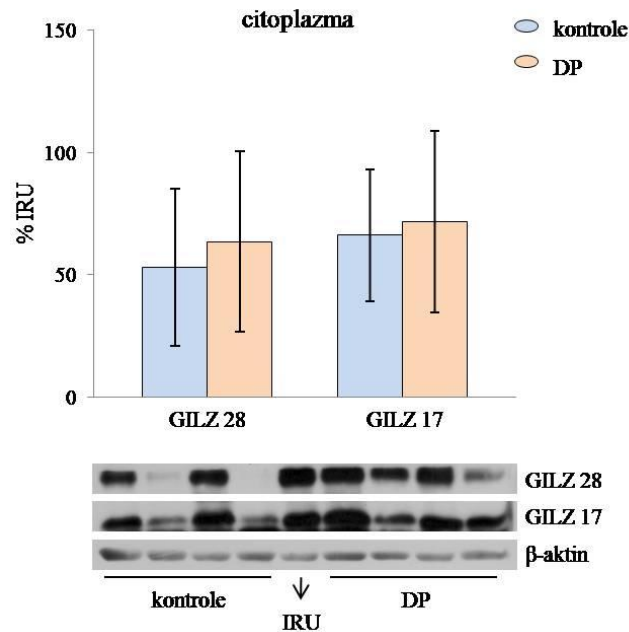
Uticaj DP-a	citoplazma			jedro		
	JNK	P-JNK	P-JNK/ JNK	JNK	P-JNK	P-JNK/ JNK
Model 1 (bez kovarijata)	F=1.844 p=0.184 $\eta^2=0.053$	F=0.008 p=0.929 $\eta^2=0.000$	F=0.038 p=0.846 $\eta^2=0.001$	F=20.648 p<0.001 $\eta^2=0.385$	F=2.158 p=0.151 $\eta^2=0.061$	F=2.751 p=0.107 $\eta^2=0.077$
Model 2 (kovarijati pol i starost)	F=2.056 p=0.162 $\eta^2=0.062$	F=0.264 p=0.611 $\eta^2=0.008$	F=0.003 p=0.958 $\eta^2=0.000$	F=17.698 p<0.001 $\eta^2=0.363$	F=2.129 p=0.155 $\eta^2=0.064$	F=1.885 p=0.180 $\eta^2=0.057$
Model 3 (kovarijati: pol, starost i pušenje)	F=0.835 p=0.368 $\eta^2=0.027$	F=0.132 p=0.719 $\eta^2=0.004$	F=0.018 p=0.894 $\eta^2=0.001$	F=14.670 p=0.001 $\eta^2=0.328$	F=2.938 p=0.097 $\eta^2=0.089$	F=.824 p=0.371 $\eta^2=0.027$

Da bismo ispitali da li je povećanje fosforilacije GR-a na S226 u limfocitima pacijenata sa DP-om povezano sa povećanjem aktivnosti JNK (Krstic i sar., 1997; Rogatsky i sar., 1998), koristili smo korelacione analize. Međutim, iako je pokazana slaba pozitivna povezanost između nivoa fosfo-JNK1/JNK1 i fosfo-GR-S226, ona nije bila statistički značajna (fosfo-GR-S226/GR vs. fosfo-JNK1/JNK1: $r=0.214$, $p=0.232$; fosfo-GR-S226 vs. fosfo-JNK1/JNK1: $r=0.176$, $p=0.290$).

4.1.4. Analiza GILZ proteina u citoplazmi limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

Analiziran je i nivo GILZ proteina u citoplazmi, s obzirom da je poznato da je ekspresija gena za ovaj protein stimulirana GR-om i da veliki deo svojih anti-inflamatornih efekata GR ostvaruje preko ovog proteina (Ayroldi i Riccardi, 2009). Detektovane su dve izoforme GILZ-a, od 17 kDa (GILZ 1) i 28 kDa (GILZ 2).

Statističke analize su pokazali da nema značajnih razlika između kontrola i pacijenata sa akutnom epizodom depresije u nivoima obe analizirane izoformi GILZ proteina u limfocitima (Slika 18). Takođe, nivoi GILZ-a nisu značajno korelisali ni sa jednom analiziranom fosfo-izoformom GR-a, kao ni sa ukupnim nivoom GR-a u jedru.

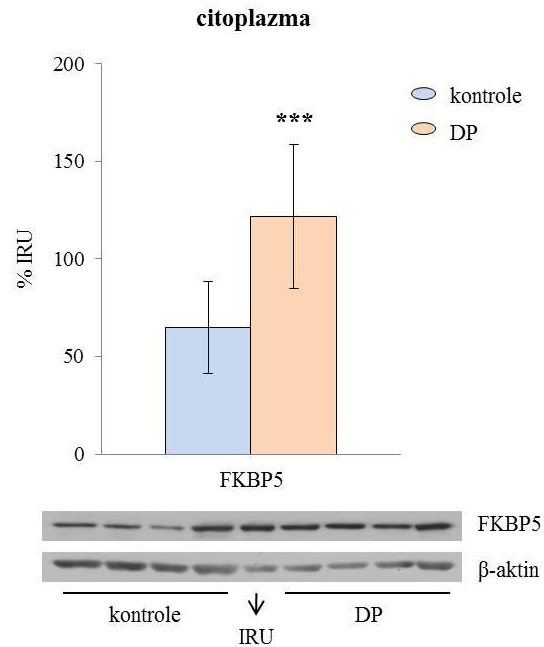


Slika 18. Nivoi GILZ-a u citoplazmi limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom. Relativni nivoi izoformi GILZ-a od 17 i 28 kDa, kao i reprezentativan Western blot. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kontrole – kontrolna grupa, DP – grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU – interni referentni uzorak.

4.1.5. Analiza FKBP5 proteina u citoplazmi limfocita kod kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresijom

FKBP5 je još jedan protein snažno stimulisan glukokortikoidima, a sam ima ulogu u obuzdavanju glukokortikoidne signalizacije u ćeliji, sprečavajući translokaciju GR-a iz citoplazme u jedro (Binder, 2009). U skladu sa ovim, ispitali smo nivoe FKBP5 proteina u uzorcima citoplazme limfocita pacijenata sa depresijom u odnosu na kontrole. Poređenjem grupa t-testom, pokazan je značajno viši nivo FKBP5 u citoplazmi limfocita pacijenata u odnosu na kontrole ($t=-7.331$; $p<0.001$) (Slika 19). Analize podataka GLM-om, uz kontrolu za uticaj potencijalnih kovarijata (pola, starosti,

pušenja i koncentracije kortizola u krvi), dale su iste rezultate i pokazano je da je uticaj DP-a na nivo FKBP5 veliki ($\eta^2 > 0.138$) (Tabela 16).



Slika 19. Nivoi FKBP5 u citoplazmi limfocita kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom. Predstavljene su relativni nivoi FKBP5, kao i reprezentativan Western blot. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kontrole – kontrolna grupa, DP – grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Statistička značajnost iz t-testa: *** $p < 0.001$. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU – interni referentni uzorak.

Tabela 16. Rezultati GLM-a. Uticaj DP-a na nivo FKBP5 u citoplazmi limfocita, kontrolisano za uticaj pola, starost, kortizola i pušenja. Predstavljene su vrednosti testa (F), statistička značajnost (p) i veličina efekta (η^2).

Uticaj DP-a	FKBP5
Model 1 (bez kovarijata)	F=53.740 $p < 0.001$ $\eta^2 = 0.468$
Model 2 (kovarijati pol i starost)	F=51.481 $p < 0.001$ $\eta^2 = 0.466$
Model 3 (kovarijati: pol, starost i kortizol)	F=52.141 $p < 0.001$ $\eta^2 = 0.478$
Model 3 (kovarijati: pol, starost i pušenje)	F=40.578 $p < 0.001$ $\eta^2 = 0.412$

Budući da FKBP5 u citoplazmi, kao što je već spomenuto, može da utiče na translokaciju GR-a u jedro, ispitali smo povezanost između nivoa FKBP5 i GR-a u citoplazmi. Pokazana je značajna i jaka pozitivna korelacija između nivoa ova dva proteina (Tabela 17). Takođe, s obzirom da GR učestvuje u regulaciji ekspresije FKBP5, a fosforilacija GR-a može bitno da utiče na njegovu transkripcionu aktivnost, ispitali smo i povezanost nivoa FKBP5 u citoplazmi, s jedne strane, i nivoa ukupnog GR-a i njegovih fosfo-izoforni u jedru, s druge strane (Tabela 17). Pokazana je srednje jaka pozitivna povezanost između nivoa FKBP5 i fosforilacije GR-a na S211 i jaka pozitivna povezanost između nivoa FKBP5 i fosforilacije GR-a na S226, a slaba negativna povezanost između nivoa FKBP5 i odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226.

Tabela 17. Povezanost nivoa FKBP5 i različitih formi GR-a u citoplazmi i jedru limfocita u uzorku kontrolnih ispitanika i pacijenata sa akutnom epizodom depresije. P-GR-S211 - fosfo-GR-S211; P-GR-S226 - fosfo-GR-S226; P-GR-S211/P-GR-S226 - odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226. Prikazani su Pirsonovi korelacioni koeficijenti i odgovarajuće statističke značajnosti: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Korelacije	citoplazma	jedro					
	GR	GR	P-GR-S211	P-GR-S226	P-GR-S211/GR	P-GR-S226/GR	P-GR-S211/P-GR-S226
FKBP5	0.504***	-0.034	0.296*	0.542***	0.492**	0.558***	-0.275*

4.2. Analiza povezanosti glukokortikoidne signalizacije u limfocitima sa nivoima negativnih afektivnih stanja kod kontrolnih ispitanika

Sledeće što smo želeli da analiziramo bilo je da li u populaciji zdravih ljudi postoji povezanost između trenutnih simptoma depresije, anksioznosti i stresa, kao faktora rizika za nastajanje kasnijeg DP-a, sa različitim parametarima glukokortikoidne signalizacije: prvenstveno fosforilacijom GR-a, a zatim i ukupnim nivoima GR-a u citoplazmi i jedru, signalizacijom vezanom za JNK i nivoima proteina regulisanim GR-om, GILZ-om i FKBP5. U procesu analiziranja podataka, kontrolne ispitanike smo podelili po polu, s obzirom da je poznato da su žene oko dva puta sklonije depresiji od muškaraca.

4.2.1. Demografske i psihometrijske karakteristike kontrolnih ispitanika

Osnovni sociodemografski i psihometrijski podaci kontrolnih ispitanika, podeljenih po polu, prikazani su u Tabeli 18. U našem uzorku, žene su bile nešto starije od muškaraca, mada je ova razlika uočena samo kao statistički trend. Ipak, naknadne statističke analize pokazale su da starost nije bila povezana ni sa jednom od kasnije ispitivanih molekularnih parametara. Žene su takođe pokazale nešto više skorova na sve tri DASS skale u poređenju sa muškarcima. Što se tiče koncentracije kortizola u krvi, nije bilo razlike između polova.

Tabela 18. Osnovne sociodemografske i psihometrijske karakteristike kontrolnih ispitanika. Podaci u tabeli su prikazani kao srednja vrednost \pm SD ili kao procenat. Poređenje između grupa rađeno je Man-Vitnijevim U testom za kontinualne varijable (date su Z vrednosti i odgovarajuće p vrednosti) ili χ^2 testom za kategoričke varijable (date su χ^2 vrednosti i odgovarajuće p vrednosti).

Karakteristike	Muškarci (16)	Žene (19)	Vrednosti testa
Starost (godine)	36.31 \pm 9.10	42.57 \pm 10.06	Z= -1.643; p=0.101
DASS - depresija	3.56 \pm 4.08	8.15 \pm 7.48	Z= -1.927; p=0.054
DASS – anksioznost	3.25 \pm 3.73	7.70 \pm 6.81	Z= -1.908; p=0.056
DASS – stres	8.81 \pm 4.55	12.65 \pm 5.90	Z= -1.843; p=0.065
kortizol (nmol/l)	434.56 \pm 166.25	372.00 \pm 118.02	Z= 1.334; p=0.187
pušanje (% pušača)	38.1	33.3	$\chi^2=0.899$; p=0.638

4.2.2. Analiza glukokortikoidne signalizacije u limfocitima i njene povezanosti sa negativnim afektivnim stanjima kod kontrolnih ispitanika

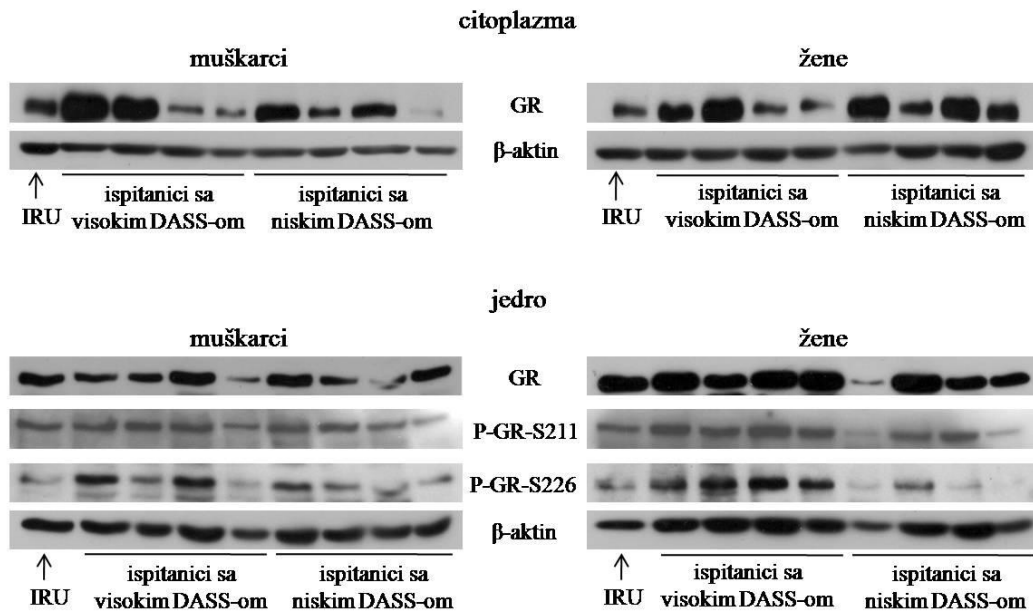
Analize ukupnog nivoa GR u jedru i citoplazmi, fosforilisanog GR-a u jedru, nivoa ukupne i fosforilisane JNK1, kao i nivoa GILZ-a i FKBP5 u citoplazmi nisu pokazale značajne razlike između polova (Tabela 19).

Tabela 19. Relativni nivoi ukupnog nivoa GR u jedru i citoplazmi, nivoi fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) u jedru (normalizovani u odnosu na β -aktin i u odnosu na ukupni jedarni GR), kao i odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226); nivoi ukupne i fosforilisane JNK1, kao i odnosa fosfo-JNK1/JNK1 (P-JNK/JNK) u citoplazmi i jedru; nivoi GILZ-a i FKBP5 u citoplazmi kod kontrolnih ispitanika. Podaci u tabeli su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Poređenje između polova rađeno je Man-Vitnejevim U testom i prikazane su Z vrednosti i odgovarajuće p vrednosti.

Relativni nivoi (% od IRU)		Muškarci	Žene	Vrednosti testa
citoplazma	GR	96.01 \pm 36.88	109.71 \pm 55.04	Z=-1.035; p=0.301
	JNK	93.79 \pm 19.23	80.32 \pm 22.59	Z=-1.699; p=0.089
	P-JNK	87.18 \pm 25.09	96.78 \pm 37.61	Z=-0.695; p=0.487
	P-JNK/JNK	90.29 \pm 35.60	123.80 \pm 61.28	Z=-1.821; p=0.069
	GILZ 17 kDa	68.49 \pm 36.55	64.13 \pm 38.35	Z=-0.476; p=0.634
	GILZ 28 kDa	47.15 \pm 35.72	58.17 \pm 28.60	Z=-1.303; p=0.193
	FKBP5	68.18 \pm 15.39	61.28 \pm 28.06	Z=-1.861; p=0.063
jedro	GR	87.78 \pm 40.43	68.88 \pm 34.74	Z=-1.344; p=0.179
	P-GR211	82.92 \pm 31.29	79.22 \pm 20.97	Z=-0.600; p=0.548
	P-GR226	58.76 \pm 16.77	54.82 \pm 22.19	Z=-0.380; p=0.704
	P-GR-S211/GR	89.46 \pm 41.95	100.22 \pm 40.03	Z=-0.611; p=0.541
	P-GR-S226/GR	100.97 \pm 62.05	81.40 \pm 32.63	Z=-0.965; p=0.335
	P-GR211/ P-GR226	139.55 \pm 64.28	161.44 \pm 58.88	Z=-1.039; p=0.299
	JNK	145.53 \pm 61.77	167.07 \pm 61.77	Z=-1.343; p=0.179
	P-JNK	100.12 \pm 30.27	97.91 \pm 29.24	Z=-0.854; p=0.393
	P-JNK/JNK	63.60 \pm 26.86	87.03 \pm 58.89	Z=-0.623; p=0.533

Sledeće što smo ispitali, što jeste bio i glavni cilj ovog dela istraživanja, jeste povezanost između signalizacije GR-a i trenutnih nivoa negativnih emotivnih stanja kod muškaraca i žena (Slike 20 i 21, i Tabela 20). Kod žena je pokazana jaka i statistički značajna korelacija između nivoa fosfo-GR-S226 u limfocitima i skorova na sve tri DASS skale: depresije, anksioznosti i stresa. Takođe, postojao je statistički trend pozitivne korelacije između fosfo-GR-S226/GR i nivoa depresije i anksioznosti. Odnos

fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 je negativno korelisao sa nivoom simptoma depresije kod žena. Kod muškaraca nije nađena nijedna statistički značajna korelacija između parametara signalizacije vezane za GR i negativnih afektivnih stanja.



Slika 20. Reprezentativan Western blot detektovanog GR-a u citoplazmi i jedru, kao i njegovih fosfo-izoforni u limfocitima kontrolnih ispitanika. Predstavljene su uzorci muškaraca i žena sa najvišim i najnižim skorovima na DASS upitniku. P-GR-S211 - fosfo-GR-S211, P-GR-S226 - fosfo-GR-S226. β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzorka na gel. IRU – interni referentni uzorak.

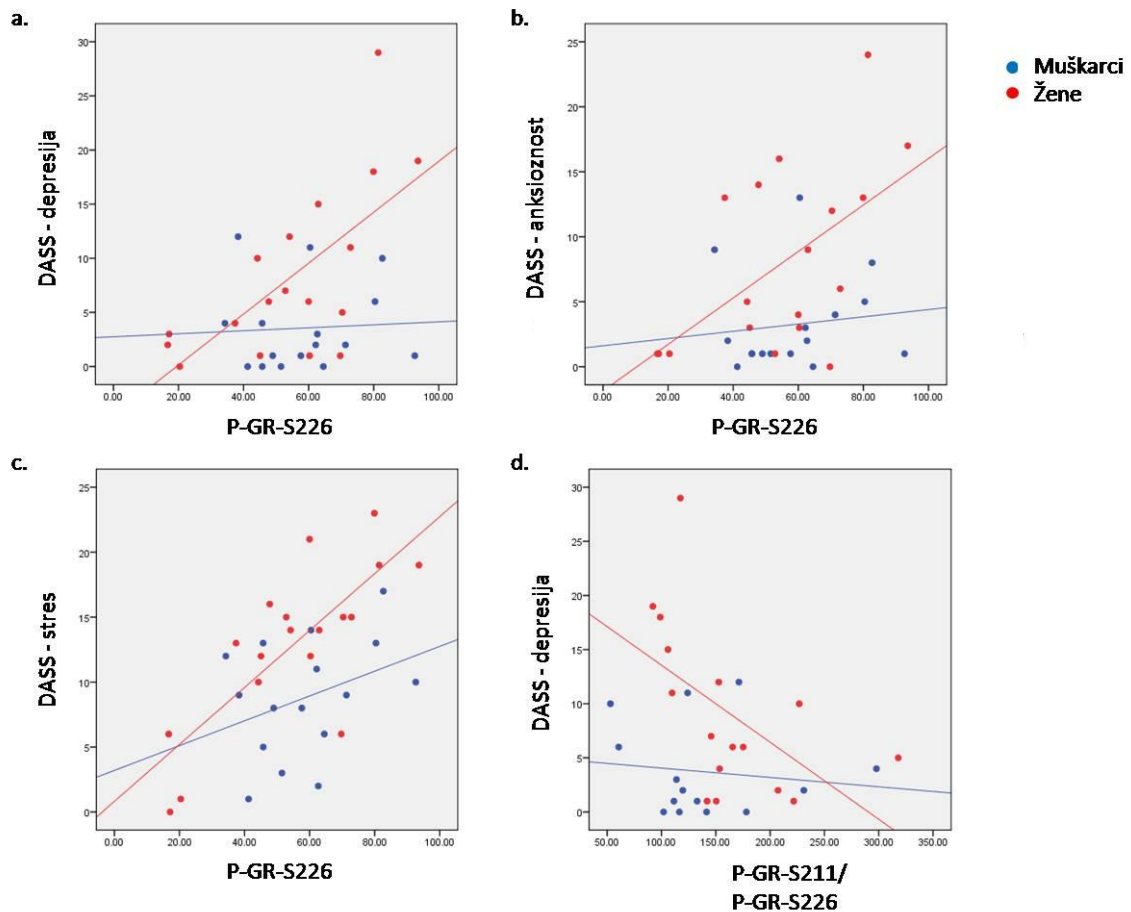
Tabela 20. Povezanost različitih formi GR-a u limfocitima sa nivoima trenutnih negativnih afektivnih stanja merenih DASS-om kod kontrolnih ispitanika. Prikazani su Spirmanovi korelacioni koeficijenti između (a) nivoa ukupnog GR-a u citoplazmi i jedru versus skorovi na DASS-u, i (b) nivoa fosforilisanog GR-a u jedru versus skorovi na DASS-u, kod muškaraca (M) i žena (Ž). P-GR-S211 - fosfo-GR-S211; P-GR-S226 - fosfo-GR-S226; P-GR-S211/P-GR-S226 - odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226. Statističke značajnosti: # $0.1 > p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

(a.)

Korelacije	citosolni GR		jedarni GR	
	M	Ž	M	Ž
DASS - depresija	0.010	0.369	-0.013	0.027
DASS - anksioznost	0.215	0.122	-0.060	0.214
DASS – stres	0.053	0.065	-0.102	0.063

(b.)

Korelacije	P-GR-S211		P-GR-S226		P-GR-S211/GR		P-GR-S226/GR		P-GR-S211/P-GR-S226	
	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž
DASS-depresija	0.042	0.141	0.040	0.626**	0.107	0.161	-0.001	0.487 [#]	-0.051	-0.598*
DASS-anksioznost	0.246	0.216	0.181	0.528*	0.217	-0.100	0.0170	0.221	-0.230	-0.283
DASS-stres	0.245	0.221	0.261	0.709***	0.258	-0.051	0.278	0.451 [#]	-0.130	-0.419



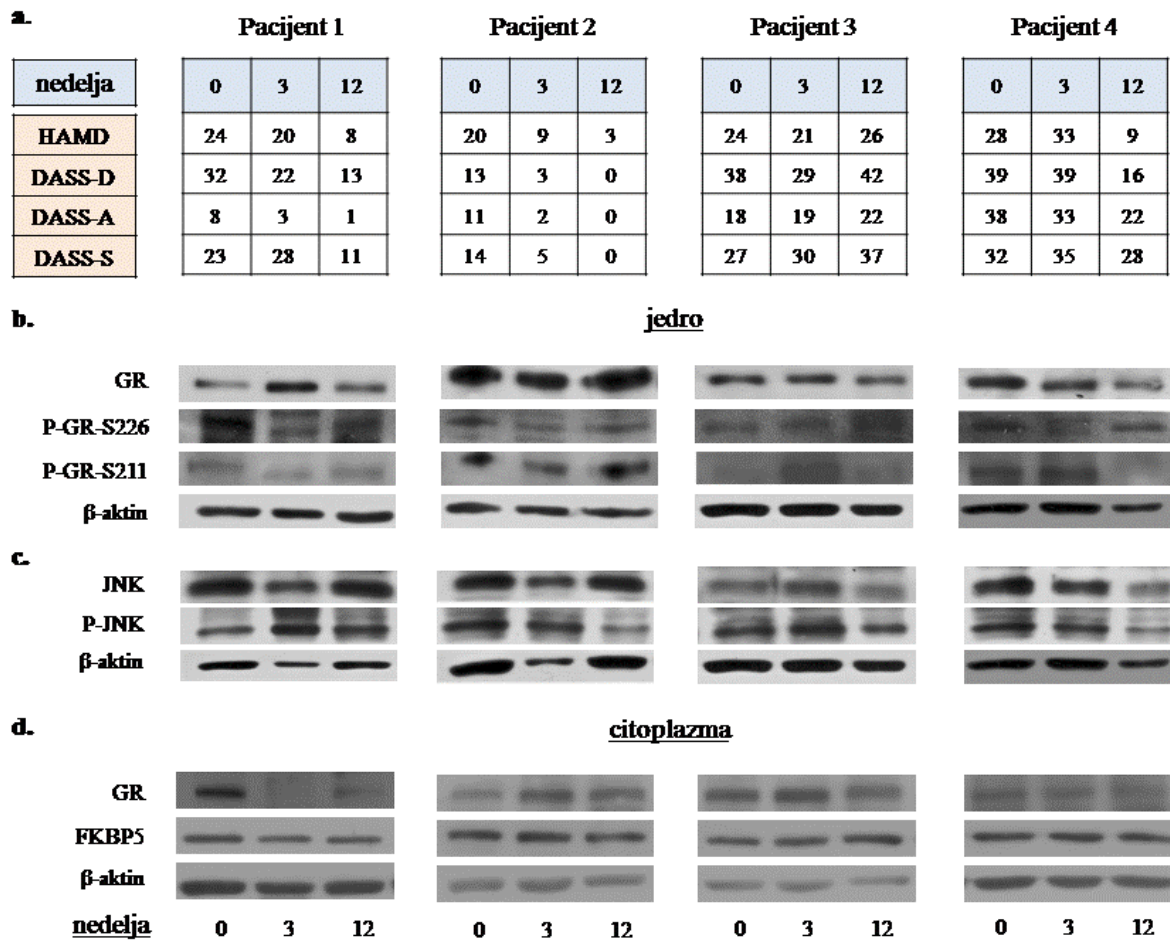
Slika 21. Grafčki prikaz povezanosti fosforilacije GR-a i nivoa trenutnih negativnih afektivnih stanja merenih DASS-om kod muškaraca i žena u kontrolnoj grupi ispitanika. (a) Povezanost nivoa fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) i skorova na skali depresije (DASS – depresija); (b) povezanost nivoa fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) i skorova na skali anksioznosti (DASS – anksioznost); (c) povezanost nivoa fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) i skorova na skali stresa (DASS – stres); (d.) povezanost odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226) i skorova na skali depresije (DASS – depresija).

Povezanosti između nivoa trenutnih samoprocenjenih nivoa depresije, anksioznosti i stresa, s jedne strane i nivoa JNK1 (ukupne i fosforilisane), GILZ-a (izoforme od 28 i 17 kDa) ili FKBP5, s druge, nisu se pokazale statistički značajnim, tako da se od analiziranih parametara, fosforilacija GR-a pokazala kao najbolji pokazatelj trenutnih negativnih afektivnih stanja kod zdravih ljudi, tj. barem kod žena.

4.3. Analiza promena u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima tokom lečenja pacijenata primenom ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije kao adjuvantne terapije

S obzirom da smo kod pacijenata sa akutnom epizodom depresije uočili povećanje fosforilacije jedarnog GR-a na S226 i smanjen odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, kao i promene u JNK signalizaciji u jedru i nivou GR-a i FKBP5 u citoplazmi, želeli smo da ispitamo kako se ovi molekularni parametri menjaju tokom lečenja pacijenata. U ovu svrhu, regrutovan je uzorak od 4 pacijenta praćenih tokom lečenja rTMS-om kao adjuvantnom terapijom uz redovnu terapiju antidepresivima koje smo analizirali pre početka lečenja (0. nedelja) i u 3. i 12. nedelji od početka lečenja.

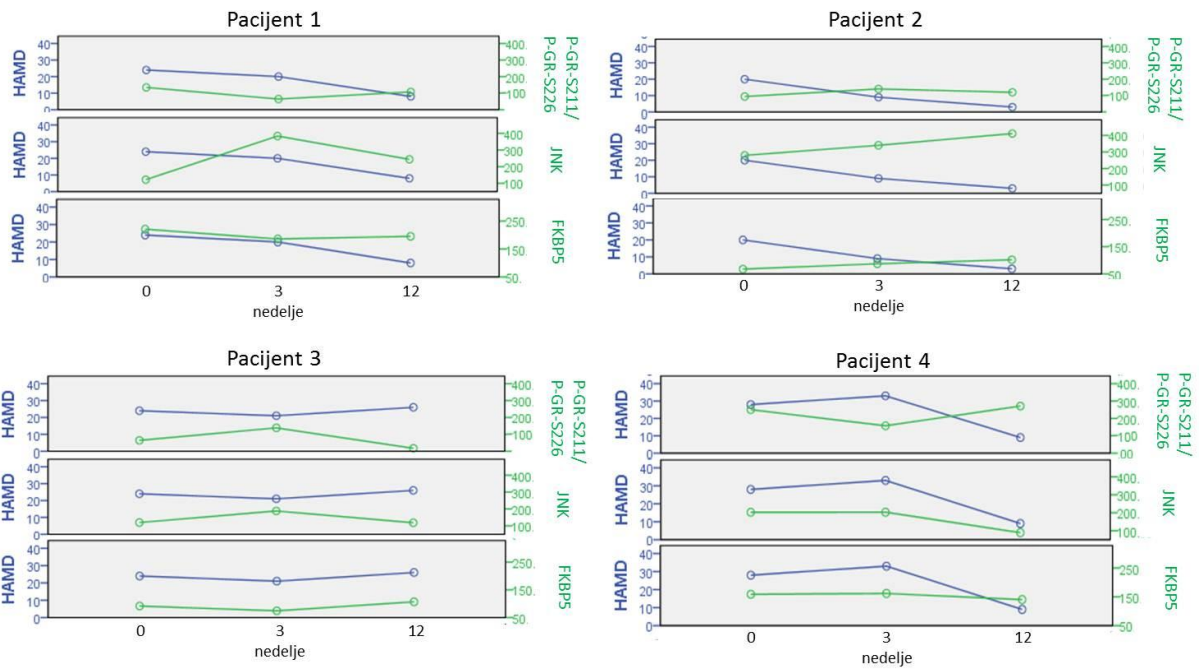
U periodu do 12 nedelje od početka rTMS protokola, kod pacijenata 1, 2 i 4. došlo je do postepenog povlačenja depresivnih simptoma uočenih pre početka rTMS terapije, što je potvrđeno i skorovima na skalama HAMD i DASS (mada, kako se posle pokazalo, kod pacijentkinje 4 ovo poboljšanje nije bilo stabilno), dok kod pacijentkinje 3 do poboljšanja nije došlo (Slika 22, a.). Što se tiče praćenih promena u molekulima u limfocitima, pokazano je da su promene u skorovima na HAMD-u u vremenu bile praćene promenama u odnosu fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, JNK signalizaciji u jedru i nivoima FKBP5 u citoplazmi (Tabela 21, Slike 22 i 23). Naime, sa poboljšanjem depresivnog stanja (tj. sa smanjenjem HAMD skora), došlo je do povećanja odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 i povećanja nivoa JNK1 i fosfo-JNK1 u jedru, a smanjenja nivoa FKBP5 u citoplazmi.



Slika 22. Psihometrijski podaci i reprezentativni Western blot-ovi analiziranih molekula u limfocitima pacijenata praćenih tokom lečenja primenom rTMS-a kao adjuvantne terapije. Za svakog od praćenih pacijenta predstavljeni su: (a.) skorovi na skalama HAMD i DASS (D – skala depresije, A – skala anksioznosti, S – skala stresa); (b.) reprezentativni Western blot-ovi jedarnog ukupnog GR-a, fosfo-GR-S211 (P-GR-S211) i fosfo-GR-S226 (P-GR-S226); (c.) reprezentativni Western blot-ovi jedarne ukupne JNK1 i fosfo-JNK1 (P-JNK); (d.) reprezentativni Western blot-ovi ukupnog GR-a i FKBP5 u citoplazmi. 0, 3, 12 – redni brojevi nedelje od početka rTMS protokola u kojima je vršena evaluacija analiziranih parametara.

Tabela 21. Rezultati GEE. Povezanost promena u skorovima na HAMD skali i nivoa proteina u limfocitima tokom vremena kod pacijenata lečenih rTMS-om. U statističkom modelu, molekularno biološki parametri su smatrani zavisnim varijablama, a HAMD skor i vreme su uzete kao kovarijti. Prikazane su vrednosti regresionog koeficijenta (B) i statistička značajnost testa (p). P-GR-S211 - fosfo-GR-S211; P-GR-S226 - fosfo-GR-S226; P-GR-S211/P-GR-S226 - odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226; P-JNK – fosfo-JNK1.

Uticaj promene HAMD-a na nivoce proteina		Vrednosti testa
citoplazma	GR	B=1.180; p=0.410
	FKBP5	B=1.159; p=0.002
jedro	GR	B=-1.596; p=0.093
	P-GR-S211	B=-1.146; p=0.200
	P-GR-S211/GR	B=0.210; p=0.930
	P-GR-S226	B=0.029; p=0.984
	P-GR-S226/GR	B=2.073; p=0.331
	P-GR-S211/P-GR-S226	B=-5.860; p<0.001
	JNK	B=-14.788; p<0.001
	P-JNK	B=-1.990; p=0.022
	P-JNK/JNK	B=0.484; p=0.725



Slika 23. Grafčki prikaz promena odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226), ukupnog nivoa JNK u jedru i nivoa FKBP5 u citoplazmi, zajedno sa promenama u skorovima na HAMD skali, kroz tri vremenske tačke (0., 3. i 12. nedelja od početka uzorkovanja krvi), za svakog pacijenta ponaosob.

5. Diskusija

Uprkos decenijama istraživanja, biološka osnova DP-a ostaje nedovoljno definisana, a klinički testovi zasnovani na biološkim promenama koji bi mogli pomoći u dijagnostici i praćenju lečenja ove bolesti još uvek nisu ustanovljeni. Ipak, jedan od najkonzistentnijih nalaza kod depresivnih pacijenata jeste narušena funkcija HHA ose koja je, bar delimično, posredovana narušenom signalizacijom preko GR-a. Imajući u vidu gore navedeno, kao i važnost fosforilacije za funkciju GR-a i rezultate prethodno dobijene u našoj laboratoriji koji pokazuju da izmenjena fosforilacija GR-a u hipokampusu i prefrontalnom korteksu doprinosi narušenoj regulaciji HHA ose tokom hronične socijalne izolacije kod pacova (Adzic i sar., 2009), u ovoj doktorskoj disertaciji je istraživana značaj fosforilacije GR-a u patogenezi depresije.

S obzirom na ograničenu dostupnost analize GR-a u mozgu kod ljudi, naša istraživanja smo izveli na limfocitima periferne krvi. Ipak, postavlja se pitanje u kojoj meri ima smisla analizirati ćelije periferne krvi u bolesti kao što je depresija, s obzirom da su simptomi koje zapažamo kod pacijenata posledica narušenih moždanih funkcija. Da bi se ovo opravdalo, treba imati u vidu sledeće činjenice koje podržavaju smislenost analize glukokortikoidne signalizacije u perifernim limfocitima kod pacijenata sa DP-om. Naime, još početkom 90-ih godina prošlog veka, pokazano je da je ekspresija GR-a u različitim moždanim strukturama i limfocita periferne krvi sličano regulisana (Lowy, 1990; Spencer i sar., 1991), a novija ispitivanja pokazuju da više od 80% gena je slično eksprimirano u mozgu i limfocitima periferne krvi, što ukazuje na sličnost u regulaciji mnogih ćelijskih procesa u ova dva tkiva (Gladkevich i sar., 2004; Liew i sar., 2006). Takođe, i sama istraživanja GR-a u depresiji pokazala su da je funkcija ovog receptora na sličan način narušena kako u mozgu tako i u perifernim leukocitima (Pariante i sar., 2001; Pariante, 2006). Uzajamni uticaj glukokortikoidne i citokinske signalizacije predstavlja još jedan razlog zašto bi analiza glukokortikoidne signalizacije u limfocitima mogla doprineti razumevanju patogeneze depresije (Pace i sar., 2007; Miller i sar., 2009). Konačno, važno je istaći i to da istraživanja na perifernim ćelijama sama po sebi mogu imati svoj praktičan klinički značaj. Potraga za adekvatnim panelom lako

dostupnih biomarkera koji će omogućiti lakšu dijagnozu, praćenje lečenja i identifikaciju osoba pod rizikom, vrlo je aktuelna danas u psihijatriji (Schmidt i sar., 2011). S toga, na naše istraživanje fosforilacije GR-a u limfocitima vezano za patogenezu depresije, možemo gledati i kao na ispitivanje jednog takvog potencijalnog biomarkera.

5.1. Razlike u glukokortikoidnoj signalizaciji između pacijenata sa akutnom epizodom depresivnog poremećaja u odnosu na zdrave kontrole

U našem uzorku, pacijenti su imali viši nivo jutarnjeg kortizola u poređenju sa kontrolama, što je u skladu sa rezultatima istraživanja decenijama unazad, koja su pokazala hiperaktivnost HHA ose kod većine depresivnih pacijenata (Bridges i Jones, 1966; Rubin i sar., 1987; Maes i sar., 1998; Holsboer, 2000). Povišeno lučenje kortizola u depresiji smatra se da je posledica povećanog lučenja CRH iz hipotalamusa, koje zatim dovodi do povećanog lučenja ACTH iz hipofize, a ovaj vodi preteranom lučenju kortizola iz adrenalne žlezde, za koju je takođe pokazano da je uvećana kod pacijenata sa depresijom (Nemeroff, 1996; Swaab i sar., 2005). Neki radovi pokazuju da starost može doprineti povećanom lučenju kortizola (Asnis i sar., 1981; Halbreich i sar., 1984; Sher i sar., 2004), međutim, u našem uzorku to izgleda nije bio slučaj. Naime, iako je grupa pacijenata bila starija od kontrola, razlike u koncentraciji kortizola između ove dve grupe bile su posledica depresije, a ne razlika u godinama.

Analize fosforilacije jedarnog GR-a u limfocitima periferne krvi pokazale su da je GR kod depresivnih pacijenata bio više fosforilisan na S226, kao i na S211, ali u manjoj meri, što je rezultiralo manjim odnosom fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, u poređenju sa kontrolama. Ove razlike u fosfo-GR-u su ostale stabilne i nakon korekcija za pol, starost, kortizol i pušenje. Povećanje fosforilacije GR-a na S226, a naročito smanjen odnos fosforilacije na S211 u odnosu na S226, sugeriše na smanjenu transkripcionu aktivnost GR-a u limfocitima periferne krvi pacijenata sa depresijom. Naime, mnoge *in vitro* studije na kulturama ćelija pokazale su da fosforilacija GR-a na S226 smanjuje maksimalnu transkripcionu aktivnost receptora na promotoru sa GRE (Chen i sar., 2008; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009; Avenant i sar., 2010). Taj efekat je bar delimično posredovan stimulacijom eksporta fosfo-GR-S226 iz jedra u

citoplazmu (Itoh i sar., 2002). Takođe, izmenjena fosforilacija GR-a na S211 i S226 utiče na različitu interakciju GR-a sa drugim transkripcionim faktorima, koaktivatorima, korepresorima i osnovnom transkripcionom mašinerijom, što konačno vodi drugačijoj ekspresiji gena i odgovoru ćelije na glukokortikode (Kino i sar., 2007; Chen i sar., 2008; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Zatim, pokazano je da fosforilacija GR-a kako na S211, tako i na S226, smanjuje efikasnost GR-a u transrepresiji, tj. ove fosforilacije mogu da inhibiraju interakcije GR-a sa AP-1 i NF κ B, glavnim transkripcionim faktorima uključenim u regulaciju ekspresije pro-inflamatornih gena (Avenant i sar., 2010). Na ovaj način izmenjena fosforilacija GR-a bi mogla doprineti i povećanoj ekspresiji pro-inflamatornih citokina, detektovanoj kod pacijenata sa depresijom (Schmidt i sar., 2011). Dakle, naši rezultati sugerišu da izmenjena fosforilacija GR-a može bar delimično doprinositi narušenoj glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima periferne krvi depresivnih pacijenata.

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je analizirala fosforilaciju GR-a na S211 i S226 kod pacijenata sa DP-om, mada fosforilacija GR-a na S211 već je analizirana u limfocitima periferne krvi pacijenata sa bipolarnim poremećajem (Bei i sar., 2009). Ova grupa naučnika je pokazala povećanje fosforilacije GR-a na S211 kroz sve tri faze bolesti (u depresivnoj epizodi, maničoj epizodi i remisiji – oporavku), pri čemu je povećanje bilo najizraženije kod pacijenata u akutnoj depresivnoj epizodi. Ipak, treba napomenuti da je teško neposredno porediti naše rezultate s obzirom na to da oni nisu analizirali fosforilaciju GR-a na S226, kao i to da su nivoe fosfo-GR-S211 normalizovali prema nivoima ukupnog GR-a u ćeliji, dok smo mi nivoe fosfo-izoforni normalizovali prema nivoima ukupnog jedarnog GR-a i prema nivoima jedarnog β -aktina. Takođe, interesantno je i to da je ista grupa naučnika nedavno pokazala da je interakcija GR-a sa hsp70 veća u limfocotima pacijenata sa bipolarnim poremećajem (kako kod onih u maničnoj, tako i kod onih u depresivnoj fazi bolest) što sugeriše da je zauzimanje pravilne konformacije GR-a u ovoj bolesti otežano (Bei i sar., 2013). Autori su predložili da kod pacijenata sa bipolarnim poremećajem zbog zauzimanja nepravilne konformacije GR-a, dolazi do otvaranja domena koji mogu olakšati pristup kinazama koje fosforilišu GR, što zatim doprinosi narušenoj fosforilaciji GR-a i konačno, njegovoj narušenoj funkciji (Bei i sar., 2013).

S obzirom da je fosforilacija na oba ispitivana epitopa, S211 i S226, stimulirana vezivanjem liganda za receptor, analizirali smo i uticaj koncentracije kortizola iz istih uzoraka krvi na fosforilaciju GR-a u limfocitima. Našli smo da postoji srednje jaka korelacija između fosforilacije GR-a na S226 i nivoa cirkulišućeg kortizola. To sugerira da bi povećanje kortizola kod pacijenata sa depresijom moglo delimično biti zaslužno za povećanje fosforilacije GR-a na ovom epitopu u limfocitima. Ipak, samo delimična povezanost fosforilacije GR-a na S226 i koncentracije kortizola u krvi, kao i izostanak povezanosti između fosforilacije GR-a na S211 i koncentracije kortizola, ukazuju na važnost i drugih mehanizama u regulaciji fosforilacije GR-a. Naime, drugi signalni putevi preko aktivacije odgovarajućih kinaza (JNK; p38, CDK i dr.) mogu menjati fosforilaciju GR-a i time modifikovati odgovor ćelije na glukokortikoide (Ismaili i Garabedian, 2004; Pace i sar., 2007; Adzic i sar., 2009). Aktivnost MDR PGP-a i 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze preko uticaja na intraćelijsku koncentraciju kortizola takođe bi mogli imati uticaja na fosforilaciju GR-a i uopšte modifikovati ćelijski odgovor na glukokortikoide (Pariante i sar., 2001; Pariante i sar., 2003; Zhang i sar., 2005). Bei i saradinici su takođe pokazali da koncentracija kortizola u krvi ne utiče na fosforilaciju GR-a na S211 u limfocitima pacijenata sa bipolarnim poremećajem (Bei i sar., 2009).

S obzirom da smo analizirali GR u limfocitima periferne krvi, teško je tvrditi u kojoj meri izmenjena fosforilacija GR-a utiče i na odgovor moždanih struktura na glukokortikoide. Ipak, studije na životinjskim modelima podržavaju pretpostavku da bi ovo mogao biti jedan od mehanizama narušene funkcije GR-a i u moždanim strukturama pacijenata sa depresijom. Naime, istraživanja u našoj laboratoriji su pokazala da hronična socijalna izolacija utiče na fosforilaciju GR-a u hipokampusu i prefrontalnom korteksu pacova, mada u ovom modelu, efekti hroničnog stresa na fosforilaciju GR-a bili su zavisni od pola (Adzic i sar., 2009; Mitic i sar., 2013). Ipak, normalizacija ponašanja nakon hroničnog tretmana fluoksetinom bila je praćena povećanjem odnosa fosfo-GR-S232/fosfo-GR-S246 u hipokampusu pacova oba pola izloženih socijalnoj izolaciji (Mitic i sar., 2013). Takođe, rezultati jedne druge, skoro objavljene studije, pokazuju da je antidepresivan efekat propolisa posredovan povećanjem odnosa fosfo-GR-S220 u odnosu na fosfo-GR-S234 (mišji ortolozi humanih fosfo-GR-211 i fosfo-GR-S226, respektivno) u hipokampusu, što je bilo

praćeno i smanjenjem kortikosterona (Lee i sar., 2013). Skupa, ovi rezultati sugerišu da bi izmenjen odnos fosforilacije GR-a na S211 i S226 mogao biti bitan mehanizam narušene glukokortikoidne signalizacije kako u limfocitima periferne krvi, tako i u mozgu, i od važnosti za razumevanje patogeneze depresije i delovanja različitih antidepresivnih supstanci.

U našem uzorku, ukupan nivo jedarnog GR-a u limfocitima pacijenta sa DP-om nije se razlikovao od kontrola, ali je ukupn nivo GR-a u citoplazmi bio veći kod depresivanih pacijenata. Ovo povećanje nivoa GR-a u citoplazmi sugeriše na smanjnu translokaciju GR-a iz citoplazme u jedro kod pacijenata sa depresijom. Detektovano povećanje GR-a u citoplazmi može biti posledica i povećane sinteze ili/i smanjene degradacije receptora. Kao što je već pomenuto, fosforilacija GR-a na S226 stimuliše eksport GR-a iz jedra nakon pada koncentracije hormona (Itoh i sar., 2002), pa možemo pretpostaviti da bi povećanje jedarnog nivoa fosfo-GR-S226 moglo bar delimično doprineti povećanom eksportu GR-a iz jedra u citoplazmu, tokom cirkadijalnog ritma promena u koncentraciji kortizola. Drugi faktor koji je takode mogao doprineti smanjenoj translokaciji GR-a u jedro kod pacijenata sa DP-om je povećan nivo FKBP5 u istim uzorcima citoplazme (Davies i sar., 2002; Storer i sar., 2011) (videti kasnije). U svakom slučaju, smanjena translokacija GR-a u jedro govori u prilog smanjene aktivnosti ovog receptora i verovatno predstavlja još jedan mehanizam koji može doprineti glukokortikoidnoj rezistenciji zapaženoj kod depresivnih pacijenata.

Analize GR-a u kojima su korišćeni eseji vezivanja liganda za GR iz lizata celih ćelija ili citosola pokazale su da je broj molekula GR-a sposobnih da vežu ligand smanjen ili nepromenjen u ćelijama periferne krvi pacijenata sa depresijom (Pariante and Miller, 2001; Calfa i sar., 2003). U našoj studiji nivo GR-a u citoplazmi meren je tehnikom *Western blot*-a, tako da naše rezultate ne možemo direktno porediti sa rezultatima eseja za vezivanje liganda. Naime, tehnikom *Western blot*-a dobija se ukupan nivo proteina u ćeliji, dok eseji za vezivanje mere broj molekula receptora sposobnih da vežu ligand, a poznato je da sposobnost GR-a da veže ligand zavisi i od drugih faktora, kao što su njegove interakcije sa šaperonima (Grad i Picard, 2007). Ono što bismo mogli da zaključimo iz naših rezultata, a u svetlu ranije izvedenih studija vezivanja liganda za GR, jeste da povećanje citosoplazmatičnog nivoa GR-a u

limfocitima pacijenata sa DP-om ne mora da znači da su ti molekuli GR-a funkcionalni, tj. sposobni da odgovore na glukokortikoide.

Dosadašnje studije ekspresije gena za GR-a u ćelijama periferne krvi pacijenata u akutnoj epizodi depresije pokazale su ili smanjen nivo njegove iRNK (Matsubara i sar., 2006; Cattaneo i sar., 2013) ili da nema promena (Frodl i sar., 2012), tako da je malo verovatno da povećanje citosolnog GR-a zapaženo u našem uzorku je uzrokovano povećanjem transkripcije njegovog gena.

Još jedna od mogućnosti jeste da povećanje GR-a u citoplazmi može biti posledica njegove smanjene degradacije. Stimulacija receptora ligandom dovodi do značajnog smanjenja poluživota GR-a, pri čemu je pokazano da fosforilacije GR-a na S211 i S226 nemaju uticaja na ovaj proces (Hoeck i sar., 1989; Webster i sar., 1997; Avenant i sar., 2010). S obzirom da neki radovi ukazuju na smanjenu sposobnost GR-a za vezivanje liganda kod pacijenata sa depresijom (Pariante i Miller, 2001; Calfa i sar., 2003), moguće je da je u takvim uslovima i degradacija GR-a usporena što bi moglo da predstavlja još jedan razlog za povećanu količinu citoplazmatičnog GR-a uočenog u našoj studiji.

Nivoi ukupnog GR-a u citoplazmi i jedru nisu bili povezani sa koncentracijom kortizola u krvi, kod naših ispitanika. Ovo nije bilo iznenađujuće, s obzirom da ni u postojećoj literaturi nije pokazana jasna veza između nivoa GR-a u ćeliji (tj. nivoa iRNK za GR ili broja GR-a sposobnih da vežu ligand) i koncentracije kortizola u krvi (Tanaka i sar., 1991; Yehuda i sar., 1993; Blackhurst i sar., 2001; Miller i sar., 2008). Takođe, u ćelijama u kulturi pokazano je da ultradijalni pulsevi kortizola nemaju značajnog efekat na količinu proteina GR-a u ćeliji (McMaster i sar., 2011). Kao što je gore već pomenuto, i aktivnosti MDR PGP-a i 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze mogu uticati na intraćelijsku koncentraciju kortizola, pa time i na ukupnu količinu GR-a u ćeliji (Pariante i sar., 2001; Pariante i sar., 2003; Zhang i sar., 2005).

S obzirom da je fosforilacija GR-a na S226 posredovana JNK-om, u istim uzorcima ćelija smo analizirali i nivoe ukupne i fosforilisane JNK1. Nismo pronašli razlike u nivoima ukupne i aktivirane forme JNK1 u citoplazmi, ali su zato depresivni pacijenti imali značajno snižen nivo jedarne JNK1. Uprkos ovom smanjenju ukupne JNK1, u jedru pacijenata, detektovali smo trend povećanja aktivirane JNK1 (tj. povišen odnos fosfo-JNK1/JNK1). Međutim, nakon korekcija za pol, starost i pušenje, ova

razlika više nije bila statistički značajna. Smanjenje ukupne jedarne JNK1 (46 kDa) u perifernim limfocitima zapaženo je i kod bipolarnih pacijenta u akutnoj epizodi depresije (Spiliotaki i sar., 2006), mada u ovom radu fosforilacija JNK1 nije bila analizirana. Dakle, izgleda da je smanjena ekspresija JNK1 u limfocitima povezana sa akutnom depresivnom epizodom kako kod unipolarne depresije tako i kod bipolarnog poremećaja. Takođe, naši rezultati su pokazali slabu pozitivnu povezanost između nivoa aktivirane JNK1 (tj. odnosa fosfo-JNK1/JNK1) i povećanja fosforilacije GR-a na S226, ali ipak, ona nije bila statistički značajna. Moguće je da i druge izoforme JNK imaju ulogu u fosforilaciji GR-a na S226, mada rezultati na životinjskim modelima pokazuju da su JNK 1 i 2 uglavnom slično regulisane u stresnim situacijama (Adzic i sar., 2009; Mitic i sar., 2013). Još jedna od mogućnosti je to da smanjena aktivnost fosfataza može imati uticaja na povećanje fosforilacije GR-a na S226 (DeFranco i sar., 1991). Ipak, s obzirom na to da je pokazano da je JNK posrednik u efektima citokina na funkciju GR-a, iako naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost ova dva puta, pretpostavljamo da dalja istraživanja signalizacije JNK-a u većem uzorku, zajedno sa GR-om, kao i drugim transkripcionim faktorima važnim za regulaciju imunog odgovora, mogu doprineti boljem razumevanju mehanizama interakcije glukokortikoidne i citokinske signalizacije u depresiji.

Želeći da dalje ispitamo posledice izmenjene fosforilacije GR-a u depresiji, analizirali smo i nivo GILZ proteina, za koga je poznato da je stimulisan glukokortikoidima i da je delom posrednik njihovih anti-inflamatornih efekata. Ipak, u našem uzorku nismo detektovali značajne razlike ni u GILZ1, ni u GILZ2 iz perifernih limfocita pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom u odnosu na zdrave kontrole. Dakle, izgleda da promene u fosforilaciji GR-a kod pacijenata nisu doprinele promenama u ekspresiji GILZ proteina. Iako bi bilo informativnije da je meren i nivo iRNK za GILZ, u jedinom skorašnjem radu pokazano je da nema razlika u nivoima iRNK za GILZ između ćelija periferne krvi pacijenata sa depresijom i kontrola (Frodl i sar., 2012). Međutim, u ovom radu je pokazano da je kod pacijenta sa depresijom ekspresija GILZ-a iz krvnih ćelija povezana sa zapreminom hipokampusa, i to tako što su pacijenti sa manjom ekspresijom GILZ-a imali veću atrofiju hipokampusa (Frodl i sar., 2012). Dakle, moguće je da je ekspresija GILZ-a povezana sa specifičnim karakteristikama/promenama kod depresivnih pacijenata koje mi nismo analizirali u ovoj

istraživanju. Ipak, na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da promene u fosforilaciji GR-a nisu uticale na promene u nivou GILZ proteina u limfocitima pacijenata sa depresijom.

U ovoj studiji smo analizirali i FKBP5, još jedan protein koji je snažno stimulisan glukokortikoidima, a važan je za samu funkciju GR-a kao deo kratke povratne sprege u zauzdavanju glukokortikoidne signalizacije u ćeliji. Naši rezultati su pokazali značajno više nivoe FKBP5 kod pacijenta u akutnoj epizodi depresije u poređenju sa kontrolama. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa skorašnjom studijom koja je takođe pokazala značajno povećan nivo iRNK za FKBP5 u ćelijama periferne krvi pacijenata u akutnoj depresiji (Cattaneo i sar., 2013). Povećana ekspresija FKBP5, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina, uočena je i u *postmortem* uzorcima frontalnog korteksa kod depresivnih pacijenata (Tatro i sar., 2009). Dakle, izgleda da povećana je ekspresija FKBP5, kako u mozgu (frontalnom korteksu) tako i u perifernim limfocitima, povezan sa patogeneom depresije i verovatno doprinosi smanjenom odgovoru na glukokortikoide kod pacijenata.

Što se tiče uloge fosforilacije GR-a u ekspresiji FKBP5, naši rezultati su pokazali da je nivo FKBP5 pozitivno povezan sa nivoima fosforilacije GR-a na S211 i S226, a negativno sa odnosom fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S22. Dakle, suprotno od onoga što bismo očekivali na osnovu dosadašnje literature, tj. smanjenje odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru izgleda da nije doprinelo smanjenju ekspresije FKBP5. Iako nismo analizirali direktno nivoe iRNK za FKBP5, na osnovu prethodnih studija (Tatro i sar., 2009; Cattaneo i sar., 2013) možemo pretpostaviti da je povećanje nivoa ovog proteina kod depresivnih pacijenata u našem istraživanju posledica povećane transkripcije njegovog gena. Moguće je da povećanje fosforilacije GR na S211 i/ili S226 u okviru ovog gena pokazuje neke genski-specifične efekte i doprinosi povećanoj ekspresiji ovog gena, međutim za sud o tome potrebna su dodatna molekularno-biološka istraživanja. Druga mogućnost je da postoje drugi mehanizmi, nezavisno od fosforilacije GR-a, koji doprinose većoj ekspresiji FKBP5 proteina kod pacijenata sa depresijom, kao što su određeni polimorfizmi u *fkbp5* genu ili uticaj epigenetičkih modifikacija (Binder, 2009; Xie i sar., 2010; Zimmermann i sar., 2011).

U svakom slučaju, funkcionalna posledica povećanja nivoa FKBP5 u limfocitima pacijenata sa DP-om u našem uzorku je izgleda smanjena translokacija GR-

a u jedro, budući da je pokazana jaka pozitivna povezanost između nivoa FKBP5 i GR-a u citoplazmi. Naime, povećanje FKBP5 u citoplazmi pokazano je da smanjuje afinitet GR-a za kortizol i sprečava njegov prelazak u jedro (Wochnik i sar., 2005). Stoga, povećanje FKBP5 kod pacijenata sa depresijom predstavlja još jedan faktor koji bi mogao doprineti neadekvatnom odgovoru na glukokortikoide, preko uticaja na translokaciju GR-a, kod ovih pacijenata.

Dakle, kod pacijenata sa akutnom epizodom depresije uočili smo povećanu fosforilaciju jedarnog GR-a na S226 i u manjoj meri na S211, što je rezultovalo smanjenim odnosom fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru, kao i povećan nivo GR-a i FKBP5 u citoplazmi limfocita. Drugim rečima, naši rezultati sugerišu da ova dva mehanizma - izmenjena fosforilacija GR-a i njegova smanjena translokacija u jedro, doprinose smanjenoj funkciji GR-a i narušenom odgovoru na glukokortikoide u depresiji.

5.2. Povezanost promena u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima i negativnim afektivnim stanjima kod zdravih ispitanika

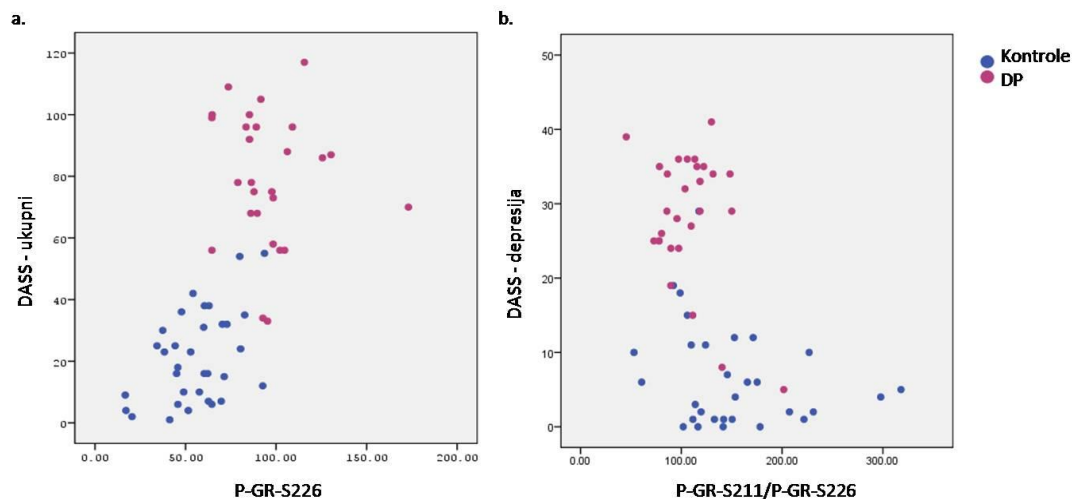
Određen stepen narušenosti glukokortikoidne signalizacije uočen je i kod zdravih ljudi izloženih hroničnom stresu i negativnim emocijama (Holsboer, 2000; Cole i sar., 2007; Miller i sar., 2008). S obzirom na to, prepostavili smo da bi određena povezanost izmenjene fosforilacije GR-a, i negativnih emotivnih stanja, kao faktora rizika za kasniju pojavu depresije, mogla postojati i u populaciji zdravih ljudi.

U grupi kontrolnih ispitanika, žene su imale nešto više nivoa trenutnih samoprocenjenih simptoma depresije, anksioznosti i stresa u poređenju sa muškarcima, što je u skladu sa mnogim ranijim studijama (Horwath i Weissman, 1995; Brown, 2001; Crawford i Henry, 2003; Kessler, 2003). S obzirom da istraživanja pokazuju da žene imaju negativniju sliku o sebi i sklonije su ruminaciji o stresnim životnim događajima (Nolen-Hoeksema, 2001; Matud, 2004; Roelofs i sar., 2008), kao i to da oko dva puta češće oboljevaju od depresije (Kessler, 2003), nije neobično što smo i u našem uzorku primetili veću sklonost žena ka negativnim emotivnim stanjima.

Iako se muškarci i žene nisu razlikovali po nivoima ukupnog GR-a u jedru i citoplazmi, kao ni po fosforilaciji jedarnog GR-a, u uzorku žena, promene u fosforilaciji

GR-a u limfocitima korelisale su sa nivoima njihovih negativnih emocija. Naime, kod žena, nivoi jedarne izoforme fosfo-GR-S226 bili su pozitivno povezani sa nivoima simptoma depresije, anksioznosti i stresa, dok je odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 bio negativno povezan sa simptomima depresije. Ovo povećanje fosfo-GR-S226 izoforme sa negativnim emotivnim stanjima, verovatno je najvećim delom posledica povećane fosforilacije jedarnog GR-a na S226, bar što se tiče simptoma depresije i stresa (sudeći po trendu pozitivne korelacije odnosa fosfo-GR-S226/GR sa skorovima depresije i stresa na DASS-u). U svakom slučaju, povećanje nivoa fosfo-GR-S226, a naročito u odnosu na fosfo-GR-S211 sugerise na smanjenje transkripcione aktivnosti GR-a sa povećanjem nivoa negativnih emocija kod žena. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa ranijim nalazima da su negativna emotivna stanja u populaciji klinički zdravih ljudi povezana sa smanjenom ekspresijom gena regulisanih GR-om, a povećanom ekspresijom gena regulisanih NFκB-om u leukocitima periferne krvi (Cole i sar., 2007; Miller i sar., 2008; Antoni i sar., 2012). Na primer, pokazano je da je kod staratelja pacijenata sa rakom mozga, koji su bili izloženi hroničnom stresu, postojala smanjena ekspresija gena za koje je bioinformatičkim analizama utvrđeno da su regulisani GR-om (Miller i sar., 2008). S druge strane, ekspresija gena za koje je utvrđeno da su regulisani NFκB-om, bila je povećana, a pomenute promene nisu bile povezane sa razlikama u lučenju kortizola, niti sa ekspresijom GR-a (Miller i sar., 2008). Do sličnih rezultata se došlo i u istraživanjima sprovedenim kod usamljenih ljudi koji su pokazivali i povišene nivoe simptoma depresije i stresa (Cole i sar., 2007). Autori ovih studija su predložili da bi stresom-indukovane post-translacione modifikacije GR-a mogle objasniti razlike koje su oni uočili u svojoj studiji (Cole i sar., 2007; Miller i sar., 2008). Naši rezultati ukazuju da bi prethodno izložena hipoteza zaista mogla biti tačna, tj. da post-translacione modifikacije GR-a mogu biti uzrok njegove smanjene transkripcione aktivnosti u limfocitima zdravih ljudi izloženih hroničnom stresu i sa povišenim nivoima negativnih emocija, barem kod žena. Naime, kao što je već spomenuto, povećana fosforilacija GR-a na S226 (a naročito u odnosu na S211) smanjuje efikasnost GR-a u transaktivaciji, zatim, fosfo-GR-S226 ima smanjenu efikasnost u transrepsiji (NFκB-a i AP-1), a i stimuliše eksport receptora iz jedra, što sve konačno vodi smanjenom odgovoru na glukokortikoide (Itoh i sar., 2002; Ismaili i Garabedian, 2004; Chen i sar., 2008; Avenant i sar., 2010). Na osnovu naših rezultata o

fosforilaciji GR-a kod kontrolnih ispitanika, a imajući u vidu i rezultate dobijene na limfocitima pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom, možemo predložiti i sledeću hipotezu: povećanje fosforilacije GR-a na S226, a naročito u odnosu na fosfo-GR-S211, doprinosi povećanoj glukokortikoidnoj rezistenciji koja se zapaža i u populaciji zdravih ljudi sa subkliničkim simptomima depresije, a dalje povećanje fosforilacije GR-a na S226, koje verovatno doprinosi još većoj glukokortikoidnoj rezistenciji, povezano je sa kliničkom depresijom (Slika 24). Drugim rečima, naši rezultati preliminarno predlažu da bi povećanje nivoa fosfo-GR-S226 i smanjenje odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 mogli biti faktori rizika za kasniju pojavu kliničke depresije (i narušenu aktivnost HHA ose), barem što se tiče žena.



Slika 24. Grafički prikaz fosforilacije GR-a i nivoa trenutnih negativnih afektivnih stanja merenih DASS-om u celom uzorku ispitanika. (a) Povezanost nivoa fosfo-GR-S226 (P-GR-S226) i ukupnog skora na sve tri DASS skal (DASS – ukupni); (b) povezanost odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 (P-GR-S211/P-GR-S226) i skorova na skali depresije (DASS – depresija). Prikazane su posebno grupa kontrola (plavo), a posebno grupa pacijenata sa akutnom epizodom depresije (ljubičasto).

Značajna povezanost fosforilacije GR-a sa negativnim emotivnim stanjima nije zapažena u grupi zdravih muškaraca. Ovakav nalaz sugerise da možda postoji polna razlika u povezanosti signalizacije koja dovodi do fosforilacije GR-a na S226 sa povećanjem nivoa negativnih emocija. Ovaj rezultat bi mogao biti povezan i sa već dokumentovanim nalazom da je kod žena, nakon izlaganja stresu, osetljivost pro-inflamatornih citokina na supresorne efekte glukokortikoida manja, u odnosu na muškarace (Rohleder i sar., 2001). Naime, moguće je da povećanje fosforilacije GR-a

na S226, kod žena, doprinosi većoj rezistenciji na imuno-supresorne efekte glukokortikoida, preko smanjene efikasnosti transrepresije pro-inflamatornih transkripcionih faktora NF κ B i AP-1 (Avenant i sar., 2010). Takođe je moguće i obrnuto, da produžena sistemska inflamacija, kod žena nakon izlaganja stresu, doprinosi povećanoj fosforilaciji GR-a na S226 (Pace i sar., 2007).

Drugo potencijalno objašnjenje bi moglo biti da ne postoje polne razlike u samoj signalizaciji vezanoj za fosforilaciju GR-a, već se muškaraci i žene razlikuju u prisećanju i saopštavanju negativnih emocija (Lutzky i Knight, 1994; Shields, 2000). Međutim, s obzirom da je naš uzorak sadržao mali broj ispitanika, kao i to da su primećene razlike samo deskriptivne, pretpostavku o uticaju polnih razlika na povezanost fosforilacije GR-a sa negativnim emocijama, trebalo bi dalje ispitati na većem uzorku.

Posmatrajući samo kontrolnu grupu, promene u merenim parametrima glukokortikoidne signalizacije nisu bile povezane sa koncentracijom kortizola u serumu, verovatno usled malog variranja vrednosti koncentracija kortizola, s jedne strane i nivoa ukupnog GR-a i njegovih fosfo-izoforni, s druge. Takođe, ovaj rezultat ide u prilog zaključku da funkcija GR-a u limfocitima zavisi i od drugih mehanizama, osim same dostupnosti njegovog liganda (kortizola) u krvi (videti poglavlje 5.1.).

Povezanost između negativnih emotivnih stanja, s jedne strane, i nivoa ukupnog GR-a u jedru ili citoplazmi, kao i nivoa JNK-a, GILZ-a ili FKBP5, s druge, nije bila primećena, tako da je od analiziranih parametara, fosforilacija GR-a izgleda najjače povezana sa povećanjem subkliničkih simptoma depresije kod zdravih ljudi.

5.3. Promene u glukokortikoidnoj signalizaciji u limfocitima tokom lečenja pacijenata primenom ponovljene transkranijalne magnetne stimulacije kao adjuvantne terapije

U cilju daljeg ispitivanja uloge fosforilacije GR-a u patogenezi DP-a, kao i mogućnosti da neki od ispitivanih molekula, činilaca glukokortikoidne signalizacije, služi kao biomarker za dijagnozu i praćenje odgovora na tretman u depresiji, promene ovih parametara smo pratili i u grupi pacijenata sa DP-om, tokom njihovog lečenja rTMS-om kao adjuvantnom metodom uz redovno propisanu terapiju antidepresivima.

Iako je uzorak pacijenata koje smo pratili tokom terapije depresije bio mali da bismo doneli jasne zaključke, rezultati su pokazali da se odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u limfocitima povećavao sa smanjenjem HAMD skora, tj. sa poboljšanjem depresivnog stanja pacijenata. S obzirom da se odnos fosforilacije GR-a na S211 u odnosu na S226 smatra markerom njegove transkripcione aktivnosti, povećanje fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 sugerise na pojačanje glukokortikoidne signalizacije tokom uspešnog lečenja. Drugim rečima, ovo potvrđuje našu pretpostavku da narušena fosforilacija GR-a predstavlja jedan od bitnih činilaca u patogenezi depresivnog stanja, kao i bitnu metu delovanja uspešnog antidepressivnog tretmana. Takođe, ovi rezultati su u saglasnosti sa već prethodno pomenutim rezultatima dobijenim na životinjskim modelima koji su pokazali da antidepressivan efekat kako fluoksetina tako i propilisa je praćen povećanjem mišjih/pacovskih ortologa fosfo-GR-S211 u odnosu na fosfo-GR-S226 u hipokampusu laboratorijskih životinja (Lee i sar., 2013; Mitic i sar., 2013). Dakle, naši rezultati, zajedno sa pomenutim rezultatima na životinjskim modelima, ukazuju da je antidepressivni efekat različitih tretmana (antidepressiva, propilisa i rTMS-a) praćen sličnim promenama u fosforilaciji GR-a (koje sugerisu o povećanju njegove transkripcione aktivnosti) kako u mozgu (hipokampusu) tako i u limfocitima periferne krvi. Takođe, skupa, ovi nalazi predlažu da bi praćenje fosforilacije GR u leukocitima možda mogao biti jedan od biomarkera uspešnog odgovora na antidepressivni tretman.

Iako su rezultati poređenja pacijenata u akutnoj epizodi depresije sa kontrolama pokazali najveće razlike u nivou fosfo-GR-S226 u limfocitima, oporavak pacijenata tokom lečenja nije bio značajno povezan sa promenama u samoj fosforilaciji GR-a na S226. S obzirom da je ovaj uzorak bio mali, ne možemo sa sigurnošću znati koja je dinamika promene same fosforilacije GR-a na S226 tokom oporavka od tretmana i za ispitivanje ovog pitanja potrebna su dalja istraživanja u većem uzorku.

Takođe, iako su pacijenti sa akutnom epizodom depresije pokazali povišen nivo GR-a u citoplazmi limfocita, povezanost promena u nivou citoplazmatičnog GR-a i težini depresivnih simptoma tokom lečenja pacijenata nisu uočene.

Promene u JNK1 signalizaciji u limfocitima pratile su poboljšanje depresije tokom lečenja. Tačnije, poboljšanje depresivnog stanja je bilo praćeno porastom ukupne jedarne JNK1, kao i fosforilisane JNK1. Ipak, odnos fosfo-JNK1/JNK1 nije pokazao značajnu korelaciju sa promenama HAMD skora. Dakle, uprkos tome što su rezultati

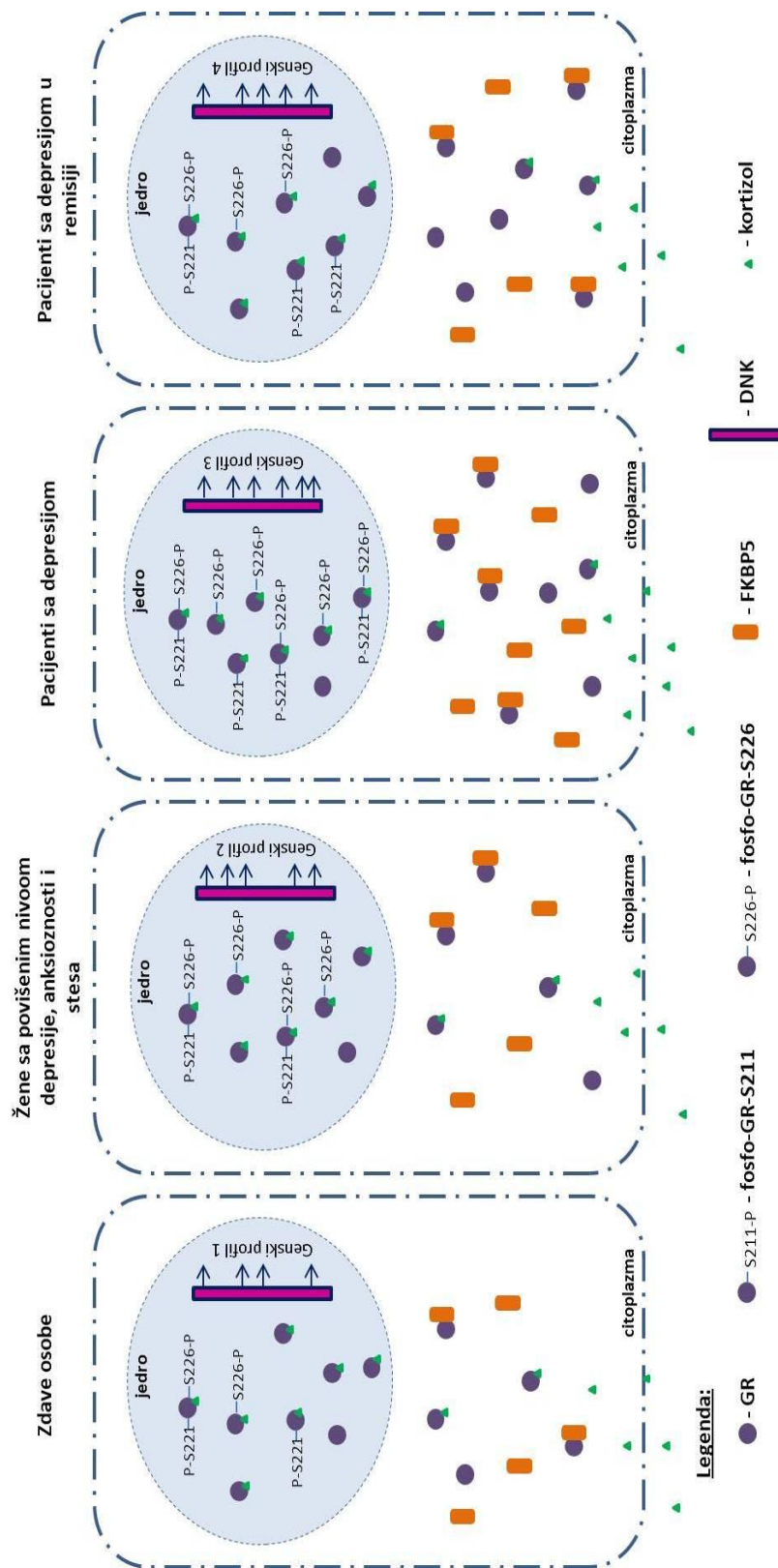
ukazivali na povećanje signalizacije preko JNK1, došlo je do porasta odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 sa oporavkom od depresije, što sugeriše na uticaj i drugih mehanizama koji su mogli doprineti promeni odnosa ovih fosfo-izoforni GR-a. Uočeno povećanje ukupnog nivoa JNK1 sa oporavkom od depresije slično je nalazu da kod bipolarnih pacijenata u remisiji, nivoi JNK1 (46 kDa) su viši nego kod pacijenata u akutnoj depresivnoj epizodi (Spiliotaki i sar., 2006). Povećanje jedarne JNK1 uočeno je i nakon hroničnog tretmana antidepresivima (fluoksetinom) u hipokampusu pacova izloženih hroničnoj izolaciji (Mitic i sar., 2013). Takođe, povećana ekspresija JNK1 gena uočena je i u strijatumu pacova nakon akutnog tretmana sa nekoliko vrsta antidepresiva (Korostynski i sar., 2013). Dakle, izgleda da je smanjenje simptoma depresije kako pacijenata sa unipolarnom depresijom, tako i sa bipolarnim poremećajem, praćeno povećanjem JNK1 u limfocitima, a izgleda da su te promene slične onima koje se dešavaju u nekim regionima mozga, i zajedničke su za različite tretmane lečenja.

Promene u nivou depresivnih simptoma tokom lečenja rTMS-om bile su praćene i promenama u FKBP5, i to tako što je poboljšanje depresije bilo praćeno smanjenjem FKBP5 u limfocitima. Sličan rezultat je pokazan i u jednoj opsežnoj studiji: naime, Cattaneo i saradici su pokazali da uspešan antidepresivan tretman, nezavisno od korišćenog leka (SSRI ili TCA), dovodi do smanjenja nivoa iRNK za FKBP5 u limfocitima pacijenta sa depresivnim poremećajem (Cattaneo i sar., 2013). Takođe, povišen nivo FKBP5 je bio uočen u ventralnom hipokampusu i prefrontalnom korteksu pacova izloženih hroničnom umerenom stresu, a dugotrajn tretman antidepresivom duloksetinom, doveo je do smanjenja iRNK za FKBP5 u obe spomenute moždane strukture, kao i do smanjenja nivoa proteina FKBP5 u prefrontalnom korteksu (Guidotti i sar., 2013). Dakle, izgleda da je smanjenje FKBP5 važno za oporavak od depresije, a promene u nivou FKBP5 u limfocitima izgleda da su slične promenama ovog proteina u moždanim strukturama (tj. hipokampusu).

Rezultati ovog preliminarog prospektivnog istraživanja su pokazali da se u limfocitima pacijenata sa depresijom, odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, kao i ukupan nivo jedarne JNK1, povećavaju, a nivo citoplazmatskog FKBP5 smanjuje, sa smanjenjem simptoma depresije, tokom lečenja antidepresivima i rTMS-om kao adjuvantnom terapijom. Iako kod ovih pacijenata koncentracija kortizola u krvi nije bila

merena, dobijeni rezultati o promenama odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru i nivoa FKBP5 proteina u citoplazmi ukazuju na normalizaciju funkcije GR-a i HHA ose tokom izlječenja.

Šematski prikaz najvažnijih rezultata ove doktorske teze i pretpostavljene posledice uočenih molekularnih pomena u limfocitima zdravih ljudi i pacijenata sa depresijom prikazane su na Slici 25.



Slika 25. Šematski prikaz najvažnijih rezultata i pretpostavljene posledice uočenih molekularnih promena u limfocitima zdravih ljudi i pacijenata sa depresijom. (a) Kod zdravih osoba, u jedru postoji odedeni nivo fosfoilisanog GR-a, što vodi određenoj šemi genske ekspresije (genski profil 1). U citoplazmi, postoji određeni nivo FKBP5 koji negativno reguliše aktivaciju GR-a, tj. vezivanje hormona i prelazak aktiviranog GR-a u jedro. (b) Kod žena sa povišenim nivoima simptoma depresije, anksioznosti i stresa, u jedru postoji viši nivo fosfo-GR-S226, dok je odnos fosfo-GR-S211/ fosfo-GR-S226 niži, što se može pretpostaviti da vodi drugačijoj šemi ekspresije gena (genski profil 2). (c) Kod pacijenata sa depresijom, nivo fosfo-GR-S226 je još veći, a takođe su povišeni i nivoi fosfo-GR-S211/ fosfo-GR-S226 još niži, što se može pretpostaviti da opet utiče na promene u ekspresiji gena (genski profil 3). U citoplazmi, postoji povećan nivo GR-a i FKBP5, što sugerise da je i pored povećanog nivo kortizola u krvi povećava što veovatno vodi promenama i u genskoj ekspresiji (genski profil 4). U citoplazmi, nivo FKBP5 se snižava, što verovatno doprinosi većoj mogućnosti aktivacije GR-a.

5.4. Ograničenja studije

Osim već diskutovanih ograničenja rezultata ove studije, treba napomenuti i sledeća.

Ograničanjem ovog istraživanja može se smatrati to što su svi pacijenti bili lečeni u trenutku ulaska u studiju. Idelno bi bilo da smo imali pacijente sa akutnom epizodom depresije, nelečene, i da smo ih pratili tokom antidepresivnog tretmana. Ipak, sakupljanje ovakvog uzorka izuzetno je teško. Međutim, i rezultati dobijeni u ovoj studiji imaju određenu snagu. Prvo, lekovi korišćeni za terapiju pacijenata bili su raznovrsni, a takođe i trajanje farmakoterapije je bilo varijabilno. Drugo, rezultati dobijeni praćenjem pacijenta tokom lečenja antidepresivima i rTMS-om kao adjuvantnom terapijom, sugerišu da su promene u fosforilaciji GR-a, kao u nivoima JNK1 i FKBP5 koje smo uočili kod pacijenata sa akutnom epizodom depresije, pre vezane za samo depresivno stanje, nego za njihovu farmakoterapiju, i da se menaju sa poboljšanjem depresivnih simptoma. Do sličnih zaključaka su došli i autori drugih studija sa sličnim eksperimentalnim dizajnom (poređenje lečenih pacijenata sa akutnom depresijom i kontrola) i sugerisali da promene uočene kod pacijenata sa depresijom lečenih različitim antidepresivima, koje ukazuju na smanjenje glukokortikoidne signalizacije, pre odražavaju stanje same bolesti, nego efekat antidepresiva (Menke i sar., 2012) (s obzirom da je pokazano da antidepresivi radije podstiču glukokortikoidnu signalizaciju, nego što je smanjuju (Pariante i Miller, 2001; Anacker i sar., 2011)). Takođe, i u radu Bei i saradnika, pokazano je da su promene u fosforilaciji GR-a na S211 kod pacijenata sa bipolarnim poremećajem bile vezane za stanje bolesti, a ne za korišćenu farmakoterapiju (Bei i sar., 2009). Konačno, povezanost fosforilacije GR-a na S226 i odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 sa depresivnom simptomatologijom merenom DASS-om uočili smo i kod zdravih, nelečenih žena. Sve navedeno podržava pretpostavku da uočene promene u signalizaciji GR-a između pacijenata sa akutnom depresijom i kontrolnih ispitanika su pre povezane sa samom bolešću nego sa efektom lekova. Ipak, bar delimičan uticaj lekova na naše rezultate ne može u potpunosti biti isključen.

Takođe, još jedno ograničenje studije je to što su žene bile izmešane u odnosu na faze menstrualnog ciklusa i korišćenje kontraceptivnih sredstava. Međutim, iako je

pokazano da ženski polni hormoni mogu uticati na fosforilaciju GR-a (Chen i sar, 2008; Zhang i sar., 2009), u našem uzorku nismo uočili polne razlike u ukupnim nivoima GR fosforilisanog na S211 i S226 kod zdravih ispitanika (već samo povezanost psihološkog stanja žena sa fosforilacijom GR-a), niti je pokazan značajan efekat pola na promene u fosforilaciji GR-a kod pacijenata sa akutnom epizodom depresije. Ipak, uticaj polnih hormona na dobijene rezultate se ne može u potpunosti isključiti.

Što se tiče korišćenja fosforilacije GR-a kao jednog od potencijalnih biomarkera za otkrivanje osoba s rizikom za razvoj DP-a, postavljanje dijagnoze akutne epizode depresije i praćenje poboljšanja depresivnih simptoma tokom tretmana pacijenata, treba imati u vidu i sledeća ograničenja. Iako rezultati ove teze sugerišu na fosforilaciju GR-a kao potencijalnog biomarkera DP-a, potrebne su dalje analize: npr. potvrda ovog rezultata korišćenjem drugih kvantitativnih proteomskih tehnika (Jin i sar., 2005), zatim analiza fosforilacije GR-a u većem uzorku i kod različitih subtipova depresije (npr. u melanhovičnoj u odnosu na atipičnu depresiju), kao i u drugim poremećajima čija je etiologija povezana sa stresom (kako bi se stekao uvid u specifičnost promene fosforilacije GR-a za DP, ili određeni podtip DP-a). Takođe, fosforilacija GR-a u ovoj studiji izražavana je relativno u odnosu na IRS, koji je proizvoljno napravljen, dok bi za praktičnu primenu analize fosforilacije GR-a za kliničke svrhe bilo neophodno razviti eseje za apsolutnu kvantifikaciju fosforilacije ovog proteina (Gerber i sar, 2003; Olive, 2004). Dakle, praktična primena fosforilacije GR-a kao biomarkera DP-a za sada još treba sačekati dalja ispitivanja kao i razvoj kvantitativnih eseja za lakšu analizu fosfo-GR-a.

6. Zaključak

Rezultati ove doktorske disertacije govore u prilog tome da izmenjena fosforilacija GR-a može doprineti boljem razumevanju narušene funkcije GR-a u patogenezi depresivnog poremećaja. Konkretno, zaključci ove doktorske teze su sledeći:

1. Pacijenti sa akutnom depresivnom epizodom imali su povećanu fosforilaciju GR-a na S226, i u manjoj meri na S211, te zbog toga smanjen odnos izoformi fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru limfocita periferne krvi, što ukazuje na smanjenu transkripcionu aktivnost GR-a kod ovih pacijenata.
2. Pacijenti sa akutnom depresivnom epizodom, iako nisu pokazali razlike u nivoima jedarnog GR-a, imali su povećan nivo GR-a u citoplazmi limfocita periferne krvi u odnosu na kontrole, što je bilo povezano sa povećanjem fosforilacije jedarnog GR-a na S226 i povećanjem nivoa FKBP5 u citoplazmi, i što sve sugeriše na smanjenu translokaciju GR-a u jedro.
3. Pacijenti sa akutnom depresivnom epizodom imali su smanjen nivo JNK1 i trend povećane aktivnosti JNK1 u jedru limfocita periferne krvi u odnosu na kontrole, mada povećanje fosforilacije GR-a na S226 kod ovih pacijenata nije bilo statistički značajno povezano sa povećanjem aktivnosti JNK1.
4. Nivoi proteina GILZ se nisu razlikovali između limfocita periferne krvi pacijenata sa akutnom epizodom depresije i zdravih kontrola.
5. Pacijenti sa akutnom depresivnom epizodom imali su povećan nivo FKBP5 u citoplazmi limfocita periferne krvi, što takođe sugeriše na smanjenu funkciju GR-a kod ovih pacijenata.
6. Kod zdravih žena, povećan nivo jedarnog GR-a fosforilisanog na S226 u limfocitima periferne krvi bio je povezan sa povećanim nivoima trenutnih samoprocenjenih simptoma depresije, anksioznosti i stresa, a smanjenje odnosa fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 je bilo povezano sa povećanjem nivoa simptoma depresije.
7. Sa poboljšanjem depresivnog stanja kod pacijenata lečenih rTMS-om kao adjuvantnom metodom uz redovnu terapiju antidepresivima, došlo je do povećanja

jedarnog odnosa izoformi fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226, kao i povećanja nivoa JNK1 u jedru, a smanjenja nivoa FKBP5 u citoplazmi limfocita periferne krvi, što ukazuje na oporavak funkcije GR-a sa izlječenjem od depresije.

Pored toga što naši rezultati govore u prilog značaja fosforilacije GR-a za razumevanje narušene funkcije GR-a u patogenezi depresije, oni takođe ukazuju da bi fosforilacija GR-a mogla biti jedan od potencijalnih biomarkera za identifikaciju osoba sa rizikom, dijagnostiku depresivnog poremećaja, kao i praćenje oporavka depresivnih pacijenata, i da je zbog toga fosforilacija GR-a vredna daljih ispitivanja u većem uzorku i različitim dizajnima kliničkih istraživanja.

Literatura:

- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M., Krstic-Demonacos, M., 2009. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol* 202, 87-97.
- Ahmed, S.A., Hissong, B.D., Verthelyi, D., Donner, K., Becker, K., Karpuzoglu-Sahin, E., 1999. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5, 681-686.
- Alesci, S., Martinez, P.E., Kelkar, S., Ilias, I., Ronsaville, D.S., Listwak, S.J., Ayala, A.R., Licinio, J., Gold, H.K., Kling, M.A., Chrousos, G.P., Gold, P.W., 2005. Major depression is associated with significant diurnal elevations in plasma interleukin-6 levels, a shift of its circadian rhythm, and loss of physiological complexity in its secretion: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2522-2530.
- Almlof, T., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., 1995. Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 17535-17540.
- Anacker, C., Zunszain, P.A., Carvalho, L.A., Pariante, C.M., 2011. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36, 415-425.
- Anacker, C., Zunszain, P.A., Cattaneo, A., Carvalho, L.A., Garabedian, M.J., Thuret, S., Price, J., Pariante, C.M., 2011. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry* 16, 738-750.
- Anisman, H., Merali, Z., Hayley, S., 2008. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 85, 1-74.
- Antoni, M.H., Lutgendorf, S.K., Blomberg, B., Carver, C.S., Lechner, S., Diaz, A., Stagl, J., Arevalo, J.M., Cole, S.W., 2012. Cognitive-behavioral stress

- management reverses anxiety-related leukocyte transcriptional dynamics. *Biol Psychiatry* 71, 366-372.
- Asnis, G.M., Sachar, E.J., Halbreich, U., Nathan, R.S., Novacenko, H., Ostrow, L.C., 1981. Cortisol secretion in relation to age in major depression. *Psychosom Med* 43, 235-242.
- Asselin-Labat, M.L., Biola-Vidamment, A., Kerbrat, S., Lombes, M., Bertoglio, J., Pallardy, M., 2005. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol* 19, 1752-1764.
- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., Woodcock, J., Zeger, S.L., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69 (3), 89–95.
- Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., Hapgood, J.P., 2010. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 327, 72-88.
- Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., Riccardi, C., 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98, 743-753.
- Ayroldi, E., Riccardi, C., 2009. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 23, 3649-3658.
- Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., Riccardi, C., 2007. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* 117, 1605-1615.
- Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., Riccardi, C., 2002. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* 22, 7929-7941.
- Barrientos, R.M., Sprunger, D.B., Campeau, S., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2003. Brain-derived neurotrophic factor mRNA

- downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* 121, 847-853.
- Beger, C., Gerdes, K., Lauten, M., Tissing, W.J., Fernandez-Munoz, I., Schrappe, M., Welte, K., 2003. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol* 122, 245-252.
- Bei, E., Salpeas, V., Pappa, D., Anagnostara, C., Alevizos, V., Moutsatsou, P., 2009. Phosphorylation status of glucocorticoid receptor, heat shock protein 70, cytochrome c and Bax in lymphocytes of euthymic, depressed and manic bipolar patients. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1162-1175.
- Bei, E.S., Salpeas, V., Alevizos, B., Anagnostara, C., Pappa, D., Moutsatsou, P., 2013. Pattern of heat shock factor and heat shock protein expression in lymphocytes of bipolar patients: Increased HSP70-glucocorticoid receptor heterocomplex. *J Psychiatr Res* 47, 1725-1736.
- Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M.C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., Peuchmaur, M., Riccardi, C., Emilie, D., 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101, 729-738.
- Berton, O., Nestler, E.J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7, 137-151.
- Besedovsky, H.O., del Rey, A., 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17, 64-102.
- Bierhaus, A., Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P.M., Petrov, D., Ferstl, R., von Eynatten, M., Wendt, T., Rudofsky, G., Joswig, M., Morcos, M., Schwaninger, M., McEwen, B., Kirschbaum, C., Nawroth, P.P., 2003. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1920-1925.
- Binder, E.B., 2009. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S186-195.

- Binder, E.B., Bradley, R.G., Liu, W., Epstein, M.P., Deveau, T.C., Mercer, K.B., Tang, Y., Gillespie, C.F., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., Schwartz, A.C., Cubells, J.F., Ressler, K.J., 2008. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA* 299, 1291-1305.
- Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Putz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M.A., Nickel, T., Kunzel, H.E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Baghai, T., Deiml, T., Zill, P., Bondy, B., Rupprecht, R., Messer, T., Kohnlein, O., Dabitz, H., Bruckl, T., Muller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J.C., Lohmussaar, E., Strom, T.M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., Muller-Myhsok, B., 2004. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36, 1319-1325.
- Biola, A., Lefebvre, P., Perrin-Wolff, M., Sturm, M., Bertoglio, J., Pallardy, M., 2001. Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol* 15, 1062-1076.
- Blackhurst, G., McElroy, P.K., Fraser, R., Swan, R.L., Connell, J.M., 2001. Seasonal variation in glucocorticoid receptor binding characteristics in human mononuclear leucocytes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 683-688.
- Blind, R.D., Garabedian, M.J., 2008. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 150-157.
- Bode, L., Durrwald, R., Rantam, F.A., Ferszt, R., Ludwig, H., 1996. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry* 1, 200-212.
- Bonaccorso, S., Puzella, A., Marino, V., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Levvero, M., Egyed, B., Bosmans, E., Meltzer, H.Y., Maes, M., 2001. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. *Psychiatry Res* 105, 45-55.

- Bosker, F.J., Westerink, B.H., Cremers, T.I., Gerrits, M., van der Hart, M.G., Kuipers, S.D., van der Pompe, G., ter Horst, G.J., den Boer, J.A., Korf, J., 2004. Future antidepressants: what is in the pipeline and what is missing? *CNS Drugs* 18, 705-732.
- Bostwick, J.M., Pankratz, V.S., 2000. Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *Am J Psychiatry* 157, 1925-1932.
- Boyle, M.P., Brewer, J.A., Funatsu, M., Wozniak, D.F., Tsien, J.Z., Izumi, Y., Muglia, L.J., 2005. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 473-478.
- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., Stowe, Z.N., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., Schwartz, A., Cubells, J.F., Ressler, K.J., 2008. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 65, 190-200.
- Brady, L.S., Gold, P.W., Herkenham, M., Lynn, A.B., Whitfield, H.J., Jr., 1992. The antidepressants fluoxetine, idazoxan and phenelzine alter corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain: therapeutic implications. *Brain Res* 572, 117-125.
- Bridges, P.K., Jones, M.T., 1966. The diurnal rhythm of plasma cortisol concentration in depression. *Br J Psychiatry* 112, 1257-1261.
- Brown, C.S., 2001. Depression and anxiety disorders. *Obstet Gynecol Clin North Am* 28, 241-268.
- Bruna, A., Nicolas, M., Munoz, A., Kyriakis, J.M., Caelles, C., 2003. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J* 22, 6035-6044.
- Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Kajta, M., Lason, W., 2000. Antidepressant drugs inhibit glucocorticoid receptor-mediated gene transcription - a possible mechanism. *Br J Pharmacol* 130, 1385-1393.
- Calfa, G., Kademian, S., Ceschin, D., Vega, G., Rabinovich, G.A., Volosin, M., 2003. Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in

- patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology* 28, 687-701.
- Cannon, J.G., St Pierre, B.A., 1997. Gender differences in host defense mechanisms. *J Psychiatr Res* 31, 99-113.
- Capuron, L., Gummick, J.F., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Reemsnyder, A., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., 2002. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology* 26, 643-652.
- Carroll, J., 1982. Clinical applications of the dexamethasone suppression test for endogenous depression. *Pharmacopsychiatry* 15, 19-24.
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K.J., Craig, I.W., Anacker, C., Zunsztain, P.A., McGuffin, P., Pariante, C.M., 2013. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology* 38, 377-385.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 259-284.
- Chen, B., Dowlatsahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T., 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50, 260-265.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K., Garabedian, M.J., 2008. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol* 22, 1754-1766.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- Cheung, J., Smith, D.F., 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14, 939-946.
- Cohen, J., 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

- Cole, S.W., Hawkey, L.C., Arevalo, J.M., Sung, C.Y., Rose, R.M., Cacioppo, J.T., 2007. Social regulation of gene expression in human leukocytes. *Genome Biol* 8, R189.
- Cook, S.C., Wellman, C.L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60, 236-248.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 695-698.
- Crawford, J.R., Henry, J.D., 2003. The Depression Anxiety Stress Scales (DASS): normative data and latent structure in a large non-clinical sample. *Br J Clin Psychol* 42, 111-131.
- Cusin, C., Yang, H., Yeung, A., Fava, M. (2009) Rating Scales for Depression. In: Baer l., Blais M.A., editors. *Handbook of Clinical Rating Scales and Assessment in Psychiatry and Mental Health*. New York: Humana Press.
- D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., Riccardi, C., 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7, 803-812.
- Dai, R., Frejtag, W., He, B., Zhang, Y., Mivechi, N.F., 2000. c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *J Biol Chem* 275, 18210-18218.
- Danner, M., Kasl, S.V., Abramson, J.L., Vaccarino, V., 2003. Association between depression and elevated C-reactive protein. *Psychosom Med* 65, 347-356.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9, 46-56.
- Davies, T.H., Ning, Y.M., Sanchez, E.R., 2002. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 277, 4597-4600.
- Davis, R.J., 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301.
- DeFranco, D.B., Qi, M., Borrer, K.C., Garabedian, M.J., Brautigan, D.L., 1991. Protein phosphatase types 1 and/or 2A regulate nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* 5, 1215-1228.
- Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P., Riccardi, C., 2004. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* 104, 4134-4141.
- Denny, W.B., Valentine, D.L., Reynolds, P.D., Smith, D.F., Scammell, J.G., 2000. Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* 141, 4107-4113.
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3, 375-383.
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Radojicic, M.B., 2012. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology* 66, 112-119.
- Dranovsky, A., Hen, R., 2006. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59, 1136-1143.
- Drevets, W.C., 1998. Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. *Annu Rev Med* 49, 341-361.
- Drouin, J., Sun, Y.L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De Lean, A., Nemer, M., Schmidt, T.J., 1993. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12, 145-156.
- Duma, D., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 11-21.
- Duman, R.S., 2004. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56, 140-145.
- Duman, R.S., Voleti, B., 2012. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35, 47-56.

- Dwivedi, Y., Rao, J.S., Rizavi, H.S., Kotowski, J., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., Pandey, G.N., 2003. Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60, 273-282.
- Eickelberg, O., Roth, M., Lorx, R., Bruce, V., Rudiger, J., Johnson, M., Block, L.H., 1999. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274, 1005-1010.
- Engler, H., Bailey, M.T., Engler, A., Stiner-Jones, L.M., Quan, N., Sheridan, J.F., 2008. Interleukin-1 receptor type 1-deficient mice fail to develop social stress-associated glucocorticoid resistance in the spleen. *Psychoneuroendocrinology* 33, 108-117.
- Epstein, J., Pan, H., Kocsis, J.H., Yang, Y., Butler, T., Chusid, J., Hochberg, H., Murrough, J., Strohmayer, E., Stern, E., Silbersweig, D.A., 2006. Lack of ventral striatal response to positive stimuli in depressed versus normal subjects. *Am J Psychiatry* 163, 1784-1790.
- Euteneuer, F., Schwarz, M.J., Hennings, A., Riemer, S., Stapf, T., Selberdinger, V., Rief, W., Depression, cytokines and experimental pain: evidence for sex-related association patterns. *J Affect Disord* 131, 143-149.
- Fava, M., Kendler, K.S., 2000. Major depressive disorder. *Neuron* 28, 335-341.
- Fink, G., Sumner, B.E., Rosie, R., Grace, O., Quinn, J.P., 1996. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol* 16, 325-344.
- Fiol, D.F., Mak, S.K., Kultz, D., 2007. Specific TSC22 domain transcripts are hypertonically induced and alternatively spliced to protect mouse kidney cells during osmotic stress. *FEBS J* 274, 109-124.
- Focking, M., Holker, I., Trapp, T., 2003. Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 720-723.

- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M.J., 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286, 1155-1158.
- Franklin, T.B., Perrot-Sinal, T.S., 2006. Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. *Psychoneuroendocrinology* 31, 38-48.
- Frodl, T., Carballo, A., Hughes, M.M., Saleh, K., Fagan, A., Skokauskas, N., McLoughlin, D.M., Meaney, J., O'Keane, V., Connor, T.J., 2012. Reduced expression of glucocorticoid-inducible genes GILZ and SGK-1: high IL-6 levels are associated with reduced hippocampal volumes in major depressive disorder. *Transl Psychiatry* 2, e88.
- Frodl, T., Schule, C., Schmitt, G., Born, C., Baghai, T., Zill, P., Bottlender, R., Rupprecht, R., Bondy, B., Reiser, M., Moller, H.J., Meisenzahl, E.M., 2007. Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry* 64, 410-416.
- Gallagher-Beckley, A.J., Cidlowski, J.A., 2009. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61, 979-986.
- Gardner, K.L., Thirivikraman, K.V., Lightman, S.L., Plotsky, P.M., Lowry, C.A., 2005. Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience* 136, 181-191.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P., 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (12), 6940-6945.
- Gladkevich, A., Kauffman, H.F., Korf, J., 2004. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 559-576.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.

- Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7, 254-275.
- Gold, P.W., Wong, M.L., Chrousos, G.P., Licinio, J., 1996. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry* 1, 257-264.
- Gormley, G.J., Lowy, M.T., Reder, A.T., Hospelhorn, V.D., Antel, J.P., Meltzer, H.Y., 1985. Glucocorticoid receptors in depression: relationship to the dexamethasone suppression test. *Am J Psychiatry* 142, 1278-1284.
- Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12, 3642-3650.
- Grad, I., Picard, D., 2007. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275, 2-12.
- Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Pariante, C.M., Riva, M.A., 2013. Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 38, 616-627.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., Davis, R.J., 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15, 2760-2770.
- Gupta, S., Gollapudi, S., 1993. P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *J Clin Immunol* 13, 289-301.
- Hajszan, T., MacLusky, N.J., Leranth, C., 2005. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 21, 1299-1303.
- Halbreich, U., Asnis, G.M., Zumoff, B., Nathan, R.S., Shindlecker, R., 1984. Effect of age and sex on cortisol secretion in depressives and normals. *Psychiatry Res* 13, 221-229.
- Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23, 56-62.

- Harbuz, M.S., Chover-Gonzalez, A.J., Jessop, D.S., 2003. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation. *Ann N Y Acad Sci* 992, 99-106.
- Heim, C., Mletzko, T., Purselle, D., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., 2008. The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biol Psychiatry* 63, 398-405.
- Heim, C., Newport, D.J., Heit, S., Graham, Y.P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2000. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* 284, 592-597.
- Heim, C., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 2004. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 641-648.
- Heine, V.M., Zareno, J., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P.J., 2005. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci* 21, 1304-1314.
- Heitzer, M.D., Wolf, I.M., Sanchez, E.R., Witchel, S.F., DeFranco, D.B., 2007. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 321-330.
- Henry, J.D., Crawford, J.R., 2005. The short-form version of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS-21): construct validity and normative data in a large non-clinical sample. *Br J Clin Psychol* 44, 227-239.
- Heuser, I., Yassouridis, A., Holsboer, F., 1994. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 28, 341-356.
- Hoeck, W., Rusconi, S., Groner, B., 1989. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment. *J Biol Chem* 264, 14396-14402.
- Hollenberg, S.M., Evans, R.M., 1988. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F., Barden, N., 1996. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17, 187-205.

- Holsboer, F., Lauer, C.J., Schreiber, W., Krieg, J.C., 1995. Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology* 62, 340-347.
- Horwath, E., Weissman, M.M. (1995) Epidemiology of depression and anxiety disorders. In: Tsuang M.T., Tohen M., Zahner G.E.P., editors. *Textbook in Psychiatric Epidemiology*. New York: Wiley.
- Hubler, T.R., Scammell, J.G., 2004. Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids. *Cell Stress Chaperones* 9, 243-252.
- Ip, Y.T., Davis, R.J., 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-219.
- Ising, M., Depping, A.M., Siebertz, A., Lucae, S., Unschuld, P.G., Kloiber, S., Horstmann, S., Uhr, M., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., 2008. Polymorphisms in the FKBP5 gene region modulate recovery from psychosocial stress in healthy controls. *Eur J Neurosci* 28, 389-398.
- Ismaili, N., Garabedian, M.J., 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 86-101.
- Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., Imai, K., 2002. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 16, 2382-2392.
- Jin, M., Bateup, H., Padovan, J.C., Greengard, P., Nairn, A.C., Chait, B.T., 2005. Quantitative Analysis of Protein Phosphorylation in Mouse Brain by Hypothesis-Driven Multistage Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7845-7851.
- Johnson, G.L., Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Johnson, J.D., Campisi, J., Sharkey, C.M., Kennedy, S.L., Nickerson, M., Greenwood, B.N., Fleshner, M., 2005. Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* 135, 1295-1307.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P., 1990. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

- Jorge, R.E., Robinson, R.G., Moser, D., Tateno, A., Crespo-Facorro, B., Arndt, S., 2004. Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry* 61, 42-50.
- Joyce, P.R., Mulder, R.T., McKenzie, J.M., Luty, S.E., Cloninger, C.R., 2004. Atypical depression, atypical temperament and a differential antidepressant response to fluoxetine and nortriptyline. *Depress Anxiety* 19, 180-186.
- Juruena, M.F., Cleare, A.J., Pariante, C.M., 2004. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr* 26, 189-201.
- Kalinyak, J.E., Dorin, R.I., Hoffman, A.R., Perlman, A.J., 1987. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem* 262 (22), 10441-10444.
- Kajantie, E., Phillips, D.I., 2006. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 31, 151-178.
- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J.M., 2002. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109, 143-148.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Prescott, C.A., 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156, 837-841.
- Kendler, K.S., Thornton, L.M., Prescott, C.A., 2001. Gender differences in the rates of exposure to stressful life events and sensitivity to their depressogenic effects. *Am J Psychiatry* 158, 587-593.
- Kennedy, N., Abbott, R., Paykel, E.S., 2004. Longitudinal syndromal and sub-syndromal symptoms after severe depression: 10-year follow-up study. *Br J Psychiatry* 184, 330-336.
- Kessler, R.C., 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48, 191-214.
- Kessler, R.C., 2003. Epidemiology of women and depression. *J Affect Disord* 74, 5-13.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., 2003. The epidemiology of major depressive

- disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289, 3095-3105.
- Kessler, R.C., Bromet, E.J., 2013. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health* 34, 119-138.
- Kim, D.R., Pesiridou, A., O'Reardon, J.P., 2009. Transcranial magnetic stimulation in the treatment of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep* 11, 447-452.
- Kino, T., Ichijo, T., Amin, N.D., Kesavapany, S., Wang, Y., Kim, N., Rao, S., Player, A., Zheng, Y.L., Garabedian, M.J., Kawasaki, E., Pant, H.C., Chrousos, G.P., 2007. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol Endocrinol* 21, 1552-1568.
- Klein, E., Kreinin, I., Chistyakov, A., Koren, D., Mecz, L., Marmur, S., Ben-Shachar, D., Feinsod, M., 1999. Therapeutic efficacy of right prefrontal slow repetitive transcranial magnetic stimulation in major depression: a double-blind controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 56, 315-320.
- Klink, R., Robichaud, M., Debonnel, G., 2002. Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: effects of gender and pregnancy. *Neuropharmacology* 43, 1119-1128.
- Kolbus, A., Blazquez-Domingo, M., Carotta, S., Bakker, W., Luedemann, S., von Lindern, M., Steinlein, P., Beug, H., 2003. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 102, 3136-3146.
- Kornstein, S.G., Schatzberg, A.F., Thase, M.E., Yonkers, K.A., McCullough, J.P., Keitner, G.I., Gelenberg, A.J., Davis, S.M., Harrison, W.M., Keller, M.B., 2000. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 157, 1445-1452.
- Korostynski, M., Piechota, M., Dzbek, J., Mlynarski, W., Szklarczyk, K., Ziolkowska, B., Przewlocki, R., 2013. Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs. *BMC Genomics* 14, 606.

- Krett, N.L., Pillay, S., Moalli, P.A., Greipp, P.R., Rosen, S.T., 1995. A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 55, 2727-2729.
- Krishnan, K.R., Doraiswamy, P.M., Lurie, S.N., Figiel, G.S., Husain, M.M., Boyko, O.B., Ellinwood, E.H., Jr., Nemeroff, C.B., 1991. Pituitary size in depression. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 256-259.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2011. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 7, 121-147.
- Krstic, M.D., Rogatsky, I., Yamamoto, K.R., Garabedian, M.J., 1997. Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 17, 3947-3954.
- Kudielka, B.M., Kirschbaum, C., 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69, 113-132.
- Kupfer, D.J., Frank, E., Phillips, M.L., 2012. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379, 1045-1055.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R., 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Ladd, C.O., Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122, 81-103.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam, R.W., Mok, H., 2008. *Depression*. Oxford New York: Oxford University Press Inc.
- Lečić Toševski, D., Đukić Dejanović, S., Nedić, A., Mihajlović, G., Špirić, G., Damjanović, A., Pejović Milovančević, M., Crnobarić, C., Stanojević, A., Čabak, B., Simić, S., 2011. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za

- dijagnostikovanje i lečenje depresije; Grbeša G., Lisulov R., Velimirović M., editors. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije.
- Lee, M.S., Kim, Y.H., Park, W.S., Ahn, W.G., Park, O.K., Kwon, S.H., Morita, K., Shim, I., Her, S., 2013. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 217853.
- Lee, S.Y., Kang, J.S., Song, G.Y., Myung, C.S., 2006. Stress induces the expression of heterotrimeric G protein beta subunits and the phosphorylation of PKB/Akt and ERK1/2 in rat brain. *Neurosci Res* 56, 180-192.
- Lekman, M., Laje, G., Charney, D., Rush, A.J., Wilson, A.F., Sorant, A.J., Lipsky, R., Wisniewski, S.R., Manji, H., McMahon, F.J., Paddock, S., 2008. The FKBP5-gene in depression and treatment response--an association study in the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) Cohort. *Biol Psychiatry* 63, 1103-1110.
- Li, H., Zhang, L., Huang, Q., 2009. Differential expression of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the hippocampus of rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res* 205, 32-37.
- Li, Y.W., Fitzgerald, L., Wong, H., Lelas, S., Zhang, G., Lindner, M.D., Wallace, T., McElroy, J., Lodge, N.J., Gilligan, P., Zaczek, R., 2005. The pharmacology of DMP696 and DMP904, non-peptidergic CRF1 receptor antagonists. *CNS Drug Rev* 11, 21-52.
- Liew, C.C., Ma, J., Tang, H.C., Zheng, R., Dempsey, A.A., 2006. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 147, 126-132.
- Little, A., 2009. Treatment-resistant depression. *Am Fam Physician* 80, 167-172.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.
- Liu, Z., Zhu, F., Wang, G., Xiao, Z., Wang, H., Tang, J., Wang, X., Qiu, D., Liu, W., Cao, Z., Li, W., 2006. Association of corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene SNP and haplotype with major depression. *Neurosci Lett* 404, 358-362.

- Lopez, J.F., Chalmers, D.T., Little, K.Y., Watson, S.J., 1998. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43, 547-573.
- Lovibond, P.F., Lovibond, S.H., 1995. The structure of negative emotional states: comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories. *Behav Res Ther* 33, 335-343.
- Lovibond, S.H., Lovibond, P.F., 1995. Manual for the Depression Anxiety Stress Scales. Sydney: Psychology Foundation.
- Lowy, M.T., 1990. Reserpine-induced decrease in type I and II corticosteroid receptors in neuronal and lymphoid tissues of adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 51, 190-196.
- Lu, N.Z., Cidlowski, J.A., 2005. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18, 331-342.
- Lu, N.Z., Cidlowski, J.A., 2006. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16, 301-307.
- Lutzky, S.M., Knight, B.G., 1994. Explaining gender differences in caregiver distress: the roles of emotional attentiveness and coping styles. *Psychol Aging* 9, 513-519.
- Maes, M., 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* 461, 25-46.
- Maes, M., Bosmans, E., De Jongh, R., Kenis, G., Vandoolaeghe, E., Neels, H., 1997. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 9, 853-858.
- Maes, M., Kubera, M., Mihaylova, I., Geffard, M., Galecki, P., Leunis, J.C., Berk, M., 2012. Increased autoimmune responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: Implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression. *J Affect Disord* 149, 23-29.
- Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., van Hunsel, F., Van Gastel, A., Delmeire, L., Biondi, M., Bosmans, E., Kenis, G., Scharpe, S., 1998. Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and

- patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand* 98, 328-335.
- Magarinos, A.M., Deslandes, A., McEwen, B.S., 1999. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371, 113-122.
- Magarinos, A.M., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E., 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16, 3534-3540.
- Magee, J.A., Chang, L.W., Stormo, G.D., Milbrandt, J., 2006. Direct, androgen receptor-mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element. *Endocrinology* 147, 590-598.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.
- Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S.G., Russell, J., 2007. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract* 61, 2030-2040.
- Malkoski, S.P., Dorin, R.I., 1999. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 13, 1629-1644.
- Matsubara, T., Funato, H., Kobayashi, A., Nobumoto, M., Watanabe, Y., 2006. Reduced Glucocorticoid Receptor alpha Expression in Mood Disorder Patients and First-Degree Relatives. *Biol Psychiatry* 59, 689-695.
- Matud, M.P., 2004. Gender differences in stress and coping styles. *Personality and Individual Differences* 37, 1401-1415.
- McCauley, J., Kern, D.E., Kolodner, K., Dill, L., Schroeder, A.F., DeChant, H.K., Ryden, J., Derogatis, L.R., Bass, E.B., 1997. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 277, 1362-1368.
- McEwen, B.S., 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22, 105-122.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M.J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid

- receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12, 342-348.
- McKay, L.I., Cidlowski, J.A., 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12, 45-56.
- McKinnon, M.C., Yucel, K., Nazarov, A., MacQueen, G.M., 2009. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34, 41-54.
- McMaster, A., Jangani, M., Sommer, P., Han, N., Brass, A., Beesley, S., Lu, W., Berry, A., Loudon, A., Donn, R., Ray, D.W., 2011. Ultradian cortisol pulsatility encodes a distinct, biologically important signal. *PLoS One* 6, e15766.
- Menke, A., Arloth, J., Putz, B., Weber, P., Klengel, T., Mehta, D., Gonik, M., Rex-Haffner, M., Rubel, J., Uhr, M., Lucae, S., Deussing, J.M., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., Binder, E.B., 2012. Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood is a sensitive marker for glucocorticoid receptor resistance in depressed patients. *Neuropsychopharmacology* 37, 1455-1464.
- Meyers, C.A., Albitar, M., Estey, E., 2005. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 104, 788-793.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65, 732-741.
- Miller, A.H., Vogt, G.J., Pearce, B.D., 2002. The phosphodiesterase type 4 inhibitor, rolipram, enhances glucocorticoid receptor function. *Neuropsychopharmacology* 27, 939-948.
- Miller, A.L., Webb, M.S., Copik, A.J., Wang, Y., Johnson, B.H., Kumar, R., Thompson, E.B., 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19, 1569-1583.

- Miller, G.E., Chen, E., Sze, J., Marin, T., Arevalo, J.M., Doll, R., Ma, R., Cole, S.W., 2008. A functional genomic fingerprint of chronic stress in humans: blunted glucocorticoid and increased NF-kappaB signaling. *Biol Psychiatry* 64, 266-272.
- Miller, G.E., Chen, E., Zhou, E.S., 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull* 133, 25-45.
- Mitic, M., Simic, I., Djordjevic, J., Radojicic, M.B., Adzic, M., 2013. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology* 70, 100-111.
- Mittelstadt, P.R., Ashwell, J.D., 2001. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276, 29603-29610.
- Modell, S., Lauer, C.J., Schreiber, W., Huber, J., Krieg, J.C., Holsboer, F., 1998. Hormonal response pattern in the combined DEX-CRH test is stable over time in subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 18, 253-262.
- Motivala, S.J., Sarfatti, A., Olmos, L., Irwin, M.R., 2005. Inflammatory markers and sleep disturbance in major depression. *Psychosom Med* 67, 187-194.
- Moylan, S., Maes, M., Wray, N.R., Berk, M., 2013. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry* 18, 595-606.
- Mullen, P.E., Martin, J.L., Anderson, J.C., Romans, S.E., Herbison, G.P., 1996. The long-term impact of the physical, emotional, and sexual abuse of children: a community study. *Child Abuse Negl* 20, 7-21.
- Muller, O.G., Parnova, R.G., Centeno, G., Rossier, B.C., Firsov, D., Horisberger, J.D., 2003. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *J Am Soc Nephrol* 14, 1107-1115.
- Murgatroyd, C., Patchev, A.V., Wu, Y., Micale, V., Bockmuhl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C.T., Almeida, O.F., Spengler, D., 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12, 1559-1566.

- Murray, C.J., Lopez, A.D., 1996. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274, 740-743.
- Musselman, D.L., Lawson, D.H., Gumnick, J.F., Manatunga, A.K., Penna, S., Goodkin, R.S., Greiner, K., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., 2001. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* 344, 961-966.
- Nakagawa, S., Kim, J.E., Lee, R., Malberg, J.E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22, 3673-3682.
- Nemeroff, C.B., 1996. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry* 1, 336-342.
- Nemeroff, C.B., Krishnan, K.R., Reed, D., Leder, R., Beam, C., Dunnick, N.R., 1992. Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. *Arch Gen Psychiatry* 49, 384-387.
- Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., Vale, W., 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342-1344.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Newton, S.S., Thome, J., Wallace, T.L., Shirayama, Y., Schlesinger, L., Sakai, N., Chen, J., Neve, R., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2002. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J Neurosci* 22, 10883-10890.
- Nolen-Hoeksema, S., 2001. Gender Differences in Depression. *Current Directions in Psychological Science* 10, 173-176.
- O'Reardon, J.P., Solvason, H.B., Janicak, P.G., Sampson, S., Isenberg, K.E., Nahas, Z., McDonald, W.M., Avery, D., Fitzgerald, P.B., Loo, C., Demitrack, M.A., George, M.S., Sackeim, H.A., 2007. Efficacy and safety of transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: a multisite randomized controlled trial. *Biol Psychiatry* 62, 1208-1216.

- Olive, D.M., 2004. Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development. *Expert Rev Proteomics* 1, 327-341.
- Oquendo, M.A., Echavarria, G., Galfalvy, H.C., Grunebaum, M.F., Burke, A., Barrera, A., Cooper, T.B., Malone, K.M., John Mann, J., 2003. Lower cortisol levels in depressed patients with comorbid post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 28, 591-598.
- Paakinaho, V., Makkonen, H., Jaaskelainen, T., Palvimo, J.J., 2011. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions. *Mol Endocrinol* 24, 511-525.
- Pace, T.W., Hu, F., Miller, A.H., 2007. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* 21, 9-19.
- Pace, T.W., Mletzko, T.C., Alagbe, O., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., Heim, C.M., 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry* 163, 1630-1633.
- Pardon, M.C., Roberts, R.E., Marsden, C.A., Bianchi, M., Latif, M.L., Duxon, M.S., Kendall, D.A., 2005. Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice. *Neuroscience* 132, 561-574.
- Pariante, C.M., 2006. The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol* 20, 79-84.
- Pariante, C.M., Hye, A., Williamson, R., Makoff, A., Lovestone, S., Kerwin, R.W., 2003. The antidepressant clomipramine regulates cortisol intracellular concentrations and glucocorticoid receptor expression in fibroblasts and rat primary neurones. *Neuropsychopharmacology* 28, 1553-1561.
- Pariante, C.M., Kim, R.B., Makoff, A., Kerwin, R.W., 2003. Antidepressant fluoxetine enhances glucocorticoid receptor function in vitro by modulating membrane steroid transporters. *Br J Pharmacol* 139, 1111-1118.
- Pariante, C.M., Makoff, A., Lovestone, S., Feroli, S., Heyden, A., Miller, A.H., Kerwin, R.W., 2001. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro

- by modulating the membrane steroid transporters. *Br J Pharmacol* 134, 1335-1343.
- Pariante, C.M., Miller, A.H., 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49, 391-404.
- Pariante, C.M., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Sanchez, C.I., Po, C., Su, C., Miller, A.H., 1999. The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 140, 4359-4366.
- Paykel, E.S., 2006. Depression: major problem for public health. *Epidemiol Psichiatr Soc* 15, 4-10.
- Peiffer, A., Veilleux, S., Barden, N., 1991. Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 16, 505-515.
- Pepin, M.C., Govindan, M.V., Barden, N., 1992. Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. *Mol Pharmacol* 41, 1016-1022.
- Pepin, M.C., Pothier, F., Barden, N., 1992. Antidepressant drug action in a transgenic mouse model of the endocrine changes seen in depression. *Mol Pharmacol* 42, 991-995.
- Picard, D., Yamamoto, K.R., 1987. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6, 3333-3340.
- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88-109.
- Pizzagalli, D.A., Holmes, A.J., Dillon, D.G., Goetz, E.L., Birk, J.L., Bogdan, R., Dougherty, D.D., Iosifescu, D.V., Rauch, S.L., Fava, M., 2009. Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 166, 702-710.
- Pliakas, A.M., Carlson, R.R., Neve, R.L., Konradi, C., Nestler, E.J., Carlezon, W.A., Jr., 2001. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* 21, 7397-7403.
- Plomin, R., Lichtenstein, P., Pedersen, N.L., McClearn, G.E., Nesselroade, J.R., 1990. Genetic influence on life events during the last half of the life span. *Psychol Aging* 5, 25-30.

- Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18, 195-200.
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R., 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Qi, M., Elion, E.A., 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118, 3569-3572.
- Quan, N., Avitsur, R., Stark, J.L., He, L., Lai, W., Dhabhar, F., Sheridan, J.F., 2003. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *J Neuroimmunol* 137, 51-58.
- Raadshcer, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J., Swaab, D.F., 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60, 436-444.
- Raddatz, D., Toth, S., Schworer, H., Ramadori, G., 2001. Glucocorticoid receptor signaling in the intestinal epithelial cell lines IEC-6 and Caco-2: evidence of inhibition by interleukin-1beta. *Int J Colorectal Dis* 16, 377-383.
- Radley, J.J., Sisti, H.M., Hao, J., Rocher, A.B., McCall, T., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125, 1-6.
- Raison, C.L., Borisov, A.S., Woolwine, B.J., Massung, B., Vogt, G., Miller, A.H., 2008. Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: relationship with proinflammatory cytokines and behavior. *Mol Psychiatry* 15, 535-547.
- Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H., 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27, 24-31.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Wei, J., Dille, G., Pittman, S.D., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Roth, B.L., Stockmeier, C.A., 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45, 1085-1098.

- Rangarajan, P.N., Umesono, K., Evans, R.M., 1992. Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol Endocrinol* 6, 1451-1457.
- Rasmusson, A.M., Shi, L., Duman, R., 2002. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology* 27, 133-142.
- Regeer, E.J., Krabbendam, L., de Graaf, R., ten Have, M., Nolen, W.A., van Os, J., 2006. A prospective study of the transition rates of subthreshold (hypo)mania and depression in the general population. *Psychol Med* 36, 619-627.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.S., Duffraisse, M., Laudet, V., 2001. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17, 554-556.
- Roelofs, J., Huibers, M., Peeters, F., Arntz, A., van Os, J., 2008. Rumination and worrying as possible mediators in the relation between neuroticism and symptoms of depression and anxiety in clinically depressed individuals. *Behav Res Ther* 46, 1283-1289.
- Rogatsky, I., Logan, S.K., Garabedian, M.J., 1998. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2050-2055.
- Rohleder, N., Schommer, N.C., Hellhammer, D.H., Engel, R., Kirschbaum, C., 2001. Sex differences in glucocorticoid sensitivity of proinflammatory cytokine production after psychosocial stress. *Psychosom Med* 63, 966-972.
- Rossby, S.P., Nalepa, I., Huang, M., Perrin, C., Burt, A.M., Schmidt, D.E., Gillespie, D.D., Sulser, F., 1995. Norepinephrine-independent regulation of GR_{II} mRNA in vivo by a tricyclic antidepressant. *Brain Res* 687, 79-82.
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P.M., Pascual-Leone, A., 2009. Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008-2039.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., Sweatt, J.D., 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry* 65, 760-769.

- Rubin, R.T., Poland, R.E., Lesser, I.M., Winston, R.A., Blodgett, A.L., 1987. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry* 44, 328-336.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., Castren, E., 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25, 1089-1094.
- Sanchez, M.M., Ladd, C.O., Plotsky, P.M., 2001. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol* 13, 419-449.
- Sarabdjitsingh, R.A., Meijer, O.C., de Kloet, E.R., 2010. Specificity of glucocorticoid receptor primary antibodies for analysis of receptor localization patterns in cultured cells and rat hippocampus. *Brain Res* 1331, 1-11.
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., Smith, D.F., 2001. Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen Comp Endocrinol* 124, 152-165.
- Schaaf, M.J., Cidlowski, J.A., 2003. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol* 23, 1922-1934.
- Schaaf, M.J., De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., 2000. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress* 3, 201-208.
- Schiene-Fischer, C., Yu, C., 2001. Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett* 495, 1-6.
- Schmidt, H.D., Shelton, R.C., Duman, R.S., 2011. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 36, 2375-2394.
- Schmidt, M.V., Sterlemann, V., Wagner, K., Niederleitner, B., Ganea, K., Liebl, C., Deussing, J.M., Berger, S., Schutz, G., Holsboer, F., Muller, M.B., 2009. Postnatal glucocorticoid excess due to pituitary glucocorticoid receptor

- deficiency: differential short- and long-term consequences. *Endocrinology* 150, 2709-2716.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.
- Schroeder, M., Krebs, M.O., Bleich, S., Frieling, H., 2010. Epigenetics and depression: current challenges and new therapeutic options. *Curr Opin Psychiatry* 23, 588-592.
- Schulze, T.G., Muller, D.J., Krauss, H., Scherk, H., Ohlraun, S., Sygailo, Y.V., Windemuth, C., Neidt, H., Grassle, M., Papassotiropoulos, A., Heun, R., Nothen, M.M., Maier, W., Lesch, K.P., Rietschel, M., 2000. Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder. *Am J Med Genet* 96, 801-803.
- Schumacher, J., Jamra, R.A., Becker, T., Ohlraun, S., Klopp, N., Binder, E.B., Schulze, T.G., Deschner, M., Schmal, C., Hofels, S., Zobel, A., Illig, T., Propping, P., Holsboer, F., Rietschel, M., Nothen, M.M., Cichon, S., 2005. Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry* 58, 307-314.
- Sheehan, D.V., Lecrubier, Y., Sheehan, K.H., Amorim, P., Janavs, J., Weiller, E., Hergueta, T., Baker, R., Dunbar, G.C., 1998. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 20, 22-33;quiz 34-57.
- Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C., 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160, 1516-1518.
- Shelton, R.C., Mainer, D.H., Sulser, F., 1996. cAMP-dependent protein kinase activity in major depression. *Am J Psychiatry* 153, 1037-1042.
- Shen, C.P., Tsimberg, Y., Salvatore, C., Meller, E., 2004. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci* 5, 36.
- Sher, L., Oquendo, M.A., Galfalvy, H.C., Cooper, T.B., Mann, J.J., 2004. Age effects on cortisol levels in depressed patients with and without comorbid post-traumatic stress disorder, and healthy volunteers. *J Affect Disord* 82, 53-59.

- Shi, X., Hamrick, M., Isales, C.M., 2007. Energy Balance, Myostatin, and GILZ: Factors Regulating Adipocyte Differentiation in Belly and Bone. *PPAR Res* 2007, 92501.
- Shields, S.A. (2000) Thinking about gender, thinking about theory: gender and emotional experience. In: Fischer A.H., editor. *Gender and Emotion: Social Psychological Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., Iyo, M., 2003. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54, 70-75.
- Shyn, S.I., Hamilton, S.P., 2010. The genetics of major depression: moving beyond the monoamine hypothesis. *Psychiatr Clin North Am* 33, 125-140.
- Smith, D.F., Faber, L.E., Toft, D.O., 1990. Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem* 265, 3996-4003.
- Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D., Pearce, D., 2007. Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *J Biol Chem* 282, 36303-36313.
- Soundararajan, R., Zhang, T.T., Wang, J., Vandewalle, A., Pearce, D., 2005. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 280, 39970-39981.
- Sousa, A.R., Lane, S.J., Cidlowski, J.A., Staynov, D.Z., Lee, T.H., 2000. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* 105, 943-950.
- Spencer, R.L., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S., 1991. Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res* 549, 236-246.
- Spijker, J., Graaf, R., Bijl, R.V., Beekman, A.T., Ormel, J., Nolen, W.A., 2004. Functional disability and depression in the general population. Results from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Acta Psychiatr Scand* 110, 208-214.

- Spiliotaki, M., Salpeas, V., Malitas, P., Alevizos, V., Moutsatsou, P., 2006. Altered glucocorticoid receptor signaling cascade in lymphocytes of bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 31, 748-760.
- Stevens, A., Garside, H., Berry, A., Waters, C., White, A., Ray, D., 2003. Dissociation of steroid receptor coactivator 1 and nuclear receptor corepressor recruitment to the human glucocorticoid receptor by modification of the ligand-receptor interface: the role of tyrosine 735. *Mol Endocrinol* 17, 845-859.
- Stockmeier, C.A., Mahajan, G.J., Konick, L.C., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Meltzer, H.Y., Uylings, H.B., Friedman, L., Rajkowska, G., 2004. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56, 640-650.
- Storer, C.L., Dickey, C.A., Galigniana, M.D., Rein, T., Cox, M.B., 2011. FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab* 22, 481-490.
- Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.
- Swaab, D.F., Bao, A.M., Lucassen, P.J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4, 141-194.
- Szatmary, Z., Garabedian, M.J., Vilcek, J., 2004. Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem* 279, 43708-43715.
- Tanaka, H., Akama, H., Ichikawa, Y., Homma, M., Oshima, H., 1991. Glucocorticoid receptors in normal leukocytes: effects of age, gender, season, and plasma cortisol concentrations. *Clin Chem* 37, 1715-1719.
- Tatro, E.T., Overall, I.P., Masliah, E., Hult, B.J., Lucero, G., Chana, G., Soontornniyomkij, V., Achim, C.L., 2009. Differential expression of immunophilins FKBP51 and FKBP52 in the frontal cortex of HIV-infected patients with major depressive disorder. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 218-226.
- Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9, 519-525.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T., Hori, R., 1992. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267, 24248-24252.

- Umesono, K., Evans, R.M., 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
- Ustun, T.B., Ayuso-Mateos, J.L., Chatterji, S., Mathers, C., Murray, C.J., 2004. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry* 184, 386-392.
- van Rossum, E.F., Binder, E.B., Majer, M., Koper, J.W., Ising, M., Modell, S., Salyakina, D., Lamberts, S.W., Holsboer, F., 2006. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry* 59, 681-688.
- Vedder, H., Bening-Abu-Shach, U., Lanquillon, S., Krieg, J.C., 1999. Regulation of glucocorticoid receptor-mRNA in human blood cells by amitriptyline and dexamethasone. *J Psychiatr Res* 33, 303-308.
- Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B.I., van der Burg, B., van Buul-Offers, S.C., Jansen, M., 2003. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 277-284.
- Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161, 1957-1966.
- Wallace, A.D., Cidlowski, J.A., 2001. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276 (46), 42714-21
- Wang, J.C., Derynck, M.K., Nonaka, D.F., Khodabakhsh, D.B., Haqq, C., Yamamoto, K.R., 2004. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15603-15608.
- Wang, X., Wu, H., Miller, A.H., 2004. Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry* 9, 65-75.
- Wang, Y., Ma, Y.Y., Song, X.L., Cai, H.Y., Chen, J.C., Song, L.N., Yang, R., Lu, J., 2012. Upregulations of glucocorticoid-induced leucine zipper by hypoxia and glucocorticoid inhibit proinflammatory cytokines under hypoxic conditions in macrophages. *J Immunol* 188, 222-229.

- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T., Garabedian, M.J., 2007. Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* 21, 625-634.
- Wang, Z., Frederick, J., Garabedian, M.J., 2002. Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277, 26573-26580.
- Wassef, A., Smith, E.M., Rose, R.M., Gardner, R., Nguyen, H., Meyer, W.J., 1990. Mononuclear leukocyte glucocorticoid receptor binding characteristics and down-regulation in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 15, 59-68.
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588, 341-345.
- Watson, S., Gallagher, P., Porter, R.J., Smith, M.S., Herron, L.J., Bulmer, S., Young, A.H., Ferrier, I.N., 2012. A randomized trial to examine the effect of mifepristone on neuropsychological performance and mood in patients with bipolar depression. *Biol Psychiatry* 72, 943-949.
- Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M.J., 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7, 847-854.
- Webster, J.C., Jewell, C.M., Bodwell, J.E., Munck, A., Sar, M., Cidlowski, J.A., 1997. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* 272, 9287-9293.
- Webster, M.J., Knable, M.B., O'Grady, J., Orthmann, J., Weickert, C.S., 2002. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry* 7, 985-994, 924.
- Westberry, J.M., Sadosky, P.W., Hubler, T.R., Gross, K.L., Scammell, J.G., 2006. Glucocorticoid resistance in squirrel monkeys results from a combination of a transcriptionally incompetent glucocorticoid receptor and overexpression of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP51. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100, 34-41.
- Wohnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., Rein, T., 2005. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 4609-4616.

- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2011. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* 31, 6277-6288.
- Woolley, C.S., Gould, E., McEwen, B.S., 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531, 225-231.
- Wray, N.R., Pergadia, M.L., Blackwood, D.H., Penninx, B.W., Gordon, S.D., Nyholt, D.R., Ripke, S., MacIntyre, D.J., McGhee, K.A., Maclean, A.W., Smit, J.H., Hottenga, J.J., Willemsen, G., Middeldorp, C.M., de Geus, E.J., Lewis, C.M., McGuffin, P., Hickie, I.B., van den Oord, E.J., Liu, J.Z., Macgregor, S., McEvoy, B.P., Byrne, E.M., Medland, S.E., Statham, D.J., Henders, A.K., Heath, A.C., Montgomery, G.W., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Madden, P.A., Sullivan, P.F., 2010. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry* 17, 36-48.
- Xie, P., Kranzler, H.R., Poling, J., Stein, M.B., Anton, R.F., Farrer, L.A., Gelernter, J., 2010. Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1684-1692.
- Yamada, S., Yamamoto, M., Ozawa, H., Riederer, P., Saito, T., 2003. Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm* 110, 671-680.
- Yau, J.L., Noble, J., Thomas, S., Kerwin, R., Morgan, P.E., Lightman, S., Seckl, J.R., Pariante, C.M., 2007. The antidepressant desipramine requires the ABCB1 (Mdr1)-type p-glycoprotein to upregulate the glucocorticoid receptor in mice. *Neuropsychopharmacology* 32, 2520-2529.
- Yehuda, R., Boisoneau, D., Mason, J.W., Giller, E.L., 1993. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 34, 18-25.

- Young, E.A., Lopez, J.F., Murphy-Weinberg, V., Watson, S.J., Akil, H., 2003. Mineralocorticoid receptor function in major depression. *Arch Gen Psychiatry* 60, 24-28.
- Zalachoras, I., Houtman, R., Atucha, E., Devos, R., Tijssen, A.M., Hu, P., Lockey, P.M., Datson, N.A., Belanoff, J.K., Lucassen, P.J., Joels, M., de Kloet, E.R., Roozendaal, B., Hunt, H., Meijer, O.C., 2013. Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7910-7915.
- Zhang, T.Y., Ding, X., Daynes, R.A., 2005. The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol* 174, 879-889.
- Zhang, Y., Leung, D.Y., Nordeen, S.K., Goleva, E., 2009. Estrogen inhibits glucocorticoid action via protein phosphatase 5 (PP5)-mediated glucocorticoid receptor dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24542-24552.
- Zhang, X., Gainetdinov, R.R., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Burch, L.H., Williams, R.B., Schwartz, D.A., Krishnan, K.R., Caron, M.G., 2005. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16.
- Zill, P., Baghai, T.C., Zwanzger, P., Schule, C., Eser, D., Rupprecht, R., Moller, H.J., Bondy, B., Ackenheil, M., 2004. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry* 9, 1030-1036.
- Zimmermann, P., Bruckl, T., Nocon, A., Pfister, H., Binder, E.B., Uhr, M., Lieb, R., Moffitt, T.E., Caspi, A., Holsboer, F., Ising, M., 2011. Interaction of FKBP5 gene variants and adverse life events in predicting depression onset: results from a 10-year prospective community study. *Am J Psychiatry* 168, 1107-1116.

Biografija autora

Iva S. Lukić (devojačko Simić) je rođena 31. marta 1983. godine u Beogradu. Osnovnu školu i IX beogradsku gimnaziju Mihajlo Petrović Alas završila je sa odličnim uspehom. Školske 2002/03. upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) na kome je diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 9,51 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Školske 2009/10. upisala je doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija.

Od 1. oktobra 2009. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, gde i sada radi na radnom mestu istraživač-saradnik u okviru projekta III 41029 „Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja“, finansiranog od strane Ministarstva nauke Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića naučnog saradnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Iva Lukić je takođe član Društva za neuronauke Srbije, EBBS-a i FENS-a. Dobitnik je stipendije EBBS-a za učešće na 45-om EBBS susretu u Minhenu, od 6-9 septembra 2013. godine.

U dosadašnjoj naučnoj karijeri Iva Lukić je autor i koautor 7 radova u vodećim međunarodnim naučnim časopisima, od kojih je u 3 rada prvi autor, kao i brojnih međunarodnih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторствуПотписани-а Ива С.Лукићброј индекса M3005/2009**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

„Анализа фосфорилације глукокортикоидног рецептора у лимфоцитима здравих људи и пацијената са акутном епизодом депресивног поремећаја“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**Име и презиме аутора Ива С. ЛукићБрој индекса M3005/2009Студијски програм Молекуларна биологија еукариотаНаслов рада „Анализа фосфорилације глукокортикоидног рецептора у лимфоцитима здравих људи и пацијената са акутном епизодом депресивног поремећаја“Ментори др Мирослав Ацић и др Гордана МатићПотписани/а Ива С. Лукић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторандаУ Београду, 25.11.2013.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Анализа фосфорилације глукокортикоидног рецептора у лимфоцитима здравих људи и пацијената са акутном епизодом депресивног поремећаја“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

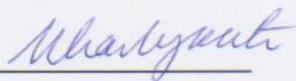
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.