

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Milica J. Jovičić

**ZNAČAJ REGULACIJE
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U
STRUKTURALNOM MODELU
PODLOŽNOSTI ZA DEPRESIJU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Milica J. Jovičić

**THE EFFECT OF GLUCOCORTICOID
RECEPTOR REGULATION IN THE
STRUCTURAL MODEL OF
VULNERABILITY TO DEPRESSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor: doc. dr Nađa Marić Bojović, Klinika za psihijatriju Kliničkog centra Srbije,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor: dr sc. Miroslav Adžić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke
Vinča, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Akademik prof. dr Dušica Lečić Toševski, Institut za mentalno zdravlje, Medicinski
fakultet Univerziteta u Beogradu, Srpska akademija nauka i umetnosti

Prof. dr Nataša Petronijević, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski
fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Aleksandra Nedić, Klinika za psihijatriju Kliničkog centra Novi Sad,
Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se:

Mom mentoru, doc. dr Nađi Marić Bojović koja mi je na svom primeru pokazala da se naukom uma treba baviti najpre srcem

Mom komentoru dr sc. Miroslavu Adžiću koji je uvek bio tu da odgonetne moje molekularne ali i sve druge "bio-psiho-socijalne" nedoumice

Mojoj majci dr Jasni Kekić, koja me je inspirisala da se posvetim pitanjima ljudske duše, a zatim podržala na svakom koraku tog puta

Mom Urošu, zbog vremena i truda koji su otišli na ovaj rad umesto na njega, i za pomoć oko slika koje su učinile ovu tezu boljom

ZNAČAJ REGULACIJE GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA U STRUKTURALNOM MODELU PODLOŽNOSTI ZA DEPRESIJU

REZIME

Uvod. Iskustvo i istraživanja pokazuju da podložnost za depresiju nastaje na bazi složenih interakcija bioloških i psiholoških činilaca, kao i faktora sredine. Međutim, precizni markeri ove predispozicije i dinamika međusobnih relacija još uvek nisu dovoljno proučeni.

Kada je reč o biološkim faktorima podložnosti za depresiju, jedan od konzistentnijih nalaza u literaturi je odstupanje koncentracije perifernog kortizola. Ovaj hormon ostvaruje efekte vezivanjem za glukokortikoidni receptor (GR), a poremećaj signalizacije GR-a dovodi do prekomerne sekrecije kortizola u perifernoj krvi, što uslovljava delimičnu glukokortikoidnu rezistenciju kod osoba sa depresijom. Međutim, pokazalo se da merenje koncentracije perifernog kortizola nije pouzdan marker depresije i zbog toga je sledeći važan korak u istraživanju ispitivanje složenih unutarćelijskih mehanizama koji regulišu aktivnost samog receptora. U ovom istraživanju su ispitivana dva mehanizma regulacije i modulacije aktivnosti GR-a za koje se od nedavno pretpostavlja da mogu imati značaja u etiopatogenezi depresivnog poremećaja. Prvi mehanizam je vezivanje FKB506-vezujućeg proteina (*FKB506-binding protein 51* – FKBP51) za kompleks GR-a (u citoplazmi), a drugi je fosforilacija GR-a (jedro). Konkretno, akcenat je stavljen na fosforilaciju GR-a na serinu 226 (pGR-226) i 211 (pGR-211), zbog prethodno uočene povezanosti sa depresijom u istraživanjima naše grupe.

Pored molekularnih mehanizama, zna se i da faktori psihološke prirode, kao što su neuroticizam i ekstroverzija (dimenzije ličnosti za koje je dokazano da modifikuju predispoziciju za depresiju), ali i faktori sredine, npr. skorašnji nepovoljni životni događaji, utiču na rizik od depresivnog poremećaja.

Svi navedeni elementi bio-psiho-socijalnog kontinuuma nedvosmisleno stupaju u određene interakcije. Ma koliko one bile složene, važno je tražiti načine da se ove interakcije analiziraju i interpretiraju, jer jednostavni modeli bazirani na konceptu linearne kauzalnosti nisu dovoljni da bi se razumela etiopatogeneza depresije, unapredila prevencija i usavršila terapija. Od aktuelnog doktorata očekuje se da uz

pomoć tehnika strukturalnog modelovanja (*structural equation modelling* – SEM) tj. putem analize interakcija opisanih bioloških i psiholoških faktora, kao i ugrožavajućih životnih događaja, prikaže model individualne podložnosti za depresiju.

Na osnovu postojećih saznanja postavljena je hipoteza da se podložnost za depresiju može objasniti putem strukturalnog modela koji uključuje molekularne parametre modulacije aktivnosti GR-a (biološke faktore), crte ličnosti neuroticizam i ekstroverziju (psihološke faktore) i skorašnje ugrožavajuće životne događaje. U okviru samog modela, može se hipotezirati da molekularni parametri regulacije GR-a imaju značajan efekat na podložnost za depresiju.

Ciljevi istraživanja. Konstruisati strukturalni model vulnerabilnosti za depresiju, radi eksploracije interakcija između tri faktora: parametara regulacije GR-a (bioloških faktora), crta ličnosti (psiholoških faktora) i skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja. Ovo podrazumeva: kvantifikovanje udela svake od navedene tri grupe faktora u objašnjavanju varijanse vulnerabilnosti za depresiju, zatim određivanje koeficijenata putanje (*path coefficients*) u međusobnim interakcijama navedenih faktora, i shematski prikaz opisanih interakcija.

Materijal i metode. Sedamdeset ispitanika (35 osoba sa dijagnozom akutnog depresivnog poremećaja i 35 zdravih kontrola) je uključeno u studiju. Kao mera podložnosti za depresiju korišćen je Upitnik za samoprocenu simptoma depresije, anksioznosti i stresa (*Depression Anxiety Stress Scales* – DASS), koji je zasnovan na dimenzionalnom pristupu mentalnim poremećajima, tj. na pretpostavci da su razlike između kliničke i opšte populacije zapravo razlike u stepenu izraženosti simptoma. Neuroticizam i ekstrovertizija su procenjene na osnovu Ajzenkovog samoupitnika za procenu ličnosti (*The Eysenck Personality Questionnaire* – EPQ). Listom ugrožavajućih životnih događaja (*The List of Threatening Experiences* – LTE) evidentirano je prisustvo 12 životnih događaja u poslednjih šest meseci, odnosno u slučaju pacijenata u periodu od šest meseci pre aktuelne epizode depresije. Od bioloških parametara analizirani su: koncentracija jutarnjeg kortizola, nivo ukupnog nuklearnog GR-a (*total GRn* – tGRn), nivo ukupnog citosolnog GR-a (tGRc), nivo nuklearnog pGR-226 (pGR-226n), nivo nuklearnog pGR-211 (pGR-211n) i nivo citosolnog FKBP51. Analizirani su i odnosi: pGR-211/tGRn, pGR-226/tGRn. Uzorci krvi za pomenute analize su uzeti između 08.00 i 09.00h ujutru. Koncentracija kortizola je određena pomoću

hemiluminiscentne metode (*DPC Immulite 2000, Siemens*), a nivoi ostalih proteina putem *Western blot*-a. Svaki uzorak je analiziran barem dva puta ("u duplikatu"), a srednje vrednosti za nivoe svakog proteina su korišćene u daljoj analizi. Polazna statistička analiza, koja je podrazumevala deskriptivnu statistiku uzorka, testiranje značajnosti razlike u ispitivanim varijablama između pacijenata i kontrola i korelacije socio-demografskih, psihometrijskih i bioloških parametara, vršena je pomoću programa SPSS 20.0 (IMB, Chicago, IL). Strukturalno modelovanje je vršeno uz pomoć programa IBM SPSS Amos 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Statistička značajnost je definisana na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p < 0,05$.

Rezultati. Pre modelovanja je urađena korelaciona analiza ispitivanih molekularnih parametara, crta ličnosti i skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja. U SEM su uključene varijable koje su značajno korelirale sa DASS-om: neuroticizam, ekstroverzija, ugrožavajući događaji, pGR-226, pGR-211 i FKBP51. U proceduri modelovanja su najpre formirane dve latentne varijable: varijabla *biološki faktori*, koja je uključila pGR-211, pGR-226 i FKBP51, i varijabla *psihološki faktori*, koja je obuhvatila neuroticizam i ekstroverziju. Inicijalno, zadovoljavajuća podesnost modela je postignuta sa sledećim vrednostima indeksa podesnosti: $\chi^2=10,74$, $p=0,378$, CFI=0,996, RMSEA=0,033. Podesnost modela je još više poboljšana kada je dodata kovarijansa greške merenja između neuroticizma i ugrožavajućih životnih događaja (indeksi podesnosti: $\chi^2=9,268$, $p=0,413$, CFI=0,999, RMSEA=0,021). U finalnom SEM-u značajni prediktori rezultata na DASS-u bili su *psihološki faktori* ($p=0,001$) i *biološki faktori* ($p=0,002$), pri čemu su *psihološki faktori* snažnije predviđali podložnost za depresiju od *bioloških faktora*. Takođe, značajan je bio efekat *psiholoških faktora* na *biološke faktore* ($p=0,002$). Iako ugrožavajući životni događaji nisu imali direktan efekat na DASS ili parametre signalizacije GR-a, pokazali su značajan efekat na *psihološke faktore* ($p=0,007$). Putanja od ugrožavajućih događaja do latentne varijable *biološki faktori* nije dostigla statističku značajnost ($p=0,999$). Opisani model sa interakcijama između navedenih faktora je prikazan shematski.

Zaključci. Parametri signalizacije GR-a i crte ličnosti su imali značajan direktan efekat na podložnost za depresiju. Udeo ispitivanih psiholoških faktora na podložnost za depresiju je bio veći u poređenju sa ispitivanim biološkim faktorima – proteinima koji modulišu funkciju GR-a u ćeliji. Ovaj nalaz se može objasniti biološkom komponentom

psiholoških faktora (koja u ovom modelu nije uzeta u obzir), kao i preklapanjem stavki na upitnicima EPQ i DASS. Takođe, efekat *bioloških faktora* na afektivitet bi bio još značajniji da su u analize uključeni i dodatni molekularni faktori (npr. parametri monoaminergičke neurotransmisije), ali to bi prevazišlo obim aktuelnog istraživanja.

Značaj postojećih nalaza ogleda se najpre u otvaranju mogućnosti za upotrebu strukturalnog modelovanja u proučavanju etiologije složenih poremećaja. Zatim, aktuelni rezultati ukazuju na perspektivu korišćenja fosforilacije GR-a kao biomarkera podložnosti za depresiju. Na kraju, predložen je dizajn terapije depresije koja bi bila zasnovana na modulaciji fosforilacije GR-a. Prednosti i ograničenja ovog potencijalnog terapijskog modaliteta detaljno su opisani u završnom poglavlju ove disertacije.

KLJUČNE REČI: depresija, stres, HPA osovina, glukokortikoidni receptor, fosforilacija, neuroticizam, poremećaj raspoloženja

NAUČNA OBLAST: medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: neuronauke

THE EFFECT OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR REGULATION IN THE STRUCTURAL MODEL OF VULNERABILITY TO DEPRESSION

SUMMARY

Introduction. Experience and research indicate that vulnerability to depression is based on the complex interactions between biological and psychological factors, as well as environmental contributors. However, the exact markers of such predisposition and the dynamics of these interrelationships are still out of reach.

When it comes to the biological factors, one of the more consistent findings in literature is the alteration of cortisol levels in the periphery. Effects of cortisol are mediated through the glucocorticoid receptor (GR), and the impairment of GR signaling leads to hypersecretion of the hormone in peripheral blood, which results in partial glucocorticoid resistance in persons with depression. However, peripheral blood cortisol levels do not represent a sufficiently reliable marker of depression. Therefore, the next important step in research is to explore the complex intracellular mechanisms that regulate and modulate the activity of the GR. Two of these mechanisms will be the focus of this doctoral dissertation due to their recently suggested association with the etiopathogenesis of major depression. The first one is the binding of the FK506-binding protein 51 (FKBP51) to the GR complex in the cytoplasm, and the second one is the phosphorylation of the GR in the nucleus. Specifically, we will concentrate on the phosphorylation of the GR at serine 226 (pGR-226) and serine 211 (pGR-211), due to the previously demonstrated association with depression in the research of our group.

Apart from the molecular mechanisms, psychological factors, such as neuroticism and extraversion (personality dimensions proven to modify the predisposition for depression), and environmental factors (e.g. recent threatening life events) alter the risk for depressive disorder.

All the elements of the bio-psycho-social continuum mentioned above interact in a specific manner. No matter how complex these relationships are, it is important to find new methods to analyze and interpret them, since simple models based on concepts of linear causality are not sufficient to comprehend the etiopathogenesis of vulnerability to depression, and improve prevention and treatment. This doctoral dissertation is expected to demonstrate a model of individual predisposition to depression, constructed

using structural equation modeling (SEM). This will be done by analyzing the interactions of the biological and psychological factors mentioned above, as well as threatening life events.

Based on the previous findings in the field, it was hypothesised that the vulnerability to depression could be explained using a SEM that included molecular modulators of GR activity (biological factors), personality traits neuroticism and extraversion (psychological factors), and recent threatening life events. In the context of the model, it could be hypothesized that GR signaling parameters would have a significant effect on the vulnerability to depression.

Aims. To construct a structural equation model of vulnerability to depression, in order to explore the complex relationships between three broadly interacting pathways: GR signaling parameters (biological factors), personality dimensions (psychological factors) and recent threatening life events. This includes: quantifying the contribution of each of the three groups of factors in the variance of vulnerability to depression, determining the path coefficients of the interactions of the factors, and presenting the analyzed interactions graphically.

Material and methods. Seventy participants (35 participants with the diagnosis of acute major depressive disorder and 35 healthy controls) were included in the study. Vulnerability to depression was assessed using the Depression Anxiety and Stress Scales (DASS). The instrument is based on a dimensional approach to mental disorders, i.e. on the assumption that the differences between depression, anxiety, and stress found in general and clinical population are differences of degree. Neuroticism and extraversion were assessed using the Eysenck Personality Questionnaire (EPQ). The List of Threatening Experiences (LTE) was used to measure the occurrence of 12 life events in the past 6 months, or in the case of MDD patients the period of 6 months prior to the onset of current major depressive episode. The following biological parameters were included in the analysis: concentration of morning cortisol, total nuclear GR (tGRn) levels, total cytoplasmic GR (tGRc) levels, levels of nuclear GR phosphorylated at serine 211 (pGR-211), levels of nuclear GR phosphorylated at serine 226 (pGR-226) and levels of cytoplasmic FKBP51. Also, the levels of pGR-226 relative to tGRn (pGR-226/tGRn), and pGR-211 relative to tGRn (pGR-211/tGRn) were analyzed. Blood samples for cortisol levels and molecular analyses were obtained between 08:00 and

09:00 h. Cortisol levels were determined using chemiluminescent immunometric assays with the DPC Immulite 2000 (Siemens), and the levels of all other proteins were analyzed using Western blot. All samples were analyzed at least twice (“in duplicate”), and average values for the levels of each protein were used in further analyses. Initial statistical analyses included the descriptive statistics of the sample, comparisons between patients and controls in demographic, psychometric and biological parameters, and the correlation matrix of the assessed variables. These analyses were performed using SPSS 20.0 (IMB, Chicago, IL). Structural modeling was performed via IBM SPSS Amos 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results. Prior to the modeling, correlational analysis of the molecular parameters, personality traits and recent threatening life events was performed. The variables that correlated significantly with DASS were included in the model: neuroticism, extraversion, life events, pGR-226, pGR-211 and FKBP51. For the purposes of the model, we formed two latent variables: *biological factors*, related to three molecular parameters of GR signaling (pGR-211, pGR-226, FKBP51); and *psychological factors*, which included neuroticism and extraversion. Initially, a good fit to the sample data was obtained (fit indices: $\chi^2=10.74$, $p=0.378$, CFI=0.996, RMSEA=0.033), but it was even more improved by adding an error covariance between neuroticism and LTE (fit indices: $\chi^2=9.268$, $p=0.413$, CFI=0.999, RMSEA=0.021). In the final model, the DASS score was significantly predicted by *psychological factors* ($p=0.001$), as well as *biological factors* ($p=0.002$), with *psychological factors* being an obvious stronger predictor than *biological factors*. The influence of *psychological factors* on *biological factors* was also significant ($p=0.002$). Although recent stressful events did not have a direct effect on DASS nor GR signaling parameters, they showed a significant effect on *psychological factors* ($p=0.007$). The path coefficient of threatening life events to the latent variable *biological factors* was not statistically significant ($p=0.999$). The described model was also presented graphically.

Conclusions. GR signaling parameters and personality dimensions had a significant direct effect on the vulnerability to depression. The effect of psychological factors on the vulnerability to depression was also significant, and stronger than the effect of the biological factors (proteins that modulate GR’s activity inside the cell). This could be explained by the biological component of the *psychological factors* (not accounted for

by the model) as well as the overlap in items in the questionnaires EPQ and DASS. Furthermore, the effect of the biological factors on affectivity would be even stronger if additional molecular factors were included (such as parameters of monoaminergic neurotransmission), but that would have been beyond the scope of this work.

The importance of these findings is primarily in the presentation of the possibilities of SEM in the exploration of etiology of complex disorders. In addition, the results implicate the possibility of using phosphorylation of the GR as a biomarker of vulnerability to depression. And finally, potential therapeutic strategies aimed at the modulation of GR phosphorylation in depression are presented.

KEY WORDS: depression, stress, HPA axis, glucocorticoid receptor, phosphorylation, neuroticism, affective disorders

ACADEMIC EXPERTISE: medicine

FIELD OF ACADEMIC EXPERTISE: neuroscience

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Depresija – opšti deo.....	1
1.1.1. Epidemiološki podaci.....	1
1.1.2. Klinička slika i dijagnostički kriterijumi.....	3
1.1.3. Etiopatogeneza depresije.....	6
1.2. Biološke teorije depresije.....	7
1.2.1. Monoaminska hipoteza depresije.....	7
1.2.2. Inflamacija i depresija.....	12
1.2.3. Oksidativni stres i depresija.....	12
1.2.4. Mitohondrijalna disfunkcija i depresija.....	13
1.2.5. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina i depresija.....	13
1.2.5.1. Glukokortikoidna signalizacija i depresija.....	16
1.2.5.2. Signalni put C-jun N-terminalne kinaze u depresiji.....	21
1.2.5.3. Fosforilacija GR-a u depresiji.....	22
1.3. Crte ličnosti i depresija.....	24
1.3.1. Modeli koji objašnjavaju vezu ličnosti i depresije.....	25
1.3.2. Crte ličnosti i HPA osovina.....	26
1.4. Stresogeni životni događaji i depresija.....	27
1.4.1. Stresogeni događaji u prenatalnom periodu – uticaj na HPA osovину.....	27
1.4.2. Stresogeni događaji u razvojnom periodu.....	28
1.4.3. Proksimalni stresogeni događaji.....	29
1.4.4. Koncept „zavisnosti“ stresogenih događaja i kauzalnost sa depresijom.....	30
1.5. Koncept strukturalnog modela i mogućnosti u proučavanju etiopatogeneze depresije.....	32

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Tip studije	35
3.2. Mesto i period istraživanja.....	35
3.3. Selekcija ispitanika	35
3.4. Upitnici	36
3.5. Analiza bioloških parametara	37
3.6. Statistička analiza	39
3.6.1. Struktura strukturalnog modela (SEM-a).....	39
3.6.1.1. Merni model	40
3.6.1.2. Strukturalni model	41
3.6.2. Polazna statistička analiza.....	42
3.6.3. Procedura strukturalnog modelovanja.....	42
4. REZULTATI	44
4.1. Deskriptivna statistika uzorka.....	44
4.2. Razlike u socio-demografskim, psihometrijskim i biološkim parametrima između pacijenata i kontrola	47
4.3. Korelaciona analiza.....	50
4.4. Strukturalno modelovanje.....	61
5. DISKUSIJA	65
6. ZAKLJUČCI	80
7. LITERATURA	81

1. UVOD

1.1. Depresija – opšti deo

Termin „depresija“ koristi se na nekoliko načina. U svakodnevnom jeziku ovaj pojam se obično odnosi na stanje neraspoloženja koje u nekom periodu života može da iskusi svaka osoba, dok se u stručnim krugovima pod ovim terminom podrazumeva precizno definisan klinički entitet – depresivni poremećaj. U kliničkom smislu, depresivni poremećaj podrazumeva promene u više psihičkih funkcija, od kojih su uvek zahvaćeni raspoloženje, mišljenje i voljni i nagonski dinamizmi. Na primer, kod osobe sa depresivnim poremećajem u sferi raspoloženja može biti prisutna utučenost, u sferi neurovegetativnih funkcija se može videti smanjen apetit i spavanje, u sferi mišljenja su često prisutni prenaplašen osećaj krivice ili osećanje bezvrednosti, a opisane tegobe su uglavnom praćene psihomotornim smetnjama (kao što su agitacija ili retardacija) (Fava i Kendler, 2000). Međutim, neke osobe sa depresijom mogu ispoljiti povišen apetit i hipersomniju, a umesto izraženog neraspoloženja mogu se žaliti na bezvoljnost ili gubitak interesovanja. Dakle, depresivni poremećaj karakteriše niz simptoma i znakova koji se mogu javljati u velikom broju kombinacija i menjati tokom vremena (Živanović i Paunović, 2005). Ova fenomenološka heterogenost, uz nedovoljno poznatu etiologiju i nedostatak biomarkera, čini depresiju posebnim izazovom za dijagnostiku, terapiju i istraživanje. Zbog visoke incidencije i prevalencije, tendencije hronifikacije i česte pojave komorbiditeta, depresivni poremećaji su svrstani među najonesposobljavajuća i najskuplja oboljenja današnjice.

1.1.1. Epidemiološki podaci

Depresija predstavlja čest poremećaj, sa životnom prevalencijom od 8-12% (u literaturi se navode i širi rasponi, npr: 1,5%-19,5% ili 3%-16,9%) (Weissman i sar., 1996; Andrade i sar., 2003). Dvanaestomesečna prevalencija depresije kod osoba bez udružene somatske bolesti procenjena je na 3,2%, dok je kod onih sa hroničnim somatskim oboljenjem značajno veća: 9,3% - 23,0% (Moussavi i sar., 2007). Depresija je 1,7 puta češća kod žena, a ovaj trend se zapaža već u adolescenciji i održava se do pedesetih godina života (Kessler i sar., 1993). Prosečna starost pri javljanju prve epizode depresije iznosi 26 godina, ali je uočljiv trend sve ranijeg javljanja poremećaja

(Zisook i sar., 2007; Burke i sar., 1991). Treba naglasiti da je starosni opseg za pojavu prve epizode depresije dosta širok (Kessler i sar., 2005). Konkretno, rezultati jednog centra pokazali su da je polovina gerijatrijskih pacijenata sa dijagnozom depresivnog poremećaja imala prvu epizodu depresije nakon 60. godine života (Brodaty i sar., 2001). Činjenica da životna prevalencija depresije nekoliko puta prevazilazi dvanaestomesečnu prevalenciju, ukazuje da je depresija poremećaj hroničnog toka. I upravo, istraživanja pokazuju da čak 31-35% osoba iskusi ponovljenu epizodu depresije tokom života, a verovatnoća relapsa se povećava sa svakom narednom depresivnom epizodom (Hardeveld i sar., 2010).

Depresija je vodeći uzrok opterećenja društva bolestima (Vos i sar., 2012). Ako se opterećenje bolestima izrazi kroz godine života sa nesposobnošću (*years of life with disability – YLD*), depresija predstavlja čak drugi uzrok opterećenja i čini 8,2% YLD u svetu. Takođe, depresija je glavni uzrok u broju godina života korigovanih u odnosu na nesposobnost (*disability adjusted life years – DALY*), čineći 2,5% globalnog DALY. Depresivnim poremećajima se pripisuje šesnaest miliona DALY u svetskoj populaciji zbog suicida i četiri miliona DALY zbog ishemijske bolesti srca, što dodatno povećava ukupno opterećenje društva depresijom (Ferrari i sar., 2010). U našoj zemlji, depresivni poremećaji su svrstani u prvih pet uzoraka opterećenja društva bolestima u 2000. godini. Zajedno sa ishemijskom bolesti srca, cerebrovaskularnim oboljenjima, kancerom pluća i šećernom bolešću, depresivni poremećaji činili su čak 70% ukupnog opterećenja društva bolestima 2000. godine u Srbiji (Jankovic i sar., 2007).

Pored toga što predstavlja vodeći uzrok onesposobljenosti, depresija iziskuje značajne troškove (Luppa i sar., 2007), kako direktne (troškovi lečenja i medicinske nege), tako i indirektno (troškovi zbog onesposobljenosti tj. troškovi usled gubitka resursa, u koje spadaju bolovanja i smanjenje produktivnosti) (Rice, 2000). Prema skorašnjoj studiji koja je procenjivala ekonomski teret poremećaja CNS-a u Ujedinjenom Kraljevstvu, poremećaji raspoloženja su bili na trećem mestu prema ukupnim troškovima (nakon demencija i psihotičnih poremećaja), a istovremeno su sva tri poremećaja iziskivala najmanje direktnih medicinskih troškova po pojedincu (Fineberg i sar., 2013).

Smrtnost bolesnika sa depresijom je veća u odnosu na opštu populaciju, a najčešće se događa usled suicida, posledica upotrebe alkohola i psihoaktivnih supstanci,

nesreća i kardiovaskularnih oboljenja (Semple i Smyth, 2013). Istraživanja procenjuju da je stopa suicida kod pacijenata sa depresijom 3,4% (Blair-West i sar., 1999), naspram 1,4% u opštoj populaciji (Värnik, 2012), a zapaženo je da su ove stope značajno veće kod muškaraca nego kod žena (7% vs. 1%) (Blair-West i sar., 1999).

1.1.2. Klinička slika i dijagnostički kriterijumi

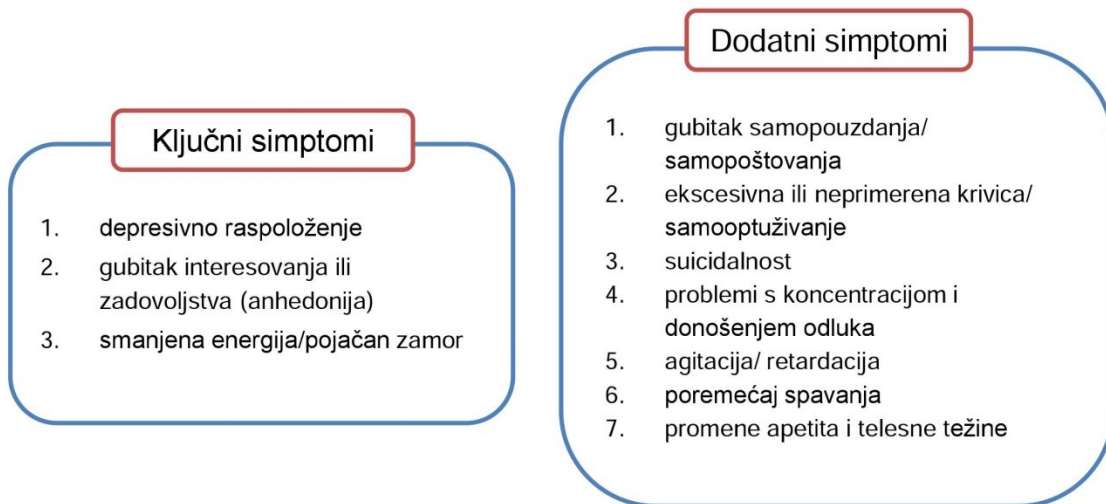
Dijagnoza depresije se u našoj zemlji postavlja na osnovu kriterijuma Međunarodne klasifikacije bolesti – 10. revizija (MKB-10) čiji je izdavač Svetska zdravstvena organizacija (SZO, 1998). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) se u ovu svrhu primenjuje drugi klasifikacioni sistem – Dijagnostički i statistički priručnik Američke psihijatrijske asocijacije (DSM-V), koji je i izvan granica SAD široko prihvaćen u istraživačkim krugovima (American Psychiatric Association, 2013). Prema kriterijumima MKB-10 da bi dijagnoza depresivnog poremećaja bila postavljena, neophodno je da su simptomi prisutni barem dve nedelje i da predstavljaju značajno odstupanje od normalnog stanja (tj. izazivaju značajnu patnju i/ili značajno utiču na socijalno, profesionalno ili opšte funkcionisanje). Takođe, neophodno je da klinička slika nije uzrokovana nekim drugim poremećajem ili upotrebom psihoaktivnih supstanci, alkohola ili lekova i da se ne javlja u sklopu žalovanja (SZO, 1998).

Važno je razlikovati depresiju u okviru unipolarnog depresivnog poremećaja i bipolarnog poremećaja. Naime, određene osobe koje imaju depresiju mogu tokom života iskusiti ograničene periode povišenog raspoloženja i povećane aktivnosti i energije (u zavisnosti od intenziteta simptoma i uticaja na funkcionalnost razlikuju se hipomanija i manija) i tada govorimo o bipolarnom poremećaju (Jašović-Gašić i Lečić-Toševski, 2007). Ukoliko se, pak, tokom života javljaju isključivo depresivne epizode, bez epizoda manije ili hipomanije, govorimo o unipolarnom depresivnom poremećaju. Iako postoji izvesno preklapanje simptomatologije između unipolarnog depresivnog poremećaja i depresivne faze bipolarnog poremećaja, etiologija, određene kliničke manifestacije, tok i lečenje ova dva klinička entiteta su različiti (Mitchell i sar., 2011; Živanović i Paunovic, 2005). Stoga će predmet ovog rada biti isključivo unipolarni depresivni poremećaj, defisan kriterijumima MKB-10, i na koji će se u daljem tekstu odnositi pojmovi „depresivni poremećaj“, „depresivna epizoda“ i „depresija“.

Depresivni poremećaji su u MKB-10 podeljeni na:

1. depresivnu epizodu, različitog intenziteta (blaga, umerena, teška) i kvaliteta (sa „somatskim simptomima“, sa „psihotičnim simptomima“). Kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode predstavljeni su na shemi 1.
2. rekurentni depresivni poremećaj: podrazumeva najmanje dve depresivne epizode koje razdvaja interval bez simptoma u trajanju od barem dva meseca. Takođe se može okarakterisati po intenzitetu i kvalitetu.
3. perzistentni depresivni poremećaj – distimiju (SZO, 1998; Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2011).

Kao što se može zaključiti iz sheme 1, klinička slika depresije je veoma heterogena. Konkretno, dva pacijenta sa depresijom mogu imati samo jedan zajednički simptom. Takođe, simptomatologija navedena u ovim kriterijumima se preklapa i sa drugim psihijatrijskim poremećajima, npr. anksioznošću. U nedostatku patognomoničnih znakova, dijagnoza depresije se postavlja *per exclusionem*, te je kao takva podložna promenama tokom vremena. Primera radi, ako osoba koja se više godina leči od depresije prvi put iskusi maničnu epizodu kasnije u životu, dijagnoza se preinačuje u bipolarni poremećaj, koji predstavlja drugačiji patofiziološki entitet. Isto tako, osoba kod koje se depresija javi prvi put u starijem životnom dobu može razviti u toku narednih godina demenciju, te je depresivni sindrom predstavljao samo početak ovog oboljenja (Li i sar., 2011). Prema tome, dijagnostički pristup zasnovan na simptomima, a bez specifičnih markera, stvara značajna ograničenja u interpretaciji, konceptualizaciji i proučavanju depresivnih poremećaja, a samim tim i njihovog lečenja. Zbog toga je i etiologija depresije većinom nepoznanica, a u daljem tekstu će biti navedene samo neke od najzastupljenijih hipoteza o njenom uzroku i mehanizmima nastanka.



Blaga depresivna epizoda (F32.0)

Bar 2 ključna + dodatni simptomi = ukupno bar četiri simptoma

Umerena depresivna epizoda (F32.1)

Bar 2 ključna + dodatni simptomi = ukupno bar 6 simptoma

Teška depresivna epizoda bez psihotičnih simptoma (F32.2)

Sva tri ključna + dodatni simptomi = ukupno bar 8 simptoma

Teška depresivna epizoda sa psihotičnim simptomima (F32.3)

Kriterijumi za tešku depresivnu epizodu + sumanute ideje ili halucinacije
i/ ili depresivni stupor

Shema 1. MKB-10 kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode.

1.1.3. Etiopatogeneza depresije

Precizni uzroci depresivnog poremećaja nisu dovoljno poznati. Heterogenost manifestacija depresije, delom zasnovana i na relativnoj nespecifičnosti postojećih dijagnostičkih kriterijuma, dodatno otežava razjašnjavanje mogućih etiopatogenetskih mehanizama. Do sada istraživani uzročni faktori su relativno pojednostavljeno podeljeni na biološke, genetske i psihosocijalne. Ova podela nije idealna jer tri navedene grupe faktora utiču jedni na druge i međusobno se preklapaju (Sadock i sar., 2007). Konkretno, psihosocijalni faktori i genetski faktori mogu da utiču na biološke faktore (npr. genski polimorfizmi za određene neurotransmitere u interakciji sa traumom u detinjstvu dovode do poremećaja funkcije neurotransmiterskih sistema koji su prisutni u depresiji). Takođe, određeni psihološki faktori imaju genetsku osnovu. Primera radi, nasledna osnova neuroticizma je najpre pokazana u blizanačkim studijama (Kendler i sar., 1993a), a kasnije je identifikovan i specifični polimorfizam (u promotoru gena za serotoninški transporter) koji korelira sa većom učestalošću ove dimenzije ličnosti (Lesch i sar., 1996; Sen i sar., 2004), doduše ovaj nalaz nije replikovano u svim kasnijim studijama (npr. Flory i sar., 1999; Willis-Owen i sar., 2005).

Integrisanje bioloških i psihosocijalnih faktora pri proučavanju složenih poremećaja predložio je internista Džordž Engel sedamdesetih godina XX veka (Engel, 1977). Iako njegov biopsihosocijalni model nije bio vezan isključivo za psihijatriju, upravo je veliku popularnost doživeo u ovoj grani s obzirom da je predstavljao pokušaj da se pomire dve dugo suprotstavljene struje – ona koja je zastupala stav da psihijatrijski poremećaji imaju dominantno biološku osnovu i ona prema kojoj su psihijatrijski poremećaji u osnovi psihodinamski (Ghaemi, 2009). Kasnije su nastupile i kritike ovog modela. Eklektizam koji je model omogućio ispostavio se kao njegovo najveće ograničenje. Gaemi je to sročio na sledeći način: “ako neko poželi može istaći “bio” ili “psiho”[...] ili „socijalno“. Ali ne postoji obrazloženje zašto bi se pošlo u jednom ili drugom pravcu: ako odemo u restoran i uzmemo spisak sastojaka umesto recepta, možemo ga spremiti kako god poželimo“ (Ghaemi, 2009). Drugim rečima, nedostatak biopsihosocijalnog modela, kako ga je postavio Engel, jeste upravo u tome što dopušta da se proizvoljno odlučuje o dominantnoj etiološkoj komponenti. Gaemi dalje navodi da je izbor naučnih metoda ključan za dalje proučavanje odnosa složenih faktora koji učestvuju u etiologiji psihijatrijskih poremećaja. Naime, istraživanja iz oblasti neuronauka koja su usledila

dovela su do novih saznanja vezanih za neurotransmitterske sisteme i molekularne procese unutar ćelije, ali su donela i izvesno razočaranje u pokušajima da se identifikuju snažniji etiološki faktori psihijatrijskih poremećaja. Uporedo sa tim razvijale su se i nove metode kojima podaci mogu da se analiziraju. Postalo je jasno da su interakcije različitih bioloških, psiholoških i drugih faktora u nastanku psihijatrijskih poremećaja kao što je depresija mnogo složeniji. I upravo zbog toga, predmet ove doktorske disertacije jeste da, uz pomoć specifične statističke metode (*modelovanja strukturalnim jednačinama*), analizira odnose između tri grupe potencijalnih etioloških faktora za depresiju. U okviru navedenih grupa faktora, u posebnom fokusu će biti glukokortikoidna signalizacija (iz grupe bioloških faktora) i crte ličnosti i stresogeni događaji (iz grupe psihosocijalnih faktora), ali će u narednom poglavlju biti predstavljene i druge dominantne biološke teorije depresije.

1.2. Biološke teorije depresije

1.2.1. Monoaminska hipoteza depresije

Ideja da je u osnovi depresije snižena funkcija monoamina (serotonina, noradrenalina i dopamina) zasnovana je na opservacijama vezanim za prve antidepresive, za koje se ispostavilo da svoj efekat ostvaruju tako što povećavaju monoaminergičku transmisiju. Kasnije registrovani antidepresivi, kao što su selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors – SSRI*), sintetisani su na osnovu ovog saznanja. Međutim, antidepresivi povećavaju dostupnost monoamina trenutno, dok se efekat na simptome depresije ispoljava tek nakon 3-4 nedelje redovne terapije (Stahl, 2008). Takođe, pokazano je da eksperimentalno izazvano smanjenje nivoa monoamina dovodi do relapsa depresivne simptomatologije samo kod osoba sa pozitivnom istorijom depresije, ali ne i kod zdravih ispitanika (Ruhé i sar., 2007). Kada su u pitanju nivoi perifernih metabolita monoamina (za koje bi se očekivalo da budu smanjeni u depresiji), rezultati velikog broja istraživanja su kontradiktorni, u smislu da su pokazani i povišeni i smanjeni nivoi ovih parametara u različitim uzorcima (urinu, likvoru), kao i izostanak razlika između pacijenata i kontrola (Roy i sar., 1986; Redmond i sar., 1986). Doduše, postoje i studije koje govore u prilog povećane sinteze serotonina u depresiji, uključujući i studije koje sugerišu da antidepresivi *smanjuju* sintezu serotonina (Barton i sar., 2008; Andrews i sar., 2015).

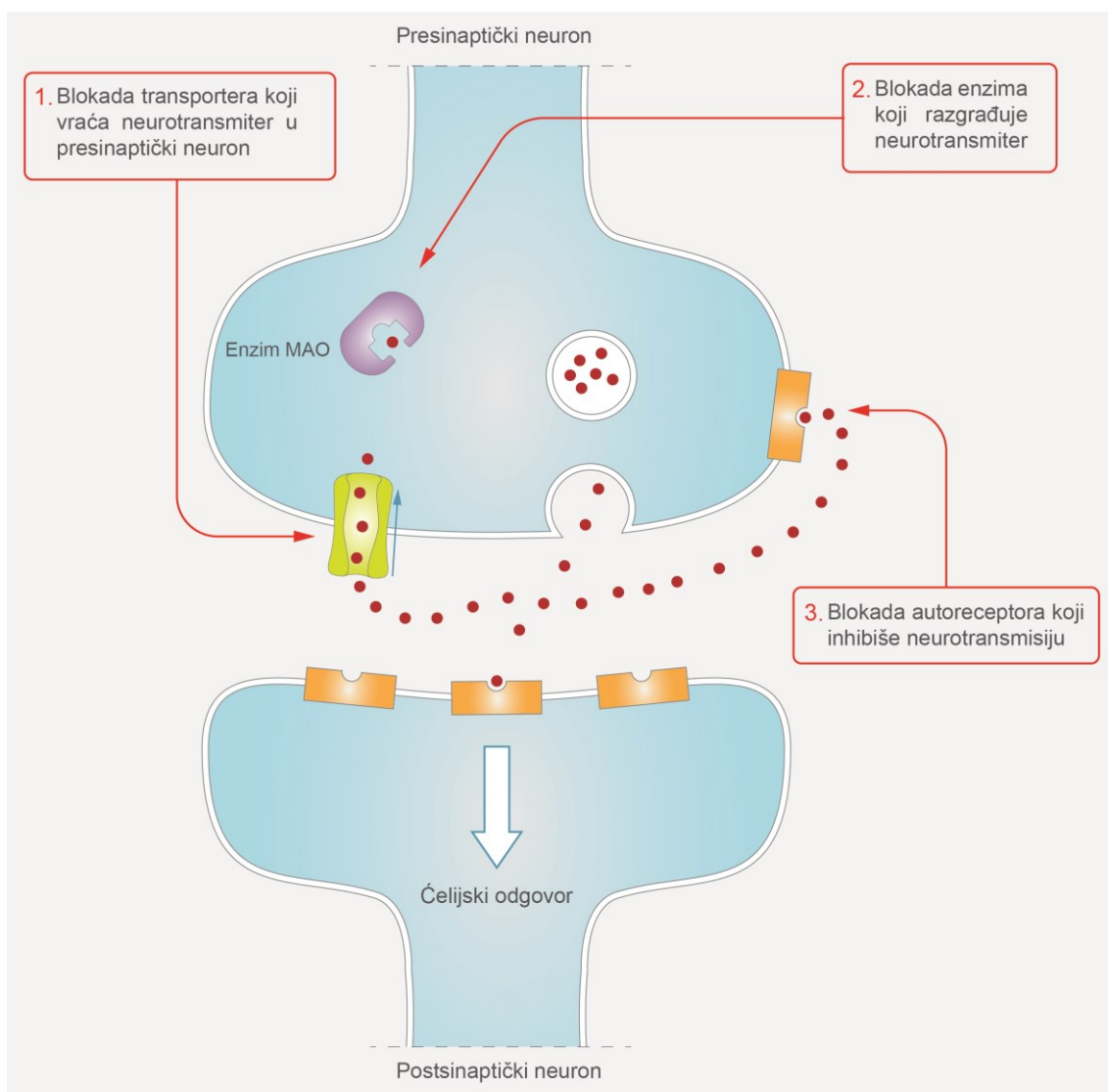
Ovo upućuje na zaključak da je etiologija depresije kompleksnija od jednostavne deficijencije monoamina, tj. da je uz izmenjenu monoaminergičku transmisiju neophodan dodatni mehanizam koji bi doveo do depresije. Dalja istraživanja su sugerisala da u depresiji postoji izmenjen broj ili senzivnost pre- i postsinaptičkih monoaminergičkih receptora (Belmaker i Agam, 2008). Novije studije su istakle još neke moguće mehanizme dejstva antidepresiva. Jedan od njih je noradrenalinom i serotoninom posredovano povećanje neurotrofičnosti, s obzirom da odgovor na antidepresive koreliše sa povećanjem nivoa BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), faktora rasta ključnog za opstanak i rast neurona i razvoj sinapsi u CNS-u (Aydemir i sar., 2005). Takođe, pokazano je da pojačan imunski odgovor utiče na monoaminergičku neurotransmisiju (Miller i sar., 2009), a sve veće interesovanje budi i interakcija glukokortikoidne signalizacije i serotonergičke i noradrenergičke transmisije u depresiji (Porter i sar., 2004).

Uprkos navedenim nepoznicama, medikamentozna terapija depresije je i dalje zasnovana na monoaminskoj teoriji. Konkretno, i dalje je uvrežen stav da se efekat većine antidepresiva zasniva na povećanju dostupnosti noradrenalina, serotoninina i dopamina. Smatra se da se ovo ostvaruje nekim od sledećih mehanizama (ili njihovom kombinacijom):

1. blokiranjem transportera koji vraća neurotransmiter u presinaptički neuron,
2. blokiranjem enzima koji razgrađuje neurotransmiter (mono-aminooksidaze – MAO),
3. blokiranjem presinaptičkih autoreceptora koji inhibiraju neurotransmisiju (Stahl, 2008) (slika 1).

Antidepresivi se međusobno razlikuju prema tome kojim mehanizmom deluju i kom neurotransmiteru povećavaju dostupnost (tabela 1). Nekoliko novijih antidepresiva, npr. agomelatin i tianeptin, imaju drugačije mehanizme dejstva i deluju na hormone i druge neurotransmitere (Stahl, 2008; Jašović-Gašić i sar., 2012), ali je njihova upotreba još uvek ograničena. Najčešće korišćeni antidepresivi pripadaju grupi selektivnih inhibitora preuzimanja serotoninina. Zbog najsigurnijeg profila neželjenih dejstava smatraju se lekovima prve linije za lečenje depresije. Ukoliko bolesnik ne odgovori na prvi izbor antidepresiva, ili se jave značajni neželjeni efekti, pristupa se zameni antidepresiva drugim antidepresivom, najčešće sa različitim mehanizmom

dejstva (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2011). Triciklični antidepresivi smatraju se najpotentnijim lekovima u terapiji depresije, ali moguća neželjena dejstva, koja uključuju i potencijalno ozbiljne kardiovaskularne i neurološke manifestacije (tabela 1), ograničavaju njihovu širu primenu. Takođe, treba naglasiti da je aktuelna farmakološka terapija neefikasna kod 40% bolesnika sa depresijom (Rush i sar., 2006), što zahteva detaljnije istraživanje svih mogućih etioloških mehanizama depresije, radi pronalaženja novih ciljnih molekula za terapiju ovog poremećaja.



Slika 1. Mehanizmi dejstva glavnih grupa antidepresiva (MAO: mono-aminooksidaza).
Izvor: Stahl, 2008; Jašović-Gašić i sar., 2012.

Tabela 1. Mehanizam dejstva, primena i najznačajniji neželjeni efekti antidepresiva

Grupa	Mehanizam dejstva (glavni)	Primena*	Najznačajnija neželjena dejstva
Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina: <i>fluoksetin, fluvoxamin, sertralin, paroksetin, citalopram, escitalopram</i>	Brokiraju serotoninski transporter i na taj način povećavaju raspoloživost serotonina u sinaptičkoj pukotini.	Lekovi prvog izbora	Seksualna disfunkcija, gastrointestinalni simptomi (mučnina, dijareja/opstipacija)
Inhibitori ponovnog preuzimanja noradrenalina i serotonina: <i>venlafaksin, duloksetin, milnacipran</i>	Blokiraju ponovno preuzimanje noradrenalina i serotonina, i indirektno (preko noradrenalina) pospešuju transmisiju dopamina frontalno.	Lekovi prvog izbora	Seksualna disfunkcija, gastrointestinalni simptomi Pri višim dozama: arterijska hipertenzija
Inhibitor ponovnog preuzimanja noradrenalina i dopamina: <i>bupropion</i>	Brokira transportere za noradrenalin i dopamin, i indirektno (preko noradrenalina) pospešuje transmisiju dopamina frontalno.	Lek prvog izbora	Sušenje usta, opstipacija, gubitak tel. težine, glavobolja, zujanje u ušima, hipertenzija Retko: konvulzije (dozno-zavisno)
Inhibitor ponovnog preuzimanja noradrenalina: <i>reboksetin</i>	Blokira transporter za noradrenalin i indirektno (preko noradrenalina) pospešuje transmisiju dopamina frontalno.		Vrtoglavica, sušenje usta, opstipacija, nesаница, ortostatska hipotenzija
Noradrenergički i specifični serotonergički antidepresivi: <i>mirtazapin</i>	Povećava neurotransmisiju noradrenalina (blokira presinaptičke α_2 adrenergičke receptore) i serotonina (preko α_2 receptora na serotonergičkim neuronima). Blokira 5HT _{2A} , 5HT _{2C} , 5HT ₃ receptore. Deluje i na histaminske H ₁ receptore.	Lek prvog izbora	Sedacija, povećanje apetita i telesne težine, sušenje usta, opstipacija
Antagonisti serotonina i inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina: <i>trazodon, nefazodon</i>	Blokiraju serotonergičke 5HT ₂ receptore (potentno) i blokiraju serotoninski transporter (manje potentno). Nefazodon blokira i transporter za noradrenalin.		Sedacija, mučnina, edem, nejasan vid, opstipacija, suvoća usta, sinkopa, hipotenzija Retki: prijapizam, poremećaj srčanog ritma
Parcijalni agonist serotonina i inhibitor ponovnog preuzimanja serotonina: <i>vilazodon</i>	Blokira serotoninski transporter i parcijalni je agonist presinaptičkih 5HT _{1A} receptora.		Suvoća usta, vrtoglavica, nesаница, gastrointestinalni simptomi

Triciklični antidepresivi: <i>amitriptilin, imipramin, klomipramin, doksepin, maprotilin</i>	U različitom stepenu blokiraju preuzimanje noradrenalina i serotonina (blokiraju transporter za noradrenalin/serotonin).	Lekovi drugog i trećeg izbora	Zamagljen vid, mučnina, opstipacija, nemir, ortostatska hipotenzija, tahikardija, seksualna disfunkcija, povišenje intraokularnog pritiska Potencijalno opasni: sniženje konvulzivnog praga, produženje QT intervala, aritmije, iznadan srčana smrt, paralitički ileus, aktiviranje suicidalne ideacije
Tetraciklični antidepresivi: <i>mianserin</i>	Blokira presinaptičke α_2 adrenergičke receptore, povećava neurotransmisiju noradrenalina i serotonina (preko α_2 receptora na serotonergičkim neuronima). Blokira histaminske H1 receptore.		Sedacija, povećanje apetita i telesne težine Retki: krvne diskrazije, konvulzije
Inhibitor monoamino-oksidaze (MAO): <i>moklobemid</i>	Inhibiše MAO koji metaboliše sva tri neurotransmitera, te povećava dostupnost noradrenalina, serotonina i dopamina. Inhibicija je reverzibilna (do 24h).	Lekovi trećeg izbora	Nesanica, agitacija, tremor, suvoća usta, gastrointestinalni simptomi Retko: hipertenzija, konvulzije, aktivacija suicidalnosti
Agonist melatonina i specifični antagonist serotonina: <i>agomelatin</i>	Agonist melatonin-1 i melatonin-2 receptora, antagonizuje 5HT _{2C} receptore, čime povećava transmisiju noradrenalina i dopamina prefrontalno.	Lek prvog izbora	Mučnina, vrtoglavica, pospanost, umor, glavobolja, dijareja, opstipacija, anksioznost Retki: hepatitis, suicidalnost
<i>Tianeptin</i>	Tricklične je strukture, ali drugačiji po mehanizmu dejstva: moduliše glutamatergičku neurotransmisiju (pretpostavlja se preko AMPA receptora), moguće da povećava i preuzimanje serotonina.	Lek prvog izbora	Glavobolja, vrtoglavica, nesanica, sedacija, sušenje usta, mučnina, opstipacija Retki: tahikardija, ekstrasistole, produžetak QT intervala, hepatotoksičnost

Izvor: Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2011; American Psychiatric Association (APA), 2010; Bauer i sar., 2013; Stahl, 2008; Jašović-Gašić i sar., 2012.

*Važi za nepsihotičnu depresivnu epizodu, prema Republičkoj stručnoj komisiji za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2011.

1.2.2. Inflamacija i depresija

Pacijenti sa depresijom, u poređenju sa zdravim osobama, imaju povišene nivoe perifernih citokina u serumu i likvoru, kao i povišene vrednosti akutnih zapaljenskih proteina, hemokina, adhezivnih molekula i inflamatornih medijatora (Miller i sar., 2009). IL-6, IL-1 i TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) jesu najkonzistentniji periferni markeri zapaljenja u depresiji (Miller i sar., 2009). Ovo je značajno zbog toga što citokini prolaze krvno-moždanu barijeru i stupaju u interakcije sa velikim brojem patofizioloških sistema uključenih u depresiju, utičući na metabolizam neurotransmitera, neuroendokrinu funkciju i neuroplastičnost. Konkretno, studije na animalnim modelima su pokazale da citokini utiču na smanjenje monoaminskih neurotransmitera. Na primer, citokini preusmeravaju metabolizam triptofana na kinureinski put, umesto ka sintezi serotonina, i smanjuju dostupnost kofaktora enzima koji sintetišu monoamine (Miller i sar., 2013). Aktivacijom specifičnih kinaza citokini povećavaju ekspresiju i aktivnost serotoninskih transportera i na taj način smanjuju dostupnost serotonina u sinapsama (Zhu i sar., 2006). Takođe, disfunkcija neuroendokrinog sistema (glukokortikoidna rezistencija usled hroničnog stresa i posledično smanjena senzitivnost na antiinflamatorne efekte kortizola) može da doprinese hroničnoj aktivaciji imunskog sistema u depresiji (Miller i sar., 2009). Citokini povećavaju oksidativni stres aktivacijom indukovane sinteze azot-monoksida (iNOS) i sledstvenim povećanjem glutamatergičke neurotransmisije, što dovodi do smanjene sinteze neurotrofičnih faktora, kao što je BDNF, i povećanja neurotoksičnosti (Ida i sar., 2008). Mnogi istraživači ističu značaj inflamacije u depresiji, sugerišući čak da su depresivni poremećaji u osnovi infalamatorne bolesti, ali ima i onih koji naglašavaju kontraargumente. Konkretno, efekti citokina na raspoloženje su kratkotrajni i prolazni, a antagonisti zapaljenskih parametara (npr. antagonisti supstance P) nemaju terapijski efekat u depresiji (Belmaker i Agam, 2008).

1.2.3. Oksidativni stres i depresija

Kao što je već naglašeno, proinflamatorni citokini uzrokuju oksidativni i nitrosativni stres, narušavajući ravnotežu pro- i antioksidanasa u organizmu. Kod pacijenata sa depresijom zabeležene su izmenjene vrednosti glutaciona, mokraćne kiseline, askorbinske kiseline, glutation peroksidaze, superoksid dizmutaze, kao i

povišene vrednosti malonilaldehida, slobodnih radikala, nitrita i nitrata u serumu (Galecki, 2014; Lukic i sar., 2014). Recipročno, snižene vrednosti antioksidanasa ili antioksidativnih enzima dovode do jačeg inflamatornog odgovora (Kobrosly i van Wijngaarden, 2010). Antidepresivi smanjuju oksidativni stres, što dodatno ukazuje na značaj ovog sistema u patogenezi depresije. Suplementi antioksidanasa, poput vitamina C, tokoferola i cinka, predloženi su kao dodatak antidepresivnoj terapiji, a sugerise se da bi i antiinflamatorni agensi, delujući na smanjenje imunskog odgovora i oksidativnog stresa, takođe mogli doprineti oporavku depresivnih pacijenata (Moretti i sar., 2012; Swardfager i sar., 2013).

1.2.4. Mitohondrijalna disfunkcija i depresija

Mitohondrije stvaraju adenzin trifosfat (ATP), koji predstavlja glavni izvor energije za ćeliju. Energija koja se oslobađa tokom razgradnje metabolita iz hrane se preko respiratornog lanca u mitohondrijama koristi za stvaranje ATP-a, koji služi kao “izvor enegrije” koji ćelije kasnije troše. Osim u energetskom metabolizmu, mitohondrije igraju važnu ulogu u održavanju homeostaze ćelijskog kalcijuma, regulaciji slobodnih radikala i regulaciji apoptoze (Newmeyer i Ferguson-Miller, 2003).

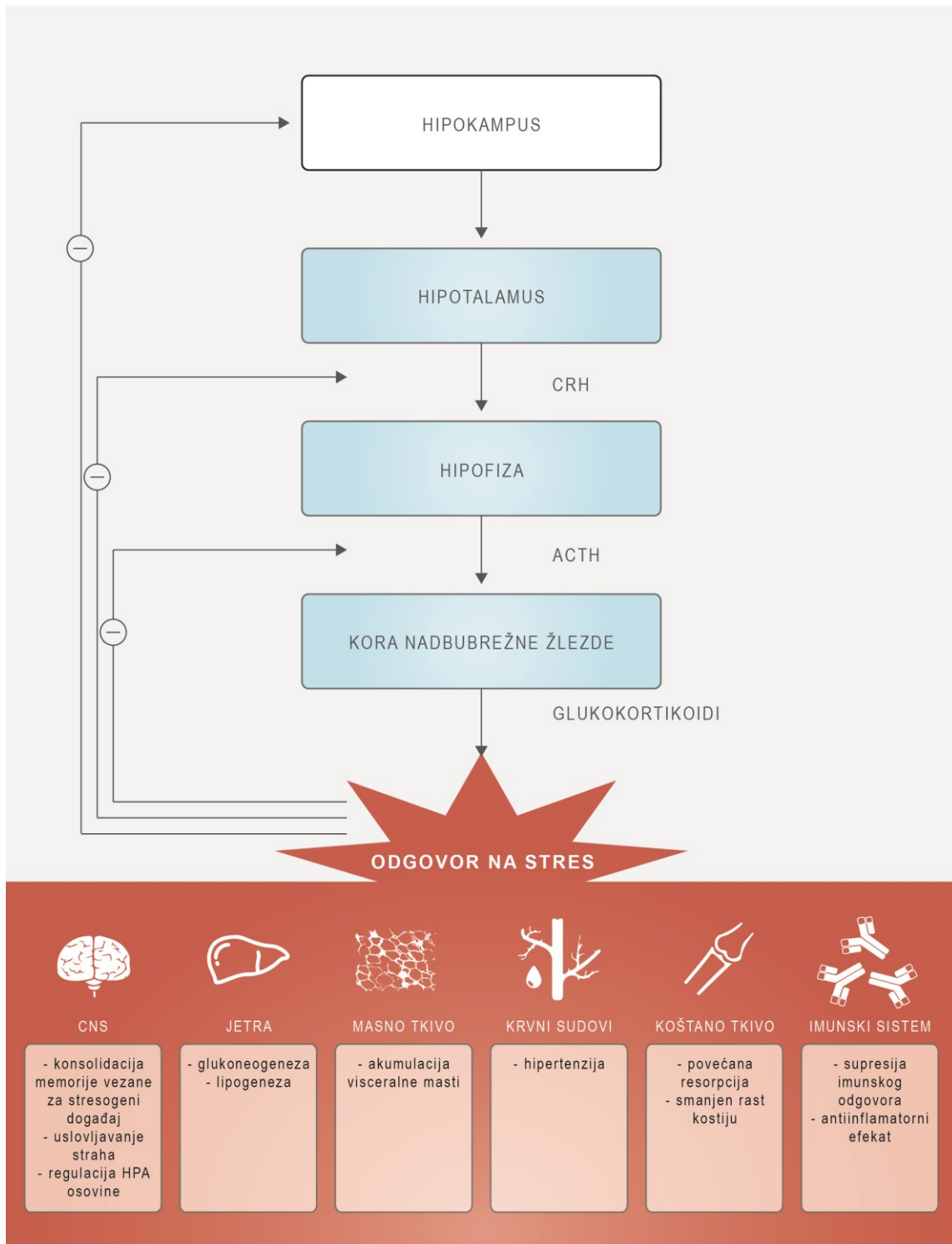
Novija istraživanja su ukazala da u depresiji postoji poremećaj u veličini, distribuciji i funkciji mitohondrija. Narušenu mitohondrijalnu funkciju prati smanjena sinteza ATP-a, povišen oksidativni stres i stvaranje slobodnih radikala, kao i aktivacija zapaljenskih medijatora u koje spadaju TNF- α i IL-6. Na primer, karakteristični simptomi depresije, kao što su poremećaj spavanja, umor, gubitak motivacije i teškoće pri održavanju koncentracije, mogu se objasniti i promenama u dostupnosti ATP-a u moždanim strukturama, koje su posebno osetljive na sniženje aerobnog metabolizma (Gardner i Boles, 2011). Interesantno je da je u animalnim modelima pokazano da antidepresivi i litijum dovode do regulacije funkcije mitohondrija, kao i da poboljšavaju postignuća na testovima kognicije kod ispitivanih životinja (Moylan i sar., 2013).

1.2.5. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina i depresija

Hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA) osovina je biološki sistem koji je ključan za fiziološki odgovor na stres. Krajnji produkti HPA osovine, glukokortikoidi, izazivaju brojne promene u organizmu, čiji je evolutivni značaj povećanje sposobnosti

preživljavanja u susretu sa opasnošću. Odgovor na stres karakterišu dva vremenska „talasa“ aktivnosti medijatora stresa. Prvi talas je rezultat trenutne aktivnosti noradrenalina, serotonina, i kortikotropin-oslobađajućeg hormona (*corticotropin-releasing hormone* – CRH). Aktivnosti navedenih medijatora služe da pospeše vigilnost pažnje, opreznost, procenu situacije i izbor optimalne strategije suočavanja sa stresorom. S obzirom na to da je lokalno povišenje pomenutih medijatora kratkotrajno, a njihova aktivnost se brzo smanjuje, ovaj prvi talas ne dovodi do trajnih adaptivnih komponenti odgovora na stres, kao što je konsolidacija pamćenja vezana za stresogeni događaj u CNS-u, ili prikupljanje energetske rezerva na periferiji. Umesto toga, ovo se postiže drugim „talasom“, koji podrazumeva modifikaciju genske ekspresije i ćelijske funkcije, a koja se pripisuje glukokortikoidima koji deluju preko glukokortikodnog receptora (GR) (Joëls i Baram, 2009). Fiziološki efekat glukokortikoida na centralni nervni sistem i periferna tkiva je prikazan na slici 2.

Poremećaj HPA osovine je odavno primećen u depresiji, a najčešće se manifestuje povišenom koncentracijom kortizola u serumu. Takođe, prema određenim istraživanjima kod čak 44% pacijenata sa depresijom viđa se izostanak supresije kortizola nakon davanja egzogenog glukokortikoida – deksametazona (Arana i sar., 1985; Vreeburg i sar., 2009; Sarai i Matsunaga, 1986), što se označava kao (delimična) glukokortikoidna rezistencija. Interesantno je da uspešna terapija antidepresivima dovodi do normalizacije aktivnosti HPA osovine i regulacije kortizolemije (Deuschle i sar., 2003). S obzirom na to da kortizol svoje efekte ispoljava putem GR-a, smatra se da poremećaj signalizacije GR-a leži u osnovi glukokortikoidne rezistencije u depresiji. Veliki broj istraživanja pokazao je da u depresivnim poremećajima postoje promene u ekspresiji GR-a, nuklearnoj translokaciji GR-a, GR-om posredovanoj transkripciji, kao i u aktivnostima proteina koji su uključeni u modulaciju aktivnosti GR-a (Anacker i sar., 2011). Značaj ovih istraživanja ogleda se u tome što se HPA osovina i signalizacija GR-a razmatraju i kao mete potencijanih antidepresiva (Maric i Adzic, 2013), ali razvoju novih lekova stoji na putu nedovoljno poznavanje svih učesnika u ovom signalnom putu.



Slika 2. HPA osovina i fiziološki efekat glukokortikoida na CNS i periferna tkiva (CRH: *corticotropin-releasing hormone*, ACTH: *adrenocorticotropic hormone*).

Izvor: Kadmiel i Cidlowski, 2013; Chrousos i Kino, 2009; Joëls i Baram, 2009.

1.2.5.1. Glukokortikoidna signalizacija i depresija

Glukokortikoidni receptor (GR) je ligand-zavisni transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju velikog broja gena, uključujući one čiji su produkti uključeni u metabolizam i imunski odgovor, ali i one koji su važni za preživljavanje neurona, neurogenezu i regulaciju HPA osovine (Kadmiel i Cidlowski, 2013). GR u svojoj neaktivnoj formi “boravi” u citoplazmi, a nakon vezivanja liganda (npr. kortizola) premešta se u jedro, gde stupa u interakcije sa specifičnim komponentama DNK i moduliše gensku ekspresiju. Na aktivnost GR-a utiče veliki broj ćelijskih faktora (proteina), koji deluju da pospeše ili inhibiraju GR-om posredovanu transkripciju specifičnih gena.

Neaktivan GR nalazi se u citoplazmi u kompleksu sa svojim šaperonima (*chaperone* – pratilac), tj. proteinima koji pomažu konformaciju GR-a iz stanja niskog do stanja visokog afiniteta za hormon. Dva glavna šaperona GR-a su *heat-shock protein 70* (HSP70) i *heat-shock protein 90* (HSP90) (Vandevyver i sar., 2012). Takođe, nekoliko proteina košaperona učestvuje u ovom procesu maturacije neaktivnog GR-a. U poslednje vreme dosta pažnje se poklanja košaperonima iz porodice imunofilina: FKB506-vezujućem proteinu 51 (*FKB506-binding protein 51* – FKBP51) i FKB506-vezujućem proteinu 52 (FKBP52), koji različito utiču na afinitet GR-a za ligand. Konkretno, FKBP51 smanjuje afinitet receptora za glukokortikoide, dok ga FKBP52 povećava. Povećana ekspresija FKBP51 povezana je sa povišenom glukokortikodnom rezistencijom, većim brojem povratnih epizoda depresije, i boljim odgovorom na antidepresive (Binder i sar., 2004). Značaj FKBP51 naglašava činjenica da se aktuelno razmatra i kao potencijalni ciljni molekul za terapiju depresije (Schmidt i sar., 2012). Vezivanje liganda za GR dovodi do promene konformacije receptora, njegove disocijacije iz proteinskog kompleksa, dimerizacije i prelaska u jedro (Bledsoe i sar., 2002). Aktivirani GR u formi homodimera vezuje se za visoko konzervirane delove na DNK, nazvane GR responsivni elementi (*GR response elements* – *GRE*), čime se aktivira transkripcija. GR takođe može preći u jedro i kao monomer, i tada se vezuje za druge transkripcione faktore, kao što je nuklearni faktor kapa B (*nuclear factor kappa B* – *NFkB*), protein aktivator-1 (*activator protein-1* – AP-1) ili vezujući protein za ciklični AMP responsivni element (*cyclic AMP response element binding protein* – *CREB*) (McKay i Cidlowski, 1998; Jonat i sar., 1990; Föcking i sar., 2003). Vezivanje za ove

transkripcione faktore dovodi do represije transkripcije ciljnih gena, a to su većinom geni za inflamatorne citokine (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF α , ciklooksigenazu-2 (COX-2) i inducibilnu sintazu azot-monoksida – iNOS) (De Bosscher i Haegeman, 2009). Upravo represija transkripcije ovih gena zaslužna je za imunosupresivne efekte glukokortikoida. Takođe, represija transkripcije može biti uzrokovana i vezivanjem GR dimera za *negativne* GRE. Na primer, negativni GRE su identifikovani u promotorskom regionu gena za CRH, što može biti jedan od mehanizama negativne povratne inhibicije glukokortikoida na HPA osovinu (Zhou i Cidlowski, 2005).

GR se javlja u vidu više izoformi, koje nastaju obradom primarnog transkripta receptora. Dve najbolje proučene izoforme su GR α i GR β . GR α predstavlja klasičnu izoformu koja svoje efekte ostvaruje vezujući se za glukokortikoide, po vezivanju za ligand prelazi u jedro i utiče na transkripciju ciljnih gena (Zhou i Cidlowski, 2005). Nasuprot tome, GR β se ne vezuje za glukokortikoide, već zaustavlja aktivnost GR α tj. transkripciju, formirajući GR α /GR β heterodimere (Oakley i Cidlowski, 2011). GR α je zastupljen u gotovo svim tkivima u organizmu, dok GR β pokazuje veću specifičnost. S obzirom da su u fiziološkim uslovima nivoi GR β u većini tkiva niski, smatra se da glavni put obrade primarnog transkripta GR-a (u fiziološkim uslovima) ide u smeru stvaranja GR α izoforme (Pujols i sar., 2002; Zhou and Cidlowski, 2005).

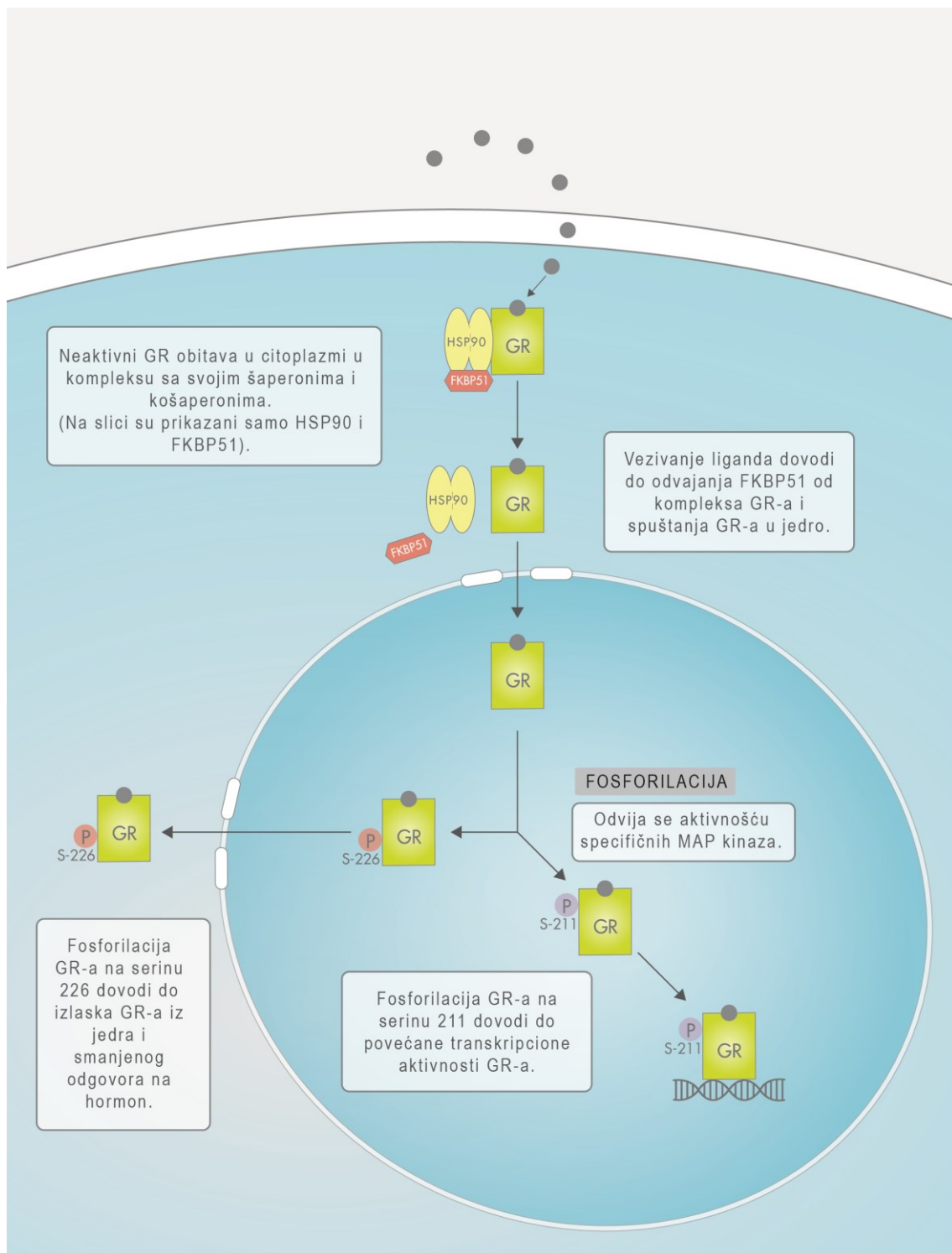
Još jedan vid modulacije aktivnosti GR-a jeste fosforilacija. Fosforilacija predstavlja dodavanje fosfatne grupe na protein ili drugi organski molekul, sa ciljem da se moduliše njegova aktivnost. Fosforilacije igraju važnu ulogu u mnogim ćelijskim funkcijama. Konkretno, fosforilacijom se određeni supstrat može aktivirati ili inaktivirati, može mu se menjati stabilnost, lokalizacija ili interakcija sa drugim proteinom, ili fosforilacija može služiti kao signal za dodatne post-translacione modifikacije koje utiču na funkciju supstrata (Treviño i Weigel, 2013). Ključna karakteristika fosforilacije jeste da može da integriše signale koji dolaze iz više ćelijskih puteva (Treviño i Weigel, 2013).

Enzimi koji vrše fosforilaciju nazivaju se kinaze. To su evolutivno visoko očuvani proteini, prisutni kod svih eukariota upravo zbog njihove ključne uloge u prenosu signala unutar ćelije i koordinaciji složenih ćelijskih procesa. Kinaze koje učestvuju u fosforilaciji GR-a pripadaju velikoj porodici nazvanoj *mitogenom aktivirane protein kinaze* (*mitogen-activated protein kinases* – MAPK). Humani GR može biti

fosforilisan na više različitih aminokiselinskih rezidua, a izgleda da su različite MAPK zadužene za fosforilaciju različitih rezidua. Najviše su proučavane fosforilacije GR-a na serinu 203, serinu 211, serinu 226 i serinu 404 (Kadmiel i Cidlowski, 2013; Beckley i Cidlowski, 2009). S obzirom na prethodno pokazanu povezanost sa poremećajima raspoloženja, fokus ovog doktorata će biti fosforilacija GR-a na serinu 226 (pGR-226) i na serinu 211 (pGR-211). Čini se da je fosforilacija na obe navedene rezidue ligand-zavisna, s obzirom da prisustvo specifičnih liganda, uključujući kortizol i deksametazon, značajno povećava fosforilaciju GR-a na obe serinske rezidue. Pokazano je da fosforilacija GR-a na serinu 226 inhibira transkripcionu aktivnost receptora i stimuliše izlazak GR-a iz jedra (Chen i sar., 2008; Itoh i sar., 2002). Fosforilacija GR-a na serinu 211 pospešuje transkripcionu aktivnost receptora, što se odražava na ekspresiju različitih gena (Chen i sar., 2008). Pojednostavljena GR signalizacija, sa fokusom na FKBP51 i fosforilaciju GR-a na serinu 226 i serinu 221, prikazana je na slici 3.

U ćelijskoj kulturi, fosforilacija je dinamičan proces, koji se dešava relativno brzo po inicijalnom stimulusu. Konkretno, Čen i sar. (2008) su ispitivali fosforilaciju GR na serinu 226 i 211 *in vitro*, tretirajući dve različite kulture ćelija steroidnim hormonima. U U2OS ćelijama je došlo do brzog povećanja fosforilacije GR na serinu 226 tokom prvog sata od davanja deksametazona, koja se održavala visokom tokom 4 sata, nakon čega je, u sledećih 6-12h progresivno opala. Slična dinamika je uočena i za fosforilaciju GR-a na serinu 211. Nasuprot tome, u drugoj kulturi ćelija (A549) povećanje nivoa pGR-226 je nakon tretmana deksametazonom bilo blago, dok je povećanje nivoa pGR-211 bilo kao i u ćelijama U2OS. Osim tipa ćelija, pokazano je i da tip liganda utiče na stepen fosforilacije GR-a. Deksametazon, kortizol, deoksikortikosteron, progesteron i progestin indukuju fosforilaciju GR-a na serinu 226, što nije slučaj kada su u pitanju aldosteron, testosteron i dihidrotestosteron. Fosforilaciju GR na serinu 221 indukuju deksametazon, kortizol i, u manjem stepenu, deoksikortikosteron (Chen i sar., 2008).

U kompleksnim sistemima kakav je ljudski organizam dinamika fosforilacije GR-a nije dovoljno poznata. Ipak, interesantno je istraživanje Menkea i sar (2014), koji su ispitivali brzinu promene genske ekspresije nakon glukokortikoidne stimulacije kod



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz signalizacije GR-a sa fokusom na ulogu FKBP51 i fosforilacije GR-a (HSP90: *heat-shock protein 90*; FKBP51: *FKB506-binding protein 51*; MAP kinaze: mitogenom aktivirane protein kinaze).

Izvor: Itoh i sar., 2002; Chen i sar., 2008; Beckley i Cidlowski, 2009; Kadmiel i Cidlowski, 2013.

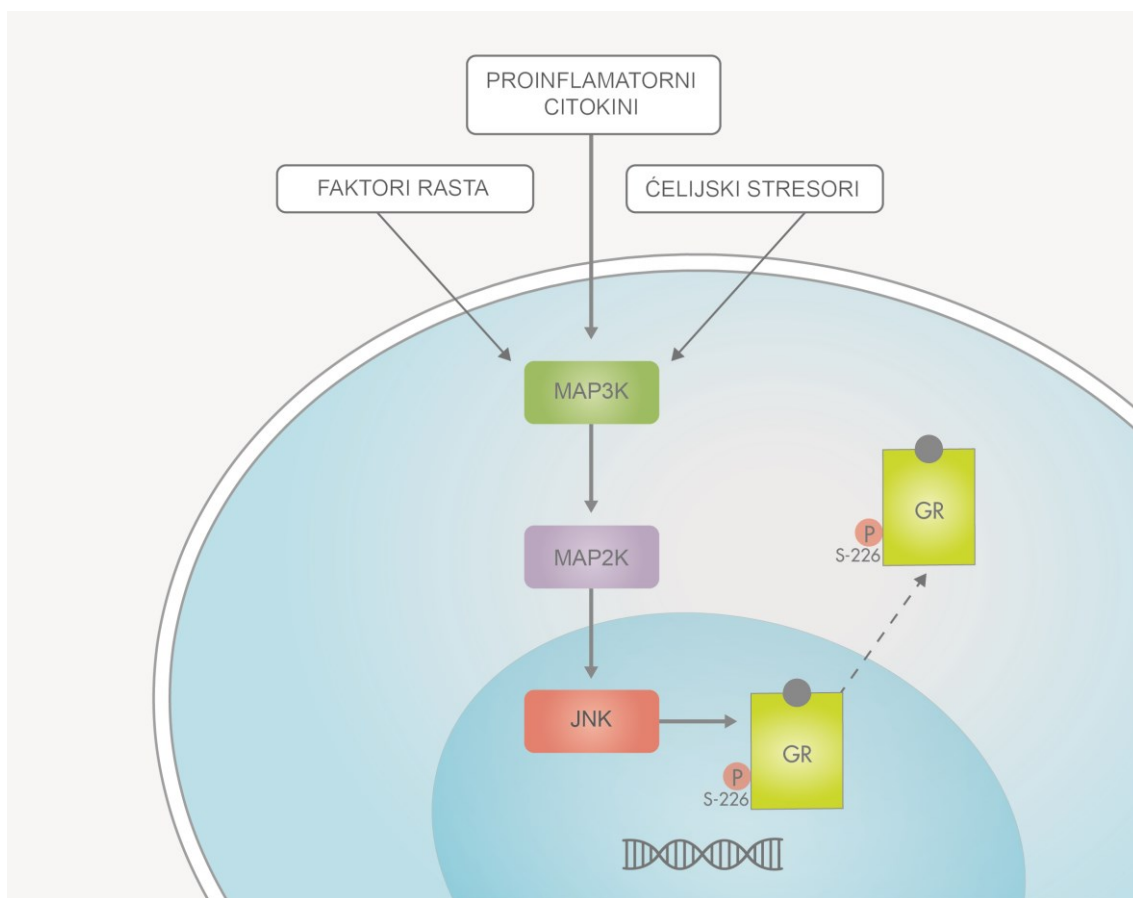
zdravih ispitanika. Oni su imali dve grupe volontera – one koji su patili od premora uzrokovanog poslom i kontrolne ispitanike (Menke i sar., 2014). Koristili su isključivo zdrave muške ispitanike ("premorene" i kontrole) kako bi isključili efekat varijacije polnih hormona koji je prisutan kod žena. Ispitanike su obučili da sami sebi uzimaju uzorke kortizola iz pljuvačke, i to u 0, 10, 20, i 30. min. po buđenju. Zatim su ovim ispitanicima istog dana u 18.00h uzeti uzorci krvi, radi analize serumskog kortizola i genske ekspresije. Nakon toga im je dat deksametazon 1,5mg *per os* i ponovljeno je uzimanje krvi u 21.00h. Pokazane su značajne razlike u koncentracijama serumskog kortizola pre deksametazona (viši kod premorenih), supresiji kortizola (veća kod premorenih), kao i u regulaciji transkripcije gena koje reguliše GR: kod premorenih je broj transkripta značajno regulisanih od strane deksametazona bio 1,6 puta veći u odnosu na kontrole.

Prema tome, ove dve studije svedoče o izrazito dinamičnim procesima koji se dešavaju nakon "stresa" (*in vitro* izazvanog davanjem glukokortikoida i *in vivo* izazvanog zamorom na poslu). *In vitro* varijacija u stepenu fosforilacije GR-a zavisila je od tipa ćelije i liganda, a *in vivo* ekspresija GR-regulisanih gena zavisila je od prisustva stresa.

Fosforilacija GR-a na serinu 226 se pripisuje c-jun N-terminalnoj kinazi (c-Jun N-terminal kinase – JNK), dok se fosforilacija na serinu 211 pripisuje drugim MAPK, poput p38 MAPK, ekstracelularno regulisanoj kinazi (extracellular-regulated kinase – ERK) i kompleksu ciklin-zavisnih kinaza (cyclin-dependent kinase complex – CDK) (Beckley i Cidlowski, 2009). Važno je naglasiti da su osim u fosforilaciji GR-a, ove kinaze uključene u niz drugih ćelijskih procesa, kao važni elementi u sprovođenju signala od ćelijske membrane do kranjih "izvršilaca" u samoj ćeliji. Fosforilisanjem različitih supstrata, ove kinaze "diriguju" kako će se signal prednositi i koji će biti krajnji ishod – kako će ćelija reagovati. Konkretno sama JNK fosforiliše veliki broj drugih molekula koji su uključeni u ćelijski rast i razvoj. U isto vreme, JNK signalni put se može aktivirati od strane različitih faktora, kao što su oksidativni stres, proinflamatorni citokini, faktori rasta, i sl. (Wang i sar., 2008).

1.2.5.2. Signalni put C-jun N-terminalne kinaze u depresiji

C-jun N-terminalna kinaza – JNK (takođe nazvana i *protein-kinaza aktivirana stresom* – *stress-activated protein kinase* – SAPK) podrazumeva barem deset izoformi koje se transkribuju iz tri gena: JNK1, JNK2 i JNK3, čija ekspresija zavisi od vrste tkiva. Signalni put JNK je kompleksan i uključen u brojne ćelijske funkcije, kao što su proinflamatorna signalizacija, ćelijska smrt, ćelijska proliferacija i ćelijsko preživljavanje (Herdegen i Leah, 1998). Singalna kaskada JNK se sastoji od tri nivoa uzvodnih kinaza kojima se prenosi signal od ćelijske membrane do ciljnih molekula unutar ćelije. Prva u nizu je kinaza kinaze MAP kinaze (MAP3K), koja kada se aktivira fosforiliše sledeću u nizu – kinazu MAP kinaze (MAP2K), koja zatim fosforiliše i aktivira JNK izoforme. Aktivirana JNK zatim može fosforilisati serinske i treoninske ostatke na specifičnim supstratima, kao što su različiti onkogeni i transkripcioni faktori (Bubici i Papa, 2014). Pojednostavljeni prikaz JNK signalnog puta sa fokusom na fosforilaciju GR-a predstavljen je na slici 4.



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz JNK signalnog puta sa fokusom na fosforilaciju GR-a (MAP3K: kinaza kinaze MAP kinaze; MAP2K: kinaza MAP kinaze; JNK: c-jun N-terminalna kinaza; GR: glukokortikoidni receptor). Izvor: Jovicic i sar., 2015.

Signalni put JNK je fokus mnogih istraživanja iz oblasti inflamatornih bolesti i karcinoma, a jedan od razloga jeste taj što u većini tih oboljenja glukokortikoidi predstavljaju značajnu terapijsku opciju. Dugotrajno lečenje glukokortikoidima može dovesti do glukokortikoidne rezistencije, što se završava sniženim antiinflamatornim i pro-apoptotičkim odgovorom, što je ozbiljna prepreka u oporavku pacijenata sa inflamatornim i malignim oboljenjima (Schlossmacher i sar., 2011). Ovome ide u prilog i činjenica da je povišena aktivnost JNK uočena pri izostanku odgovora na steroidnu terapiju (Bantel i sar., 2002). Međutim, treba naglasiti da je signalizacija JNK povezana i sa pro-apoptotičkom i sa proliferativnom aktivnošću (zavisno od konteksta, tipa ćelije i JNK izoforme) (Davies i Tournier, 2012).

Iako je poremećaj u signalizaciji JNK zapažen u različitim bolestima, definisanje konteksta i uslova koji bi bili specifični za jedan određen signalni odgovor je trenutno veliki izazov. Konkretno, razlike u senzitivnosti, amplitudi ili trajanju signala u odgovoru na spoljašnje stresore mogu da dovedu različitih ćelijskih odgovora (Rallis i sar., 2010; Ventura i sar., 2006). U završnom delu Diskusije (deo Perspektive) biće objašnjeno kako bazalni vs. stresogeni uslovi mogu dovesti do različite aktivnosti JNK, te različitog prenosa signala kroz ćeliju.

Kada je u pitanju depresija, signalizacija JNK je nedovoljno proučavana, uprkos činjenici da JNK moduliše funkciju GR-a (Wang i sar., 2005) i samim tim može doprineti nastanku glukokortikodne rezistencije i povišenog inflamatornog odgovora, koji su prisutni kod depresivnih pacijenata.

1.2.5.3. Fosforilacija GR-a u depresiji

Istraživanja koja su ispitivala ulogu fosforilacije GR-a u depresiji kod humane populacije su, za sada, u početnoj fazi. Bei i sar. (2009) su proučavali fosforilaciju GR-u kod pacijenta sa bipolarnim poremećajem i zapazili su da pacijenti u depresivnoj fazi imaju značajno povišene nivoe jedarnog pGR-211 u perifernim limfocitima, ali nisu proučavali nivoe drugih fosfo-formi receptora, niti su razmatrali pacijente sa unipolarnom depresijom (Bei i sar., 2009). Istraživanja naše grupe su obuhvatila animalni model depresije baziran na hroničnom stresu koji je izazvan socijalnom izolacijom, i studiju preseka u koju su bili uključeni pacijenti sa depresijom i zdravi ispitanici. Animalni model pružio je interesantne rezultate vezane za signalizaciju GR-a

u CNS-u pacova, dok je translaciono istražvanje bilo fokusirano na fosforilaciju GR-a u perifernim limfocitima humane populacije. Kod pacova je hronični stres doveo do povećanja hipokampalnog GR-a fosforilisanog na serinu 246 (analognom pGR-226 kod ljudi), a davanje antidepresiva (fluoksetina) dovelo je do snižavanja nivoa ovog parametra (Mitic i sar., 2013). Pacijenti sa depresijom su (očekivano) imali povišene nivoe perifernog pGR-226 (i u manjoj meri i pGR-211) u odnosu na zdrave ispitanike (Simic i sar., 2013a). Posebno je interesantan nalaz kod zdravih ispitanica, gde je primećeno da su nivoi perifernog pGR-226 pozitivno korelisali sa neuroticizmom, crtom ličnosti koja je povezana sa podložnošću za depresiju (Simic i sar., 2013b).

U svakom slučaju, proćavanje bolesti složene etiologije u kojoj učestvuje niz faktora, zahteva analizu interakcija više sistema. Tako, sve više istraživaća depresije proućava interakcije imunoloških, neuroendokrinih i neurotransmiterskih parametara, a napori su usmereni i u rasvetljavanje veze sredinskih faktora (kao što su npr. stresogeni događaji) sa molekularnim procesima za koje se smatra da bi mogli biti u osnovi ovog kompleksnog poremećaja.

1.3. Crte ličnosti i depresija

Povezanost specifičnih crta ličnosti sa patološkim procesima primećena je još u doba Hipokrata, koji je opisao četiri osnovne telesne tečnosti koje je doveo u vezu sa četiri tipa ličnosti (sanguinik, kolerik, flegmatik i melanholik) (Hippocrates, 1952). Kasnija istraživanja iz oblasti psihologije intenzivno su se bavila tipologijom ličnosti, njenom biološkom osnovom, ali i odnosom ličnosti sa psihopatologijom.

Brojne empirijske studije su pokazale da se u okviru normalne varijacije ličnosti u opštoj populaciji izdvajaju tri osnovne dimenzije. Na osnovu prirodnog variranja u izraženosti ove tri dimenzije, koje su Ajzenkovi nazvali neuroticizam, ekstroverzija i psihoticizam, moguće opisati ličnost jedne osobe (Eysenck i sar., 1985). Kasnija istraživanja, posebno Koste i sar, dovela su do osmišljavanja petofaktorskog modela ličnosti, gde su osim neuroticizma i ekstroverzije uključene dimenzije *otvorenost za iskustvo*, *saradljivost* i *savesnost* (Costa i sar., 1991; McCrae i John, 1992). Od navedenih crta ličnosti, sa depresijom su najjače i najkonzistentnije povezivani neuroticizam i ekstroverzija.

Od sredine XX veka predlagane su mnoge definicije neuroticizma, ali su se istraživači složili da suštinu neuroticizma predstavlja *sklonost ka doživljavanju negativnih emocija*, kao što su razdražljivost, ljutnja, tuga, napetost, briga i hostilnost (Ormel i sar., 2013). Osobe sa izraženim neuroticizmom ispoljavaju opisane reakcije češće, intenzivnije i u nesrazmeri sa okolnostima koje ih izazvaju. Takođe, ove osobe su sklonije samokritici, osetljivije su na kritiku drugih i imaju snažnije osećanje sopstvene neadekvatnosti (Watson i sar., 1994). Značaj neuroticizma leži u činjenici da je snažno povezan sa brojnim psihijatrijskim poremećajima. Najsnažnija je povezanost neuroticizma sa poremećajima raspoloženja (u koje spada depresija), a zatim sa poremećajima ishrane, somatofornim poremećajima, shizofrenijom, anksioznim poremećajima itd. (Malouff i sar., 2005).

Ekstroverzija podrazumeva osobine kao što su društvenost, pričljivost, asertivnost, sklonost ka "akciji" (McCrae i Costa, 2003). Pokazano je da ekstroverzija može da predvidi efikasno funkcionisanje u širokom rasponu različitih domena, uključujući kognitivno i socijalno funkcionisanje (Wilt i Revelle, 2009). Interesantno je i da su mnogobrojna istraživanja pokazala konzistentnu povezanost "sreće", odnosno subjektivnog doživljaja blagostanja (*subjective well-being*), sa visokim nivoima

ekstroverzije (Pavot i sar., 1990). Prema tome ne čudi da ekstroverzija predstavlja značajan faktor otpornosti za različite oblike psihopatologije (Wilt i Revelle, 2009), mada se u određenim psihopatološkim stanjima mogu naći i povišeni nivoi ove crte. Konkretno, depresija, socijalna anksioznost i shizofrenija su povezane sa niskim nivoima ekstroverzije, dok je kod bipolarnog poremećaja i histrioničnog poremećaja ličnosti ova crta povišena (Watson i Naragon-Gainey, 2014).

Osim trofaktorskog modela Ajzenkovih i petofaktorskog modela Koste i sar., značajno je pomenuti i Klonindžerov psihobiološki model ličnosti (Cloninger, 1987). Klonindžer i saradnici (1993) su predložili tri osnovne dimenzije temperamenta: *izbegavanje kazne*, *potraga za novim* i *zavisnost od nagrade* (kasnije je dodata i dimenzija *istrajnost*). Od posebnog značaja za ovaj rad su prve dve dimenzije, s obzirom na njihovu snažnu korelaciju sa neuroticizmom (*izbegavanje kazne*) i ekstroverzijom (*potraga za novim*) (De Fruyta i sar., 2000). *Izbegavanje kazne* se sastoji od nekoliko dimenzija nižeg reda: pesimizam, strah od neizvesnosti, strah od ljudi i zamor (nasuprot poletu), dok *potraga za novim* obuhvata aspekte kao što su istraživačka uzbudljivost, impulsivnost, ekstravagantnost i neurednost. Povezanost visokog skora na dimenziji *izbegavanje kazne* sa depresivnim poremećajima replikovana je u značajnom broju istraživanja (Abrams i sar., 2004). Takođe je zanimljivo da ovaj četvorofaktorski model temperamenta odgovara Hipokratovim tipovima ličnosti: melanholičnom visoko *izbegavanje kazne*, koleričnom visoka *potraga za novim*, sangviničnom visoka *zavisnost od nagrade* i flegmatičnom *istrajnost* (Hadži Pešić, 2003).

1.3.1. Modeli koji objašnjavaju vezu ličnosti i depresije

Na osnovu opsežnog proučavanja povezanosti ličnosti i depresije osmišljeno je nekoliko teorijskih modela koji na različit način objašnjavaju prirodu i smer ove veze (Ormel i sar., 2013). Prema *modelu vulnerabilnosti* (podložnosti), crte ličnosti „aktiviraju“ procese koji dovode do psihopatologije, bilo direktno, bilo povećavajući uticaj drugih faktora rizika kao što su stresogeni životni događaji. Drugi model, *model spektra*, zasnovan je na pretpostavci da neuroticizam i specifični psihopatološki entitet (npr. depresija) predstavljaju različite manifestacije istog procesa, gde je psihopatološki poremećaj pozicioniran na kraju kontinuuma neuroticizma. Prema ovom modelu, visoki skorovi na skalama neuroticizma ekvivalentni su simptomima poremećaja. Zatim,

model zajedničkog uzroka predlaže koncept u kome crte ličnosti predviđaju psihopatologiju, s obzirom na to da dele genetske i sredinske činioce. Pretpostavka je da je ovaj “zajednički uzrok” zaslužan za nekauzalnu statističku povezanost između ličnosti i psihopatologije. *Model „ožiljka“ (scar model)* sugerira da psihopatologija oblikuje ličnost, u smislu da iskustvo značajnog psihijatrijskog poremećaja ima trajne efekte na ličnost, čak i nakon oporavka. *Model stanja (state model)* takođe predlaže da psihopatologija oblikuje ličnost, ali suprotno modelu ožiljka, efekti poremećaja su privremeni i nestaju po opravku. Prema Ormelu i sar. (2013) opisani modeli se međusobno ne isključuju, i granice među njima su nejasne.

1.3.2. Crte ličnosti i HPA osovina

Značajan broj istraživanja ispitivao je povezanost HPA osovine i neuroticizma, ali rezultati nisu do kraja konzistentni. Većina studija je koristila hormonske pokazatelje u proučavanju ove asocijacije, kao što su koncentracije kortizola po buđenju, promene koncentracija kortizola nakon psihološkog ili farmakološkog stresa (npr. davanja deksametazona) i promene nivoa ACTH (McCleery i Goodwin, 2001; Zobel i sar., 2004; Oswald i sar., 2006; Tyrka i sar., 2008; Van Santen i sar., 2011; Laceulle i sar., 2015). Na primer, značajan broj studija pokazao je da u odgovoru na stres osobe sa visokim neuroticizmom ispoljavaju naglašeno lučenje kortizola (Zoccola i sar., 2010; Portella i sar., 2005; Nater i sar., 2010), ali ima i studija koje su pronašle zaravnjenu sekreciju kortizola (Oswald i sar., 2006). Takođe, ima i istraživanja koja nisu pokazala povezanost neuroticizma i reaktivnosti HPA osovine (Laceulle i sar., 2015). Velika varijabilnost u dnevnom lučenju kortizola, kao i razlike u korišćenim metodama bi mogle da objasne protivrečnosti u navedenim rezultatima.

1.4. Stresogeni životni događaji i depresija

Stresogeni životni događaji se navode kao značajni faktori u nastanku depresije. Prema tome kada su se dogodili, stresogeni događaji se mogu postaviti u dve vremenske odrednice: distalno i proksimalno u odnosu na pojavu depresivne epizode. Distalni događaji deluju u toku razvojnog doba (u detinjstvu, adolescenciji, ali i mnogo ranije, npr. u prenatalnom periodu), dok su proksimalni događaji oni koji se dešavaju neposredno pre pojave depresivne epizode. Smatra se da distalni stresogeni događaji učestvuju u stvaranju predispozicije za kasniji razvoj depresije, dok su proksimalni stresogeni događaji okidači koji deklanširaju depresivnu epizodu kod vulnerabilnih osoba (Ensel i sar., 1996; Martin i Martin, 2002).

1.4.1. Stresogeni događaji u prenatalnom periodu – uticaj na HPA osovину

Jasno je ustanovljeno da stresogeni događaji u prenatalnom periodu utiču na parametre telesnog rasta i razvoja deteta. Na primer, Marić i sar. (2010) su pokazale da su deca nošena tokom bombardovanja 1999. godine u Srbiji imala značajno manju telesnu masu na rođenju u odnosu na decu nošenu tri godine ranije ili četiri godine kasnije (Maric i sar., 2010). Pored toga, ranije studije su pokazale da telesna masa na rođenju negativno koreliše sa lučenjem kortizola u odraslom dobu (Phillips i sar., 1998). Promena aktivnosti, tj. „reprogramiranje“ HPA osovine fetusa jedan je od mogućih mehanizama kojim prenatalni stresogeni događaji utiču na dalji rast i razvoj, kako telesni tako i psihički.

U evolutivnom kontekstu promene HPA aktivnosti se mogu shvatiti kao prilagođavanje ploda na stresogenu okolinu koja ga očekuje (Gluckman i sar., 2007), i to se, za razliku od genskih promena, dešava brzo, već u prvoj generaciji. Međutim, životne okolnosti su promenljive, te nesklad između okoline koja je postojala tokom ranog razvoja i okoline u kasnijim fazama života može da učini ove rano stečene karakteristike maladaptivim i otvori put razvoju psihopatologije (Gluckman i sar., 2007).

Studije na animalnim modelima su ukazale na potencijalni mehanizam kojim stres majke utiče na aktivost HPA osovine ploda. Naime, aktivnost HPA osovine ploda se menja u smislu povećanja bazalne sekrecije glukokortikoida ili naglašenije sekrecije kortizola u odgovoru na stres (Weinstock, 2005). Pretpostavlja se da je jedan od uzroka

ove promena smanjenje aktivnost 11-beta hidroksterooid dehidrogenaze u posteljici, koja štiti plod od glukokotikoida majke time što vrši inaktivaciju kortizola (Welberg i sar., 2000). Prenaglašena HPA aktvnost ispoljava se izmenjenom negativnom povratnom spregom glukokotikoida usled snižene ekspresije glukokortikoidnih receptora u hipokampusu, ali i povišenom ekspresijom CRH, posebno u amigdalama kod ploda (Weinstock, 2005).

Epidemiološke studije su pokazale da deca majki koje su u trudnoći doživele značajan stres češće imaju probleme iz domena mentalnog zdravlja. Na primer, prema australijskoj studiji i nezavisni prenatalni događaj (npr. smrt majci bliske osobe, gubitak posla majke) i zavisni prenatalni događaji (npr. finansijska kriza, bračni problemi majke) bili su povezani sa većom učestalošću psihijatrijskog morbiditeta kod dece uzrasta 2-14 godina (Robinson i sar., 2011). Takođe, jedna danska studija je pokazala da muški potomci majki izloženih stresu u trudnoći imaju veći rizik za probleme mentalnog zdravlja, i to iz afektivnog kruga (Khashan i sar., 2011), mada ista povezanost nije pokazana kod ćerki.

1.4.2. Stresogeni događaji u razvojnom periodu

Stresogeni i traumatski događaji u detinjstvu povećavaju rizik za pojavu depresije kasnije u životu. Izgleda da oni sami po sebi nisu dovoljan uzrok, već u interakciji sa drugim faktorima doprinose nastanku psihopatologije. Na primer, ustanovljeno je da je proksimalni (akutni) stres medijator između ranog stresa i početka epizode depresije (Hazel i sar., 2008). Mnogobrojne studije naglasile su značaj interakcije ranih sredinskih faktora i genskih polimorfizama u etiologiji depresije. Caspi i sar. (2003) su u istraživanju koje je pre desetak godina izazvalo veliko interesovanje pokazali da određeni polimorfizam u promotorskom delu gena za serotoniniski transporter služi kao moderator efekta ranih stresogenih događaja na nastanak depresije (Caspi i sar., 2003). Sa aspekta ovog doktorata posebno su zanimljivi polimorfizmi gena čiji produkti učestvuju u GR signalizaciji. Konkretno, pokazano je da trauma u detinjstvu, u prisustvu određenih polimorfizama gena za FKBP51, ima značajan efekat na nastanak depresije (Zimmermann i sar., 2011). Kao što je već opisano, protein FKBP51 ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti GR-a.

1.4.3. Proksimalni stresogeni događaji

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da u značajnom broju slučajeva depresivnoj epizodi prethodi stresogeni događaj (Tennant, 2002). Prema jednoj studiji iz 2012. godine, skorašnji životni događaji nose najveći rizik sa pojavu depresije u srednjim godinama, posebno kod žena starosti od 40-49 godina. U ovom multicentričnom istraživanju, koje je obuhvatilo ispitanike iz nekoliko zapadno- i istočno-evropskih zemalja i Čilea, događaji koji su najznačajnije bili povezani sa depresijom bili su lične teškoće (teža bolest, pretrpljeni napad ili povreda), nepovoljni događaji kod članova porodice ili prijatelja i problemi sa zakonom (Stegenga i sar., 2012). Takođe, pokazano je da pacijenti sa depresijom koji su pre početka epizode imali značajan stresogeni događaj pokazuju izraženije simptome depresije, lošije kognitivno funkcionisanje i niži nivo opšte funkcionalnosti od onih kod kojih pre epizode nije bilo akutnog stresora (Muscatell i sar., 2009). Kumulacija hroničnih stresora je takođe istaknuta kao značajan faktor u pojavi depresivne epizode, posebno kod rekurentnih epizoda (Monroe i sar., 2007). Ovde treba pomenuti koncept „dnevni neprilika“ (*daily hassles*), koje predstavljaju iskustva i događaje iz svakodnevnice koja su doživljena kao neprijatna ili preteća po subjektivni osećaj blagostanja (Lazarus, 1984). Tu se, između ostalog, ubrajaju nedostatak vremena, previše obaveza, briga za zdravlje bliskog člana porodice, porast cena, zagađenje i sl. (Chamberlain i Zika, 1990). Vinkers i sar. (2014) su, u nameri da utvrde koji tip stresora je najjače povezan sa depresijom, proučavali tri osnovna domena stresogenih događaja: traumatu u detinjstvu, značajne životne događaje tokom života i dnevne neprilike. Ustanovili su da sva tri oblika stresora značajno doprinose nastanku depresivne epizode, a ovo je posebno bilo izraženo kod osoba sa višim nivoima neuroticizma.

Ako se posmatra tok depresivnog poremećaja, može se primetiti da se povezanost nepovoljnih životnih događaja sa depresivnim epizodama smanjuje tokom vremena, i da početak svake naredne epizode sve manje zavisi od stresogenog događaja (Willner i sar., 2013). Moguće je da je nakon prve epizode depresije osoba senzibilisana za životne događaje, ili, prema već pomenutoj teoriji, da prva epizoda ostavlja „ožiljak“ te je za svaku sledeću epizodu potreban sve manji stimulus. Ovo bi objasnilo značajnu učestalost povratnih depresivnih epizoda i sve kraće periode bez tegoba između epizoda kod osoba koje pate od rekurentnog depresivnog poremećaja (Lewinsohn i sar., 1999).

Naravno, ima i drugih teorija, a posebno je aktuelna ona koja pretpostavlja da je depresija neuroprogresivno oboljenje, te se rekurentnost epizoda objašnjava različitim strukturalnim, funkcionalnim i biohemijskim promenama koje se usložnjavaju i povećavaju tokom vremena. Konkretno, smanjenje volumena hipokampusa, promene u monaminskoj neurotransmisiji, porast nivoa inflamatornih medijatora, povećanje oksidativnog i nitrosativnog oštećenja, mitrohondrijalna disfunkcija i smanjenje neuroplastičnosti, neki su od procesa za koje je pokazan progresivan tok kod pacijenata sa ponovljenim epizodama depresije (Moylan i sar., 2013).

Takođe, i ovde treba naglasiti da nepovoljni životni događaji ne mogu sami po sebi dovesti do depresije, već to čine u sadejstvu sa drugim faktorima, u koje spadaju pol, genetski faktori i faktori ličnosti (posebno neuroticizam) (Kendler i sar., 2002; Kendler i sar., 2004). Aktivnost HPA osovine takođe je izmenjena pod uticajem negativnih životnih događaja, što su pokazale studije koje su pratile sekreciju kortizola u različitim tkivima u odnosu na akutne i hronične stresore (Rao i sar., 2008; Holleman i sar., 2012; Elzinga i sar., 2008). Međutim, većina ovih studija su studije preseka, te se ne može sa sigurnošću utvrditi da li su proksimalni ili distalni događaji doveli do promena u HPA osovini.

1.4.4. Koncept „zavisnosti“ stresogenih događaja i kauzalnost sa depresijom

Kada je ustanovljeno da su nepovoljni životni događaji značajno češći u populaciji depresivnih pacijenata, usledilo je pitanje da li su ove osobe na neki način podložnije doživljavanju neprijatnih iskustava. Za početak, u literaturi se pravi razlika između tzv. „zavisnih“ i „nezavisnih“ stresogenih događaja. „Zavisni“ stresogeni događaji su oni čijem je nastanku doprinelo ponašanje pojedinca i obično su iz domena interpersonalnih odnosa (npr. bračna kriza ili razvod). „Nezavisni“ stresogeni događaji predstavljaju nasumične pojave i, kako su to zaključili Kendler i sar, rezultat su „loše sreće“. Ovde spadaju npr. gubitak kuće usled poplave, iznenadna smrt ili gubitak bliske osobe (Kendler i sar., 1999a). Ideja o „zavisnim“ stresogenim događajima je važna zbog toga što dovodi u pitanje kauzalnost sa pojavom depresije. Naime, iako nakon „zavisnih“ događaja može da usledi depresivna epizoda, ovi događaji možda nisu u uzročnoj vezi sa depresijom, već su potencijalno rezultat prodromalne depresivne simptomatologije ili faktora ličnosti koji čine predispoziciju i za stresogene događaje i

za depresiju. Nasuprot tome, veza između „nezavisnih“ stresogenih događaja i nastanka depresije nosi jaču kauzalnost (Kendler i sar., 1999b). Interesantno je da su Kendler i sar. zapazili da upravo „zavisni“ stresogeni događaji značajnije predviđaju nastanak depresivne epizode. Takođe, na osnovu rezultata dobijenih na opsežnim blizanačkim studijama zaključuju da je čak jedna trećina povezanosti nepovoljnih događaja sa depresijom neuzročna, te da osobe podložne depresiji „biraju“ da uđu u visoko rizične situacije (Kendler i sar., 1999b).

1.5. Koncept strukturalnog modela i mogućnosti u proučavanju etiopatogeneze depresije

Direktna kauzalna povezanost se izuzetno retko sreće u psihijatriji. Odnosi između patogenetskih činilaca su često složeni i posredni. Na primer, moguće je da uticaj određenog faktora bude značajan samo u pristustvu drugog faktora (kada govorimo o drugom faktoru kao o *medijatoru*), ili da se u prisustvu specifičnog faktora (*moderatora*) menja jačina ili smer povezanosti između dve pojave (MacKinnon, 2011).

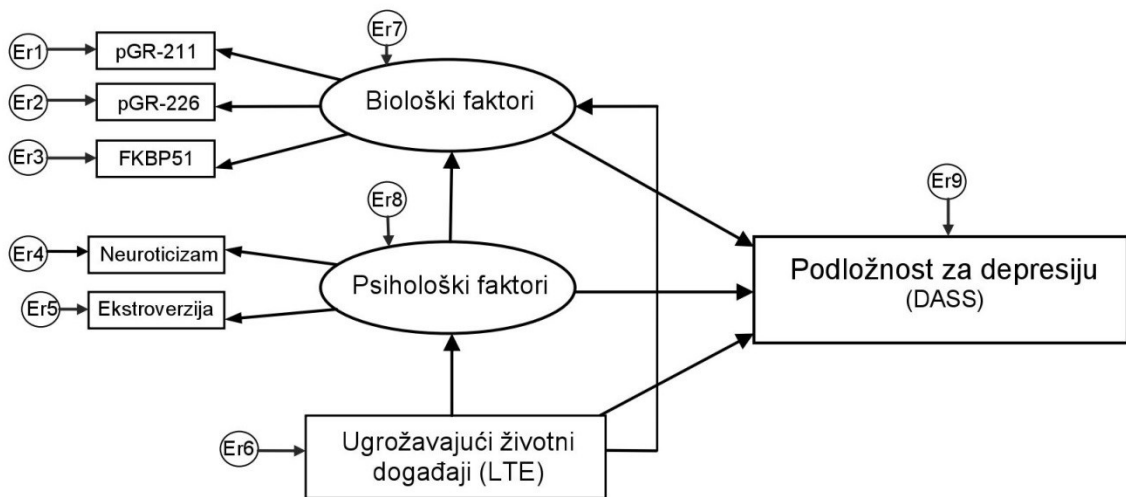
Kao što je već pomenuto, etiopatogeneza složenih poremećaja, u koje spada i depresija, zasnovana je na interakcijama mnogobrojnih faktora. Dakle, ne postoji jedan uzrok depresije, već se smatra da specifični čionoci, u koje spadaju različiti biološki faktori i sredinski uticaji, stupaju u međusobne odnose, i kod različitih osoba na različite načine dovode do nastanka ovog poremećaja. Upravo zbog toga je u proučavanju depresije i drugih kompleksnih psihijatrijskih poremećaja važno naći metodu kojom se mogu simultano analizirati složene interakcije više varijabli, i koja dozvoljava korišćenje apstraktnih, nemerljivih pojmova koje podrazumeva svaka nauka koja se bavi ponašanjem. Strukturalno modelovanje, ili modelovanje strukturalnim jednačinama (*structural equation modelling* – SEM) je statistička metoda koja zadovoljava ove zahteve. SEM predstavlja metodu koja služi za stvaranje i testiranje statističkih modela. U SEM-u se kombinuju faktorska analiza, analiza putanje i regresija da bi se ispitale direktne i indirektno povezanosti između različitih varijabli (Violato i Hecker, 2007). SEM je više konfirmatorni nego eksplorativni metod, koji je najpre namenjen za testiranje teorija nego za njihovo osmišljavanje i nadgradnju. To znači da istraživač pravi teoretski model (hipotezu) na osnovu prethodnog znanja, a zatim testira podesnost (*fit*) hipotetičkog modela sa empirijskim podacima (Byrne, 2010). Prema tome, u SEM-u pretpostavljamo da između seta neopserviranih (latentnih) varijabli koje merimo pomoću određenih indikatora postoji određena kauzalna struktura, čiju ćemo podesnost tesirati na našem uzorku (Fassinger, 1987).

Hipoteza ove disertacije biće ispitana na bazi modela podložnosti za depresiju prikazanog na shemi 2. Glavna hipoteza ove teze jeste da se podložnost za depresiju može analizirati preko strukturalnog modela koji uključuje molekularne parametre modulacije aktivnosti GR-a (biološke faktore), crte ličnosti neuroticizam i ekstroverziju

(psihološke faktore) i ugrožavajuće životne događaje. Takođe, pretpostavlja se i da će, u okviru modela, parametri regulacije GR-a imati značajan efekat na podložnost za depresiju. Hipotetički model je osmišljen na osnovu podataka izloženih u uvodnom delu teze, a posebno na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja naše grupe sprovedenih na animalnim modelima depresije i humanoj populaciji (Mitic i sar., 2013; Simic i sar., 2013a; Simic i sar., 2013b; Adzic i sar., 2009; Lukic i sar., 2014).

Ovaj model predlaže sledeće kauzalne veze:

- a) ugrožavajući životni događaji kauzalno i direktno utiču na biološke faktore, psihološke faktore i podložnost za depresiju,
- b) psihološki faktori kauzalno i direktno utiču na biološke faktore i podložnost za depresiju,
- c) biološki faktori direktno utiču na podložnost za depresiju.



Shema 2. Hipotetički model podložnosti za depresiju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je konstruisanje strukturalnog modela vulnerabilnosti za depresiju, radi eksploracije kompleksnih odnosa između tri faktora: parametara regulacije GR-a (bioloških faktora), crta ličnosti (psiholoških faktora), i skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja. To obuhvata:

1. kvantifikovanje udela svake od navedenih tri grupe faktora u objašnjavanju varijanse vulnerabilnosti za depresiju,
2. određivanje koeficijenata putanje (*path coefficients*) u međusobnim interakcijama navedenih faktora,
3. shematski prikaz opisanih interakcija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Tip studije

Translaciono istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije je dizajnirano kao studija preseka.

3.2. Mesto i period istraživanja

Klinički deo ispitivanja je obavljen u Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Srbije, a analiza molekularnih parametara u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je deo projekta Ministarstva prosvete i nauke (III 41029), započetog 2011. godine sa predviđenim trajanjem do decembra 2015. godine.

3.3. Selekcija ispitanika

U studiju je uključeno 70 ispitanika oba pola, starosti od 18-65 godina, sa različitim intenzitetom simptoma depresije: 35 bolesnika sa umerenim ili teškim depresivnim poremećajem u akutnoj fazi bolesti i 35 zdravih kontrola. Bolesnici su regrutovani u Klinici za psihijatriju KCS, a zdravi ispitanici putem obaveštenja i poziva u neposrednom okruženju.

Strukturisani intervju za utvrđivanje psihijatrijske dijagnoze tj. poremećaja sa Ose I prema DSM-IV obavljen je putem upitnika MINI (*The MINI International Neuropsychiatric Interview 5.0.0*) kod svih ispitanika (Sheehan i sar., 1998). Ova verzija upitnika je korišćena zbog toga što je psihometrijsko testiranje ispitanika započeto pre objavljivanja DSM-V. Dijagnoza depresivnog poremećaja je potvrđena od strane dva psihijatra, putem dva odvojena intervjua, a na osnovu MKB-10 kriterijuma (F32.1-2 ili F33.1-2). Kada je reč o psihijatrijskim poremećajima sa Ose II, ispitivano je prisustvo poremećaja obuhvaćenih navedenom verzijom upitnika MINI (generalizovani anksiozni poremećaj i antisocijalni poremećaj ličnosti), dok prisustvo drugih poremećaja sa Ose II nije analizirano ni kod pacijenata ni kod zdravih ispitanika.

Bolesnici sa aktuelnim značajnijim somatskim oboljenjem, zloupotrebom alkohola i/ili psihoaktivnih supstanci, ili prethodno primenjenom elektrokonvulzivnom terapijom su isključeni iz studije. Bolesnici na terapiji antidepresivima po izboru

ordinirajućeg lekara nisu isključeni iz studije. Kriterijumi za uključivanje zdravih ispitanika bili su odsustvo prošlog/sadašnjeg psihijatrijskog oboljenja i značajnijeg somatskog oboljenja, i odsustvo bilo kakve farmakoterapije u trajanju od barem nedelju dana pre početka studije. Faza menstrualnog ciklusa bolesnica i zdravih ispitanica nije uzeta u obzir pri uključivanju u studiju.

Sve procedure istraživanja su vršene u skladu sa Helsinškom deklaracijom, uz odobrenje Etičkog odbora ustanova u kojima je istraživanje sprovedeno (Kliničkog centra Srbije i Medicinskog fakulteta u Beogradu).

3.4. Upitnici

Ispitanici su popunili sledeće upitnike:

1. Socio-demografski upitnik, sastavljen za potrebe istraživanja, uključivao je pitanja koja se odnose na starost, pol i broj godina školovanja.
2. Upitnik za samoprocenu simptoma depresije, anksioznosti i stresa (*Depression Anxiety Stress Scales – DASS*) korišćen je kao mera podložnosti za depresiju. Ovaj upitnik je zasnovan na dimenzionalnom pristupu mentalnim poremećajima (Lovibond i Lovibond, 1995), odnosno na pretpostavci da su razlike između kliničke i opšte populacije, kada su pitanju depresija, anksioznost i stres, zapravo razlike u stepenu izraženosti simptoma. Upitnik se sastoji od tri supskale od kojih svaka ima po 14 stavki. Supskala za procenu simptoma depresije ispituje disforiju, beznadežnost, obezvređivanje života, samopotcenjivanje, gubitak interesovanja, anhedoniju. Supskala za samoprocenu anksioznosti uključuje pitanja u vezi sa ekscitacijom autonomnog nervnog sistema, situacionom anksioznošću i subjektivnim doživljajem anksioznosti. Supskala stresa ispituje osećanje nervoze i tenzije, teškoće u opuštanju i razdražljivost. Ukupan rezultat na svim supskalama DASS-a, kao ishodna varijabla, korišćen je za analizu.
3. Ajzenkov upitnik za procenu ličnosti (*The Eysenck Personality Questionnaire – EPQ*) je samoupitnik kojim se ispituju tri dimenzije ličnosti: ekstroverzija, neuroticizam i psihoticizam (Eysenck i sar, 1985). Format odgovora je dihotoman (da/ne). Za potrebe istraživanja analizirane su supskale za neuroticizam i ekstroverziju. Supskala neuroticizma meri tendenciju doživljavanja negativnog afekta, a osobe koje imaju visok skor na ovoj supskali su sklone brizi, osećanju krivice, usamljenosti i tuzi. Skala

ekstroverzije meri društvenost, aktivnost i impulsivnost. Osobe sa visokim skorom na ovoj subskali su pričljive, otvorene i često u potrazi za uzbuđenjima (Weiner i Craighead, 2010).

4. Lista ugrožavajućih životnih događaja (*The List of Threatening Experiences – LTE*) je upitnik kojim se registruje prisustvo 12 životnih događaja u poslednjih šest meseci (Brugha i Cragg, 1990), kao što su ozbiljna bolest ili povreda, smrt bliskog prijatelja ili rođaka, nezaposlenost, značajan finansijski gubitak itd. U slučaju bolesnika sa depresijom ispitivan je period od šest meseci pre aktuelne epizode depresije.

3.5. Analiza bioloških parametara

U ovom istraživanju analizirani su sledeći biološki parametri: koncentracija jutranjeg kortizola, nivoi ukupnog nuklearnog GR-a (*total GRn – tGRn*), nivoi ukupnog citosolnog GR-a (*tGRc*), nivoi nuklearnog pGR-226 (*pGR-226n*), nivoi nuklearnog pGR-211 (*pGR-211n*), i nivoi citosolnog FKBP51. Kod svih uzoraka kvantifikovana je izoforma GR α od ~ 95 kDa, s obzirom da je najzastupljenija i prisutna u gotovo svim tkivima čoveka. Analizirani su i odnosi pGR-211/tGRn i pGR-226/tGRn. Uzorci krvi za pomenute analize su uzeti između 08.00 i 09.00h ujutru. Koncentracija jutarnjeg kortizola određena je iz seruma, pomoću hemiluminiscentne metode (*DPC Immulite 2000, Siemens*).

Molekularni parametri analizirani su iz limfocita periferne krvi. Separacija limfocita iz periferne krvi vršena je korišćenjem LSM (*Lymphocyte Separation Medium, MP Biomedicals*), prema uputstvu proizvođača. Nakon pranja sa hladnim PBS-om (*phosphate buffered saline*), limfociti su čuvani na -80 °C do dalje obrade.

Celularni ekstrakti iz limfocita obrađeni su na osnovu protokola Šrajbera i sar. (Schreiber i sar., 1989). Taloci limfocita su suspendovani u 500 μ l hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7.9) koji sadrži 10 mM KCl, 0,1 mM Na₂EDTA, 0,1 mM Na₂EGTA, 1 mM DTT i inhibitore fosfataza i proteaza, opisane u prethodnom radu naše grupe (Adzic i sar., 2009). Uzorci su inkubirani na ledu 15 min, uz snažno ljučenje 30 min, nakon čega je u svaki uzorak dodato 75 μ l 10% rastvora *Tween 20*, a zatim su uzorci vorteksovani 20 s i centrifugirani na 10000 x g tokom 7 min, na 4°C. Dobijeni supernatant je korišćen kao citoplazmatski ekstrakt, a nakon njegovog odlivanja, talog u kome se nalaze jedra je suspendovan u 150 μ l hladnog pufera C (20 mM HEPES pH

7.9) koji sadrži 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT i iste proteazne i fosfatne inhibitore kao pufer A. Uzorci su inkubirani na 4°C tokom 15 min. uz snažno ljuljanje, a zatim centrifugirani na 10000 x g tokom 10 min, na 4°C. Dobijeni supernatant je korišćen kao jedarni ekstrakt limfocita. Nakon određivanja koncentracije proteina pomoću BCA (*bicinchoninic acid*) kita (*SERVA Electrophoresis*), nuklearni ekstrakti su pomešani sa denaturišućem puferom prema Lemliju (Laemmli) i zagrevani 5 min. na 100°C.

Nakon zagrevanja uzoraka na 100°C, nivoi navedenih proteina su detektovani *Western blot*-om. Ukratko, 60µg nuklearnih/citosolnih proteina je nanošeno na SDS (*Sodium dodecil sulphat*) poliakrilamidni gel, a nakon razdvajanja proteina elektroforezom, proteini su prebačeni na PVDF (poliviniliden difluorid) membranu (*Immobilon-P membrane, Millipore*). Nakon blokiranja u trajanju od 1h u 5% nemasnom mleku ili BSA (*bovine serum albumin*) u PBS-u (*phosphate buffered saline*), membrane su inkubirane u odgovarajućim rastvorima primarnih antitela. Za detekciju proteina korišćena su sledeća antitela: M-20 (*Santa Cruz Biotechnology*) za detekciju ukupnog GR-a, phospho-GR (Ser211) (*Cell Signaling*) za detekciju pGR-211, phospho-GR (Ser226) (*Abcam*) za detekciju pGR-226 i FKBP51 H-100 (*Santa Cruz Biotechnology*) za detekciju FKBP51. Nakon ispiranja sa PBST-om (PBS sa 0,1% *Tween*-om), membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim anti-zečijim HRP (*Horseradish peroxidase*)-konjugovanim antitelom (*Amersham*). Signali su detektovani korišćenjem *Pico* ili *Femto* (*Pierce*) hemiluminescentnog supstrata (*Thermo Scientific Pierce*), i izlaganjem membrane radiografskom filmu. Za denzitometriju proteinskih traka sa radiografskog filma korišćen je *Image J* program. Nivoi proteina su najpre normalizovani u odnosu na odgovarajući β-aktin, koji je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel i detektovan pomoću specifičnog antitela (*Abcam*). Nivoi proteina su predstavljeni kao procenat od jačine signala internog referentnog uzorka (IRU). IRU je dobijen mešanjem alikvota uzoraka iz studije, a korišćen sa ciljem poređenja uzoraka sa različitim gelova i smanjenja variranja uslova između različitih *Western blot*-ova.

Svaki uzorak je analiziran barem dva puta ("u duplikatu"), a srednje vrednosti za nivoe svakog proteina korišćene su u daljoj analizi.

3.6. Statistička analiza

3.6.1. Struktura strukturalnog modela (SEM-a)

SEM je jedinstvena metoda po tome što omogućava uvođenje *latentnih* varijabli. U naučnim granama koje se bave ponašanjem, kao što su psihijatrija i psihologija, često se proučavaju entiteti koji se ne mogu direktno opservirati. Ovi apstraktni fenomeni nazivaju se u SEM-u *latentne varijable*. Primeri latentnih varijabli su ličnost ili inteligencija. Zbog toga što se latentne varijable ne mogu direktno opservirati, ne mogu se direktno ni meriti. Prema tome, istraživač definiše latentnu varijablu u odnosu na manifestaciju koja je predstavlja, tj. *latentna (neopservirana)* varijabla se predstavlja preko varijable koja se može meriti i koja se naziva *opservirana ili manifestna* varijabla. Primeri opserviranih varijabli su ukupan skor na samoupitniku za procenu neuroticizma, ili rezultat na testu inteligencije. Prema tome, ispitivanje određenog fenomena iz oblasti ponašanja sastoji se iz direktnog merenja opservirane varijable, te posrednog merenja latentne varijable. Opservirane (manifestne) varijable su dakle „predstavnic“ latentnih varijabli, odnosno služe kao „most“ ka datim osnovnim apstraktnim konstruktima koji su u fokusu humanističkih nauka.

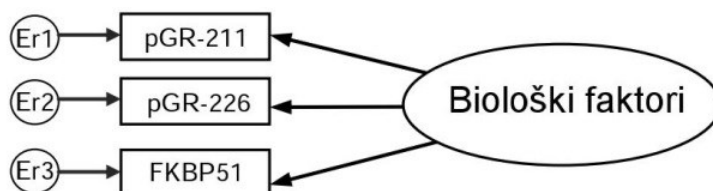
Praktično, latentne varijable odgovaraju faktorima, poput onih koji su izvedeni faktorskom analizom. Formiraju se iz najmanje dve opservirane varijable i predstavljene su preklapanjem varijanse između opserviranih varijabli (Beran i Violato, 2010). Takođe, bitno je napraviti razliku između *egzogenih* i *endogenih* latentnih varijabli. *Egzogene* latentne varijable su *nezavisne* varijable – one utiču na vrednosti drugih latentnih varijabli u modelu. Promene u vrednostima egzogenih varijabli nisu objašnjene modelom. Varijable kao što nivo edukacije ili socioekonomski status su primeri ovih varijabli. *Endogene* latentne varijable su *zavisne* varijable, i pod uticajem su nezavisnih varijabli u modelu, bilo da je taj uticaj direktan ili indirektan. Promene u vrednostima endogenih varijabli su objašnjene modelom, zbog toga što se sve latentne varijable koje na njih utiču uključuju u strukturu modela (Byrne, 2010).

Kompletan model strukturalnih jednačina (SEM) se sastoji iz dva „podmodela“: *mernog modela (measurement model)* i *strukturalnog modela (structural model)*. Merni model definiše interakcije između opserviranih i latentnih varijabli. Drugim rečima, u njemu je sadržana veza između mernih instrumenata (opserviranih varijabli) i osnovnih konstrukata koje ti instrumenti mere (latentnih varijabli). Prema tome, merni model

predstavlja obrazac na osnovu kog se svaka mera zasićuje na određenom faktoru. Nasuprot tome, *strukturalni model* definiše veze između latentnih varijabli. U njemu je objašnjeno na koji način konkretna latentna varijabla direktno ili indirektno utiče na druge varijable u modelu (Byrne, 2010).

3.6.1.1. Merni model

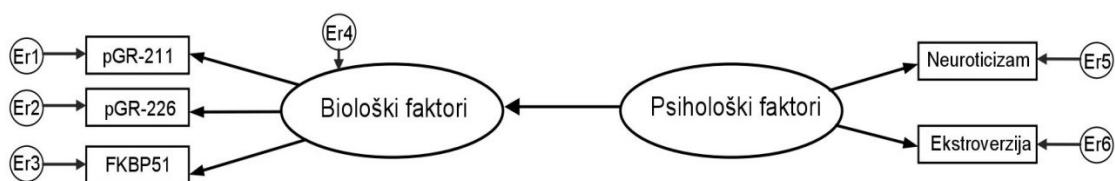
Na shemi 3 je prikazan primer mernog modela koji je deo većeg SEM-a ove doktorske disertacije. Merni model je predstavljen latentnom varijablom (elipsom) od koje kreću jednosmerne strelice ka tri opservirane varijable koje su predstavljene pravougaonicima. Prikazani merni model se odnosi na latentnu varijablu *biološki faktori*, koja je konstruisana merenjem nivoa pGR-226, pGR-211 i FKBP51 iz perifernih limfocita. Na shemi 3 može se primetiti da je svaka opservirana varijabla povezana sa kružićem koji u sebi ima slova *Er* i redni broj. Ovi kružići označavaju *greške merenja* (Er1–Er3), i odnose se na adekvatnost opserviranih varijabli da mere svoje osnovne faktore. Greške merenja mogu biti *slučajne* ili *sistematske*. Slučajna greška merenja je posledica različitih promenljivih uzroka koji se ne mogu kontrolisati i između kojih, u opštem slučaju, ne postoji korelacija. S obzirom na to da za ove greške važe statistički zakoni raspodele, pri velikom broju merenja mogu se odrediti granice unutar kojih se nalazi prava vrednost opservirane variable. Sistematske greške, sa druge strane, ostaju konstantne pri ponovljenim merenjima ili se menjaju po određenom zakonu. Uslovljene su greškom u samoj metodici merenja, npr. nesavršenošću mernih instrumenata. Uvek imaju isti „smer javljanja“, i uvođenjem korekcije u metod merenja mogu se otkloniti (Erić-Marinković i sar., 2001).



Shema 3. Merni model koji predstavlja fatorsku analizu varijable *biološki faktori*

3.6.1.2. Strukturalni model

Strukturalna komponenta SEM-a odnosi se na putanje (*paths*), koje predstavljaju teorijske interakcije koje će biti testirane. Veze između navedenih varijabli su predstavljene jednosmernim strelicama, koje predstavljaju regresione koeficijente u strukturalnim jednačinama. Na shemi 4 predstavljen je jedan strukturalni model, čija hipoteza je da latentna varijabla *psihološki faktori* kauzalno i direktno utiče na *biološke faktore*. U ovom strukturalnom modelu sadržana su dva merna modela, koja odgovaraju dvema faktorskim analizama (jedna se odnosi na varijablu *biološki faktori*, a druga na varijablu *psihološki faktori*). U strukturalnu komponentu modela takođe spada i greška u strukturalnim jednačinama (označena kao Er4), koja se nazivaja *rezidualna greška*. Predstavlja grešku u predviđanju endogene varijable iz egzogene varijable. Ove greške takođe mogu biti slučajne ili rezultat sistematskih uticaja koji se ne modeluju. U suštini, i greške merenja i rezidualne greške su latentne varijable, te se, u određenim softverima za SEM, takođe prezentuju u ovalnim/kružnim figurama. U AMOS-u, softveru koji je korišćen za SEM u ovoj disertaciji, oba tipa grešaka su prikazane na isti način.



Schema 4. Primer strukturalnog modela.

Dakle, prednost SEM-a u odnosu na druge multivarijantne tehnike jeste mogućnost da se u isto vreme analizira više varijabli i da se simultano objasni njihova direktna i indirektna povezanost (Beran i Violato, 2010). Takođe, zbog toga što dopušta uvođenje latentnih varijabli SEM je od posebne koristi u psihijatriji i psihologiji, gde se većina fenomena ne može direktno meriti i posmatrati (Beran i Violato, 2010). U isto vreme latentne varijable smanjuju grešku merenja, što je još jedna prednost SEM-a. Takođe, konačno dobijeni model, sa složenim interakcijama između ispitivanih varijabli, može se predstaviti shematski, što olakšava sagledavanje fenomena koji se proučava (Byrne, 2010).

3.6.2. Polazna statistička analiza

Polazna statistička analiza, koja uključuje deskriptivnu statistiku uzorka, testiranje značajnosti razlike u ispitivanim varijablama između pacijenata i kontrola, i korelacije sociodemografskih, psihometrijskih i bioloških parametara urađena je pomoću programa SPSS 20.0 (IMB, Chicago, IL). Rezultati su predstavljeni kao frekvencije, procenti, srednja vrednost \pm standardna devijacija i, gde je bilo odgovarajuće, medijana. Normalnost raspodele je procenjena Šapiro-Vilk testom, grafičkim prikazima i skjunisom i kurtozisom.

Varijable koje nisu zadovoljile normalnu raspodelu su transformisane logaritamski (pGR-211) ili korenovanjem (DASS). Značajnost razlike testirana je putem hi kvadrat testa, Studentovog t-testa i Man Vitnijevog (*Mann-Whitney*) testa. Korelacije između ispitivanih varijabli analizirane su putem Pirsonovog, Spirmanovog ili *point-biserial* koeficijenta korelacije.

3.6.3. Procedura strukturalnog modelovanja

Strukturalno modelovanje je rađeno uz pomoć programa IBM SPSS Amos 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Statistička značajnost je definisana na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p < 0,05$. SEM prisup u ovom istraživanju je bio konfirmativan. To znači da je najpre konstruisan hipotetički model na osnovu prethodnih saznanja (shema 2), a zatim je uz pomoć tehnika SEM-a testirana podesnost (*fit*) hipotetičnog modela. tj. njegova podudarnost sa empirijskim podacima (dobijenim iz aktuelnog istraživanja). Hipotetički model je baziran na biopsihosocijalnom modelu Šotea i sar. (Schotte i sar., 2006), i modifikovan u skladu sa saznanjima o signalizaciji GR-a stečenim iz prethodnih istraživanja naše grupe.

Pre samog modelovanja, bilo je potrebno izračunati koeficijente korelacije između ispitivanih varijabli radi određivanja koje će varijable biti uključene u model. Varijable koje su statistički značajno korelisale sa DASS-om su su uvrštene u SEM. Od odabranih varijabli iz "iste grupe" formirane su latentne varijable (npr. od pGR-226, pGR-221 i FKBP51 formirana je latentna varijabla *biološki faktori*). Smerovi putanja (*paths*) su na početku dodeljeni na osnovu prethodnog saznanja iz oblasti, a u toku procesa modelovanja su modifikovani radi povećanja podesnosti modela.

Podesnost modela je procenjena na osnovu tri indeksa podesnosti (*fit indices*) za koje je prethodno ustanovljeno da su valjani indikatori podesnosti modela (Byrne, 2010). Komparativni indeks podesnosti (*comparative fit index* – CFI) upoređuje postojeći model sa nultim modelom i najčešće se koristi. Vrednosti $CFI \geq 0,90$ govore u prilog dobre podesnosti modela. Kvadratni koren prosečne kvadirarane greške aproksimacije (*root mean square error of approximation* – RMSEA) jeste indeks podesnosti koji predstavlja deo varijanse koji nije obuhvaćen modelom. Predstavlja koren srednje vrednosti razlika između procenjenih i pravih vrednosti. Vrednosti $RMSEA < 0,05$ se smatraju adekvatnim. χ^2 ispituje verovatnoću da su razlike između matrica kovarijanse populacije i matrica kovarijanse modela jednake nuli. U slučaju SEM-a, poželjno je da se hipotetički model ne razlikuje od podataka iz rezultata istraživanja (drugim rečima nije cilj da nulta hipoteza bude odbačena), tako da je kriterijum adekvatne podesnosti modela da χ^2 ne bude statistički značajan (tj. da je $p > 0,05$).

Kada je u pitanju veličina uzorka potrebna za adekvatno utvrđivanje podesnosti modela, u literaturi se mogu naći različite preporuke (Bentler i Chou, 1987; Hair i sar., 2006; Kline, 2005; Worthington i Whittaker, 2006). Ne postoji univerzalno prihvaćeno pravilo, ali se preporučuju veći uzorci. *Monte Carlo* studija je pokazala da se adekvatni rezultati mogu postići sa veličinom uzorka od 10 za jednofaktorski model sa 5 opserviranih varijabli, ili veličinom uzorka od 30 za dvofaktorski model sa 5 opserviranih varijabli (Geweke i Singleton, 1980).

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna statistika uzorka

U uzorku, koji se sastojao od 70 ispitanika, muški pol je bio zastupljen sa 42,86% (30 ispitanika). Prosečna starost ispitanika iznosila je $42,24 \pm 9,10$ godina (opseg godina: 22-57). U trenutku ispitivanja 61,43% ispitanika je bilo u braku.

Psihometrijsko testiranje je pokazalo da je prosečan skor na samoupitniku DASS iznosio $48,72 \pm 34,56$ (medijana 38; opseg: 1-117). Na supskalama DASS-a dobijeni su sledeći rezultati: na supskali za depresivnost srednja vrednost skora iznosila je $17,01 \pm 13,86$ (medijana 13; opseg 0-41), prosečan skor na supskali za anksioznost iznosio je $13,36 \pm 11,38$ (medijana 12; opseg 0-40) i prosečan skor na supskali za stres iznosio je $18,35 \pm 10,98$ (medijana 15; opseg 0-41). Prosečan skor na samoupitniku za neuroticizam iznosio je $15,53 \pm 7,56$ (opseg: 1-28), dok su na upitniku za ekstroverziju srednja vrednost i standardna devijacija (SD) rezultata iznosili $9,37 \pm 4,74$ (opseg: 0-17). Prosečna vrednost i SD broja skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja iznosile su $1,52 \pm 2,04$ (medijana: 1; opseg: 0-7). Demografske karakteristike ispitanika, kao i rezultati na psihometrijskim instrumentima prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Socio-demografske i psihometrijske karakteristike uzorka.

	N(%)/srednja vrednost \pm SD	Opseg
<i>Socio-demografske karakteristike</i>		
Pol – muški	30 (42,86%)	
Starost – u godinama	$42,24 \pm 9,10$	22-57
Bračno stanje – u braku	43 (61,43%)	
Broj članova porodice – više od 3	32 (45,71%)	1-6
Veličina stambenog prostora *	$22,26 \pm 18,40$	4,50-100

*m² po članu porodice

Tabela 2 (nastavak). Socio-demografske i psihometrijske karakteristike uzorka.

	N(%) / srednja vrednost \pm SD	Opseg
<i>Rezultati na psihometrijskim instrumentima</i>		
Ukupan skor na DASS-u	48,72 \pm 34,56 (medijana 38)	1-117
Depresivnost (DASS)	17,01 \pm 13,86 (medijana 13)	0-41
Anksioznost (DASS)	13,36 \pm 11,38 (medijana 12)	0-40
Stres (DASS)	18,35 \pm 10,98 (medijana 15)	0-41
Neuroticizam	15,53 \pm 7,56	1-28
Ekstroverzija	9,37 \pm 4,74	0-17
Broj ugrožavajućih događaja	1,52 \pm 2,04 (medijana 1)	0-7

Prosečna starost pacijenata na početku bolesti bila je $37,26 \pm 9,61$ (opseg: 20-53), dok je prosečna starost pri prvoj hospitalizaciji (kod onih koji su tokom života bili hospitalizovani zbog depresije) iznosila $40,21 \pm 9,00$ (opseg: 23-54). Prosečan broj hospitalizacija zbog depresije iznosio je $4,06 \pm 3,55$ (opseg: 0-14). Prosečan broj epizoda depresije tokom života iznosio je $4,85 \pm 2,22$ (opseg: 1-12). Kliničke karakteristike pacijenata predstavljene su u tabeli 3.

Tabela 3. Kliničke karakteristike pacijenata sa depresijom.

	N	Srednja vrednost \pm SD (medijana)
Starost na početku bolesti	35	$37,26 \pm 9,61$ (39)
Starost pri prvoj hospitalizaciji	33	$40,21 \pm 9,00$ (41)
Broj hospitalizacija	35	$4,06 \pm 3,55$ (3)
Broj epizoda depresije	34	$4,85 \pm 2,22$ (6)

Većina bolesnika bila je na terapiji lekovima iz grupe SSRI i tricikličnih i tetracikličnih antidepresiva (TCA i TeCA). Od lekova iz grupe SSRI najzastupljeniji je bio escitalopram (20,0%), zatim paroksetin (14,3%), i na kraju sertralin (8,6%). Od lekova iz grupe TCA i TeCA najzastupljeniji je bilo klomipramin (25,7%), zatim maprotilin (14,3%), dok su amitriptilin i mianserin bili primenjeni sa podjednakom učestalošću (2,9%). Od antidepresiva iz grupe inhibitora ponovnog preuzimanja

serotonina i noradrenalina (SNRI) primenjen je jedino venlafaksin, i to kod tri pacijenta (8,6% pacijenata). Od inhibitora mono-aminooksidaze (MAOI) primenjen je moklobemid i to kod jednog pacijenta. U trenutku kada je istraživanje sprovedeno tri bolesnika su bila bez antidepresiva (8,6% pacijenata), dok su tri pacijenta bila na terapiji sa po dva antidepresiva. Primenjeni antidepresivi prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Primenjeni antidepresivi kod pacijenata sa dijagnozom depresije.

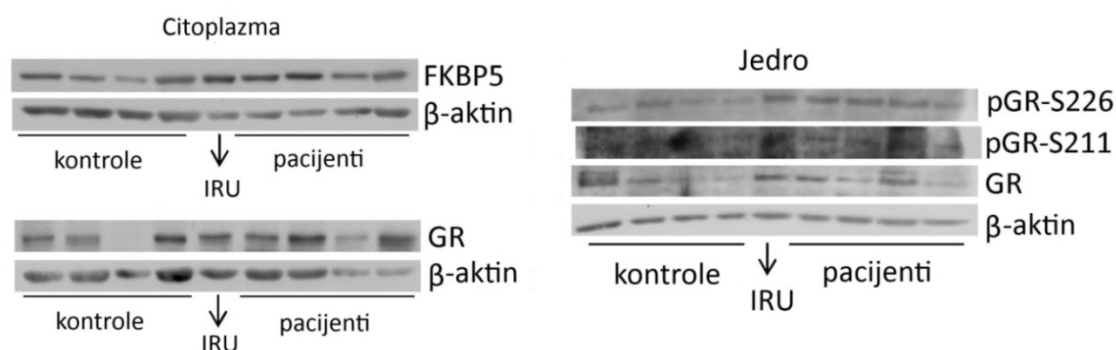
<i>Primenjeni antidepresivi*</i> (<i>N=35</i>)	N	(%)
<i>SSRI</i>		
Escitalopram	7	(20,0%)
Paroksetin	5	(14,3%)
Sertralin	3	(8,6%)
<i>TCA i TeCA</i>		
Klomipramin	9	(25,7%)
Maprotilin	5	(14,3%)
Amitriptilin	1	(2,9%)
Mianserin	1	(2,9%)
<i>SNRI</i>		
Venlafaksin	3	(8,6%)
<i>MAOI</i>		
Moklobemid	1	(2,9%)
<i>Bez antidepresiva</i>	3	(8,6%)

* Tri bolesnika su bila na terapiji sa po dva antidepresiva.

Nivoi tGRn, tGRc, pGR-211, pGR-226 i FKBP51 predstavljeni su kao procenat od jačine signala internog referentnog uzorka (IRU) za svaki ispitivan protein. IRU je dobijen mešanjem alikvota uzoraka iz studije, a korišćen sa ciljem poređenja uzoraka sa različitim gelova i smanjenja variranja uslova između različitih *Western blot*-ova. Nivoi molekularnih parametara normalizovani su u odnosu na β -aktin. Deskriptivna statistika parametara signalizacije GR-a predstavljena je u tabeli 5, dok je reprezentativni *Western blot* prikazan na slici 5.

Tabela 5. Nivoi bioloških parametara.

	N	Srednja vrednost ± SD (medijana)
Kortizol (nmol/L)	64	430,50 ± 153,47
tGRn	66	81,21 ± 46,96
tGRc	68	102,32 ± 39,18
pGR-211n	66	93,65 ± 36,74 (81,8)
pGR-266n	69	77,29 ± 30,36
pGR-211/tGRn	62	119,76 ± 72,75
pGR-226/tGRn	61	114,67 ± 58,52
FKBP51	68	96,81 ± 47,92



Slika 5. Reprezentativni *Western blot-ovi* ispitivanih parametara signalizacije GR-a (IRU – interni referentni uzorak).

Nivoi citoplazmatskog FKBP51, citoplazmatskog GR-a, nuklearnog GR-a i njegovih fosfo-formi (pGR-211 i pGR-226), normalizovani su u odnosu sa odgovarajućim β-aktinom, koji je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel.

4.2. Razlike u socio-demografskim, psihometrijskim i biološkim parametrima između pacijenata i kontrola

Kada su u pitanju socio-demografski parametri, pacijenti i kontrolni ispitanici su se statistički značajno razlikovali samo prema starosti (pacijenti su bili stariji od kontrola; $t=-2,64$; $p=0,01$). Sa druge strane, pacijenti i kontrole značajno su se razlikovali na svim ispitivanim psihometrijskim instrumentima.

Tabela 6. Razlike između pacijenata i kontrolnih ispitanika u socio-demografskim karakteristikama i rezultatima na psihometrijskim instrumentima.

	Pacijenti N(%)/sred. vrednost± SD	Kontrole N(%)/sred. vrednost ± SD	Vrednost testa; p
<i>Socio-demografske karakteristike</i>			
Pol – muški	14 (40,00%)	16 (45,71%)	$\chi^2=0,23$; p=0,63
Starost – u godinama	45,00 ± 7,68	39,49 ± 9,65	t= -2,64; p=0,01*
Bračno stanje – u braku	22 (62,86%)	21 (60,00%)	$\chi^2=0,06$; p=0,81
Broj članova porodice – više od 3	14 (40,00%)	18 (51,43%)	$\chi^2=0,92$; p=0,34
Veličina stambenog prostora	30,95 ± 23,02	24,22 ± 13,07	t= -1,45; p=0,15
<i>Psihometrijski instrumenti</i>			
Ukupan skor na DASS-u	75,24 ± 27,33 (medijana 78)	22,97±16,69 (medijana 23)	Z= -6,15; p<0,001**
Depresivnost (DASS)	28,18 ±9,89 (medijana 30,50)	6,17 ± 6,63 (medijana 4)	Z= -6,34; p<0,001**
Anksioznost (DASS)	21,12 ± 10,34 (medijana 21)	5,83 ± 6,06 (medijana 3)	Z= -5,69; p<0,001**
Stres (DASS)	25,94 ± 9,84 (medijana 27,50)	10,97 ±5,76 (medijana 12)	Z= -5,67; p<0,001**
Neuroticizam	21,58 ± 5,36	11,26 ± 5,77	t= -6,90; p<0,001**
Ekstroverzija	5,67 ± 4,06	11,91 ± 3,30	t= 6,50; p<0,001**
Broj ugrožavajućih događaja	2,96 ± 2,24 (medijana 3)	0,34 ± 0,65 (medijana 0)	Z= -5,00; p<0,001**

*p<0,05, **p<0,01

χ^2 – vrednost hi kvadrat testa, t – vrednost Studentovog t-testa, Z – vrednost Man Vitni testa

Pacijenti su imali značajno veće ukupne skorove na DASS-u ($Z = -6,15$; $p < 0,001$), kao i na pojedinačnim supskalama DASS-a: depresivnosti ($Z = -6,34$; $p < 0,001$), anksioznosti ($Z = -5,69$; $p < 0,001$) i stresa ($Z = -5,67$; $p < 0,001$).

Takođe, pacijenti su imali značajno veće skorove na supskali EPQ-a za neuroticizam ($t = -6,90$; $p < 0,001$), i značajno niže skorove na supskali EPQ-a za ekstroverziju ($t = 6,50$; $p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Pacijenti su prijavili značajno i veći broj skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja ($Z = -5,00$; $p < 0,001$). Razlike između pacijenata i kontrolnih ispitanika u socio-demografskim karakteristikama i rezultatima na psihometrijskim instrumentima prikazane su u tabeli 6.

Kada je reč o biološkim parametrima, pacijenti i kontrole su se statistički značajno razlikovali u nivoima tGRc (pacijenti su imali više nivoe ovog parametra, $t = -3,16$; $p = 0,002$), u nivoima pGR-211 (viši kod pacijenata, $Z = -2,82$; $p = 0,005$), pGR-226 (viši kod pacijenata $t = -7,47$; $p < 0,001$), pGR-211/tGRn (viši kod pacijenata, $t = -2,67$; $p = 0,01$), pGR-226/tGRn (viši kod pacijenata, $t = -3,37$; $p = 0,001$) i FKBP51 (viši kod pacijenata, $t = -6,98$; $p < 0,001$). U tabeli 7 prikazane su razlike u nivoima bioloških parametara između pacijenata i kontrole.

Tabela 7. Razlike u nivoima bioloških parametara između pacijenata i kontrole

	Pacijenti Sred. vrednost \pm SD	Kontrole Sred. vrednost \pm SD	Vrednost testa; p
Kortizol (nmol/L)	469,38 \pm 157,48	398,29 \pm 144,44	$t = -1,88$; $p = 0,06$
tGRn	84,03 \pm 53,96	78,03 \pm 38,20	$t = -0,51$ $p = 0,61$
tGRc	116,42 \pm 39,83	88,22 \pm 33,47	$t = -3,16$; $p = 0,002^{**}$
pGR-211	105,05 \pm 41,56	80,78 \pm 25,39	$Z = -2,82$; $p = 0,005^{**}$
pGR-266	97,31 \pm 25,13	56,67 \pm 19,64	$t = -7,47$; $p < 0,001^{**}$
pGR-211/tGRn	141,83 \pm 87,00	94,66 \pm 40,67	$t = -2,67$; $p = 0,01^*$
pGR-226/tGRn	136,86 \pm 58,86	90,17 \pm 48,16	$t = -3,37$; $p = 0,001^{**}$
FKBP51	126,91 \pm 45,52	64,88 \pm 23,74	$t = -6,98$; $p < 0,001^{**}$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

t – vrednost Studentovog t-testa, Z – vrednost Man Vitni testa

Dalje analize, koje su podrazumevale korelacione analize i strukturalno modelovanje, rađene su na celom uzorku. To je učinjeno zbog toga što je cilj ove teze bio da podložnost za depresiju posmatra kao dimenzionalni fenomen (koji se prostire od zdravlja, preko supkliničkih simptoma, do jasno ispoljenog poremećaja), a ne kategorijalni (koji podrazumeva podelu uzorka na dve grupe – zdrave i obolele). Dimenzionalni pristup omogućava veću senzitivnost za supkliničke promene, koje su od ključnog značaja kada se proučava podložnost za određeni poremećaj. Opisane razlike između pacijenata i kontrola u molekularnim i psihometrijskim parametrima koji su od interesa za ovu disertaciju omogućavaju neophodnu varijansu u malom uzorku.

4.3. Korelaciona analiza

U tabeli 8 predstavljeni su koeficijenti korelacije između rezultata na DASS-u, bioloških parametara, crta ličnosti i skorašnjih ugrožavajućih događaja. Od socio-demografskih karakteristika ispitanika prikazanih u tabeli 2, samo su pol i starost značajno korelirali sa DASS-om (pol: $r=0,26$, $p=0,03$; starost: $r=0,45$, $p<0,001$). S toga je urađena analiza parcijalne korelacije kako bi se kontrolisali efekti ove dve varijable. Osim korelacije DASS-a sa tGRc ($r=0,24$, $p=0,06$) sve druge prethodno statistički značajne korelacije su sadržale svoju značajnost (tabela 9). Prema tome, nakon kontrolisanja za starost i pol sa DASS-om su statistički značajno korelirali: pGR-211, pGR-211/tGRn, pGR-226, pGR-226/tGRn, FKBP51, neuroticizam, ekstroverzija i ugrožavajući događaji.

Kada su u pitanju jačine korelacije, od bioloških parametara jedini je pGR-226 snažno korelirao sa DASS-om ($r=0,601$), dok je korelacija FKBP51 bila umerena ($r=0,492$), a zatim su, prema opadajućim vrednostima jačine korelacije sledili pGR-226/tGRn ($r=0,362$), pGR-211 ($r=0,309$) i pGR-211/tGRn ($r=0,276$). Neuroticizam je imao najsnažniju korelaciju od svih ispitivanih parametara ($r=0,820$), dok je ekstroverzija sa DASS-om korelirala umereno ($r=-0,531$). Ugrožavajući događaji su takođe pokazali umerenu korelaciju sa DASS-om ($r=0,557$).

Sledeći korak je bio odabir varijabli koji će biti uključene u model. Inicijalno su razmotrene sve varijable koje su pokazale statistički značajnu korelaciju sa DASS-om.

Tabela 8. Koeficijent korelacija između skora na DASS-u, bioloških parametara, psiholoških parametara i skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. DASS ^a	1											
2. Kortizol	0,159	1										
3. tGRn	0,065	-0,121	1									
4. pGR-211 ^b	0,341**	-0,019	0,318*	1								
5. pGR-211/tGRn	0,204	0,167	-0,497**	0,335*	1							
6. pGR-226	0,639**	0,242	0,372**	0,471**	0,168	1						
7. pGR-226/tGRn	0,307*	0,413**	-0,512**	0,199	0,691**	0,270*	1					
8. tGRc	0,250*	0,149	0,124	0,168	0,250	0,354**	0,319*	1				
9. FKBP51	0,486**	0,128	0,168	0,415**	0,459**	0,609**	0,443**	0,594**	1			
10. Neuroticizam	0,848**	0,261	0,062	0,334*	0,255	0,505**	0,329*	0,220	0,396**	1		
11. Ekstroverzija	-0,587**	-0,003	-0,152	-0,178	-0,059	-0,349**	-0,074	-0,283*	-0,412**	-0,671**	1	
12. Događaji ^c	0,576**	-0,023	-0,043	0,058	0,128	0,381**	0,166	0,204	0,378**	0,465**	-0,450**	1

*p<0,05, **p<0,01

^a varijabla je transformisana korenovanjem

^b varijabla je transformisana logaritamski (ln – prirodni logaritam)

^c Spirmanovi koeficijenti korelacije

Tabela 9. Parcijalni koeficijenti korelacija između skora na DASS-u, bioloških parametara, psiholoških parametara i skorašnjih ugrožavajućih životnih događaja, nakon kontrolisanja za uzrast i pol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. DASS ^a	1											
2. Kortizol	0,164	1										
3. tGRn	0,006	-0,124	1									
4. pGR-211 ^b	0,309*	-0,040	0,311*	1								
5. pGR-211/tGRn	0,276*	0,164	-0,492**	0,348**	1							
6. pGR-226	0,601**	0,244	0,355**	0,455**	0,198	1						
7. pGR-226/tGRn	0,362**	0,402**	-0,519**	0,184	0,694**	0,289*	1					
8. tGRc	0,237	0,142	0,116	0,152	0,256	0,344**	0,317*	1				
9. FKBP51	0,492**	0,113	0,159	0,395**	0,471**	0,606**	0,437**	0,589**	1			
10. Neuroticizam	0,820**	0,274	0,014	0,305*	0,312*	0,451**	0,371*	0,204	0,384**	1		
11. Ekstroverzija	-0,531**	0,007	-0,121	-0,140	-0,087	-0,291*	-0,081	-0,270*	-0,397**	-0,632**	1	
12. Događaji ^c	0,557**	-0,035	0,038	0,074	0,081	0,320*	0,157	0,233	0,365**	0,551**	-0,500**	1

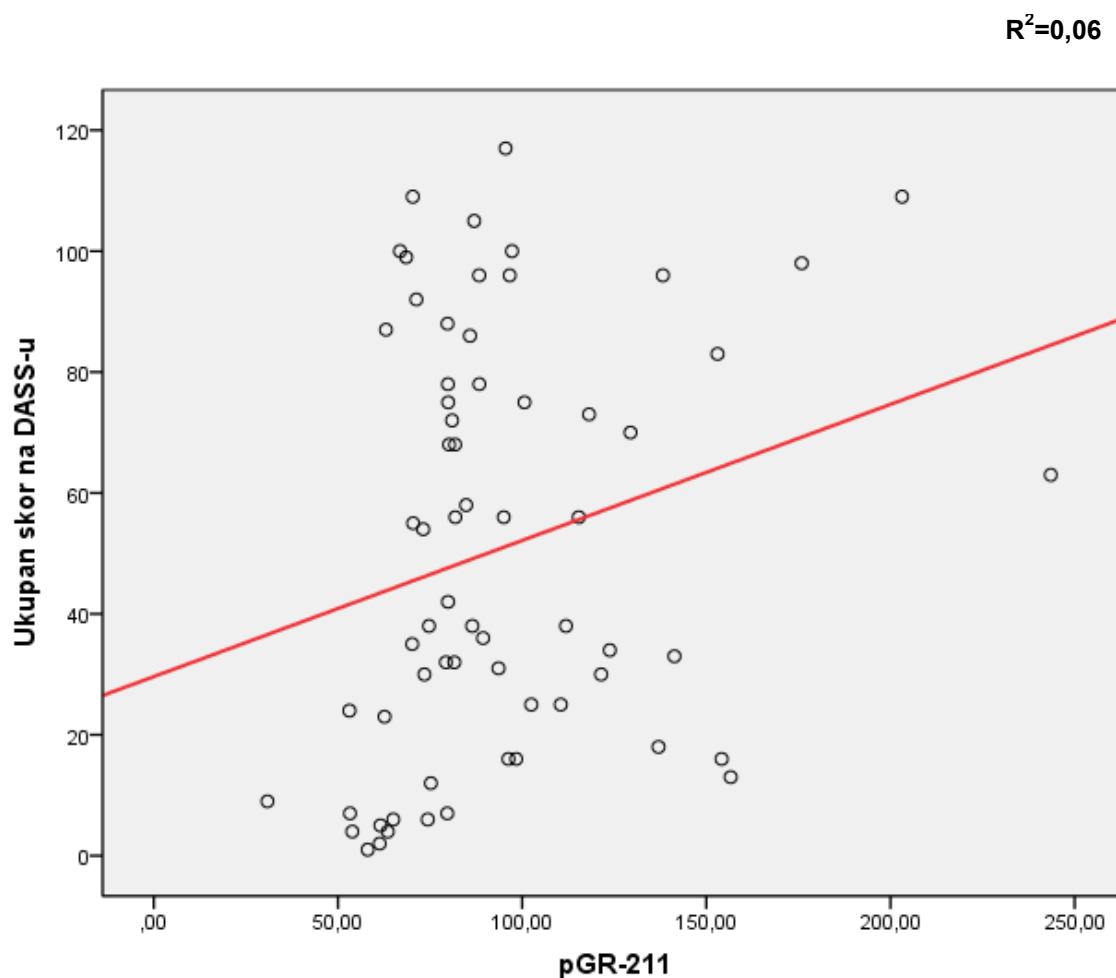
*p<0,05, **p<0,01

^a varijabla je transformisana korenovanjem

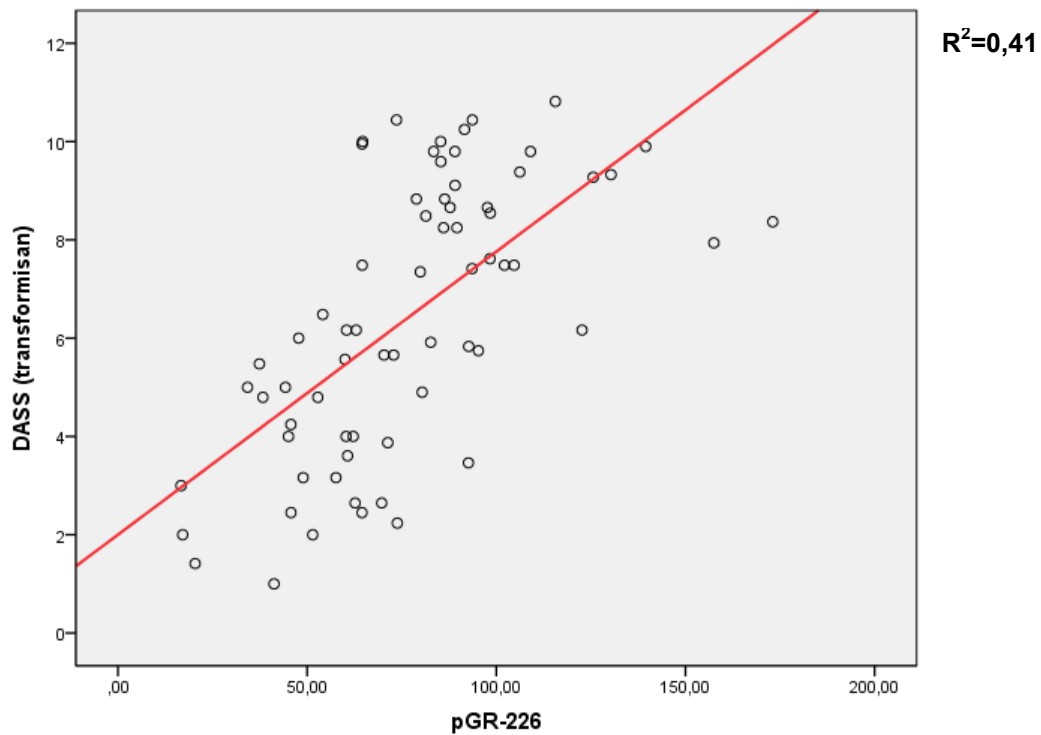
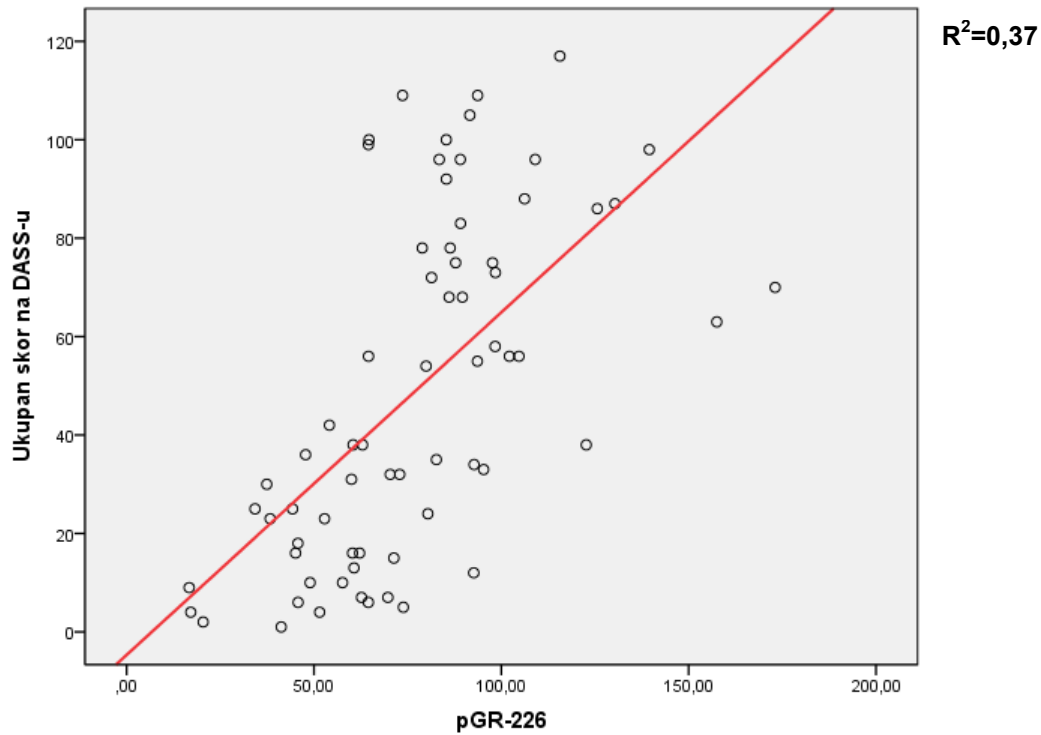
^b varijabla je transformisana logaritamski (ln – prirodni logaritam)

^c Spirmanovi koeficijenti korelacije.

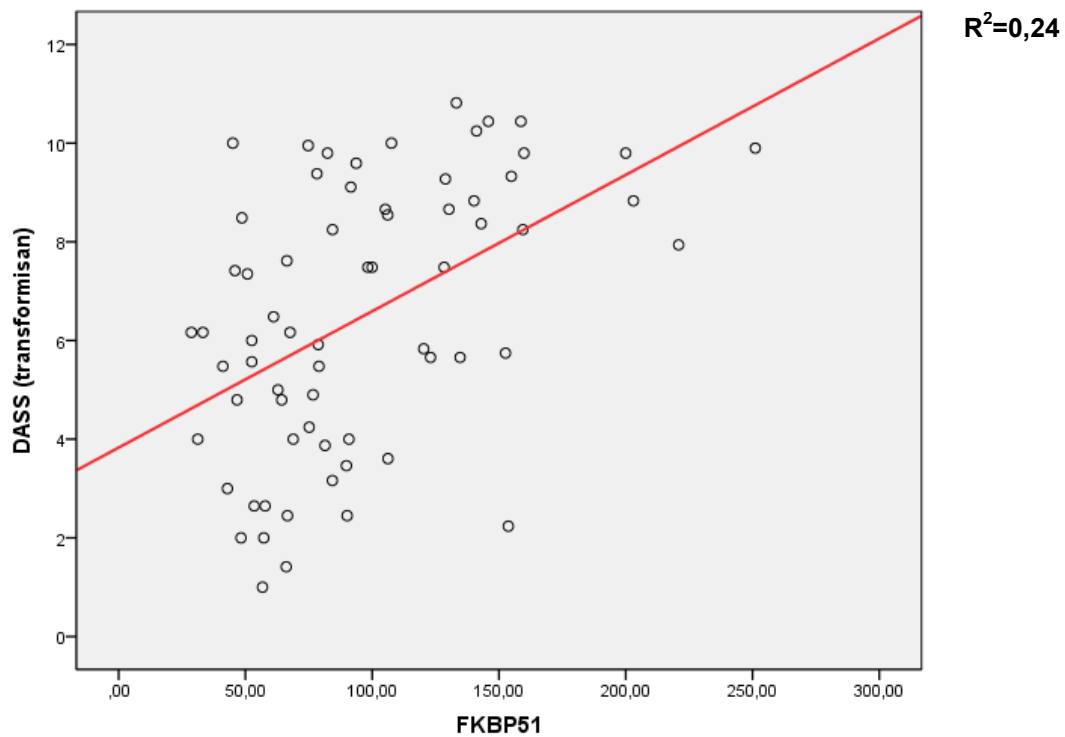
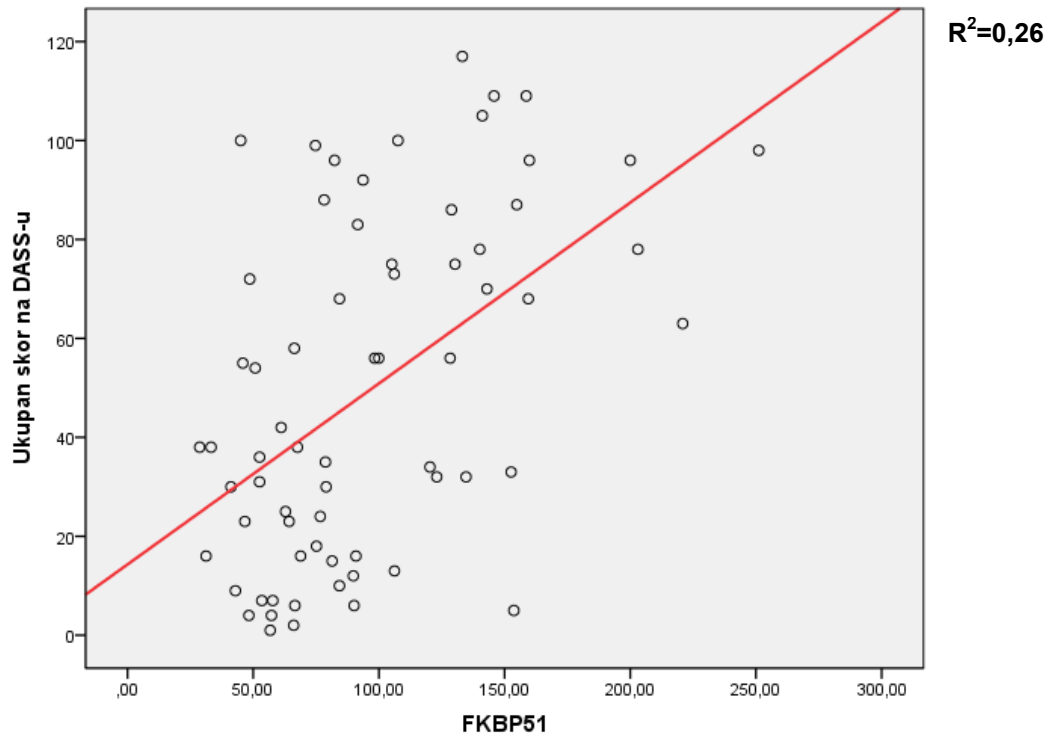
Kada su u pitanju *biološki parametri*, u model su uključeni pGR-226, pGR-211 i FKBP51, s obzirom na to da su imali najjaču korelaciju sa merom podložnosti za depresiju. Korelacije skorova na DASS-u sa biološkim parametrima koji su uvršteni u model su prikazane na grafikonima 1-3.



Grafikon 1. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa nivoima pGR-211. S obzirom da su u korelacionim analizama obe varijable transformisane, na grafikonu su prikazane sirove (netransformisane) vrednosti DASS-a i pGR-211 (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*; pGR-211: GR fosforilisan na serinu 211).



Grafikon 2. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa nivoima pGR-226. S obzirom da su transformisane vrednosti DASS-a korišćene u korelacionoj analizi i modelovanju, ovde su prikazane korelacije pGR-226 sa netransformisanim vrednostima DASS-a (gore) i sa transformisanim vrednostima DASS-a (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*; pGR-226: GR fosforilisan na serinu 226).



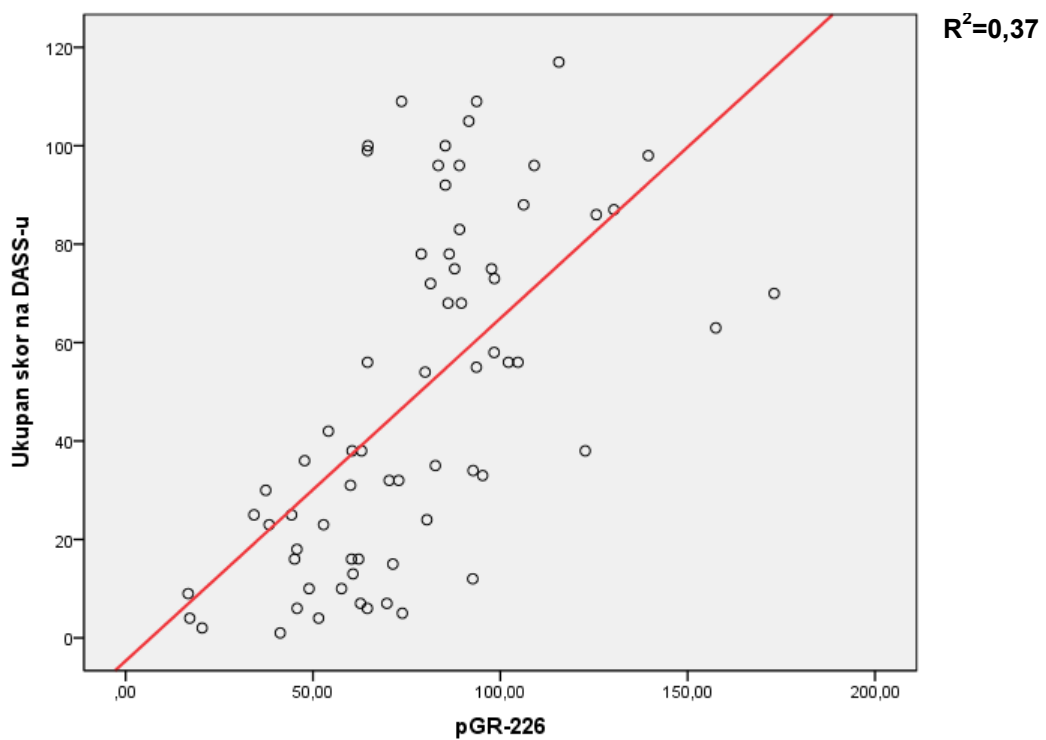
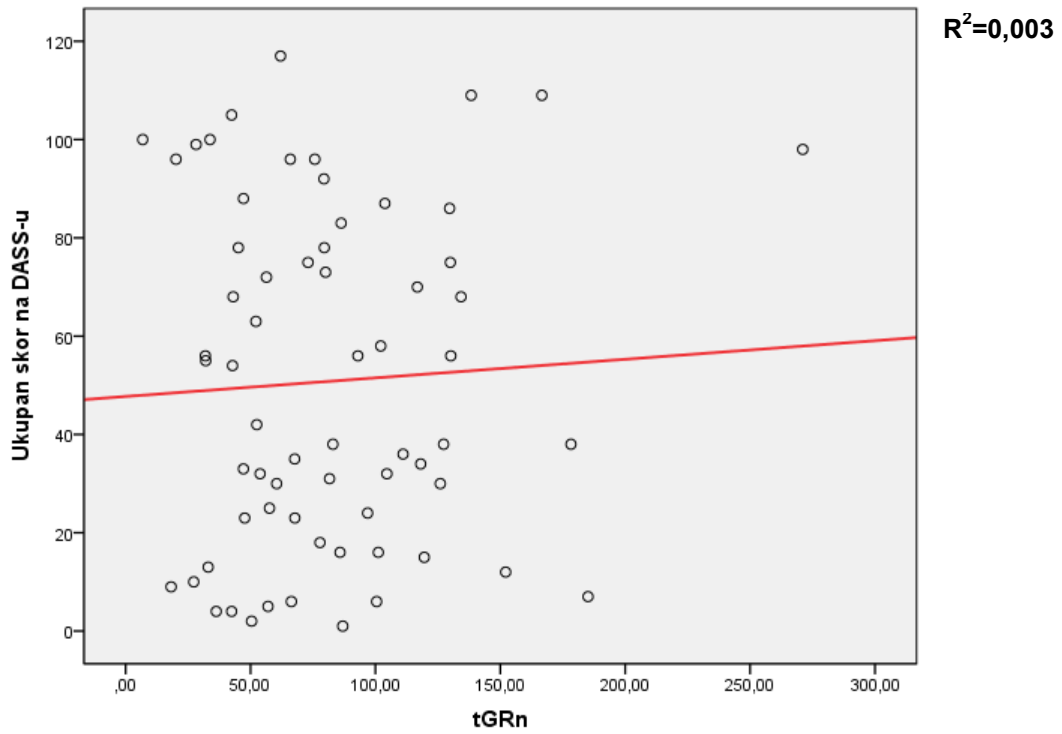
Grafikon 3. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa nivoima FKBP51. S obzirom da su transformisane vrednosti DASS-a korišćene u korelacionoj analizi i modelovanju, ovde su prikazane korelacije FKBP51 sa netransformisanim vrednostima DASS-a (gore) i sa transformisanim vrednostima DASS-a (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*; FKBP51: FKB506-vezujući protein 51).

Kao što je naglašeno u poglavlju *Materijal i metode*, osim nivoa fosforilisanih formi receptora u jedru analizirani su i nivoi *fosforisanih formi GR-a normalizovanih na nivo ukupnog jedarnog receptora*. Ovo je učinjeno kako bi se ispitalo da li je porast nivoa fosfo-formi GR-a odraz porasta nivoa ukupnog jedarnog GR-a ili je zaista rezultat povećane fosforilacije receptora. Ovde će biti dati rezultati vezani za ovo pitanje. Kao što se vidi iz tabela 8 i 9, korelacija pGR-226 sa DASS-om je snažna, dok korelacija ukupnog jedarnog GR-a (tGRn) sa DASS-om nije dostigla statističku značajnost. Korelacija DASS-a sa pGR-226/tGRn je slabija u odnosu na korelaciju sa pGR-226, a isto važi i za pGR-211/tGRn i pGR-211. Štaviše, pGR-226 i tGRn slabo korelišu, što sugeriše da povećanje fosforilisanih formi GR-a nije rezultat povećanja ukupnog broja receptora u jedru, već povećanja procesa fosforilacije. Pomenuto važi i za odnos pGR-211/tGRn i pGR-211.

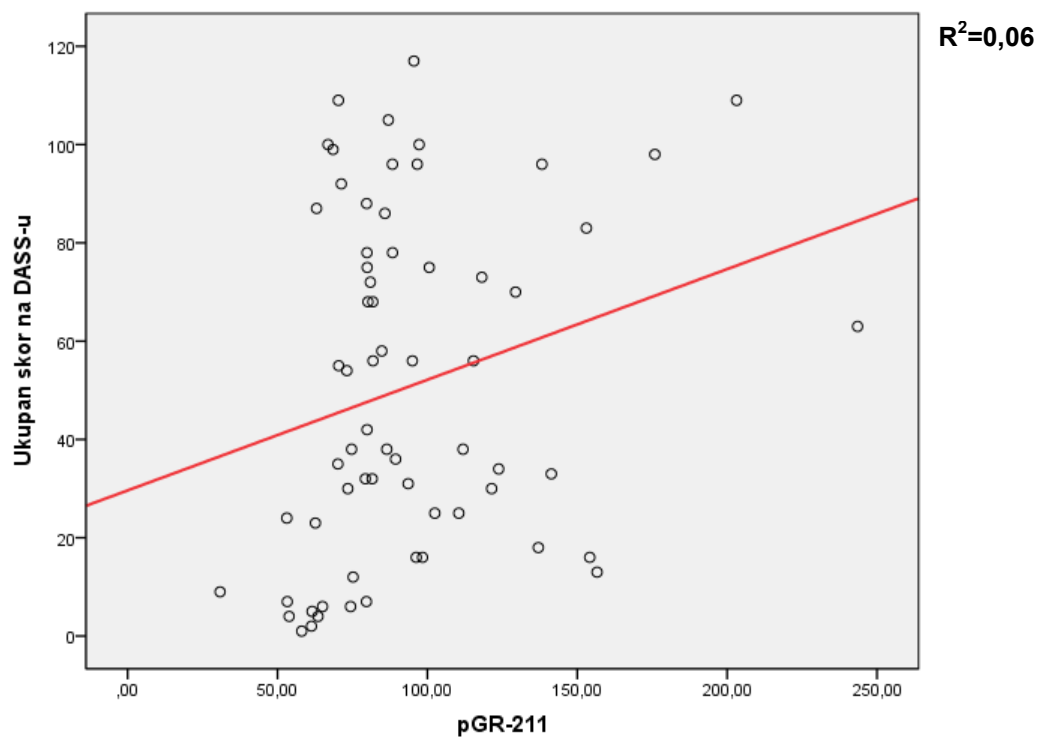
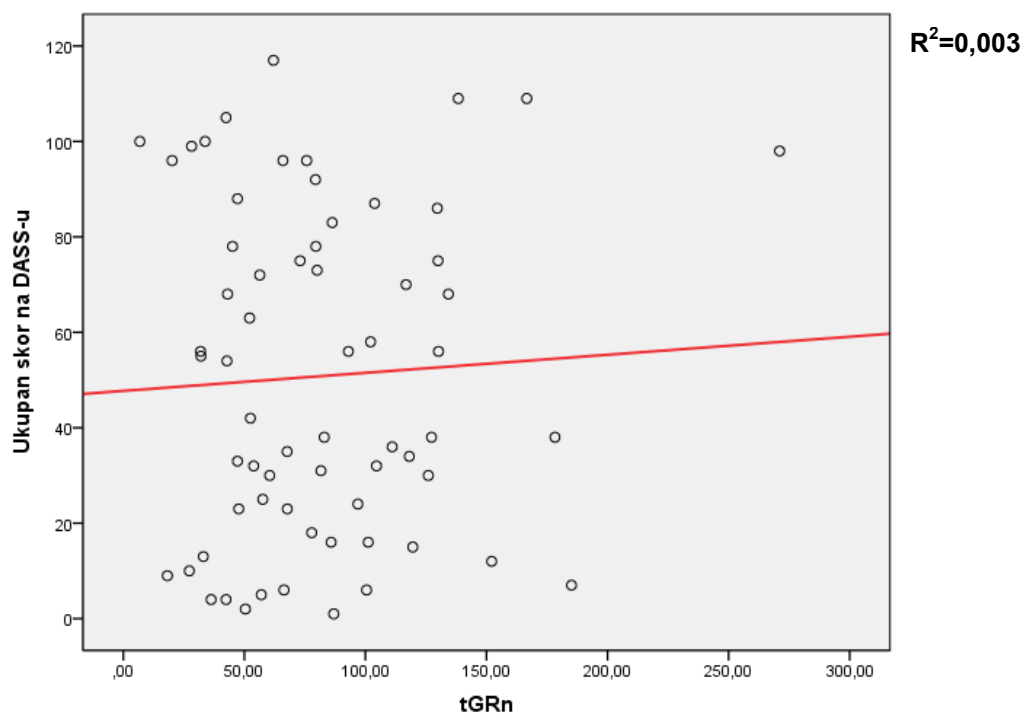
Na grafikonu 4 su predstavljene korelacije tGRn i pGR-226 sa DASS-om. Linearna povezanost pGR-226 sa DASS-om je očigledna, dok isto ne važi za poveznost tGRn sa DASS-om. Na grafikonu 5 su prikazane korelacije tGRn i pGR-211, gde se može primetiti sličan obrazac. Uzimajući u obzir navedeno, od receptorskih parametara u dalje modelovanje su uključeni pGR-226 i pGR-211, dok su pGR-226/tGRn i pGR-211/tGRn izostavljeni.

Od *psiholoških faktora* u model su uključeni neuroticizam i ekstroverzija, s obzirom da na to da su statistički značajno korelisali sa DASS-om. Na grafikonima 6 i 7 prikazane su korelacije netransformisanih i transformisanih vrednosti DASS-a sa psihološkim faktorima.

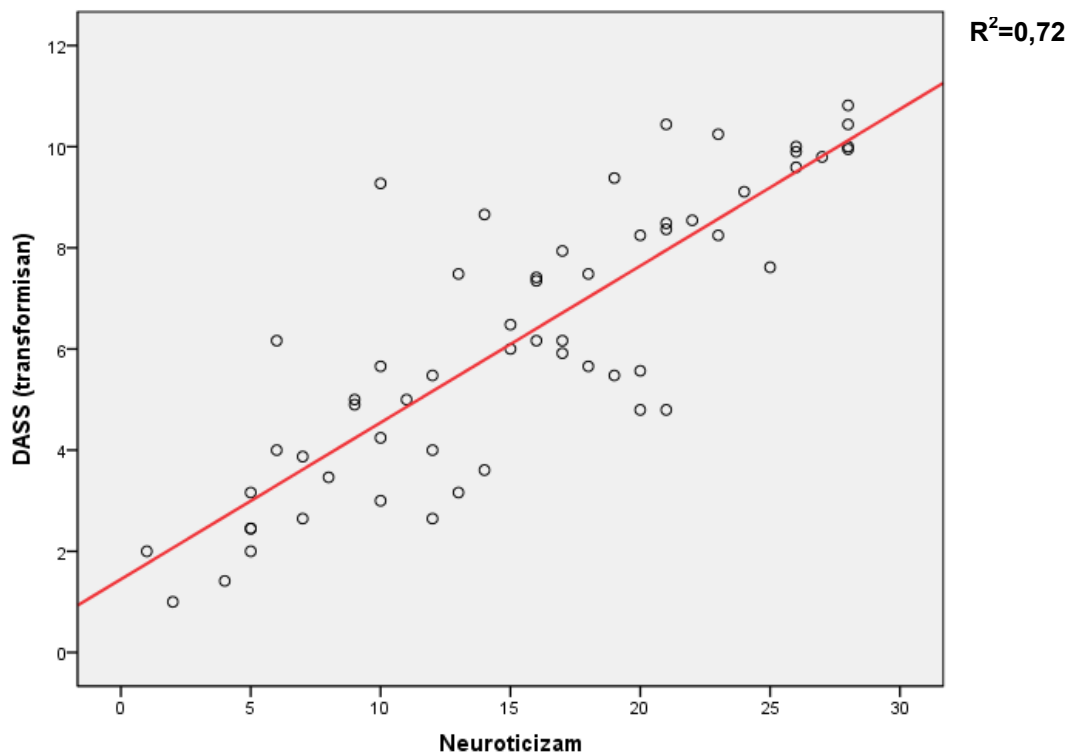
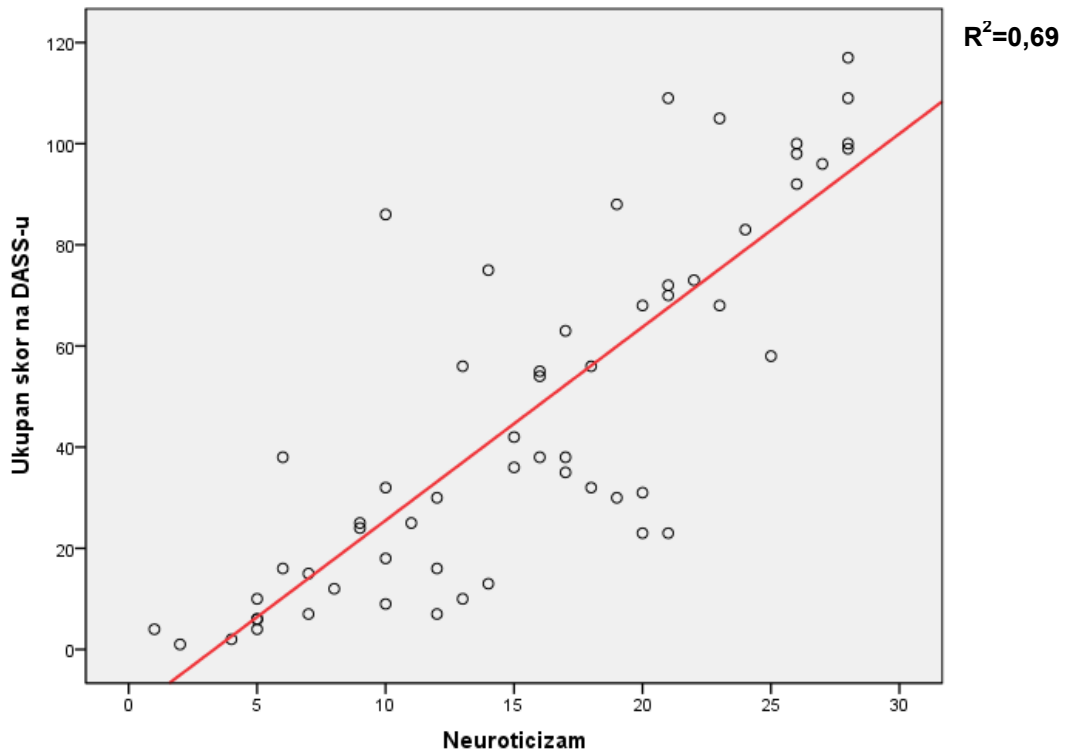
Ugrožavajući događaji su takođe značajno korelisali sa DASS-om, te su odabrani za uključivanje u model. Na grafikonu 8 prikazana je korelacija transformisanih vrednosti DASS-a sa skorašnjim ugrožavajućim životnim događajima.



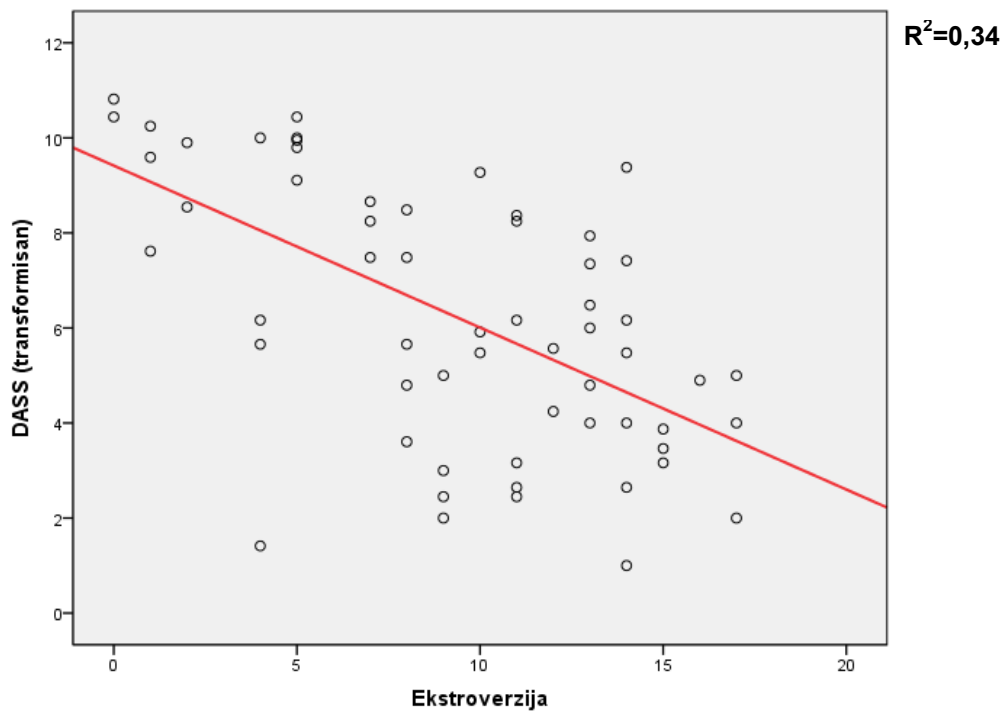
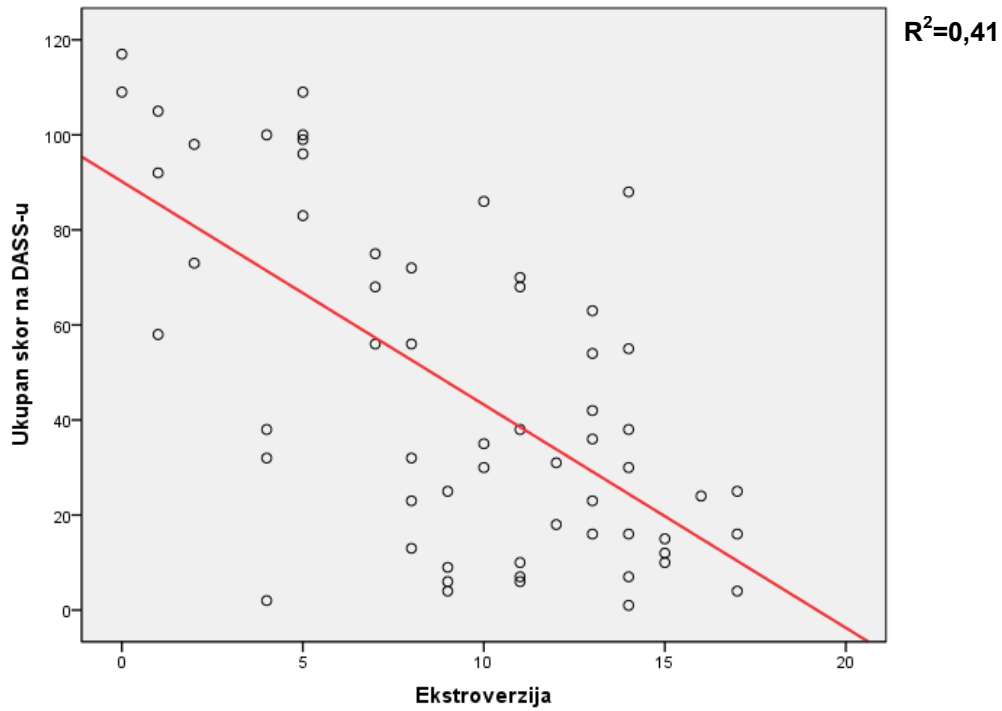
Grafikon 4. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa nivoima tGRn (gore) i pGR-226 (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*; tGRn: *total nuclear GR*; pGR-226: GR fosforilisan na serinu 226).



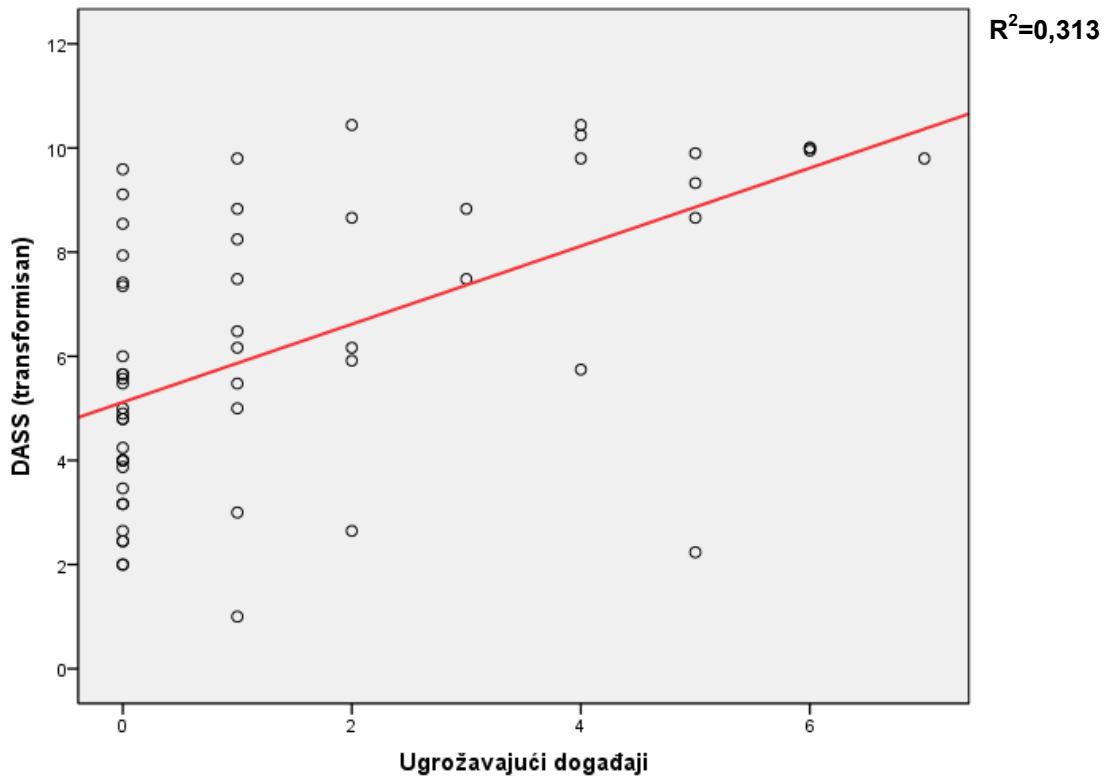
Grafikon 5. Grafički prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa nivoima tGRn (gore) i pGR-211 (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*; tGRn: *total nuclear GR*; pGR-211: GR fosforilisan na serinu 211).



Grafikon 6. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa neuroticizmom. S obzirom da su transformisane vrednosti DASS-a korišćene u korelacionoj analizi i modelovanju, ovde su prikazane korelacije neuroticizma sa netransformisanim vrednostima DASS-a (gore) i sa transformisanim vrednostima DASS-a (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*).



Grafikon 7. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa ekstroverzijom. S obzirom da su transformisane vrednosti DASS-a korišćene u korelacionoj analizi i modelovanju, ovde su prikazane korelacije ekstroverzije sa netransformisanim vrednostima DASS-a (gore) i sa transformisanim vrednostima DASS-a (dole) (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*).



Grafikon 8. Prikaz korelacija ukupnog skora na DASS-u sa ugrožavajućim životnim događajima. Prikazane su transformisane vrednosti DASS-a (DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*).

4.4. Strukturalno modelovanje

U proceduri modelovanja, najpre su formirane dve latentne varijable:

1. varijabla *biološki faktori*, koja je uključila tri parametra vezana za signalizaciju GR-a: pGR-211, pGR-226, FKBP51, i
2. varijabla *psihološki faktori*, koja je obuhvatala dve varijable vezane za dve supskale upitnika EPQ – neuroticizam i ekstroverziju.

Prvi (inicijalni) model sa kojim je postignuta zadovoljavajuća podesnost prikazan je na shemi 5. Model je imao sledeće vrednosti indeksa podesnosti: $\chi^2=10,74$, $p=0,378$, CFI=0,996, RMSEA=0,033. U ovom modelu sledeće putanje su se pokazale statistički značajnim:

1. putanja od *bioloških faktora* ka DASS-u ($p=0,003$)
2. putanja od *psiholoških faktora* ka DASS-u ($p<0,001$)

3. putanja od ugrožavajućih događaja ka *psihološkim faktorima* ($p=0,010$)

4. putanja od *psiholoških faktora* ka *biološkim faktorima* ($p<0,001$)

Dve putanje u prvom modelu nisu pokazale statističku značajnost:

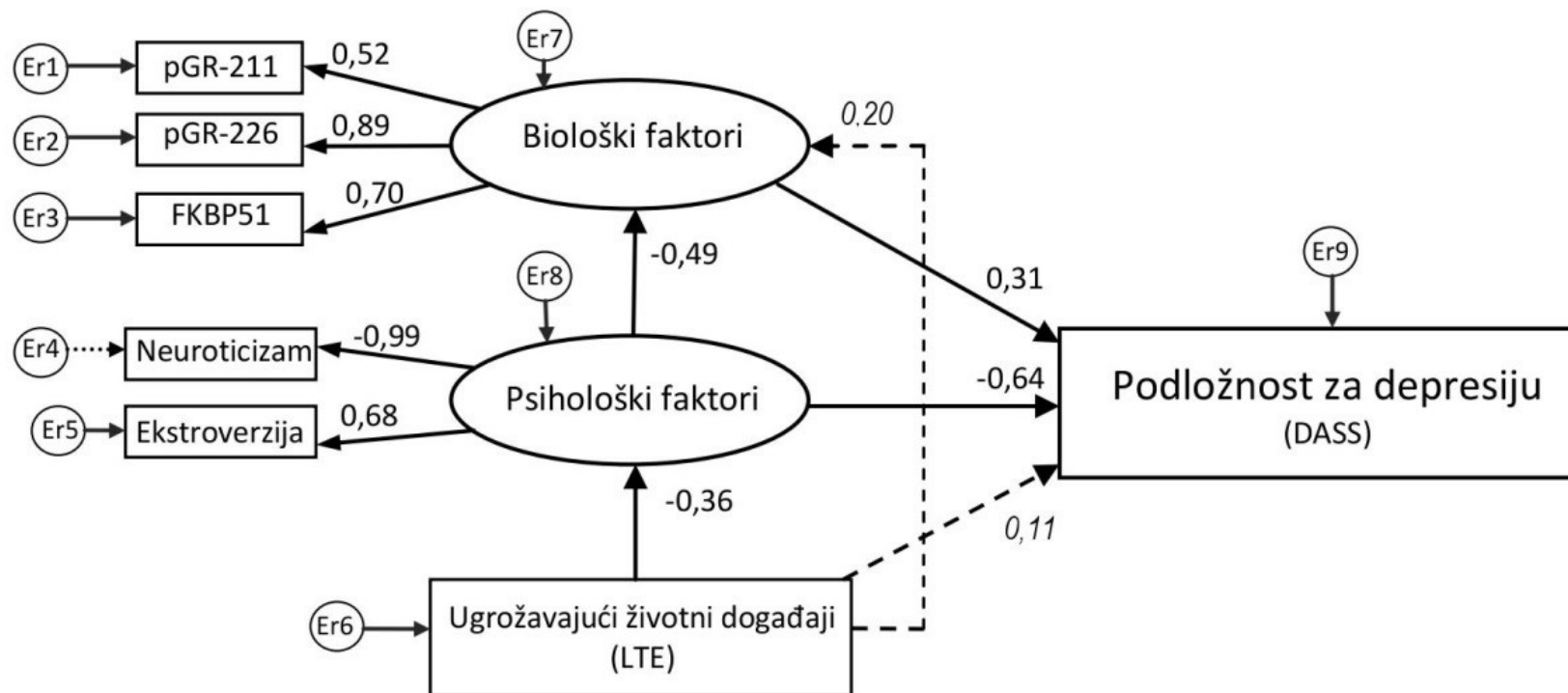
5. putanja od ugrožavajućih životnih događaja ka DASS-u ($p=0,124$)

6. putanja od ugrožavajućih životnih događaja ka *biološkim faktorima* ($p=0,140$).

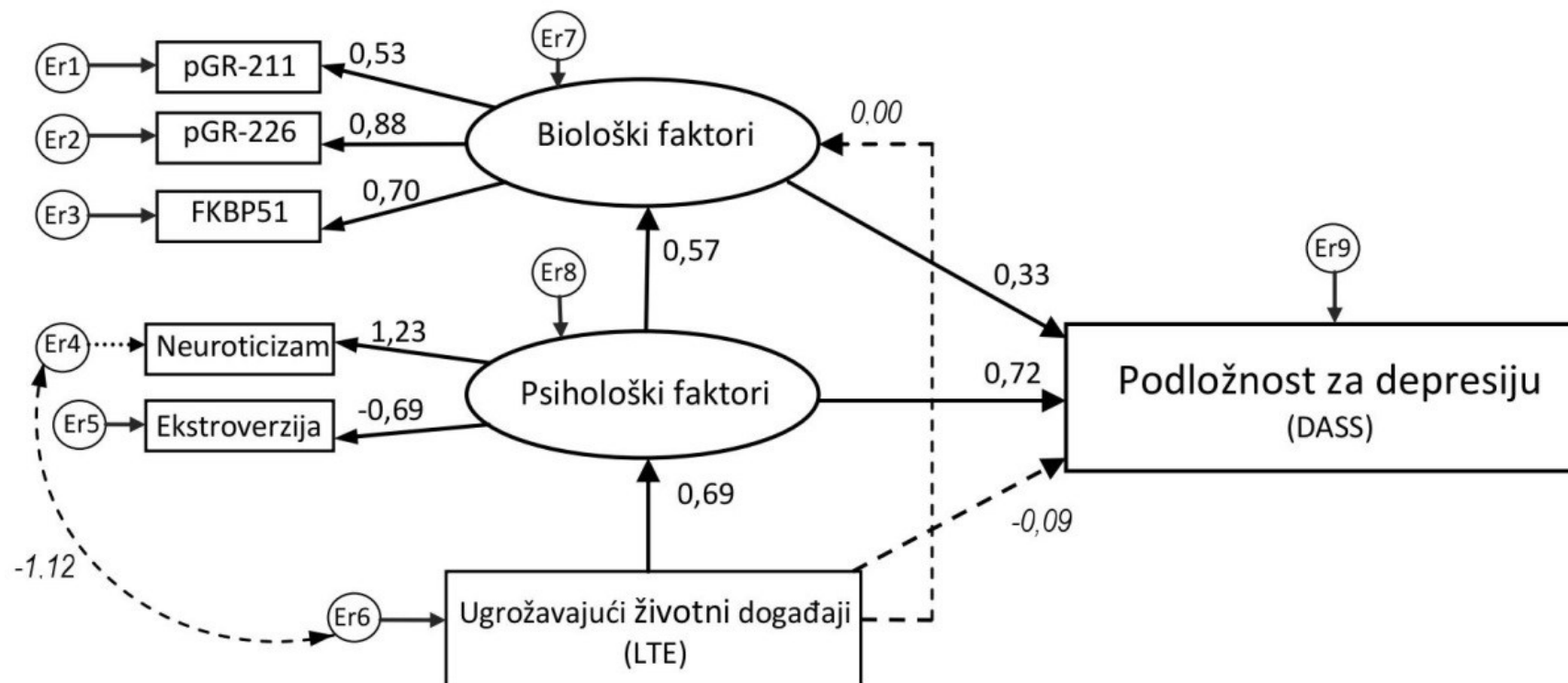
Podesnost modela je još više poboljšana kada je dodata kovarijansa greške merenja između neuroticizma i ugrožavajućih životnih događaja. Tako je dobijen drugi – *finalni model*, koji je prikazan na shemi 6. Indeksi podesnosti ovog modela iznose: $\chi^2=9,268$, $p=0,413$, CFI=0,999, RMSEA=0,021.

Kao i u prvom modelu, dve putanje nisu dostigle statističku značajnost: putanja od ugrožavajućih događaja do DASS-a ($p=0,617$), i putanja od od ugrožavajućih događaja do latentne varijable *biološki faktori* ($p=0,999$).

Značajni prediktori skora na DASS-u bili su *psihološki faktori* ($p=0,001$) i *biološki faktori* ($p=0,002$), pri čemu su *psihološki faktori* nesumnjivo snažnije predviđali podložnost za depresiju od *bioloških faktora*. Takođe, značajan je bio efekat *psiholoških faktora* na *biološke* ($p=0,002$). Iako ugrožavajući životni događaji nisu imali direktan efekat na DASS ili parametre signalizacije GR-a, pokazali su značaj efekat na *psihološke faktore* ($p=0,007$).



Shema 5. Inicijalni model podložnosti za depresiju (indeksi podesnosti: $\chi^2=10,74$, $p=0,378$, $CFI=0,996$, $RMSEA=0,033$). Pravougaonici predstavljaju opservirane varijable, elipse predstavljaju latentne varijable. Neisprekidane strelice predstavljaju statitički značajne putanje, dok su isprekidane strelice putanje koje nisu statistički značajne. Brojevi pored strelica prikazuju standardizovane koeficijente putanje. Brojevi u italiku nisu statistički značajni, dok su ostali značajni na nivou $p<0,05$ (Er: error; pGR-211: GR fosforilisan na serinu 211; pGR-226: GR fosforilisan na serinu 226; FKBP51: *FKB506-binding protein 51*; LTE: *The List of Threatening Experiences*; DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*).



Shema 6. Finalni model podložnosti za depresiju – indeksi podesnosti: $\chi^2=9,268$; $p=0,413$; CFI= 0,999; RMSEA=0,021 (Er: error; pGR-211: GR fosforilisan na serinu 211; pGR-226: GR fosforilisan na serinu 226; FKBP51: *FKB506-binding protein 51*; LTE: *The List of Threatening Experiences*; DASS: *Depression Anxiety Stress Scales*).

5. DISKUSIJA

U ovom radu predstavljen je strukturalni model podložnosti za depresiju kojim su obuhvaćene interakcije parametara signalizacije glukokortikoidnog receptora, crta ličnosti i skorašnjih stresogenih događaja. Veliki broj istraživanja ukazao je na značaj HPA osovine u depresivnim poremećajima (Bosch i sar., 2012) ali, po našem saznanju, istraživanje na kome je zasnovana ova doktorska disertacija je prvo u svetu koje je prikazalo strukturalni model podložnosti za depresiju sa uključivanjem fosforilacije glukokortikoidnog receptora (Jovicic, Maric i sar., 2015). Takođe, značajnost ovog istraživanja jeste što nije korišćen kategorijalni pristup depresiji, već je podložnost za depresiju posmatrana dimenzionalno, u vidu kontinuuma koji se prostire od zdravlja, preko supkliničkih simptoma depresije, do jasne epizode depresivnog poremećaja. Ovaj pristup omogućava veću senzitivnost za suptilne i supkliničke promene, što je posebno važno kada je cilj proučavanje vulnerabilnosti za određeni poremećaj.

Glavni nalazi istraživanja su da parametri GR signalizacije (izraženi kroz latentnu varijablu *biološki faktori*) i crte ličnosti (izražene kroz latentnu varijablu *psihološki faktori*) imaju direktan nezavisni efekat na podložnost za depresiju (izraženu kroz skor na DASS-u), dok skorašnji stresogeni događaji nisu predviđali DASS direktno, ali su pokazali značajan efekat na crte ličnosti.

Uticaj parametara signalizacije GR-a na podložnost za depresiju. Među parametrima signalizacije GR-a, pGR-226 je pokazao jaču korelaciju sa DASS-om u odnosu na FKBP51 i pGR-211. Takođe, pGR-226 je imao i najveći standardizovani koeficijent putanje među biološkim faktorima. Ovo je značajan nalaz, s obzirom na to da je do sada FKBP51 bio glavni fokus istraživanja koja su proučavala signalizaciju GR-a u depresiji (Binder i sar., 2004; Schmidt i sar., 2012).

Sa druge strane, fosforilacija GR-a je značajno manje ispitivana u kontekstu afektivnih poremećaja. Skorašnja istraživanja naše grupe ukazala su na to da iako se depresivni pacijenti nisu razlikovali od zdravih kontrola prema nivoima ukupnog nuklearnog GR-a, imali su značajno više vrednosti pGR-226, kao i niži odnos pGR-211/pGR-226, što ukazuje na sniženu transkripcionu aktivnost GR-a u depresiji (Simic i sar., 2013a). Ove studije su istakle značaj istraživanja fosforilacije GR-a u pokušajima

da se se pronadu molekularni biomarkeri izmenjene funkcije HPA osovine u depresiji. Takođe, skorašnje prekliničke studije pokazale su da različite grupe antidepresiva utiču na funkciju GR-a tako što modulišu fosforilaciju receptora (Mitic i sar., 2013; Guidotti i sar., 2013). Nažalost, odsustvo kliničkih studija vezanih za efekat antidepresiva na aktivnost GR-a, uključujući i status fosforilisanosti receptora, otežava osmišljavanje novih terapijskih mogućnosti koje bi delovale preko signalnog puta GR-a.

Interesantno je da u ovom istraživanju koncentracija kortizola nije pokazala značajnu korelaciju sa DASS-om. Naime, krv za analizu kortizola je uzeta između 08.00 i 09.00h ujutru, a ne neposredno po buđenju svakog ispitanika, te je moguće da je upravo velika varijabilnost u fiziološkoj pulsativnoj dnevnoj sekreciji kortizola uzrok izostanka statističke značajnosti. Sekrecija kortizola pokazuje izrazitu varijabilnost tokom dana, a prema skorašnjoj studiji Paslakisa i sar. (2011) najveća senzitivnost i specifičnost vrednosti kortizola u diferencijaciji između depresivnih i nedeprativnih ispitanika postiže se ako se analizira kortizol iz seruma uzetog između 10.00 i 12.00 časova pre podne (Paslakis i sar., 2011).

Uticao crta ličnosti na podložnost za depresiju. Crte ličnosti imale su najjači efekat na skor na DASS-u, a među njima neuroticizam je imao veći koeficijent putanje kada je u pitanju latentna varijabla *psihološki faktori*. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja su izdvojila neuroticizam kao ključni prediktor depresije (Kendler i sar., 2004). Istraživanja su pokazala da osobe sa visokim neuroticizmom imaju izraženiji trenutni negativni afekat, i jače i trajnije negativne emocije kada su suočene sa svakodnevnim problemima (Jacobs i sar., 2011). Međutim, u ovom SEM-u nije uzeta u obzir biološka osnova neuroticizma, te je ovo ograničenje detaljnije objašnjeno u delu *Ograničenja*.

Psihološki faktori su pokazali značajan efekat na *biološke faktore*. Prethodna istraživanja su uglavom proučavala vezu neuroticizma i HPA osovne merenjem koncentracije kortizola po buđenju ili koncentracije kortizola u odgovoru na stres, ali konzistentna poveznost nije utvrđena (Ormel i sar., 2013; McCleery i Goodwin, 2001; Zobel i sar., 2004; Oswald i sar., 2006; Tyrka i sar., 2008; Zoccola i sar., 2010). U ovom istraživanju kortizol je od svih ispitivanih bioloških parametara imao najslabiju

povezanost sa DASS-om, što upućuje da je potreban specifičniji parametar funkcije HPA osovine kada se ispituje podložnost sa depresiju.

Efekat stresogenih događaja na podložnost za depresiju. Stresogeni životni događaji nisu imali direktan efekat na rezultat na DASS-u niti na *biološke faktore*. Prethodne studije su pokazale da se, kada se sagleda tok depresije, povezanost između stresogenih događaja i epizoda depresije smanjuje sa vremenom, tj. početak svake sledeće depresivne epizode sve manje zavisi od prisustva stresogenog događaja (Willner i sar., 2013). S obzirom na to da je ovaj uzorak bio heterogen po pitanju prisustva kliničke depresije (i po pitanju broja depresivnih epizoda kod pacijenata), povezanost između stresogenih događaja i podložnosti za depresiju se nije pokazala. Međutim, ugrožavajući događaji su imali značajan efekat na psihološke faktore u našem modelu, upućujući na njihov indirektan efekat na skor na DASS-u.

U finalnom modelu, podesnost je poboljšana kada je uključena kovarijansa greške merenja između neuroticizma i ugrožavajućih životnih događaja. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale da neuroticizam utiče na prijavljivanje broja stresogenih događaja (Brett i sar., 1990). Prema tome, ostaje pitanje do koje mere primenjeni upitnik za ugrožavajuće životne događaje (LTE) meri stresogene životne događaje, a koliko je pod uplivom trenutnog negativnog afekta.

Značaj primene SEM-a u rasvetljavanju etiologije depresije. Kao što je već naglašeno u uvodnom delu, SEM je veoma moćna multivarijantna statistička tehnika, koja koristi konceptualni model, dijagrame putanja i sistem povezanih regresionih jednačina kako bi „uhvatila“ složene i dinamične veze između opserviranih i neopserviranih varijabli. SEM, kao i regresiona analiza, koristi se da odgovori na pitanja vezana za kauzalnost, ali se bitno razlikuje od regresije. U regresionom modelu postoji jasna razika između zavisne i nezavisne varijable. U SEM-u, suprotno tome, ovi koncepti su relativni, s obzirom da zavisna varijabla u jednoj jednačini modela može da bude nezavisna varijabla u drugom delu modela (Gunzler i sar., 2013). U složenim poremećajima, u koje spada većina psihijatrijskih fenomena, ne postoji jednosmerna veza između uzroka i posledice, niti postoji samo jedan uzrok. Takođe, između određenog uzroka (npr. određeni genetski polimorfizam) i posledice (npr. depresija)

moгу da postoje faktori koji menjaju i značajno utiču na odnos uzroka i posledice (npr. trauma u detinjstvu). To su medijatori i moderatori, o kojima je bilo reči u *Uvodu*. Određeni autori navode da je za psihijatriju od izuzetnog značaja da pažljivo sagledava efekat ovih „intermedijarnih varijabli“, koje utiču na faktore rizika i pojavu oboljenja, i da neuspeh velikih genetskih i epidemioloških studija da otkriju značajnije prediktore oboljenja upravo leži u nesagledavanju kompleksnih višesmernih povezanosti između zavisnih, nezavisnih i „intermedijarnih“ varijabli (Kraemer i sar., 2001). Medijacija je fenomen u kome intermedijarna varijabla objašnjava kako ili zašto nezavisna varijabla utiče na uzrok. Medijacija podrazumeva uzročnost i vremensku odrednicu između tri varijable koje se prate (npr. faktor rizika, medijator, ishod). Takođe, varijable koje su u kauzalnoj vezi mogu istovremeno predstavljati i uzrok i efekat neke pojave, a standardna regresija ne dozvoljava ovu bidirekcionalnost već traži da se *a priori* za svaku varijablu odredi da li je uzrok ili efekat (Gunzler i sar., 2013). Stoga je SEM pogodnija metoda za analiziranje medijacije ili drugih vrsta kauzalnih analiza.

Iako u psihologiji SEM ima odavno svoju primenu, istraživači iz oblasti biološke psihijatrije i neuronauka intenzivnije koriste prednosti ove metode tek poslednjih desetak godina. Međutim, upotreba SEM-a je i dalje pre sporadična nego trend. Poseban doprinos u upotrebi strukturalnog modelovanja u proučavanju etiologije depresije je dala Kendlerova grupa. Kendler i sar. su objavili nekoliko modela konstruisanih na osnovu podataka dobijenih na velikim uzorcima blizanačkih parova, a modelovanje je obavljeno odvojeno za muškarce i žene (Kendler i sar., 2002; Kendler i sar., 2006; Kendler i sar., 1993b). Konkretno, u SEM-u depresije kod žena je uključeno 18 različitih faktora rizika vezanih za specifična razvojna doba: detinjstvo (genetski rizik, poremećena porodična sredina, seksualno zlostavljanje u detinjstvu, gubitak roditelja u detinjstvu), ranu adolescenciju (neuroticizam, samopouzdanje, rani početak anksioznosti i poremećaj ponašanja), kasnu adolescenciju (akademsko postignuće, traume tokom života, društvena podrška i zloupotreba supstanci), odraslo doba (pozitivna istorija razvoda i prethodnih epizoda depresije) i poslednjih godinu dana (bračni problemi, teškoće i stresogeni životni događaji). Ovi faktori rizika i njihove međusobne interakcije objasnile su 52% varijanse u podložnosti za depresivni poremećaj kod žena (Kendler i sar., 2002). Opšti zaključak Kendlera i sar. je da razvoj rizika za depresiju nastaje interakcijom tri velike grupe faktora – internalizujućih

simptoma (u koje spadaju genetski rizik, neuroticizam, nisko samopouzdanje, rani početak anksioznosti i prethodna istorija depresije), eksternalizujućih simptoma (poremećaj ponašanja, zloupotreba supstanci, prethodna depresivna epizoda) i psihosocijalnih teškoća (poremećena porodična sredina, seksualno zlostavljanje u detinjstvu, gubitak roditelja u detinjstvu, nizak obrazovni nivo, traumatizacija u toku života, nizak nivo društvene podrške, razvod braka, prethodna istorija depresije, bračni problemi u poslednoj godini, teškoće u poslednjoj godini, zavisni i nezavisni stresogeni događaji u poslednjoj godini) (Kendler i sar., 2002). Slični rezultati su pokazani i na modelu depresije kod muškaraca, kod kojih su gubitak roditelja u detinjstvu i nisko samopouzdanje pokazali veći efekat nego kod žena (Kendler i sar., 2006). Veliki uzorak, longitudinalni dizajn, i širok spektar analiziranih faktora rizika čine ova istraživanja izuzetno značajnim i podvlače kompleksnost i heterogenost depresivnog poremećaja.

S obzirom na to da su ove studije sprovedene na velikim uzorcima blizanaca, biološka komponentna depresije je zasnovana na fenotipskoj diskordantnosti blizanačkih parova i pozitivnoj istoriji depresije kod roditelja, bez analiziranja specifičnih molekularnih parametara. U navedenim modelima (Kendler i sar., 1993b; Kendler i sar., 2002; Kendler i sar., 2006) Kendler i sar. se izjašnjavaju samo o genetskoj predispoziciji, dok izostaju informacije vezane za molekularne promene na nivou transkriptoma i proteoma. Iako je opisan model depresije kod žena objavljen pre nešto više od 10 godina, uvrštavanje specifičnih bioloških i molekularnih supstrata u strukturalne modele depresije se nije značajnije povećalo. Kao primer može da posluži studija objavljena u *American Journal of Psychiatry* u periodu pisanja ove disertacije, koja je, uz pomoć metoda SEM-a, imala za cilj da utvrdi stepen naslednosti perinatalne depresije kao i da odgovori na pitanje da li postoji preklapanje u naslednosti između perinatalne i neperinatalne depresije (Viktorin i sar., 2015). Studija je uključila dve velike grupe ispitanica – prvu je činilo 3,427 švedskih blizankinja, a drugu grupa od 313,632 parova sestara (uključujući rođene sestre, polusestre po majci, polusestre po ocu, dizigotne i monozigotne blizakinje). Kao i kod Kendlera, podaci vezani za genetsku osnovu depresije zasnovani su na diskordantnosti prisustva depresije kod parova sestara, a sledeće varijable su bile uključene u model: genetski faktori (određeni na osnovu stepena srodstva), zajednički sredinski faktori (koji su smatrani u potpunosti

zajedničkim za sve parove sestara osim za polusestre po ocu) i individualni sredinski faktori. Ni u ovom SEM-u, koji je za cilj imao ispitivanje biološke komponente depresije, nije analiziran nijedan specifičan biološki parametar (ako se izuzme da je 27% blizanačkih parova testirano na zigotnost – kod ostalih je zigotnost procenjena na osnovu fenotipskih karakteristika).

Sličnih primera ima još, posebno kada su u pitanju blizanačke studije depresije (npr. reference Silberg i sar., 1999; Wade i sar., 2000). Međutim, ohrabruje činjenica da postoje istraživanja koja su koristila SEM kako bi analizirala vezu konkretnih bioloških supstrata sa depresijom, iako je njihov broj ograničen. Na primer, Ros i sar. (2004) su konstruisali biopsihosocijalni model perinatalne depresivnosti i anksioznosti, koji je uključio hormonske parametre (serumski progesteron i kortizol) kao i druge, doduše „posredne“ biološke varijable (podatke vezane za predmenstrualni sindrom i porodičnu istoriju depresije) zajedno sa psihosocijalnim faktorima (između ostalih životnim događajima i nivoom edukacije). Uzorak je činilo 150 žena, a u samom modelu navedeni biološki parametri nisu imali direktan efekat na meru depresivnosti, već posredan, dejstvom na psihosocijalni stres i simptome anksioznosti (Ross i sar., 2004). Istraživači su modelovali i druge biološke supstrate depresije. Na primer, jedna istraživačka grupa predstavila je SEM u kome je analizirana strukturalna povezanost moždanih regiona u depresiji. Na grupi od 119 pacijenata i 49 zdravih kontrola identifikovano je nekoliko značajnih putanja: limbičko-kortikalne veze su se razlikovale kod pacijenata koji su odgovorili na terapiju u odnosu na one koji nisu. Zatim, oni koji nisu odgovorili na terapiju su pokazali dodatne nepravilnosti u limbičko-supkortikalnim putevima. I na kraju, putem razlika u koeficijentima putanja limbičko-kortikalnih puteva i kortiko-kortikalnih puteva mogli su se diferencirati oni koji su odgovorili na kognitivno-bihejvioralnu terapiju, od onih koji su odgovorili na farmakološki tretman (Seminowicz i sar., 2004). Autori studije implikaciju svojih nalaza vide u razvoju algoritama zasnovanim na biološkim fenotipovima depresije na osnovu kojih bi se optimizovalo postavljanje dijagnoze i izbor terapije (Seminowicz i sar., 2004).

Posebnu pažnju zavređuje studija Gata i sar. (2009) koji su u svom SEM-u pokušali da povežu specifične molekularne, fiziološke i neuroanatomske markere, sredinske faktore i neuroticizam sa simptomima depresije i anksioznosti (Gatt i sar., 2009). Oni su konstruisali SEM u kome su identifikovali nekoliko značajnih putanja i

medijacija: najpre da prisustvo specifičnog polimorfizma za BDNF u kombinaciji sa ranim stresom predviđa smanjeni volumen hipokampalne sive mase i lateralnog prefrontalnog korteksa, a zatim i veću depresivnost. Takođe su pokazali da je veća depresivnost povezana sa lošijom kognitivnom performansom. Interakcija specifičnog polimorfizma za BDNF i ranog stresa je takođe predviđala neuroticizam, a ovaj veću depresiju. BDNF i rani stres su efekat na neuroticizam ostvarili posredstvom efekta na srčanu frekvencu (koja je u ovom slučaju bila *medijator*). Ova studija, koja je uključila značajan broj bioloških i bihevioralnih varijabli iz različitih sistema je dobar primer SEM-a koji odgovara potrebama kompleksnog multifaktorijskog oboljenja kao što je depresija. Važno je naglasti da je istraživanje urađeno na manjem uzorku (374 ispitanika), ali su uprkos tome dobijeni statistički značajni rezultati.

Međutim, glukokortikoidna signalizacija nije do sada ispitivana ni u jednom strukturalnom modelu depresije. Objavljeno je svega nekoliko modela u kojima su korišćeni drugi parametri HPA osovine, i to uglavnom kortizol, koji je u našem istraživanju pokazao nedovoljno snažnu povezanost sa simptomima depresije, anksioznosti i stresa. Interesantan je strukturalni model depresije i anksioznosti koji povezuje rani stres i koncentraciju kortizola u detinjstvu sa funkcionalnom povezanošću (*functional connectivity*) moždanih regiona u adolescenciji (Burghy i sar., 2012). Funkcionalna povezanost između amigdala i prefrontalnog korteksa u adolescenciji je bila medijator efekta povišenog kortizola u detinjstvu na kasnije simptome depresije. To znači da je direktan efekat nivoa kortizola u detinjstvu na kasniju depresiju bio tek na granici značajnosti, ali je direktan efekat kortizola na funkcionalnu povezanost navedenih moždanih struktura bio značajan, kao što je i *povećana* funkcionalna povezanost bila značajno povezana sa depresijom.

Iz ovog pregleda nekih od do sada publikovanih bioloških strukturalnih modela depresije može se zaključiti da su se istraživači uglavnom fokusirali na jedan, ili ređe dva ili tri sistema (biološka ili psihosocijalna) u okviru kojih su pokušali da objasne deo etiologije depresije. Modeli u kojima su korišćeni specifični biološki supstrati u kombinaciji sa sredinskim faktorima su uspevali da daju statistički značajne rezultate, uprkos relativno malim uzorcima, posebno kada se uporede sa veličinom uzoraka velikih genomskih studija asocijacije (*genome wide association studies*) koje do sada nisu uspele da identifikuju gene sa značajnijim efektom na podložnost za depresiju.

Uprkos tome, većina obimnih bioloških i epidemioloških studija i dalje koristi jednostavne regresione analize, zanemarujući efekat medijacije i moderacije u kompleksnim poremećajima. To je jedan od mogućih razloga zbog kojih i na velikim uzorcima izostaju snažni efekti.

Perspektiva neuronauka, čini se, ipak leži u sagledavanju složenih odnosa različitih faktora, a razvoj statističkih metoda i kompjuterskih softvera će potencijalno omogućiti da se ove suptilne veze identifikuju i preciziraju. Poremećaji u medicini koji se tiču apstraktnih fenomena kao što su emocije, afekat, nagoni, mišljenje, kognicija, ne mogu se proučavati ni koncipirati na jednosmernim linearnim putanjama. Ovi entiteti zahtevaju poštovanje njihove heterogenosti, kompleksnosti i varijabilnosti, što se može postići samo korišćenjem obuhvatnijih i složenijih modela, u koje spadaju tehnike SEM-a. Štaviše, familjarizovanje sa SEM-om bi potencijalno omogućilo lakši prelazak na čak složenije metode proučavanja psihijatrijskih poremećaja. Ovde spada konstruisanje složenih algoritama za predviđanje nastanka poremećaja, postavljanje dijagnoze ili izbora terapije. *Machine learning* je metoda koja podrazumeva pravljenje kompleksnih algoritama koji mogu da uče iz dostupnih podataka i da iz njih predviđaju ishode. *Machine learning* se razvio iz nauke prepoznavanja obrazaca i teorije kompjuterskog učenja iz oblasti veštačke inteligencije. Funkcioniše tako što kompjuter stvara model iz velikog broja primera koji mu se daju, kako bi na osnovu tih podataka pravio predviđanja i odluke. Pokušaji da se *machine learning* iskoristi u neuronaukama već postoje – primer je istraživanje sa Medicinskog fakulteta na Harvardu gde je konstruisan algoritam za brzo postavljanje dijagnoze autizma pomoću tehnika *machine learning*-a, sa specifičnošću od 94% (Wall i sar., 2012). Takođe, *machine learning* je oprobano i za postavljanje dijagnoze depresije na osnovu nalaza funkcionalne magnetne rezonance. Postignuta je specifičnost od 78,3%, ali na uzorku od samo 25 ispitanika (Sato i sar., 2015). Prvi rezultati su obećavajući, ali da bi *machine learning* zaista mogao da posluži svojoj svrsi, trebalo bi da mu prethodi pažljiva selekcija potencijalnih bioloških markera, i testiranje njihovih efekata u složenim statističkim modelima kao što je SEM.

Ograničenja istraživanja. Iako je veličina uzorka zadovoljila neophodan broj prema preporukama određenih autora (Geweke i Singleton, 1980), SEM se smatra

metodom velikih uzoraka te je povećanje broja ispitanika preporučljivo. Međutim, skupe i vremenski zahtevne molekularne analize koje su urađene u ovoj studiji, kao i činjenica da do sada fosforilacija GR-a nije nikada proučavana u kontekstu modela podložnosti za depresiju, opravdavaju pokušaj SEM-a na malom uzorku.

Drugo ograničenje odnosi se na veličinu efekta *psiholoških faktora* na DASS. U ovom modelu napravljena je “veštačka” podela na biološke i psihološke faktore, kako bi se konstruisao koncizan i jasan model. Međutim, neuroticizam ima biološku, a verovatno i genetsku osnovu, te se stoga ne može u potpunosti smatrati kao isključivo “psihološki” faktor (Hettema i sar., 2006; Calboli i sar., 2010). Prema tome, latentna varijabla *psihološki faktori* u sebi nosi i deo *biološkog*, koja doprinosi njegovom efektu na DASS. Takođe, metodološki „artefakt“, koji nastaje preklapanjem stavki na upitnicima za neuroticizam, anksioznost i depresiju, takođe doprinosi snažnom efektu crta ličnosti na DASS. Još jedan značajan problem koji se javlja u istraživanjima koja proučavaju povezanost crta ličnosti i psihijatrijskih poremećaja jeste zavisnost „crte i stanja“ (*trait-state dependance*). Naime, pokazano je da rezultati na upitnicima za neuroticizam zavise od trenutnog raspoloženja, odnosno prisustva ili odsustva depresivnosti. Drugim rečima, rezultati na samoupitnicima za neuroticizam su veći u toku epizode depresije (Ormel i sar., 2004), i postepeno opadaju po oporavku, što doprinosi snažnim korelacijama između rezultata na upitnicima neuroticizma i depresije. Sa druge strane, određene studije su pokazale da je neuroticizam relativno stabilan tokom vremena (stabilnost se povećava tokom života, dostižući vrhunac u starijem životnom dobu) (Conley, 1984), a preklapanje stavki sa depresijom i anksioznošću ne predstavlja glavni deo povezanosti sa njima (Uliaszek i sar., 2009). Premda ovaj nalaz može opravdati korišćenje neuroticizma kao važnog prediktora podložnosti za depresiju, neophodan je poseban oprez u tumačenju velične efekta, posebno ako se koriste instrumenti samoprocene, kao što je bio slučaj u ovom doktoratu. Dalja istraživanja bi trebalo da uključe genetske faktore čija je korelacija sa neuroticizmom već pokazana (npr. polimorfizmi 5-HTTLPR) (Calboli i sar., 2010), kao i podatke dobijene i drugim metodama (npr. intervjuom, heteropodacima i sl.) (Ormel i sar., 2013).

Kada se govori o vezi između ličnosti i depresije, značajno je osvrnuti se na to da pri selekciji ispitanika nije analizirano prisustvo svih poremećaja ličnosti i da pri

samom modelovanju dijagnoza poremećaja ličnosti nije uzeta u obzir. Naime, kao što je već naglašeno, varijable koje su korišćene u modelovanju su dimenzionalne – za podložnost za depresiju rezultat na upitniku DASS, a za psihološke faktore rezultati na upitnicima za neuroticizam i ekstroverziju. Psihijatrijske dijagnoze nisu korišćene u analizi, tj. celokupan uzorak pri modelovanju nije bio podeljen u odnosu na dijagnostičke kategorije. Iako je pokazano da poremećaji ličnosti značajno utiču na tok i prognozu depresije (Newton-Howes i sar., 2004), opravdanje za dimenzionalni pristup koji je primenjen u ovoj studiji može se naći u istraživanjima koja pokazuju da su razlike i sličnosti između pojedninačnih poremećaja ličnosti zasnovane na sličnostima i razlikama između ispoljenih bazičnih crta koje se nalaze osnovi svakog od poremećaja (Costa i McCrae, 1990). Konkretno, svaki poremećaj ličnosti ispoljava drugačiji profil petofaktorskog modela ličnosti koji je u saglasnosti sa dijagnostičkim kriterijuma za taj poremećaj. U isto vreme, pokazano je da su određene crte ličnosti, kao što su neuroticizam i saradljivost, u osnovi većine poremećaja ličnosti (Saulsman i Page, 2004), ali da ono što pravi razliku između poremećaja ličnosti jeste stepen izraženosti ostalih dimenzija. S obzirom da povišen neuroticizam karakteriše većinu poremećaja ličnosti, a takođe značajno koreliše sa vulnerabilnošću za depresiju, može se pretpostaviti da je to crta koja je u osnovi ranjivosti za depresiju kod osoba sa poremećajem ličnosti. Time što se u modelu podložnosti za depresiju analiziraju (dimenzionalne) crte ličnosti umesto kategorijalnih dijagnostičkih varijabli, dobijaju se preciznije informacije o karakteristikama ličnosti koja će ispoljiti veću osetljivost za depresiju. U modelu ove disertacije to je ličnost sa izraženijim neuroticizmom i nižom ekstroverzijom, što bi npr. odgovaralo izbegavajućem i zavisnom poremećaju ličnosti. Navedeni poremećaji ličnosti u prethodim istraživanjima i jesu povezani sa većim rizikom za depresiju (Fava i sar., 1996). U ovoj studiji su uzete u obzir samo dve crte ličnosti, a radi sveobuhvatijeg razumevanja uticaja ličnosti na podložnost za depresiju bilo bi korisno u buduća istraživanja uključiti i ostale dimenzije petofaktorskog modela.

Još jedno ograničenje predstavlja činjenica da faza menstrualnog ciklusa i upotreba oralnih kontraceptiva ispitanica nisu uzete u obzir pri analiziranju bioloških parametara. Uloga polnih hormona u signalizaciji GR-a je nedovoljno ispitana kod ljudi, ali su istraživanja na kulturi ćelija pokazala da, uz deksametazon, kortizol i deoksikortikoseron, *progesteron* i *progestin* indukuju fosforilaciju GR-a na serinu 226

(Chen i sar., 2008). Istraživanja vezana za uticaj polnih hormona na sekreciju kortizola kod ljudi su suprostavljena – određeni istraživači su pokazali da oralni kontraceptivi ne utiču značajno na sekreciju kortizola kod žena (Weekes i sar., 2006), dok postoje studije koje tvrde da je u uslovima povišenog stresa efekat polnih hormona na sekreciju kortizola značajan. Na primer, jedna studija je pokazala da kod žena u lutealnoj fazi ciklusa postoji pozitivna korelacija između subjektivnog stresa i nivoa kortizola, dok je kod žena u folikularnoj fazi ova povezanost negativna (Duchesne i Pruessner, 2013). U drugoj studiji, koja je uključila restrikciju spavanja kao stresor, žene u folikularnoj fazi imale su značajan pad koncentracije kortizola po buđenju nakon prethodne restrikcije spavanja, dok su u popodnevim časovima nivoi kortizola bili povišeni (ovaj obrazac je primećen i kod muškaraca). Žene u lutealnoj fazi nisu pokazale depresiju kortizola po buđenju, niti povišenje kortizola u popodnevnim i večernjim satima (LeRoux i sar., 2014). U svakom slučaju, uloga polnih hormona u modulisanju HPA osovine u odgovoru na stres i emocionalnoj regulaciji je važna tema i zaslužuje dodatno ispitivanje u kontekstu glukokortikoidne signalizacije.

Konačno, parametri signalizacije GR-a su analizirani iz limfocita periferne krvi, te se postavlja pitanje koliko dobro rezultati dobijeni “na periferiji” odražavaju stanje u centralnom nervnom sistemu. Animalne studije sprovedene još devedestih godina ukazale su da su GR iz različitih delova mozga i GR iz imunskog sistema slično regulisani od strane kortikosterona (analog kortizolu kod ljudi) (Lowy, 1991; Spencer i sar., 1991). Takođe, skorija istraživanja su pokazala da ćelije periferne krvi dele 80% transkriptoma sa ćelijama mozga, i da su mnogi procesi koji se odigravaju u ova dva sistema poredivi (Gladkevich i sar., 2004; Liew i sar., 2006). Pored toga, promene u funkciji GR-a u limfocitima, posebno kada je u pitanju fosforilacija, mogu imati uticaj na parametre inflamacije koji su takođe uključeni u hronični stres i depresiju (Avenant i sar., 2010; Cole i sar., 2007; Miller i sar., 2008; Antoni i sar., 2012). Naime, putem svojih interakcija sa imunskim sistemom, signalizacija GR-a može biti povezana sa funkcijom CNS-a i ponašanjem (Dantzer i sar., 2008). I konačno, izuzimajući sličnost signalizacije GR-a između periferne krvi i mozga, iznalaženje lako dostupnog biološkog markera za depresiju nosi svojevrzni klinčki značaj (Daskalakis i sar., 2014).

Perspektive istraživanja. U delu koji sledi će biti razmotrene terapijske implikacije vezane za rezultate ovog doktorata. Konkretno, fokus će biti stavljen na potencijalne terapijske modalitete koji bi delovali na signalni put GR-a, posebno na modulaciju fosforilacije receptora kod pacijenata sa depresijom.

Na osnovu saznanja iz naše laboratorije, može se pretpostaviti da bi inhibicija fosforilacije GR-a na serinu 226 mogla imati antidepresivni efekat, tako što bi pospešila transkripcionu aktivnost receptora, te smanjila glukokortikoidnu rezistenciju. Ova inhibicija bi bila usmerena na signalni put JNK – delujući na samu JNK ili modulišući aktivnost uzvodnih kinaza. Istraživanja na animalnim modelima su pokazala da akutni stres dovodi do povećanja nivoa JNK u mozgu i do ispoljavanja ponašanja sličnog depresiji (Galeotti i Ghelardini, 2012). U isto vreme, primećeno je i da akutni stres snažno povećava nivoe MAPK4 (prvog uzvodnog aktivatora JNK) u nekoliko regiona u mozgu, i to više nego što povećava JNK (Shen i sar., 2004). Ovaj nalaz je značajan jer ukazuje i na drugi potencijalni ciljni molekul u signalnom putu JNK (koji nije sama JNK) koji bi mogao imati terapijski značaj. Interesantna je i studija Klarkove i sar. koji su na miševima pokazali da efekat antagonizacije JNK zavisi od konteksta. Konkretno, u bazalnim uslovima (uslovima bez stresa) inhibicija JNK dovela je do monoaminergičkih i bihejvoralnih promena sličnim onima koje se viđaju u stresu, dok je u uslovima akutnog stresa antagonizacija JNK dovela do ublažavanja efekata stresora (Clarke i sar., 2012).

Kada je u pitanju hronični stres, Li i sar. su pronašli da je tradicionalni herbalni lek sa antidepresivnim svojstvima doveo do poboljšanja depresivnog ponašanja kod pacova prethodno izloženih stresu, a ova promena je bila praćena smanjenom ekspresijom JNK u hipokampusu (Li i sar., 2014). Rezultati iz naše laboratorije su ukazali na značajne polne razlike u aktivaciji JNK u hipokampusu pacova (Mitic i sar., 2015; Mitic i sar., 2013). Bazalni nivoi JNK su bili viši kod ženki u odnosu na mužjake, a hroničan stres je smanjio nivoe JNK kod ženki, dok je imao suprotan efekat kod mužjaka. Štaviše, kod mužjaka je zapaženo da je u odgovoru na stres porast nivoa aktivirane (fosforilisane) JNK bio povezan sa fosforilacijom GR-a na 246 (analognom pGR-226 kod ljudi), što nije bio slučaj kod ženki. Ovo upućuje da kod ženki jedarnu fosforilaciju na serinu 246 možda vrše i neke druge kinaze, što ima implikacije u razmatranju polno-specifičnog lečenja depresije.

Do sada nisu objavljene studije na humanoj populaciji vezane za signaliziju JNK u depresiji. Jedna studija je pokazala da pacijenti sa hroničnim bipolarnim poremećajem imaju značajno niže nivoe JNK1 u limfocitima u poređenju sa zdravim kontrolama, dok su pacijenti sa bipolarnim poremećajem u remisiji imali vrednosti JNK1 koje su bile između prethodne dve grupe ispitanika (Spiliotaki i sar., 2006).

Modulacija signalnog puta JNK bi, pored potencijalnog efekta na odgovor na stres, mogla da se pokaže korisnom i u modulaciji inflamatornog odgovora u depresiji. Jedan od mehanizama je smanjenje rezistencije na glukokortikoide (i stimulacija antiinflamatornih svojstava glukokortikoida), ali takođe i modulacija drugih puteva. Na primer, pokazano je da inhibicija JNK dovodi do inhibicije inflamatornog odgovora *in vitro* putem inaktivacije NF- κ B (Park i sar., 2008), kao i smanjenja oksidativnog stresa preko COX-2 inhibicije (Ki i sar., 2013). Inhibitori JNK su se pokazali korisnim u smanjenju inflamacije u animalnom modelima kolitisa, ishemijskog oštećenja mozga i reumatoidnog artritisa (Assi i sar., 2006; Nijboer i sar., 2013; Schepetkin i sar., 2015).

Do sada je proučeno više tipova inhibitora puta JNK, koji se međusobno razlikuju prema specifičnosti za JNK, kao i prema tome na koja mesta na enzimu se vezuju. U daljem tekstu biće prikazani najbolje proučeni inhibitori JNK.

Potencijalni inhibitori signalnog puta JNK. Najviše proučavani inhibitori puta JNK jesu ATP-kompetitivni inhibitori JNK. Oni se vezuju za visoko konzervirano ATP-vezujuće mesto na JNK i blokiraju sve izoforme JNK. Takođe, pri većim dozama mogu blokirati i p38 MAPK signalizaciju. Prema tome, nedostatak specifičnosti i potencijal da izazovu neželjene efekte može da onemogući njihovu kliničku upotrebu (Bubici i Papa, 2014).

Druga opcija je ciljanje na vezujuća mesta JNK supstrata, ili na mesto za koje se vezuju elementi koji deluju regulatorno na JNK. Konkretno, pažnja je usmerena na JNK-interreagujuće proteine (*JNK-interacting proteins – JIPs*). JIP-ovi su *scaffold* proteini koji predstavljaju medijatore signalizacije JNK i poseduju veću specifičnost prema određenim formama JNK (Davies i Tournier, 2012). Međutim, detaljnija ispitivanja su neophodna pre nego što zažive u kliničkoj praksi.

Iako to nije fokus ovog rada, vredi istaći još jedan potencijalni molekul u signalnom putu GR-a koji bi bio interesantan za farmakološka ispitivanja. Fosfataze su

enzimi koji, suprotno kinazama, vrše defosforilaciju svojih supstrata. Fosfataze su razmatrane kao potencijalni terapijski modaliteti u inflamatornim bolestima, ali da bi bili razmatrani za kliničku praksu neophodno je opsežnije istraživanje i bolje razumevanje ovih molekula (Beck i sar., 2009).

Ograničenja i izazovi inhibicije signalizacije JNK. Iako su JNK uključene u široki opseg oboljenja i poremećaja, takođe igraju važnu ulogu u nizu ćelijskih funkcija. Prema tome, glavni izazov u modulisanju signalnog puta JNK predstavljaju potencijalni neželjeni efekti koji bi mogli nastati iz ove inhibicije. Primer jedne od najozbiljnih jeste nastanak tumora (Cui i sar., 2007). Trenutni inhibitori JNK puta su pokazali potencijalnu dobrobit za određena oboljenja u *in vitro* i u životnjskim studijama (npr. Schepetkin i sar., 2015; Reinecke i sar., 2012; Crocker i sar., 2011), ali njihov profil sigurnosti tek treba da bude ispitan i prilagođen pre nego što se započne sa kliničkim istraživanjima. Novi inhibitori koji bi bili usmereni na druge komponente puta JNK i posedovali veću specifičnost bi potencijalno mogli da prevaziđu ova ograničenja. Sa druge strane, dalja istraživanja su neophodna kako bi se otkrilo da li i koje od različitih izoformi JNK doprinose nastanku depresije. Na primer, selektivna aktivacija JNK2/3 tokom neuronalnog stresa je pokazana *in vitro*, dodatno potvrđujući dokaze o ćelijskoj i tkivnoj specifičnosti JNK signalizacije (Coffey i sar., 2002). Prema tome, trebalo bi istražiti koja JNK izoforma i ushodna kaskada je uključena u fosforilaciju GR-a na serinu 226 u depresiji, pridajući posebnu pažnju moždanim strukturama ključnim za ovaj poremećaj.

Konačno, inhibicija JNK signalnog puta verovatno ne može biti korisna za ceo spektar anksiozno-depresivnih poremećaja, s obzirom na to da stanja povezana sa stresom mogu takođe biti povezana i sa sniženim nivoima kortizola. Za osobe koje imaju afektivni poremećaj koji uključuje hipokortizolemiju ili veću supresiju kortizola nakon deksametazona (npr. neki slučajevi posttraumatskog stresnog poremećaja) (Pitman i sar., 2012), pristup modulaciji HPA osovine bi trebalo da bude drugačiji.

Malo je verovatno da bi potencijalni lekovi koji ciljaju na put JNK bili efikasni u svim slučajevima depresivnog poremećaja. S obzirom na to da dosadašnja istraživanja sugerišu da je aktivnost JNK zavisna od konteksta i pola, možemo da pretpostavimo da će određena populacija depresivnih pacijenata, npr. oni sa izraženijom

glukokortikoidnom rezistencijom, imati više koristi od terapije vezane za JNK. Konkretno, muški pol, prisustvo psihološkog stresora, veći nivoi anksioznosti i prisustvo specifičnih bioloških parametara (povišena koncentracija kortizola, povišeni nivoi pGR-226 ili veća ekspresija JNK) bi potencijalno mogli da predvide bolji odgovor na terapiju inhibicijom JNK, ako bi se takva izrodila iz sadašnjih naučnih napora.

Od izuzetne važnosti su dalja istraživanja promena u signalizaciji JNK i GR-a i njihove povezanosti sa simptomatskim oporavkom kod depresivnih pacijenata. Iako postoji optimizam vezan za terapijske strategije uperene na put JNK, mogućnost korišćenja signalizacije JNK kao biomarkera za specifične podtipove depresije je možda nešto što će pre zaživeti u skorijoj budućnosti.

6. ZAKLJUČCI

1. U strukturalnom modelu podložnosti za depresiju ćelijski modulatori signalizacije GR-a (izraženi kroz latentnu varijablu *biološki faktori*) imali su direktan nezavisan efekat na meru podložnosti za depresiju (izraženu kroz rezultat na upitniku DASS).
2. Među molekularnim parametrima signalizacije GR-a, parametar pGR-226 je pokazao jaču korelaciju sa podložnošću sa depresijom u poređenju sa FKBP51 i pGR-211.
3. Koncentracija serumskog kortizola nije značajno korelisala sa afektivnim statusom, te nije ni uvrštena u SEM.
4. U navedenom modelu, crte ličnosti (izražene kroz latentnu varijablu *psihološki faktori*) imale su direktan nezavisan efekat na podložnost za depresiju.
5. Među *psihološkim faktorima*, neuroticizam je imao veći koeficijent putanje u odnosu na ekstroverziju, te snažniji efekat na podložnost za depresiju.
6. Skorašnji ugrožavajući životni događaji (izraženi kao broj ugrožavajućih događaja u šest meseci) u ovom modelu nisu predviđali podložnost za depresiju direktno, ali su pokazali značajan efekat na crte ličnosti, tj. izloženost događajima je pozitivno korelisala sa neuroticizmom i ekstroverzijom.
7. Značaj ovih nalaza je višestruk, najpre jer su prikazane mogućnosti strukturalnog modelovanja u proučavanju kompleksnih interakcija različitih faktora koji doprinose nastanku složenih poremećaja, zatim jer su ukazane perspektive korišćenja fosforilacije GR-a kao biomarkera podložnosti za depresiju, i konačno jer su predloženi novi terapijski modaliteti koji uključuju modulaciju fosforilacije GR-a.

7. LITERATURA

1. Abrams KY, Yune SK, Kim SJ, Jeon HJ, Han SJ, Hwang J, i sar. Trait and state aspects of harm avoidance and its implication for treatment in major depressive disorder, dysthymic disorder, and depressive personality disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2004; 58:240-248.
2. Adzic M, Djordjevic J, Djordjevic A, Niciforovic A, Demonacos C, Radojicic M, i sar. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol*. 2009; 202:87-97.
3. American Psychiatric Association (APA). 2010. Practice guideline for the treatment of patients with major depressive disorder. 3rd ed. American Psychiatric Association (APA), Arlington (VA).
4. American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. American Psychiatric Association, Washington, D.C.
5. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, and Pariante CM. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36:415-425.
6. Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Berglund P, Bijl RV, De Graaf R, Vollebergh W, i sar. The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2003; 12:3-21.
7. Andrews PW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, and Thomson JA Jr. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 51:164-188.
8. Antoni MH, Lutgendorf SK, Blomberg B, Carver CS, Lechner S, Diaz A, i sar. Cognitive-behavioral stress management reverses anxiety-related leukocyte transcriptional dynamics. *Biol Psychiatry*. 2012; 71:366-372.
9. Arana GW, Baldessarini RJ, and Ornstein M. The dexamethasone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry. Commentary and review. *Arch Gen Psychiatry*. 1985; 42:1193-1204.

10. Assi K, Pillai R, Gómez-Muñoz A, Owen D, and Salh B. The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology*. 2006; 118:112-121.
11. Avenant C, Ronacher K, Stubbsrud E, Louw A, and Hapgood JP. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 327:72-88.
12. Aydemir O, Deveci A, and Taneli F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29:261-265.
13. Bantel H, Schmitz ML, Raible A, Gregor M, and Schulze-Osthoff K. Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *FASEB J* 2002; 16:1832-1834.
14. Barton DA, Esler MD, Dawood T, Lambert EA, Haikerwal D, Brenchley C, et al. Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65:38-46.
15. Bauer M, Pfennig A, Severus E, Whybrow PC, Angst J, Möller HJ; World Federation of Societies of Biological Psychiatry. Task Force on Unipolar Depressive Disorders. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, part 1: update 2013 on the acute and continuation treatment of unipolar depressive disorders. *World J Biol Psychiatry*. 2013; 14:334-385.
16. Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, and De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev*. 2009; 30:830-882.
17. Beckley AJ and Cidlowski JA. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 2009; 61:979-986.
18. Bei E, Salpeas V, Pappa D, Anagnostara C, Alevizos V, and Moutsatsou P. Phosphorylation status of glucocorticoid receptor, heat shock protein 70, cytochrome c and Bax in lymphocytes of euthymic, depressed and manic bipolar patients. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34:1162-1175.

19. Belmaker RH and Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med.* 2008; 358:55-68.
20. Bentler PM and Chou CP. Practical issues in structural modeling. *Sociol Methods Res.* 1987; 16:78-117.
21. Beran T and Violato C. Structural equation modeling in medical research: a primer. *BMC Res Notes* 2010; 3:267.
22. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Pütz B, i sar. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet.* 2004; 36:1319-1325.
23. Blair-West GW, Cantor CH, Mellsop GW, and Eyeson-Annan ML. Lifetime suicide risk in major depression: sex and age determinants. *J Affect Disord.* 1999; 55:171-178.
24. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, i sar. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 2002; 110:93-105.
25. Bosch O, Seifritz E, and Wetter T. Stress-related depression: neuroendocrine, genetic, and therapeutic aspects. *World J Biol Psychiatry.* 2012; 13:556-568.
26. Brett JF, Brief AP, Burke MJ, George JM, and Webster J. Negative affectivity and the reporting of stressful life events. *Health Psychol.* 1990; 9:57-68.
27. Brodaty H, Luscombe G, Parker G, Wilhelm K, Hickie I, Austin MP, i sar. Early and late onset depression in old age: different aetiologies, same phenomenology. *J Affect Disord.* 2001; 66:225-236.
28. Brugha TS and Cragg D. The List of Threatening Experiences: the reliability and validity of a brief life events questionnaire. *Acta Psychiatr Scand.* 1990; 82:77-81.
29. Bubici C and Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2014; 171:24-37.
30. Burghy CA, Stodola DE, Ruttle PL, Molloy EK, Armstrong JM, Oler JA, i sar. Developmental pathways to amygdala-prefrontal function and internalizing symptoms in adolescence. *Nat Neurosci.* 2012; 15:1736-1741.

31. Burke KC, Burke JD Jr, Rae DS, and Regier DA. Comparing age at onset of major depression and other psychiatric disorders by birth cohorts in five US community populations. *Arch Gen Psychiatry*. 1991; 48:789-795.
32. Byrne B. 2010. *Structural Equation Modeling with AMOS: basic concepts, applications, and programming*. Routledge, Taylor and Francis Group, New York.
33. Calboli FC, Tozzi F, Galwey NW, Antoniadou A, Mooser V, Preisig M, et al. A genome-wide association study of neuroticism in a population-based sample. *PLoS One*. 2010; 5:e11504.
34. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003; 301:386-389.
35. Chamberlain K and Zuckerman D. The minor events approach to stress: support for the use of daily hassles. *Br J Psychol*. 1990; 81:469-481.
36. Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z, Cavasotto CN, Hittelman AB, et al. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol*. 2008; 22:1754-1766.
37. Chrousos GP and Kino T. Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1179:153-166.
38. Clarke M, Pentz R, Bobyn J, and Hayley S. Stressor-like effects of c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibition. *PLoS One*. 2012; 7:e44073.
39. Cloninger CR, Svrakic DM, and Przybeck TR. A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry*. 1993; 50:975-990.
40. Cloninger CR. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psychiatry*. 1987; 44:573-588.
41. Coffey ET, Smicic G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, et al. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci*. 2002; 22:4335-4345.
42. Cole SW, Hawkley LC, Arevalo JM, Sung CY, Rose RM, and Cacioppo JT. Social regulation of gene expression in human leukocytes. *Genome Biol*. 2007; 8:R189.

43. Conley JJ. Longitudinal consistency of adult personality: self-reported psychological characteristics across 45 years. *J Pers Soc Psychol.* 1984; 47:1325-1333.
44. Costa PT, and McCrae RR. Personality Disorders and The Five-Factor Model of Personality. *J Pers Disord.* 1990; 4:362-371.
45. Costa PT, McCrae RR, and Dye DA. Facet Scales for Agreeableness and Conscientiousness: A Revision of the NEO Personality Inventory. *Pers Individ Dif.* 1991; 12:887-898.
46. Crocker CE, Khan S, Cameron MD, Robertson HA, Robertson GS, and Lograsso P. JNK Inhibition Protects Dopamine Neurons and Provides Behavioral Improvement in a Rat 6-hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2011; 2:207-212.
47. Cui J, Zhang M, Zhang YQ, and Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28:601-608.
48. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, and Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:46-56.
49. Daskalakis NP, Cohen H, Cai G, Buxbaum JD, Yehuda R. Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:13529-13534.
50. Davies C and Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40:85-89.
51. De Bosscher K and Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2009; 23:281-291.
52. De Fruyta F, Van De Wieleb L, and Van Heeringen C. Cloninger's Psychobiological Model of Temperament and Character and the Five-Factor Model of Personality. *Pers Individ Dif.* 2000; 29:441-452.
53. Deuschle M, Hamann B, Meichel C, Krumm B, Lederbogen F, Kniest A, et al. Antidepressive treatment with amitriptyline and paroxetine: effects on saliva cortisol concentrations. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; 23:201-205.

54. Duchesne A and Pruessner JC. Association between subjective and cortisol stress response depends on the menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38:3155-3159.
55. Elzinga BM, Roelofs K, Tollenaar MS, Bakvis P, van Pelt J, and Spinhoven P. Diminished cortisol responses to psychosocial stress associated with lifetime adverse events a study among healthy young subjects. *Psychoneuroendocrinology*. 2008; 33:227-237.
56. Engel G. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science*. 1977; 196:129-136.
57. Ensel WM, Peek MK, Lin N, and Lai G. Stress in the life course: a life history approach. *J Aging Health*. 1996; 8:389-416.
58. Erić-Marinković J, Dotlić R, Janošević S, Kocev N, Gajić M, Ille T, i sar. 2001. Statistika za istraživače u oblasti medicinskih nauka. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
59. Eysenck SBG, Eysenck HJ, and Barrett P. A revised version of the psychoticism scale. *Pers Individ Dif*. 1985; 6:21-29.
60. Fassinger RE. Use of structural equation modeling in counseling psychology research. *J Cogn Psychol*. 1987; 34:425-436.
61. Fava M, Alpert JE, Borus JS, Nierenberg AA, Pava JA, and Rosenbaum JF. Patterns of personality disorder comorbidity in early-onset versus late-onset major depression. *Am J Psychiatry*. 1996; 153:1308-1312.
62. Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron*. 2000; 28:335-341.
63. Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJ, i sar. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med*. 2013; 10:e1001547.
64. Fineberg NA, Haddad PM, Carpenter L, Gannon B, Sharpe R, Young AH, i sar. The size, burden and cost of disorders of the brain in the UK. *J Psychopharmacol*. 2013; 27:761-770.
65. Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE, Dent KM, Peters DG, and Muldoon MF. Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism. *Mol Psychiatry*. 1999; 4:93-96.

66. Föcking M, Hölker I, and Trapp T. Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304:720-723.
67. Galecki P. 2014. Oxidative Stress in Depression. In: Laher I (ed.): *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
68. Galeotti N and Ghelardini C. Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012; 15:781-793.
69. Gardner A and Boles RG. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35:730-743.
70. Gatt JM, Nemeroff CB, Dobson-Stone C, Paul RH, Bryant RA, Schofield PR, et al. Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry.* 2009; 14:681-695.
71. Geweke JF and Singleton KJ. Interpreting the likelihood ratio statistic in factor models when sample size is small. *J Am Stat Assoc.* 1980; 75:133-137.
72. Ghaemi SN. The rise and fall of the biopsychosocial model. *Br J Psychiatry.* 2009; 195:3-4.
73. Gladkevich A, Kauffman HF, and Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28:559-576.
74. Gluckman PD, Hanson MA, and Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007; 19:1-19.
75. Guidotti G, Calabrese F, Anacker C, Racagni G, Pariante CM, and Riva MA. Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38:616-627.
76. Gunzler D, Chen T, Wu P, and Zhang H. Introduction to mediation analysis with structural equation modeling. *Shanghai Arch Psychiatry.* 2013; 25:390-394.

77. Hadži Pešić M. 2003. Robert Klonindžer – sedmofakorski model ličnosti. U: Filozofski fakultet, Univerzitet u Nišu. Godišnjak za psihologiju. Filozofski fakultet u Nišu, Niš.
78. Hair J, Black W, Babin B, Anderson R, and Tatham R. 2006. Multivariate data analysis. Pearson Educational, New Jersey.
79. Hardeveld F, Spijker J, De Graaf R, Nolen WA, and Beekman AT. Prevalence and predictors of recurrence of major depressive disorder in the adult population. *Acta Psychiatr Scand.* 2010; 122:184-191.
80. Hazel NA, Hammen C, Brennan PA, and Najman J. Early childhood adversity and adolescent depression: the mediating role of continued stress. *Psychol Med.* 2008; 38:581-589.
81. Herdegen T, and Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998; 28:370-490.
82. Hettema JM, Neale MC, Myers JM, Prescott CA, and Kendler KS. A population-based twin study of the relationship between neuroticism and internalizing disorders. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:857-864.
83. Hippocrates. 1952. On airs, waters, and places. In: Adler MJ. Great books of the Western world. Britannica, Chicago.
84. Holleman M, Vreeburg SA, Dekker JJ, and Penninx BW. The relationships of working conditions, recent stressors and childhood trauma with salivary cortisol levels. *Psychoneuroendocrinology.* 2012; 37:801-809.
85. Ida T, Hara M, Nakamura Y, Kozaki S, Tsunoda S, and Ihara H. Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci Lett.* 2008; 432:232-236.
86. Itoh M, Adachi M, Yasui H, Takekawa M, Tanaka H, and Imai K. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:2382-2392.
87. Jacobs N, van Os J, Derom C, Thiery E, Delespaul P, and Wichers M. Neuroticism explained? From a non-informative vulnerability marker to informative person-context interactions in the realm of daily life. *Br J Clin Psychol.* 2011; 50:19-32.

88. Jankovic S, Vlajinac H, Bjegovic V, Marinkovic J, Sipetic-Grujicic S, Markovic-Denic L, i sar. The burden of disease and injury in Serbia. *Eur J Public Health*. 2007; 17:80-85.
89. Jašović-Gašić M, Lečić-Toševski D. (ur.). 2007. Psihijatrija: udžbenik za studente medicine. Medicinski fakultet u Beogradu; CIBID – Centar za izdavačku, bibliotečku i informacionu delatnost, Beograd.
90. Jašović-Gašić M, Marić-Bojović N, Jovanović A, Pejović-Nikolić S, i Đurić D. 2012. Antidepresivi. GlaxoSmithKline, Beograd.
91. Joëls M and Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10:459-466.
92. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, i sar. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*. 1990; 62:1189-1204.
93. Jovicic M, Maric NP, Soldatovic I, Lukic I, Andric S, Mihaljevic M, i sar. The role of glucocorticoid receptor phosphorylation in the model of negative affective states. *World J Biol Psychiatry*. 2015; 16:301-311.
94. Jovicic MJ, Lukic I, Radojicic M, Adzic M, Maric NP. Modulation of c-Jun N-terminal kinase signaling and specific glucocorticoid receptor phosphorylation in the treatment of major depression. *Med Hypotheses*. 2015; 85:291-294.
95. Kadmiel M and Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34:518-530.
96. Kendler KS, Gardner CO, and Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *Am J Psychiatry*. 2002; 159:1133-1145.
97. Kendler KS, Gardner CO, and Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. *Am J Psychiatry*. 2006; 163:115-124.
98. Kendler KS, Karkowski LM, and Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999a; 156:837-841.
99. Kendler KS, Karkowski LM, and Prescott CA. The assessment of dependence in the study of stressful life events: validation using a twin design. *Psychol Med*. 1999b; 29:1455-1460.

100. Kendler KS, Kessler RC, Neale MC, Heath AC, and Eaves LJ. The prediction of major depression in women: toward an integrated etiologic model. *Am J Psychiatry*. 1993b; 150:1139-1148.
101. Kendler KS, Kuhn J, and Prescott CA. The interrelationship of neuroticism, sex, and stressful life events in the prediction of episodes of major depression. *Am J Psychiatry*. 2004; 161:631-636.
102. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, and Eaves LJ. A longitudinal twin study of personality and major depression in women. *Arch Gen Psychiatry*. 1993a; 50:853-862.
103. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, and Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62:593-602.
104. Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, and Nelson CB. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *J Affect Disord*. 1993; 29:85-96.
105. Khashan AS, McNamee R, Henriksen TB, Pedersen MG, Kenny LC, Abel KM, et al. Risk of affective disorders following prenatal exposure to severe life events: a Danish population-based cohort study. *J Psychiatr Res*. 2011; 45:879-885.
106. Ki YW, Park JH, Lee JE, Shin IC, and Koh HC. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol Lett*. 2013; 218:235-245.
107. Kline R. 2005. Principles and practice of structural equation modeling. The Guilford Press, New York.
108. Kobrosly R and van Wijngaarden E. Associations between immunologic, inflammatory, and oxidative stress markers with severity of depressive symptoms: an analysis of the 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Neurotoxicology*. 2010; 31:126-133.
109. Kraemer HC, Stice E, Kazdin A, Offord D, and Kupfer D. How do risk factors work together? Mediators, moderators, and independent, overlapping, and proxy risk factors. *Am J Psychiatry*. 2001; 158:848-856.

110. Laceulle OM, Nederhof E, van Aken MA, and Ormel J. Adolescent personality: associations with Basal, awakening, and stress-induced cortisol responses. *J Pers.* 2015; 83:262-273.
111. Lazarus RS. Puzzles in the study of daily hassles. *J Behav Med.* 1984; 7:375-389.
112. LeRoux A, Wright L, Perrot T, and Rusak B. Impact of menstrual cycle phase on endocrine effects of partial sleep restriction in healthy women. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 49:34-46.
113. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996; 274:1527-1531.
114. Lewinsohn PM, Allen NB, Seeley JR, and Gotlib IH. First onset versus recurrence of depression: differential processes of psychosocial risk. *J Abnorm Psychol.* 1999; 108:483-489.
115. Li G, Wang LY, Shofer JB, Thompson ML, Peskind ER, McCormick W, et al. Temporal relationship between depression and dementia: findings from a large community-based 15-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry.* 2011; 68:970-977.
116. Li YH, Zhang CH, Qiu J, Wang SE, Hu SY, Huang X et al. Antidepressant-like effects of Chaihu-Shugan-San via SAPK/JNK signal transduction in rat models of depression. *Pharmacogn Mag.* 2014; 10:271-277.
117. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, and Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006; 147:126-132.
118. Lovibond SH and Lovibond PF. 1995 Manual for the Depression Anxiety Stress Scales. Psychology Foundation, Sydney.
119. Lowy MT. Corticosterone regulation of brain and lymphoid corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 39:147-154.
120. Lukic I, Mitic M, Djordjevic J, Tatalovic N, Bozovic N, Soldatovic I, et al. Lymphocyte levels of redox-sensitive transcription factors and antioxidative enzymes as indicators of pro-oxidative state in depressive patients. *Neuropsychobiology.* 2014; 70:1-9.

121. Luppá M, Heinrich S, Angermeyer MC, König HH, and Riedel-Heller SG. Cost-of-illness studies of depression: a systematic review. *J Affect Disord.* 2007; 98:29-43.
122. MacKinnon DP. Integrating Mediators and Moderators in Research Design. *Res Soc Work Pract.* 2011; 21:675-681.
123. Malouff JM, Thorsteinsson EB, and Schutte NS. The relationship between the five-factor model of personality and symptoms of clinical disorders: A meta-analysis. *J Psychopathol Behav Assess.* 2005; 27:101-114.
124. Maric NP and Adzic M. Pharmacological modulation of HPA axis in depression - new avenues for potential therapeutic benefits. *Psychiatr Danub.* 2013; 25:299-305.
125. Maric NP, Dunjic B, Stojiljkovic DJ, Britvic D, and Jasovic-Gasic M. Prenatal stress during the 1999 bombing associated with lower birth weight-a study of 3,815 births from Belgrade. *Arch Womens Ment Health.* 2010; 13:83-89.
126. Martin P and Martin M. Proximal and Distal Influences on Development: The Model of Developmental Adaptation. *Dev Rev.* 2002; 22:78-96.
127. McCleery JM and Goodwin GM. High and low neuroticism predict different cortisol responses to the combined dexamethasone--CRH test. *Biol Psychiatry.* 2001; 49:410-415.
128. McCrae R and Costa PT. 2003. *Personality in Adulthood: A Five-factor Theory Perspective.* The Guilford Press, New York.
129. McCrae RR and John OP. An introduction to the five-factor model and its applications. *J Pers.* 1992; 60:175-215.
130. McKay LI and Cidlowski JA. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol.* 1998; 12:45-56.
131. Menke A, Arloth J, Gerber M, Rex-Haffner M, Uhr M, Holsboer F, et al. Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood indicates glucocorticoid-receptor hypersensitivity in job-related exhaustion. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 44:35-46.
132. Miller AH, Haroon E, Raison CL, and Felger JC. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety.* 2013; 30:297-306.

133. Miller AH, Maletic V, and Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 65:732-741.
134. Miller GE, Chen E, Sze J, Marin T, Arevalo JM, Doll R, et al. A functional genomic fingerprint of chronic stress in humans: blunted glucocorticoid and increased NF-kappaB signaling. *Biol Psychiatry*. 2008; 64:266-272.
135. Mitchell PB, Frankland A, Hadzi-Pavlovic D, Roberts G, Corry J, Wright A, et al. Comparison of depressive episodes in bipolar disorder and in major depressive disorder within bipolar disorder pedigrees. *Br J Psychiatry*. 2011; 199:303-309.
136. Mitic M, Lukic I, Bozovic N, Djordjevic J, and Adzic M. Fluoxetine signature on hippocampal MAPK signalling in sex-dependent manner. *J Mol Neurosci*. 2015; 55:335-346.
137. Mitic M, Simic I, Djordjevic J, Radojicic MB, and Adzic M. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology*. 2013; 70:100-111.
138. Monroe SM, Slavich GM, Torres LD, and Gotlib IH. Major life events and major chronic difficulties are differentially associated with history of major depressive episodes. *J Abnorm Psychol*. 2007; 116:116-124.
139. Moretti M, Colla A, de Oliveira Balen G, dos Santos DB, Budni J, de Freitas AE, et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res*. 2012; 46:331-340.
140. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, and Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*. 2007; 370:851-858.
141. Moylan S, Maes M, Wray NR, and Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry*. 2013; 18:595-606.
142. Muscatell KA, Slavich GM, Monroe SM, and Gotlib IH. Stressful life events, chronic difficulties, and the symptoms of clinical depression. *J Nerv Ment Dis*. 2009; 197:154-160.

143. Nater UM, Hoppmann C, and Klumb PL. Neuroticism and conscientiousness are associated with cortisol diurnal profiles in adults--role of positive and negative affect. *Psychoneuroendocrinology*. 2010; 35:1573-1577.
144. Newmeyer DD and Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003; 112:481-490.
145. Newton-Howes G, Tyrer P, and Johnson T. Personality disorder and the outcome of depression: meta-analysis of published studies. *Br J Psychiatry*. 2006; 188:13-20.
146. Nijboer CH, Bonestroo HJ, Zijlstra J, Kavelaars A, and Heijnen CJ. Mitochondrial JNK phosphorylation as a novel therapeutic target to inhibit neuroinflammation and apoptosis after neonatal ischemic brain damage. *Neurobiol Dis*. 2013; 54:432-444.
147. Oakley RH and Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*. 2011;286:3177-3184.
148. Ormel J, Jeronimus BF, Kotov R, Riese H, Bos EH, Hankin B, i sar. Neuroticism and common mental disorders: meaning and utility of a complex relationship. *Clin Psychol Rev*. 2013; 33:686-697.
149. Ormel J, Oldehinkel AJ, and Vollebergh W. Vulnerability before, during, and after a major depressive episode: a 3-wave population-based study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61:990-996.
150. Oswald LM, Zandi P, Nestadt G, Potash JB, Kalaydjian AE, and Wand GS. Relationship between cortisol responses to stress and personality. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31:1583-1591.
151. Park HJ, Lee HJ, Choi MS, Son DJ, Song HS, Song MJ, i sar. JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin. *J Inflamm (Lond)*. 2008; 5:7.
152. Paslakis G, Krumm B, Gilles M, Schweiger U, Heuser I, and Richter I. Discrimination between patients with melancholic depression and healthy controls: comparison between 24-h cortisol profiles, the DST and the Dex/CRH test. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36:691-698.
153. Pavot W, Diener E, and Fujita F. Extraversion and happiness. *Pers Individ Dif*. 1990; 11:1299-1306.

154. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, i sar. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:757-760.
155. Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, i sar. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13:769-787.
156. Portella MJ, Harmer CJ, Flint J, Cowen P, and Goodwin GM. Enhanced early morning salivary cortisol in neuroticism. *Am J Psychiatry.* 2005; 162:807-809.
157. Porter RJ, Gallagher P, Watson S, and Young AH. Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. *Psychopharmacology (Berl).* 2004; 173:1-17.
158. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, i sar. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:1324-1331.
159. Rallis A, Moore C, and Ng J. Signal strength and signal duration define two distinct aspects of JNK-regulated axon stability. *Dev Biol.* 2010; 339:65-77.
160. Rao U, Hammen C, Ortiz LR, Chen LA, and Poland RE. Effects of early and recent adverse experiences on adrenal response to psychosocial stress in depressed adolescents. *Biol Psychiatry.* 2008; 64:521-526.
161. Redmond DE Jr, Katz MM, Maas JW, Swann A, Casper R, and Davis JM. Cerebrospinal fluid amine metabolites. Relationships with behavioral measurements in depressed, manic, and healthy control subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 1986; 43:938-947.
162. Reinecke K, Eminel S, Dierck F, Roessner W, Kersting S, Chromik AM, i sar. The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis. *PLoS One.* 2012; 7:e30985.
163. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. 2011. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje depresije. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije, Beograd.
164. Rice DP. Cost of illness studies: what is good about them? *Inj Prev.* 2000; 6:177-179.

165. Robinson M, Mattes E, Oddy WH, Pennell CE, van Eekelen A, McLean NJ, i sar. Prenatal stress and risk of behavioral morbidity from age 2 to 14 years: the influence of the number, type, and timing of stressful life events. *Dev Psychopathol.* 2011; 23:507-520.
166. Ross LE, Sellers EM, Gilbert Evans SE, and Romach MK. Mood changes during pregnancy and the postpartum period: development of a biopsychosocial model. *Acta Psychiatr Scand.* 2004; 109:457-466.
167. Roy A, Pickar D, Douillet P, Karoum F, and Linnoila M. Urinary monoamines and monoamine metabolites in subtypes of unipolar depressive disorder and normal controls. *Psychol Med.* 1986; 16:541-546.
168. Ruhé HG, Mason NS, and Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry.* 2007; 12:331-359.
169. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, i sar. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:1905-1917.
170. Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P (ed.). 2007. *Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry.* 10th ed. Wolters Kluwer, NewYork.
171. Sarai M and Matsunaga H. Low-dose (0.5-mg) dexamethasone suppression test in depressive patients. *Biol Psychiatry.* 1986; 21:744-750.
172. Sato JR, Moll J, Green S, Deakin JF, Thomaz CE, and Zahn R. Machine learning algorithm accurately detects fMRI signature of vulnerability to major depression. *Psychiatry Res.* 2015; 233:289-291.
173. Saulsman LM, and Page AC. The five-factor model and personality disorder empirical literature: A meta-analytic review. *Clin Psychol Rev.* 2004; 23:1055-1085.
174. Schepetkin IA, Kirpotina LN, Hammaker D, Kochetkova I, Khlebnikov AI, Lyakhov SA, i sar. Anti-Inflammatory Effects and Joint Protection in Collagen-Induced Arthritis after Treatment with IQ-1S, a Selective c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015; 353:505-516.
175. Schlossmacher G, Stevens A, and White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol.* 2011; 211:17-25.

176. Schmidt MV, Paez-Pereda M, Holsboer F, and Hausch F. The prospect of FKBP51 as a drug target. *ChemMedChem*. 2012; 7:1351-1359.
177. Schotte CK, Van Den Bossche B, De Doncker D, Claes S, and Cosyns P. A biopsychosocial model as a guide for psychoeducation and treatment of depression. *Depress Anxiety*. 2006; 23:312-324.
178. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, and Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17:6419.
179. Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, Goldapple K, Kennedy S, Segal Z, i sar. Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage*. 2004; 22:409-418.
180. Semple D. and Smyth R. 2013. *Oxford Handbook of Psychiatry*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.
181. Sen S, Burmeister M, and Ghosh D. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004; 127B:85-89.
182. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, i sar. 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*. 1998; 59(Suppl 20):22-33.
183. Shen CP, Tsimberg Y, Salvadore C, and Meller E. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci*. 2004; 5:36.
184. Silberg J, Pickles A, Rutter M, Hewitt J, Simonoff E, Maes H, i sar. The influence of genetic factors and life stress on depression among adolescent girls. *Arch Gen Psychiatry*. 1999; 56:225-232.
185. Simic I, Adzic M, Maric N, Savic D, Djordjevic J, Mihaljevic M, i sar. A preliminary evaluation of leukocyte phospho-glucocorticoid receptor as a potential biomarker of depressogenic vulnerability in healthy adults. *Psychiatry Res*. 2013b; 209:658-664.
186. Simic I, Maric NP, Mitic M, Soldatovic I, Pavlovic Z, Mihaljevic M, i sar. Phosphorylation of leukocyte glucocorticoid receptor in patients with current

- episode of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013a; 40:281-285.
187. Spencer RL, Miller AH, Stein M, and McEwen BS. Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res*. 1991; 549:236-246.
188. Spiliotaki M, Salpeas V, Malitas P, Alevizos V, and Moutsatsou P. Altered glucocorticoid receptor signaling cascade in lymphocytes of bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*. 2006; 31:748-760.
189. Stahl S. 2008. Depression and bipolar disorder: Stahl's essential psychopharmacology. 3rd edition. Cambridge University Press, New York.
190. Stegenga BT, Nazareth I, Grobbee DE, Torres-González F, Švab I, Maaros HI, i sar. Recent life events pose greatest risk for onset of major depressive disorder during mid-life. *J Affect Disord*. 2012; 136: 505-513.
191. Swardfager W, Herrmann N, Mazereeuw G, Goldberger K, Harimoto T, and Lanctôt KL. Zinc in depression: a meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2013; 74:872-878.
192. SZO. 1998. MKB-10 Klasifikacija mentalnih poremećaja i poremećaja ponašanja. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
193. Tennant C. Life events, stress and depression: a review of recent findings. *Aust N Z J Psychiatry*. 2002; 36:173-182.
194. Treviño LS and Weigel NL. Phosphorylation: a fundamental regulator of steroid receptor action. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 24:515-524.
195. Tyrka AR, Wier LM, Price LH, Rikhye K, Ross NS, Anderson GM, i sar. Cortisol and ACTH responses to the Dex/CRH test: influence of temperament. *Horm Behav*. 2008; 53:518-525.
196. Uliaszek AA, Hauner KK, Zinbarg RE, Craske MG, Mineka S, Griffith JW, i sar. An Examination of Content Overlap and Disorder-Specific Predictions in the Associations of Neuroticism with Anxiety and Depression. *J Res Pers*. 2009; 43:785-794.
197. Van Santen A, Vreeburg SA, Van der Does AJ, Spinhoven P, Zitman FG, and Penninx BW. Psychological traits and the cortisol awakening response: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36:240-248.

198. Vandevyver S, Dejager L, and Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic*. 2012; 13:364-74.
199. Värnik P. Suicide in the world. *Int J Environ Res Public Health*. 2012; 9:760-771.
200. Ventura JJ, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, and Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*. 2006; 21:701-710.
201. Viktorin A, Meltzer-Brody S, Kuja-Halkola R, Sullivan PF, Landén M, Lichtenstein P, i sar. Heritability of Perinatal Depression and Genetic Overlap With Nonperinatal Depression. *Am J Psychiatry*. 2015 (in press)
202. Vinkers CH, Joëls M, Milaneschi Y, Kahn RS, Penninx BW, and Boks MP. Stress exposure across the life span cumulatively increases depression risk and is moderated by neuroticism. *Depress Anxiety*. 2014; 31:737-745.
203. Violato C and Hecker KG. How to use structural equation modeling in medical education research: a brief guide. *Teach Learn Med*. 2007; 19:362-371.
204. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, i sar. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2163-2196.
205. Vreeburg SA, Hoogendijk WJ, van Pelt J, Derijk RH, Verhagen JC, van Dyck R, i sar. Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66:617-626.
206. Wade TD, Bulik CM, Neale M, and Kendler KS. Anorexia nervosa and major depression: shared genetic and environmental risk factors. *Am J Psychiatry*. 2000; 157:469-471.
207. Wall DP, Kosmicki J, Deluca TF, Harstad E, and Fusaro VA. Use of machine learning to shorten observation-based screening and diagnosis of autism. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e100.
208. Wang SF, Yen JC, Yin PH, Chi CW, and Lee HC. Involvement of oxidative stress-activated JNK signaling in the methamphetamine-induced cell death of human SH-SY5Y cells. *Toxicology*. 2008; 246:234-241.

209. Wang X, Wu H, Lakdawala VS, Hu F, Hanson ND, and Miller AH. Inhibition of Jun N-terminal kinase (JNK) enhances glucocorticoid receptor-mediated function in mouse hippocampal HT22 cells. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:242-249.
210. Watson D, Clark LA, and Harkness AR. Structures of personality and their relevance to psychopathology. *J Abnorm Psychol.* 1994; 103:18-31.
211. Watson D. and Naragon-Gainey K. Personality, Emotions, and the Emotional Disorders. *Clin Psychol Sci.* 2014; 2:422-442.
212. Weekes N, Lewis R, Patel F, Garrison-Jakel J, Berger DE, and Lupien SJ. Examination stress as an ecological inducer of cortisol and psychological responses to stress in undergraduate students. *Stress.* 2006; 9:199-206.
213. Weiner IB and Craighead WE. 2010. *The Corsini encyclopedia of psychology.* John Wiley & Sons, Hoboken.
214. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* 2005; 19:296-308.
215. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, i sar. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA.* 1996; 276:293-299.
216. Welberg LA, Seckl JR, and Holmes MC. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:1047-1054.
217. Willis-Owen SA, Turri MG, Munafò MR, Surtees PG, Wainwright NW, Brixey RD, i sar. The serotonin transporter length polymorphism, neuroticism, and depression: a comprehensive assessment of association. *Biol Psychiatry.* 2005; 58:451-456.
218. Willner P, Scheel-Krüger J, and Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10 Pt 1):2331-2371.
219. Wilt J and Revelle W. 2009. Extraversion. In: Leary MR, Hoyle RH (ed.). *Handbook of Individual Differences in Social Behavior.* The Guilford Press, New York.
220. Worthington R and Whittaker T. Scale development research. A content analysis and recommendations for best practices. *Couns Psychol.* 2006; 34:806-838.

221. Zhou J and Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005; 70:407-417.
222. Zhu CB, Blakely RD, and Hewlett WA. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31:2121-2131.
223. Zimmermann P, Brückl T, Nocon A, Pfister H, Binder EB, Uhr M, et al. Interaction of FKBP5 gene variants and adverse life events in predicting depression onset: results from a 10-year prospective community study. *Am J Psychiatry*. 2011; 168:1107-1116.
224. Zisook S, Lesser I, Stewart JW, Wisniewski SR, Balasubramani GK, Fava M, i sar. Effect of age at onset on the course of major depressive disorder. *Am J Psychiatry*. 2007; 164:1539-1546.
225. Živanović O, Paunovic VR. Problemi taksonomije depresije: nemoć nozologije ili ustupak pragmatičnosti. *Acta Clinica*. 2005; 5:9-33.
226. Zobel A, Barkow K, Schulze-Rauschenbach S, Von Widdern O, Metten M, Pfeiffer U, i sar. High neuroticism and depressive temperament are associated with dysfunctional regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in healthy volunteers. *Acta Psychiatr Scand*. 2004; 109:392-399.
227. Zoccola PM, Quas JA, and Yim IS. Salivary cortisol responses to a psychosocial laboratory stressor and later verbal recall of the stressor: The role of trait and state rumination. *Stress*. 2010; 13:435-443.

8. LISTA SKRAĆENICA

ACTH (*adrenocorticotropic hormone*): adrenokortikotropni hormon

AP-1 (*activator protein-1*): protein aktivator-1

ATP (*adenosine triphosphate*): adenozin trifosfat

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*): moždani neurotrofni faktor

CDK (*cyclin-dependent kinase complex*): kompleks ciklin-zavisnih kinaza

CFI (*comparative fit index*): komparativni indeks podesnosti

CNS: centralni nervni sistem

CREB (*cyclic AMP response element binding protein*): vezujući protein za ciklični AMP responsivni element

CRH (*corticotropin-releasing hormone*): kortikotropin-oslobađajući hormon

DALY (*disability adjusted life years*): godine života korigovane u odnosu na nesposobnost

DASS (*Depression Anxiety Stress Scales*): Upitnik za samoprocenu simptoma depresije, anksioznosti i stresa

DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*): Dijagnostički i statistički priručnik Američke psihijatrijske asocijacije, peto izdanje

EPQ (*The Eysenck Personality Questionnaire*): Ajzenkov upitnik za procenu ličnosti

ERK (*extracellular-regulated kinase*): ekstracelularno regulisana kinaza

FKBP51 (*FKB506-binding protein 51*): FKB506-vezujući protein 51

FKBP52 (*FKB506-binding protein 52*): FKB506-vezujući protein 52

GR (*glucocorticoid receptor*): glukokortikoidni receptor

GRE (*GR response elements*): GR responsivni elementi

HSP70 (*heat-shock protein 70*): protein toplotnog udara 70

HSP90 (*heat-shock protein 90*): protein toplotnog udara 90

IL (*interleukin*): interleukin

iNOS (*inducibile nitric oxide synthase*): inducibilna sintaza azot-monoksida

JIPs (*JNK-interacting proteins*): JNK-interreagujući proteini

JNK (*c-Jun N-terminal kinase*): c-jun N-terminalna kinaza

LTE (*The List of Threatening Experiences*): lista (upitnik) ugrožavajućih životnih događaja

MAO (*monoamine oxidase*): mono-aminooksidaza

MAPK (*mitogen-activated protein kinases*): mitogenom aktivirane protein kinaze; MAP kinaze

MAP2K (*MAP kinase kinase*): kinaza MAP kinaze

MAP3K (*MAP kinase kinase kinase*): kinaza kinaze MAP kinaze

MKB-10: Međunarodna klasifikacija bolesti – 10. revizija

NFκB (*nuclear factor kappa B*): nuklearni faktor kapa B

p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases p38*): mitogenom aktivirane protein kinaze p38

pGR-211: fosforilacija GR-a na serinu 211; GR fosforilisan na serinu 211

pGR-226: fosforilacija GR-a na serinu 226; GR fosforilisan na serinu 226

RMSEA (*root mean square error of approximation*): kvadratni koren prosečne kvadrirane greške aproksimacije

SD (*standard deviation*): standardna devijacija

SDS (*Sodium dodecil sulphat*): natrijum dodecil sulfat

SEM (*structural equation modelling*): modelovanje strukturalnim jednačinama

SNRI (*serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors*): inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina

SSRI (*selective serotonin reuptake inhibitors*): selektivni inhibitori preuzimanja serotonina

TCA (*tricyclic antidepressants*): triciklični antidepresivi

TeCA (*tetracyclic antidepressants*): tetraciklični antidepresivi

tGRc (*total cytoplasmic GR*): ukupni citosolni GR

tGRn (*total nuclear GR*): ukupni jedarni GR

TNF- α (*tumor necrosis factor - alpha*): faktor nekroze tumora - alfa

YLD (*years of life with disability*): godine života sa nesposobnošću

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Jovičić je rođena 1985. godine u Beogradu. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,73. U toku studija je bila član Centra za stručni i naučno-istraživački rad studenata i aktivno se bavila naučnim radom iz oblasti genetike, kancera i psihijatrije. Kao student je bila prvi autor tri istraživačka rada, od kojih je jedan iz oblasti psihijatrije (mentor doc. dr Milica Pejović Milovančević) objavljen *in extenso* u časopisu *Psihijatrija danas*. Tokom 2008. je u sklopu IFMSA naučne razmene u Montereju, Meksiko bila uključena u rad na projektu *Ekspresija faktora rasta u tumoru jajnika kod pacova*.

Uporedo je bila angažovana u volonterskom radu: 2011. je osmislila i rukovodila projektom *Volonterija!*, koji je obuhvatao kreativne radionice za decu sa razvojnim teškoćama. Projekat je dobio donacije od dve nevladine organizacije u vrednosti od 2.400,00 evra.

Doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je oktobra 2011. Od 2012-2015. je bila zaposlena na projektu Ministarstva prosvete i nauke *Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanu dijagnostiku i terapiju poremećaja raspoloženja* (rukovodilac dr sc. Miroslav Adžić, rukovodilac potprojekta doc. dr Nađa Marić Bojović). U zvanje *istraživač saradnik* na Medicinskom fakultetu u Beogradu je izabrana 2014.

U novembru 2014. godine održala je predavanje na Nemačkom nacionalnom kongresu psihijataru u Berlinu gde je predstavila deo rezultata svojih doktorske teze.

U februaru 2015. je bila na studijskom boravku na Sakler Medicinskom fakultetu Tel Aviv Univerziteta, na poziv prof. dr Davida Gurvica radi sticanja znanja vezanih za farmakogenetiku depresije.

Od juna 2015. zaposlena je na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Srbije.

Objavila je 18 naučno-istraživačkih radova *in extenso*, od čega 7 u časopisima indeksiranim u SCI/SCIexp. Rezultate doktorske disertacije predstavila je u dva rada objavljena u *World Journal of Biological Psychiatry* (IF 4.183) i *Medical Hypotheses* (IF 1.074).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milica J. Jovičić

broj upisa 2011/2012

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Značaj regulacije glukokortikoidnog receptora u strukturalnom modelu podložnosti

za depresiju

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 8.3.2016.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Milica J. Jovičić

Broj upisa 2011/2012

Studijski program neuronauke

Naslov rada Značaj regulacije glukokortikoidnog receptora u strukturalnom modelu
podložnosti za depresiju

Mentor doc. dr Nađa Marić Bojović

Potpisani Milica J. Jovičić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 8.3.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Značaj regulacije glukokortikoidnog receptora u strukturalnom modelu
podložnosti za depresiju

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 8.3.2016.

