

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr med. Milutin Kostić

**Utvrđivanje povezanosti relevantnih genetskih
polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne
rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim
poremećajem**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dr med. Milutin Kostic

**Study of relationship between pertinent genetic
polymorphisms and MRI findings in patients with
depressive disorder**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Mentor: Prof. Dr Dušica Lečić-Toševski, specijalista neuropsihijatrije, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završne teze:

1. Prof. Dr Ivana Novaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu na predmetu humane genetike
2. Prof. Dr Tatjana Pekmezović, specijalista epidemiologije, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu na predmetu epidemiologije
3. Prof. Dr Sanja Totić Poznanović, specijalista neuropsihijatrije, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu na predmetu psihijatrije
4. Doc. Dr Šarlota Mesaroš, specijalista neurologije, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu na predmetu neurologije
5. Prof. Dr Slavica Djukić Dejanović, specijalista neuropsihijatrije, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Kragujevcu na predmetu psihijatrije

Datum odbrane teze:

Zahvalnica

Ovu disertaciju posvećujem deci i supruzi. Viktoru, Vasilu i Sonji jer su moj život u poslednjih 7 godina učinili neizmerno lepšim i na taj način mi pomogli da završim ovaj posao. Supruzi iz istog razloga, ali i zbog nebrojenih sati i dana kada je preuzimala obaveze na sebe da bih ja imao više vremena da radim na doktoratu, što je morala da trpi ponekad moje nervoze i frustracije u ovom višegodišnjem procesu i za kraj što je i direktno učestvovala u tehničkom sređivanju ove disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem i majci Vesni, tastu Mići i tašti Miri čija je nesebična pomoć u svim sferama života (ali posebno u čuvanju dece) omogućila da imam neophodno vreme za rad. Istu zahvalnost dugujem i ocu Vladimiru, koji je pored dedovskih obaveza pomogao i sa mnogobrojnim savetima kako u samom radu, tako i u pisanju disertacije.

U samom istraživanju iz kojeg je izašla ova disertacija, učestvovao je ogroman broj ljudi. Od lekara i sestara Instituta za mentalno zdravlje koji su učestvovali u prepoznavanju pacijenata koji ispunjavaju kriterijume za ulazak u studiju i vađenje krvi, do osoblja u genetskoj laboratoriji, kabinetu za nuklearnu magnetnu rezonancu, sobi za ultrazvuk, kao i lekara i sestara Klinike za neurologiju koji su učestvovali u pronalaženju i vađenju krvi kontrolama i snimanju svih pacijenata.

Ipak posebno mesto u ovoj disertaciji zaslužuju dr Ana Munjiza bez koje ova disertacija ne bi postojala, koja je testirala i uzela uzorke polovine pacijenata i kontrola i sa kojom sam direktno saradivao od samog početka do samog kraja istraživanja. Bez predusretljivosti i entuzijazma Doc. dr Šarlote Mesaroš, organizovanje snimanja pacijenata bi bilo neizmerno teže i iskreno se radujem što će njen doprinos biti zaokružen time što mi je učinila veliku čast da bude u Komisiji za odbranu disertacije. Isto važi i za Prof. dr Novaković, koja oko sebe ima divan tim sa kojim je bilo beskrajno lako se dogovoriti svaki detalj. Tu treba posebno istaći dr

Valeriju Dobričić koju sam zvao i kada je bilo pristojno i kada nije i koja je uvek bila maksimalno predusretljiva. Ass. dr Milija Mijailović je kolege i mene uveo u metodologiju i tehničke detalje transkranijalne ultrasonografije i u nas usadio entuzijazam sa kojim on pristupa radu. Bez Prof. dr Pekmezović ova disertacija ne bi bila ono što danas jeste, jer su njeni saveti, predlozi i iskustva, kao i kreativna rešenja direktno uobličila razradu, rezultate i tumačenje rezultata.

Za kraj bih da se zahvalim i svojoj mentorki koja je uz mene od početka mog profesionalnog života, koja mi je prva dala priliku, iskazala poverenje, bila podrška i pružila mi iskustva koja prevazilaze njene obaveze kako direktora tako i mentora.

Utvrdjivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem

REZIME

Uvod: Depresija je poremećaj raspoloženja koji izaziva perzistentno osećanje tuge i gubitka interesovanja. Uzrok depresije nije poznat, ali su populacione genetske studije pokazale da genetika ima uticaj na pojavu poremećaja. Do sada su izučavani mnogi polimorfizmi i nekoliko ih je pokazalo obećavajuće rezultate, tj. da verovatno utiču na povećanje podložnost za razvoj depresije. Među njima su i 5-HTTLPR polimorfizam gena za serotoninški transporter, Val66Met funkcionalni polimorfizam neurotrofnog faktora dobijenog iz mozga (BDNF) i Val158Met funkcionalni polimorfizam katehol-O-metiltransferaze (COMT). Heterogenost rezultata dosadašnjih istraživanja depresije govori u prilog tome da aktuelna dijagnostička kategorija obuhvata više etiološki različitih poremećaja koji imaju sličnu kliničku sliku. Izučavanje interakcije polimorfizama i njihov uticaj na morfologiju može biti jedan od pristupa distinkciji među potencijalnim etiopatogenetskim tipovima depresije.

Cilj: (1) Utvrđivanje da li postoje specifične interakcije ili akumulacije alela BDNF Val66Met, COMT Val158Met i SERT 5-HTTLPR funkcionalnih polimorfizama koje su češće kod pacijenata sa depresivnim poremećajem nego kod kontrola. (2) Utvrđivanje specifičnih kliničkih, sociodemografskih karakteristika ili specifičnih morfoloških (VBM, traktografija, debljina sive mase, transkranijalna ultrasonografija) parametara koji bi definisali patološke ili kliničke specifičnosti grupa pacijenata oformljenih prema njihovom genetskom profilu.

Metod: Istraživanje je koncipirano kao hibridna studija, koja se zasnivala na studiji preseka i studiji slučajeva i kontrola. U studijsku grupu uključeno je 85 konsektivnih, hospitalizovanih pacijenata Instituta za mentalno zdravlje (Beograd), kojima je

postavljena klinička dijagnoza *prve depresivne epizode* ili *rekurentnog depresivnog poremećaja* (F32 i F33 prema MKB-10 klasifikaciji), starosti od 18 do 65 godina. Kontrolna grupa je uključivala 73 zdrava dobrovoljca, koja nisu imali podatke o bilo kakvom psihijatrijskom poremećaju i koji su upareni po polu i godinama sa studijskom grupom, tj. pacijentima sa depresivnim poremećajem. Ispitivač bi sa pacijentima uradio skale: Strukturisani dijagnostički intervju za kliničke sindrome osovine I DSM IV-TR (SCID I), Hamiltonovu skalu depresivnosti (HAMD) i Hamiltonovu skalu anksioznosti (HAMA). I pacijenti i kontrole su popunjavali sociodemografski upitnik, Bekov upitnik depresivnosti (BDI) i upitnik o postojanju zlostavljanju u detinjstvu (CTQ).

Rađen je MR endokranijuma u Kabinetu za nuklearnu magnetnu rezonancu Klinike za neurologiju KCS po protokolu. Potom su analizirani: morformetrija zasnovana na vokselu, difuzioni tenzorski imidžing (engl. diffusion tensor imaging; DTI) i debljina kore mozga.

Rađene su molekularno genetičke analize 3 polimorfizma: rs6265; rs4680; 5-HTTLPR.

Na Klinici z neurologiju KCS je rađena i transkranijalna sonografija moždanog tkiva.

Rezultati: Pacijenti imaju niže obrazovanje u odnosu na zdrave kontrole. Pacijenti takođe imaju češće postojanje herediteta za depresivni poremećaj, češće su bili žrtve zlostavljanja i imali su veće skorovena skalama depresije u odnosu na kontrole, što je i očekivano.

Od 85 pacijenata uključenih u istraživanje i 73 kontrole, osam pacijenata (9%) i 7 zdravih kontrola (9,5%) nisu imali urađenu potpunu genetsku, neuroradiološku ili kliničku analizu. Prema tome, uzorak koji je korišćen za genetsko-morfološku analizu uticaja akumulacije gena sastojao se od 77 pacijenata i 66 kontrola.

Najprevalentnija kombinacija i kod pacijenata i kod kontrola bila je Val homozigot BDNF, Met nosilac COMT i L nosilac SERT (u daljem tekstu VML). Ukupno 40 pacijenata (52%) i 17 kontrola (26%) imalo je kombinaciju ta tri alela. Ta kombinacija je upravo i jedina dala statistički značajnu razliku u učestalosti polimorfizama između pacijenata i kontrola ($p=0,001$), sa značajno češćom pojavom te kombinacije među pacijentima, usled čega smo smatrali tu kombinaciju kao visoko rizičnu. Koristeći ovaj rezultat, pacijente i kontrole smo podelili u po 3 grupe (6 ukupno). Te grupe su dve visoko rizične grupe (VRG) koje su

činili VML osobe (jedna grupa su pacijenti, a druga kontrole), dve intermedijerne grupe (IRG) i dve niskorizične grupe (NRG). Ove grupe su oformljene korišćenjem akumulacionog modela, odnosno stepena akumulacije alela koji izazivaju povećanu suseptibilnost za razvoj depresije.

Akumulacione grupe pacijenata među sobom su se razlikovale u dva klinička skora i po hereditetu. U pitanju 11 na BDI (iritabilnost) NRG pacijenti su imali viši skor, a u pitanju 18 na HAMD (diurnalna varijacija) VRG pacijenti su imali više skorove. VRG pacijenti su češće imali prisutan hereditet depresivnog poremećaja.

VRG pacijenti su imali smanjen volumen korteksa u odnosu na NRG kontrole u bilateralnom inferiornom frontalnom korteksu, bilateralnom srednjem orbitofrontalnom girusu i insuli bilateralno, kao i u levom superiornom frontalnom girusu, levom srednjem cingularnom korteksu i levom inferiornom temporalnom girusu. VRG pacijenti imali su značajno stanjenu debljinu sive mase u rostralnom delu srednjeg frontalnog girusa obostrano u odnosu i na VRG kontrole i NRG kontrole.

Hipoehogenost rafe kod pacijenata je bila značajno češća u odnosu na kontrole. Utvrđena su 4 prediktora koja su zajednički uticala na ehogenost rafe kod pacijenata: pitanje 5 na HAMA, komorbiditet socijalne fobije, S homozigot 5-HTTLPR i komorbiditet generalizovanog anksioznog poremećaja.

Zaključak: Trostruka kombinacija BDNF Val homozigot/COMT Met nosilac/SERT L nosilac (VML) je bila visoko statistički značajno češća kod pacijenata u odnosu na kontrole. Model izučavanja depresivnog poremećaja kroz genetske akumulacije ili interakcije je obećavajući i ima potencijal da prikaže suptilne, ali potencijalno etiološki, patološki i terapijski značajne razlike među samim depresivnim pacijentima.

Ključne reči: depresija, genetika, morfologija, magnetna rezonanca, transkranijalna ultrasonografija, BDNF Val66Met, COMT Val158Met, SERT 5-HTTLPR

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Psihijatrija

Study of relationship between pertinent genetic polymorphisms and MRI findings in patients with depressive disorder

ABSTRACT

Introduction: Depression is a mood disorder caused by persistent feeling of sadness and loss of interest. The cause of depression has not yet been elucidated, but the population genetic studies have shown the impact of genetics on the occurrence of this disorder. So far numerous polymorphisms have been investigated and several yielded positive results, i.e. they probably increase the proneness to development of depression. Among them are the 5-HTTLPR functional polymorphism for serotonin transporter, Val66Met functional polymorphism of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Val158Met functional polymorphism of catechol-O-methyl-transferase (COMT). Heterogeneity of results of previous depression studies suggests that the current diagnostic category comprises several etiologically different disorders with similar clinical presentation. Study of interaction of the polymorphisms and their impact on morphology can be an approach to differentiate among the potential etiopathogenetic types of depression.

Aim: (1) To establish possible specific interactions or accumulation of alleles BDNF Val66Met, COMT Val158Met and SERT 5-HTTLPR of functional polymorphisms that are more common in patients with depressive disorder than in controls. (2) To establish specific clinical, sociodemographic features or specific morphological (VBM, tractography, gray matter thickness, transcranial ultrasonography) parameters that may define pathological or clinical specificities of groups of patients composed by their respective genetic profiles.

Method: The study has been designed as a hybrid one, based on cross-sectional study, case study and controls. The study group comprised 85 consecutive, in-patients at the Institute of Mental Health (Belgrade), diagnosed with the *first depressive episode* or

recurrent depressive disorder (F32 and F33 acc. to ICD-10 classification), aged 18 to 65 years. The controls included 73 healthy volunteers with no history of any psychiatric disorder, matched by sex and age with the study group, i.e. patients with depressive disorder. The investigator applied Structured Clinical Interview for DSM Disorders, Axis I (SCID I), Hamilton Rating Scale for Depression (HAMD) and Hamilton Rating Scale for Anxiety (HAMA) to all. Both patients and controls filled in the sociodemographic questionnaire, Beck Depression Inventory (BDI) and Childhood Trauma Questionnaire (CTQ).

MR imaging of the endocranium was performed at the MRI Service of the Institute of Neurology, CCS, according to protocol. The following analyses were performed: voxel-based morphometry, diffusion tensor imaging (DTI) and cerebral cortical thickness measurement. Molecular genetic tests were performed for 3 polymorphisms: rs6265; rs4680; 5-HTTLPR. Transcranial ultrasonography of the brain tissue was also performed at the Institute of Neurology, CCS.

Results: Educational level of patients was lower than that of controls. As expected, patients also have higher hereditary factors for depressive disorder, history of abuse and higher scores on depression scales.

Out of 85 patients included in the study and 73 controls, eight patients (9%) i 7 healthy controls (9,5%) did not have genetic, MRI or clinical analyses completed. Accordingly, the sample used for the genetic-morphological analysis of the influence of gene accumulation was composed of 77 patients and 66 controls.

The most prevalent combination in both patients and controls was BDNF Val homozygote, COMT Met-carrier and SERT L-carrier (hereinafter: VML). The total of 40 patients (52%) and 17 controls (26%) had the combination of these three alleles. The combination was the only one yielding the statistically significant difference in the incidence of polymorphisms between patients and controls ($p=0.001$), with significantly more common occurrence of this combination in patients. Therefore, we considered this combination a high risk one. On the basis of this result, we divided the patients and controls into 3 groups each (6 in all). The groups included two high-risk ones (HRG)

composed of VML persons (patients and controls), two intermediary groups (IRG), and two low risk groups (LRG). These groups were made up using the accumulation model, i.e. degree of accumulation of the alleles that cause higher susceptibility to development of depression.

The accumulation groups of patients differed among themselves in two clinical scores and heredity. In item 11 of BDI (irritability) the LRG scored more, and in item 18 at HAMD (diurnal variation) HRG patients scored more. Heredity for depressive disorder was more common in HRG patients.

HRG patients has reduced volume in comparison with LRG controls in the bilateral inferior frontal cortex, bilateral mid orbitofrontal gyrus and insula bilaterally, as well as in the left superior frontal gyrus, left mid cingular cortex and left inferior temporal gyrus. HRG patients had significantly thinned grey matter thickness in the rostral part of the mid frontal gyrus bilaterally in comparison with both HRG and LRG controls.

Hipoechogeneity of raphe was significantly more common in patients than in controls. Four predictors that jointly affected the raphe echogeneity in patients were identified: item 5 at HAMA, social phobia co-morbidity, S homozygote 5-HTTLPR and generalized anxiety disorder co-morbidity.

Conclusion: The triple combination BDNF Val homozygote/COMT Met carrier/SERT L carrier (VML) was highly significantly more common in patients than in controls. The model of depressive disorder study through genetic accumulation or interactions is promising, and has a potential for identification of subtle, but potentially etiologically, pathologically and therapeutically important differences among depressive patients themselves.

Keywords: depression, genetics, morphology, MR imaging, transcranial ultrasonography, BDNF Val66Met, COMT Val158Met, SERT 5-HTTLPR

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Psychiatry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. DEPRESIJA.....	1
1.1.1 Istorijat.....	1
1.1.2. Definicija.....	3
1.1.3. Klinička slika.....	3
1.1.4. Klasifikacija.....	4
1.1.4.1. Međunarodna klasifikacija bolesti – MKB10.....	4
1.1.4.2. DSM-IV.....	5
1.1.4.3. DSM-V.....	6
1.1.5. Komorbiditet depresivnog poremećaja i generalizovanog anksioznog poremećaja.....	6
1.1.6. Epidemiologija.....	7
1.1.7. Psihosocijalne teorije etiopatogeneze depresije.....	8
1.1.8. Biološke teorije etiopatogeneze depresije.....	9
1.2. GENETSKE OSNOVE DEPRESIJE.....	11
1.2.1. Populaciona genetska epidemiologija.....	11
1.2.2. Geni od interesa za studiju.....	13
1.2.2.1. SERT.....	13
1.2.2.1.1 Gen koji kodira za SERT (SERT).....	13
1.2.2.1.2. Gen koji kodira za SERT i depresivni poremećaj.....	14
1.2.2.2. Neurotropni faktor dobijen iz mozga.....	16
1.2.2.2.1. Gen koji kodira neurotropni faktor dobijen iz mozga.....	18
1.2.2.2.2. Neurotropni faktor dobijen iz mozga i depresivni poremećaj.....	18
1.2.2.3. Katehol-O-metiltransferaza.....	19
1.2.2.3.1. Gen koji kodira za katehol-O-metiltransferazu.....	20
1.2.2.3.2. Gen koji kodira za katehol-O-metiltransferazu i depresivni poremećaj.....	20
1.3. MORFOLOŠKE OSNOVE DEPRESIJE.....	21
1.3.1. Tehnike magnetne rezonance.....	21
1.3.1.1. Morfometrija zasnovana na vokselima.....	23
1.3.1.2. Frakciona anizotropija i traktografija.....	23
1.3.1.3. Debljina sive mase.....	24
1.3.2. Dosadašnja saznanja o depresiji korišćenjem nuklearne magnetne rezonance.....	24
1.3.3. Transkranijalna ultrasonografija.....	25
1.3.3.1. Dosadašnja saznanja o depresiji korišćenjem transkranijalne ultrasonografije.....	26
1.3.4. Morfološka istraživanja korišćenjem modela interakcije gena.....	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. METOD.....	30
3.1.1. Uzorak.....	30
3.1.2. Instrumenti kliničke procene.....	31
3.2. PROTOKOL ISTRAŽIVANJA.....	33
3.3. MOLEKULARNO GENETIČKE ANALIZE POLIMORFIZAMA.....	34
3.3.1. Izolacija genomske DNK.....	34
3.3.2. Protokol za brzu izolaciju genomske DNK komercijalnim kitovima.....	34
3.3.3. Određivanje koncentracije ukupne DNK.....	36
3.3.4. Protokol za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNK.....	36
3.3.5. Analiza rs6265 i rs4680 metodom Real-time PCR (RT-PCR).....	37
3.3.6. Analiza polimorfizma 5-HTTLPR.....	39
3.3.7. Protokol za pripremu i izvođenje agarozne gel elektroforeze.....	41

3.4. SNIMANJA METODOM NUKLEARNE MAGNETNE REZONANCE	42
3.4.1. <i>Analiza snimaka dobijenih magnetnom rezonancom</i>	42
3.4.1.1 Morfometrija zasnovana na vokselu (VBM)	43
3.4.1.2. Merenje debljine kore mozga	45
3.4.1.3. Difuzioni tenzorski imidžing (DTI)	45
3.4.1.3.1 Traktografija	46
3.5. TRANSKRANIJALNA PARENHIMSKA SONOGRAFIJA TKIVA MOZGA.....	47
3.6. STATISTIČKA ANALIZA.....	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. KLINIČKE I SOCIODEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE.....	49
4.2. REZULTATI GENETSKIH ANALIZA	49
4.3. KLINIČKE I SOCIODEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE AKUMULACIONOG MODELA	53
4.4. REZULTATI SNIMAKA MAGNETNOM REZONANCOM	55
4.4.1. <i>Morfometrija zasnovana na vokselima</i>	55
4.4.2 <i>Traktografija</i>	57
4.4.3. <i>Debljina sive mase</i>	57
4.5. REZULTATI MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA KOD PACIJENATA SA I BEZ KOMORBIDITETA SA GENERALIZOVANIM ANKSIOZNIM POREMEĆAJEM	59
4.5.1. <i>Demografske i kliničke karakteristike</i>	59
4.5.2. <i>Debljina korteksa</i>	59
4.5.3. <i>Traktografija</i>	60
4.5.4. <i>Korelacije između kortikalne debljine i mera DT MRI</i>	60
4.6. REZULTATI TRANSKRANIJALNE ULTRASONOGRAFIJE	61
5. DISKUSIJA	63
6. ZAKLJUČCI	93
7. LITERATURA.....	96

1. Uvod

1.1. Depresija

1.1.1 Istorijat

Ekstremne promene raspoloženja, uključujući depresiju, pominjane su u literaturi još u najstarijim spisima (Radden, 2003). Jedna od prvih poznatih teorija o uzroku promena raspoloženja potiče od Hipokrata koji je tvrdio da su one posledica promena u koncentraciji četiri osnovne tečnosti u ljudskom telu: krv, sluz, crna i žuta žuč. Hipokrat je prvi upotrebio izraz melanholija (od grčkog μέλας - "crna" i χολή - "žuč"), koji je dugo korišćen više kao opis sumanutosti nego depresivnog raspoloženja (Smith, 2012). Pod uticajem Galena koji je razradio i promovisao ideju o četiri tečnosti u Rimskom carstvu, odakle se proširila i u arapske zemlje i sav Islamski svet, ova teorija dominira medicinom sve do 17. veka (Jacquart, 1996). Robert Burton 1632. godine objavljuje delo „Anatomija melanholije“ u kojem je probao da sažme sva dotadašnja znanja o melanholiji u jednu knjigu (Project Gutenberg, 2004). Odmah za njim, 1664. godine, Tomas Vilis, profesor prirodne filozofije na Oksfordskom Univerzitetu, izdaje knjigu „Cerebri anatomi“ u kojoj se nakon skoro 2000 godina odstupa od ideje disbalansa tečnosti kao uzroka melanholije i postavlja se teza da je centar poremećaja u mozgu (i srcu) (Molnar, 2004). U istom periodu u literaturi („Hronike Engleskih kraljeva“ Ričardsa Bejkera) počinje da se koristi reč depresija (od latinske reči: deprimere ili „biti pritisnut“) u kontekstu „depresija duše“/“duša koja je pritisnuta“. Sa promenama u pristupu lečenju, osobama sa mentalnim poremećajima tokom 19. veka koje su uvedene u Francuskoj u bolnici Salpetriere, pod uticajem Pinela i Šarkoa, počinje da se razvija psihijatrija kao nauka i da se više ulaže u istraživanja (Weiner, 1992). Upravo iz te bolnice dolazi Luis Delasiauve koji prvi put 1856. godine u medicinskoj knjizi koristi reč depresija, što je vrlo brzo bilo prihvaćeno u mnogim udžbenicima (Berrios, 1988).

Sa Frojdomim delom „Tuga i melanholija“ depresija postaje predmet i psihoanalitičkih teorija i razmišljanja, koja će nekoliko decenija biti dominantna u psihijatrijskoj praksi (Freud, 1917). Kurt Šnajder u istom periodu govori o endogenoj i egzogenoj depresiji i ta podela je preko 50 godina prisutna u literaturi, ali nikada nije naučno potvrđena (Sneider, 1920). Tokom većeg dela 20. veka fokus je bio usmeren na psihološka i dinamska razjašnjenja uzroka depresivnog raspoloženja i pokušaj jasnijeg definisanja depresije kao poremećaja. U DSM-I našla se dijagnostička kategorija „depresivna reakcija“, dok je u DSM-II ona preimenovana u „depresivnu neurozu“, što pokazuje u velikoj meri i promenu u razumevanju depresije kao poremećaja, posebno pod uticajem iproniazida (inhibitor monoamino oksidaze) (Cole et al, 1959) i imipramina (triciklični antidepresiv) (Kuhn, 1958) (tokom '50-tih godina 20. veka prvi otkriveni antidepresivni lekovi). U drugoj polovini veka istraživanja depresije sve više počinju da se okreću biološkim uzrocima uz pomoć povećanog znanja o genetici, epigenetici, hormonima, imunologiji, kao i razvoju magnetne rezonance i drugih imidžing tehnika.

Međutim, sav napredak koji je ostvaren u poslednjih 30 godina nije doveo do stvaranja preciznijih, biološki zasnovanih dijagnostičkih kriterijuma, te i najnoviji DSM-V Američke psihijatrijske asocijacije iz 2013. godine nema među kriterijumima nikakve objektivne, biološke parametre za donošenje dijagnoze depresije (APA, 2013). Kompleksnost samog poremećaja i heterogenost kliničke slike među osobama, ali i kod iste osobe kroz vreme, pokazali su se kao prevelike prepreke. Ipak, pojavile su se određene smernice i tragovi u šumi informacija koje nas usmeravaju u daljem istraživanju. Otkrića u oblasti epigenetike ukazala su nam na fiziološki način na koji sredina utiče direktno na naš genom. Varijacije u genomu pokazale su da određene osobe mogu biti podložnije razvoju depresije, pa čak iako nisu dovoljno specifični markeri (Caspi et al, 2003). Uočeni su poremećaji u hormonskim (Lutter et al, 2008) i imunološkim parametrima (Dantzer, 2009) kod određenog broja pacijenata, a ti nalazi sve više se povezuju sa genetskim istraživanjima. Trend usložnjavanja pristupa posmatranj je sve više odlika novijih istraživanja i sigurno je da će sve dominantnije biti prisutan, jer je to jedini način da se dešifruje ovako teška zagonetka. Na sve to se

nadovezuju i istraživanja magnetnom rezonancom kao svojevrsan prozor u strukturu mozga i promene koje se događaju kod depresivnih osoba.

1.1.2. Definicija

Depresija je poremećaj raspoloženja koji izaziva perzistentno osećanje tuge i gubitka interesovanja. Depresivni poremećaj utiče na način na koji se osoba oseća, misli i ponaša, i može dovesti do niza emocionalnih i fizičkih tegoba. Depresija je više od obične tuge. Ona nije slabost. Iz depresije se ne može «trgnuti». (<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/basics/definition/con-20032977>)

1.1.3. Klinička slika

Depresija je poremećaj koji se manifestuje heterogenim simptomima, od kojih neki mogu biti prisutni kod jedne osobe, dok sasvim drugi mogu biti dominantni kod druge. Posebno je od značaja da jedna osoba može imati dve odvojene depresivne epizode koje imaju makar delimično različite simptome ili čak da se u okviru iste epizode simptomi mogu menjati tokom vremena. Neki od najčešćih simptoma depresivne epizode su tuga, anksioznost, bezvoljnost, nesanica, nedostatak apetita, loša koncentracija, razdražljivost, gubitak interesovanja, gubitak energije, suicidalne i pesimističke misli (bespomoćnost, beznadežnost, bezvrednost, krivica). Mogu se javljati i somatska ispoljavanja u vidu bolova u telu, glavobolja, opstipacija, dijareja, učestalo mokrenje, grčevi u mišićima, gubitak daha, preznojavanje, i dr. Depresija može imati akutan, rekurentan i subsindromski, hroničan tok (distimija). Posebno značajna i problematična je diferencijalna dijagnostika sa bipolarnim poremećajem jer i u unipolarnom i u bipolarnom spektru se javljaju depresivne epizode koje klinički nije moguće razlikovati, te je dobra anamneza i dugoročno praćenje pacijenta od izuzetne važnosti (Hirschfeld,

2014). Kada je depresija psihotična postoje sumanute ideje koje su u skladu sa emocijama, a neretko i auditivne halucinacije. Pored toga, depresija uzrokuje i značajnu promenu ponašanja i funkcionisanja. Zbog svega navedenog, depresivni poremećaj smatra se sindromom.

Prepoznate su i depresije koje imaju karakteristike iz sfere voljno nagoniskih dinamizama suprotne od «standardnih» i one se zovu atipične. Njih karakteriše povećana potreba za snom i hranom. Sezonske depresije (sezonski afektivni poremećaj), ili depresije koje se javljaju rekurentno u određeno, uvek isto godišnje doba (obično zima), najčešće imaju ovakvu kliničku sliku (Magnusson and Partonen, 2005.).

Nakon porođaja 10-15% žena pati od postpartalne depresije (Seyfried and Marcus, 2003) .

1.1.4. Klasifikacija

1.1.4.1. Međunarodna klasifikacija bolesti – MKB10

U desetom izdanju Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB -10), depresija se deli na depresivnu epizodu, rekurentni poremećaj i distimiju. Svaka epizoda može biti: a) blaga, umerena ili teška i b) sa i bez psihotičnih simptoma. Ukoliko se depresivne epizode ponavljaju i podeljene su intervalima od 2 meseca, koji su dominantno bez simptoma, dijagnostikuju se kao rekurentni depresivni poremećaj. Distimija predstavlja perzistentni depresivni poremećaj niskog intenziteta, koji može biti komplikovan teškim depresivnim epizodama, kada se naziva «dupla depresija». U starijim udžbenicima bipolarni i unipolarni afektivni poremećaji često su svrstavani u ista poglavlja, pa su i u MKB-10 klasifikaciji svrstani u zajedničku grupu poremećaja: afektivni poremećaji. Zanimljivo je da novija istraživanja sve više upućuju na to da su etiološki bipolarni poremećaji bliži poremećajima iz shizofrenog spektra (Gatt et al, 2015).

1.1.4.2. DSM-IV

Kriterijumi Američke psihijatrijske asocijacije za depresivni poremećaj su unekoliko konkretniji od čega konkretniji? i imaju istu shemu koju prate i ostale dijagnoze. Potrebno je da depresivno raspoloženje i gubitak interesovanja ili zadovoljstva traje dve nedelje, da je poremećeno funkcionisanje i da je prisutno 5 od 9 kriterijuma skoro svaki dan tokom te dve nedelje.

Tabela 1. Kriterijumi DSM-IV za veliku depresivnu epizodu

(1) depresivno raspoloženje ili razdražljivost
(2) gubitak interesovanja ili zadovoljstva
(3) značajan gubitak težine (5%) ili promena apetita
(4) promene u spavanju, bilo insomnija ili hipersomnija
(5) promene u aktivnosti, bilo psihomotorna agitacija ili retardacija
(6) umor ili gubitak energije
(7) osećanje krivice ili beskorisnosti
(8) pad koncentracije
(9) suicidalnost

Naglašeno je da se obrati pažnja na nekoliko faktora koji mogu uticati na kliničku sliku i uzrokovati simptome depresivnosti: zloupotreba psihoaktivnih supstanci, somatska bolest, druge psihijatrijske bolesti (manija, bipolarni poremećaj, shizoafektivni poremećaj, shizofrenija, i dr.). Pored toga, period od dva meseca nakon smrtnog slučaja smatra se periodom ožalošćenosti i u tom vremenskom opsegu se ne dijagnostikuje depresivni poremećaj. Izuzetak za ovo pravilo je depresija izuzetno visokog nivoa koja dovodi do značajnog pada funkcionalnosti, morbidne preokupacije idejama beskorisnosti, suicidalnih misli, psihotičnih simptoma ili psihomotorne retardacije (American Psychiatric Association, 2000).

Kao i u MKB-10 i u DSM-IV se koristi dimenzionalan pristup i depresivne epizode se dele na blage, umerene i teške.

1.1.4.3. DSM-V

U DSM V učinjene su neznatne izmene u odnosu na DSM-IV kada je u pitanju depresivni poremećaj i svi kriterijumi navedeni u Tabeli 1. su ostali. Najviše pažnje je izazvalo isključivanje ožalošćenosti nakon smrtnog slučaja kao faktora koji može da produži tugovanje i do 2 meseca, a da se ne dijagnostikuje depresivna epizoda. Distimija i hronični depresivni poremećaj spojeni su u jednu dijagnozu – perzistentni depresivni poremećaj. Dodata je i dijagnoza *premenstrualnog disforičnog poremećaja*. U okviru samog depresivnog poremećaja uključene su dve kategorije za preciznije opisivanje same depresivne epizode: sa mešanim simptomima (dakle maničnim, što može da navede na potencijalno postojanje bipolarnog afektivnog poremećaja) i sa anksioznim distresom (da bi se naglasili anksiozni simptomi koji često prate depresivni poremećaj) (American Psychiatric Association, 2013).

1.1.5. Komorbiditet depresivnog poremećaja i generalizovanog anksioznog poremećaja

Generalizovani anksiozni poremećaj se karakteriše perzistentnom, nerealističnom i ekscesivnom brigom koja traje preko 6 meseci (Angst et al, 2009, APA, 2000). Mnoga istraživanja pokazala su visok stepen komorbiditeta anksioznih poremećaja u celini, a najčešće komorbiditete generalizovanog anksioznog i depresivnog poremećaja. Procene govore o rasponu od 10 do 50% (Gorman, 1996, Ressler et al, 2007) dok su longitudinalne studije pokazale da je preklapanje i češće ako se posmatra kumulativno kroz vreme (Moffitt et al, 2007). Pored toga, terapijski pristup anksioznim i depresivnim poremećajima je skoro identičan, sa antidepresivima kao prvom linijom za oba poremećaja (Schaffer et al, 2012). Ovi nalazi naveli su mnoge istraživače da depresivni poremećaj i generalizovani anksiozni poremećaj posmatraju kao iste

poremećaje sa donekle različitom kliničkom manifestacijom ili makar kao dva bliska poremećaja koja pripadaju istom spektru (Gorman, 1996; Ressler et al, 2007). Ipak, postoje i istraživanja koja su ukazala da je prognoza za pacijente sa komorbiditetom lošija nego ako pacijent ispunjava kriterijume samo za jednu od dve dijagnoze (Gorman et al, 1996; Kessler et al, 2005; Bruce et al, 2005; Rush et al, 2005). Nažalost, prema našim saznanjima, samo jedno istraživanje magnetnom rezonancom direktno je upoređivalo pacijente sa i bez komorbiditeta (van Tol et al, 2010). Ostala istraživanja koja su analizirala svaki poremećaj zasebno uglavnom nisu uzimala postojanje komorbiditeta kao isključujućeg kriterijuma, što čini da je čak i indirektno upoređivanje rezultata skoro nemoguće.

1.1.6. Epidemiologija

Depresija je četvrti najčešći uzrok opterećenja populacije sa bolešću, izražene kroz «godine života sa invaliditetom» (SZO, 1990). Svetska zdravstvena organizacija takođe procenjuje da će se do 2020. godine na ovoj listi depresija biti na drugom mestu. Epidemiološke studije pokazuju da će čak polovina populacije u toku života imati bar jednu depresivnu epizodu (Moffitt et al, 2010), a kada se pojavi, depresija je u dve trećine slučajeva rekurentna (Kennedy et al, 2004), dok se kod 10-15% osoba završava suicidom (Andreasen, 2001), što predstavlja dve trećine svih izvršenih suicida. U Evropi je procena da godišnje od depresije pati između 3 i 10% opšte populacije (Wittchen i Jacobi, 2005). Interesantno da ove brojke nisu mnogo različite čak ni u adolescentnoj populaciji, te u Velikoj Britaniji 2,6% osobastarih od 16 do 17 godina boluje od depresivnog poremećaja, dok je sa subsindromskom depresijom ta brojka čak 11,4% (Singelton et al, 2001). I pored ovih brojki, procene su da je depresija i u Evropi (Henriksson et al, 2006) i u Srbiji (Lisulov i Nedić, 2006) nedovoljno lečena i nedovoljno prepoznata. Celoživotna prevalencija se kreće između 4% i 10% za depresivnu epizodu i između 2,5% i 5% za distimiju (Waraich et al, 2004). Depresija je 1,5 do 2 puta češća kod žena (Waraich et al, 2004).

1.1.7. Psihosocijalne teorije etiopatogeneze depresije

Postoje brojne psihosocijalne etiološke teorije depresije. Pet najčešće razmatranih uključuju:

1. Psihoanalitička je jedna od prvih i dugo vremena dominantnih teorija razvoja depresije. Oslanjala se na većinu osnovnih postulata psihoanalize. Frojd je verovao da je depresija gotovo uvek posledica gubitka značajnog odnosa i u odnosu na tu primarnu hipotezu je objašnjavao šta se dalje dešava. Jedna teza je da se radi o agresiji usmerenoj ka samom sebi. Druga je da se radi o introjkciji osobe koju je depresivni pacijent izgubio. Kasnije je čak tvrdio da je introjkcija normalna reakcija, ali da depresija nastupa kada se umešaju previsoki zahtevi super ega (Freud, 1917). Melanija Klajn je depresiju objašnjavala deprivacijom odnosa sa majkom u prvoj godini (Kleine, 1934). Psihoanalitički teoretičari su govorili i o gubitku samopouzdanja (Bibring, 1953) ili o ličnostima sa narcističkim, analnim ili oralnim crtama kao osobama sa povišenim rizikom (Chodoff, 1972).

2. Humanistički pristup počiva na ideji da ljudi imaju potrebu specifičnu za celokupni živi svet, a to je potreba za dostizanjem sopstvenog potencijala (Maslow, 1962). Kada ovo nije moguće dolazi do pojave depresije.

3. Egzistencijalistički pristup počiva na iskustvima i kasnijim učenjima Viktora Frankla o ljudskoj potrebi za smislom. Ono što je izdvaja od humanističkog pristupa jeste fokus na depresiji kao bolesti modernog društva koje je stvorilo previše slobodnog vremena i sledstvenoj ruminaciji o smislu života što dovodi do depresije. Po ovoj teoriji u društvima u kojima su ljudi pritisnuti svakodnevnim egzistencijalnim pitanjima (hrana, voda, hladnoća) nemaju vremena za takvim razmišljanjima jer su fokusirani na preživljavanje i ne doživljavaju depresiju na način na koji ona postoji u zapadnom svetu obilja (Frankl, 1964).

4. Danas najupotrebljavanije u kliničkoj praksi i najčešće izučavane i upotrebljavane zajedno su kognitivna i bihevioralna teorija, odnosno kognitivnobihevioralna. Obe se zasnivaju na teoriji socijalnog učenja (Bandura, 1977). Biheviorizam se fokusira na značaj sredine u oblikovanju našeg ponašanja. Tu se poseban značaj stavlja na pozitivnu motivaciju koja dolazi iz ispunjujućih interakcija sa drugima. U slučaju gubitka pozitivnog motivatora (osoba, posao) dolazi do poremećaja u okruženju i uspostavljanja novih obrazaca ponašanja mogu biti motivisana negativnim interakcijama ili nedostatkom ikakvih interakcija te mogu voditi ka depresiji (Lewisohn, 1974). Kognitivna teorija se fokusira na mišljenje. Ovde je ideja da je process mišljenja kod depresivnih osoba takav da dovodi do depresivnog raspoloženja i ponašanja. Osnovni postulate ove teorije se nalaze u radovima Arona Beka i Martina Seligmana. Bek je definisao kognitivni trijas (odnosno Bekov trijas) što su tri forme negativnog mišljenja kod depresivnih osoba (lose mišljenje o sebi, lose mišljenje o svetu i negativna anticipacija budućnosti) (Beck, 1967). Seligman je radio istraživanja na psima i dao objašnjenje za negativne kognitivne procese teorijom naučene bespomoćnosti. Naučena bespomoćnost se događa kada osoba zaključi (iz iskustva u detinjstvu najčešće, ali ne nužno) da njeni pokušaji da izbegne negativne događaje neće činiti razliku. Usled toga osoba postaje pasivna i dominira osećaj bespomoćnosti čak i kada objektivne okolnosti mogu da budu promenjene (Seligman, 1974).

1.1.8. Biološke teorije etiopatogeneze depresije

Kao i za psihosocijalne, postoje brojne biološke etiopatogenetske teorije, ali dominantnih pet su:

1. Monoaminska hipoteza je prva predložena biološka hipoteza depresije. Pedesetih godina prošlog veka, tokom izučavanja uticaja rezerpina na hipertenziju, uočeno je da taj lek izaziva depresiju (Freis, 1954). Razvijanjem lekova koji utiču na koncentraciju norepinefrina, dopamina i prevashodno serotonina i njihovim dobrim

rezultatima u lečenju depresije ova hipoteza dobila je delimičnu potvrdu. Međutim, ta hipoteza ima i ograničenja s obzirom na to da su nedavne meta analize pokazale da antidepressivi imaju efekat samo u simptomatski najintenzivnijim depresivnim epizodama (Fournier et al, 2010). Poslednjih godina mnoga istraživanja ukazuju na značajan uticaj gama-aminobuterne kiseline i glutamata, dok se monoamini smatraju sekundarnim regulatorima (Goldberg et al, 2014).

2. Hormonska/kortikosteroidna hipoteza govori o povećanoj reaktivnosti hipotalamo-pituitarno-adrenalne (HPA) osovine. Pretpostavlja se da je osnovni razlog takve reaktivnosti moglo biti zlostavljanje u detinjstvu i hronična ekscitacija u tom dobu koja dovodi do zadržavanja visokog stepena reaktivnosti i u odraslom dobu (Kino, 2015). Ova teorija je i danas popularna, ali donekle istraživački zapostavljena usled nemogućnosti adekvatnog terapijskog dejstva na HPA sistem bez izraženih neželjenih efekata.

3. Imunološka hipoteza govori da je u depresivnom poremećaju prisutan hroničan inflamatorni proces i porast primarno citokina (Miller et al, 2009). Studije su do nedavno imale konfliktne i ne previše ubedljive rezultate, ali je istraživanje grupe iz Atlante pokazalo da zaista mnogi pacijenti nemaju taj nalaz, ali da se kod određene podgrupe koja ima povišene parametre inflamacije može postići značajan terapijski pomak sa terapijom koja utiče na inflamaciju (antagonisti tumor nekroze faktora) umesto na monoaminski sistem (Raison et al, 2013).

4. Poremećaj neuroplastičnosti je hipoteza koju niko ne smatra za dominantnu, apsolutnu ili dovoljnu, ali je niko i ne isključuje kao jedan od dodatnih patoloških mehanizama koji se dešavaju u depresivnom poremećaju. Ova hipoteza ima osnova samo u dva nalaza koja su uočena u depresivnom poremećaju, ali su ti nalazi toliko konzistentni da se danas smatraju jednim od najznačajnijih patoloških obeležja u depresiji. To su smanjena koncentracija neurotrofnog faktora dobijenog iz mozga (BDNF) i smanjen

volumen hipokampusa kao direktna posledica koncentracije BDNF (Castren and Rantamaki, 2010).

5. Genetska hipoteza se ne može i ne treba posmatrati kao potpuno izdvojena i nezavisna od ostalih bioloških i psihosocijalnih teorija. Ona ih dopunjava i daje dodatna potencijalna objašnjenja za nastanak patoloških promena koje uočavamo u depresivnom poremećaju. Najveći broj gena koji se izučavaju pripadaju genima koji transkribuju proteine koji utiču na monoamine, HPA osovinu ili imunološki sistem. Izučavani su mnogobrojni polimorfizmi, neki sa više, neki sa manje uspeha. Tako npr. geni za katehol-O-metiltransferazu (COMT) i serotoninški transporter (SERT) (koje se u ovoj studiji istražuju) direktno utiču na raspoloživost monoamina tako da se mogu smatrati suštinskim za potencijalno objašnjenje nastanka monoaminskog disbalansa koji je osnova monoaminske hipoteze. Neurotropni faktor dobijen iz mozga (BDNF) utiče na neuroplastičnost i pokazao je dejstvo na sve moguće oblasti u mozgu te je uz COMT i SERT jedan od najviše izučavanih gena u psihijatriji (Notaras et al, 2015).

1.2. Genetske osnove depresije

Depresija je kompleksan poremećaj uzrokovan interakcijom mnogobrojnih faktora – psiholoških, socijalnih i bioloških i nijedna od gore nabrojanih teorija ne daje potpunu sliku. Ipak ono što genetiku čini posebno značajnom je što jeste ili može biti u osnovi svih drugih psihosocijalnih i bioloških teorija.

1.2.1. Populaciona genetska epidemiologija

Još u prvim dekadama 20 veka pojavile su se prve studije koje su pokazale porodičnu agregaciju osoba koje boluju od depresije (Tsuang i Faraone, 1990). Novija istraživanja su izračunala u kojoj meri je to slučaj, te je odnos šansi (engl. odds ratio) 2,84

za povećani rizik od dobijanja depresivnog poremećaja u prvoj generaciji rođaka osoba koje boluju od depresije (Sullivan et al, 2000). Naslednost depresije je u velikoj blizanačkoj studiji ustanovljena kod 38% ispitanika (Kendler et al, 2006). Devet velikih studija asocijacije u čitavom genomu (engl. *genome wide association studies*; GWAS) rađene su u cilju nalaska konkretnih gena koji utiču na pojavu depresije, ali bez ozbiljnijih rezultata (Cohen-Woods et al, 2013). Jedan o razloga za to može biti da polimorfizmi imaju mali uticaj pojedinačno, a GWAS nisu u stanju da označe lokuse sa odnosom šansi manjim od 1,2, osim ako se u istraživanje ne uključi desetina hiljada subjekata (Flint & Kendler, 2014). To potvrđuju i istraživanja koja pokazuju da je naslednost polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphisms*; SNP) u depresiji 21% (Lee et al, 2013) odnosno 30% (Lubke et al., 2012). To u prevodu znači da su upravo uobičajene genetske varijante u populaciji, sa odnosom šansi manjim od 1,2 one koje utiču na preko 50% heritabilnosti depresije i da stoga nisu mogle da se nađu upotrebom GWAS. Veruje se da takvih varijanti može biti i nekoliko hiljada, od kojih svaka utiče sa vrlo malim efektom (Flint & Kendeler, 2014), a sve više se uočava i da razvoj tog efekta nije linearan i lako predvidiv, već da zavisi od životnih okolnosti (Caspi et al, 2003) i interakcije samih gena (Rabl et al, 2014).

Ipak, treba istaći da pored ove teorije, postoje i druge dve koje su naizgled suprotstavljene, ali objektivno mogu biti i u sinergiji ili postojati uporedo, objašnjavajući samo određeni deo populacije koja boluje od depresije. Prva je da su uzrok poremećaja genetske promene koje su značajne, ali vrlo retke i zato neuhvatljive za istraživače. Druga grupa istraživača smatra da je depresija predstavlja heterogenu grupu poremećaja koji su svi uključeni u istu kategoriju. Po toj tezi, ukoliko bi se pronašle homogenije grupe pacijenata, uspelo bi se i u pronalaženju njihovih genetskih markera (Flint & Kendeler, 2014). Ovo do sada u praksi nije bilo moguće ostvariti.

1.2.2. Geni od interesa za studiju

1.2.2.1. SERT

Serotoninski transporter (5-HTT, u daljem tekstu SERT) je protein koji transportuje serotonin iz sinapse u presinaptički neuron. Time se prekida aktivno dejstvo serotonina u sinapsi i omogućava njegovo ponovno korišćenje od strane presinaptičkog neurona. Pored mozga, serotonin je prisutan i u trombocitima gde ima ulogu vazokonstriktora (Vanhoutte et al, 1984). Serotoninski transporter i njegov gen, kao i funkcionalni polimorfizmi tog gena su sa više ili manje uspeha izučavani u gotovo svakom psihijatrijskom entitetu, kao i u nekim kardiološkim bolestima (Tabela 2).

Tabela 2. Bolesti i reference u kojima je izučavan i pokazan značaj SERT

Bipolarni poremećaj	Szczepankiewicz , 2013.
Autizam	Huang et al, 2008.
Shizofrenija	Seidman et al, 2003.
Opsesivno kompulzivni poremećaj	Bloch et al, 2008.
Alkoholizam	Lesch, 2005.
Granični poremećaj ličnosti	Amad et al, 2014.
Post-traumatski stresni poremećaj	Gressier et al, 2013.
Arterijska hipertenzija	Zhang et al, 2013.

1.2.2.1.1 Gen koji kodira za SERT (SERT)

Gen koji kodira SERT (SLC6A4; engl. solute carrier family 6, member 4) kod ljudi se nalazi na hromozomu 17 na lokaciji 17q11.1-q12. U okviru samog gena otkriveni su mnogobrojni funkcionalni polimorfizmi, a najviše je istraživani 5-HTTLPR. Ovaj polimorfizam odlikuje se varijacijom broja ponovaka u promotorskoj regiji samog

gena, usled čega postoji kraća („s“) i duža („l“) varijanta, za koje je pokazano da utiču na učestalost transkripcije iRNK (Heils et al, 1996).

1.2.2.1.2. Gen koji kodira za SERT i depresivni poremećaj

Sredinom '60-tih godina 20. veka Schildkraut, pod uticajem otkrića prvih antidepressiva i njihovog dejstva, postavlja teoriju da uzrok depresije leži u niskim nivoima norepinefrina (Schildkraut, 1965), da bi Coppen dve godine kasnije postavio teoriju o serotoninu (Coppen, 1967). Ova teorija (poznatija kao monoaminska hipoteza) zauzimala je dominantno mesto u literaturi veći deo poslednje trećine 20-og kao i početkom 21. veka, velikim delom utičući na značajan porast prodaje lekova koji ciljaju upravo na serotoninški sistem. Prema izveštaju iz 2004. godine lekovi iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (SSRI) su među najprodavanijim u celokupnoj medicinskoj praksi (International Marketing Services Health, 2004). Ipak, i pored efikasnosti ovih lekova kod određenog broja bolesnika, mnogi ne reaguju pozitivno na njih a postoji i izražen placebo odgovor u svim istraživanjima antidepressiva (Moncrieff et al, 2005), dok istraživanja koja su pokušala da direktnim uticajem na nivo serotonina kod čoveka izazovu ili leče depresiju nisu imala uspeha (Heninger et al, 1996; Mendels et al, 1975). Sve ovo nedvosmisleno govori u prilog značajno kompleksnijem uzroku depresivnih poremećaja (Horgan, 1999).

Ipak, serotoninški sistem verovatno na neki način utiče na razvoj depresije, bar kod određenog dela pacijenata. Tome u prilog posebno govori jedno od prvih i i dalje najznačajnijih otkrića genetskog uticaja na ličnost i povećanu podložnost razvoju depresije upravo u genu za serotoninški transporter. Sredinom '90-tih pojavljuju se prva istraživanja koja ukazuju na uticaj fiziološke, funkcionalne varijacije u promotoru serotoninškog transportera 5-HTTLPR na razvoj neuroticizma i povećanu podložnost razvoju afektivnih poremećaja (Lesch et al, 1996; Collier et al, 1996). Izučavanje ovog polimorfizma dodatno je dobilo na zamahu nakon prvog prospektivnog istraživanja koje je povezalo 5-HTTLPR, stres i razvoj depresivnog poremećaja (Caspi et al, 2003).

Nažalost, rezultati su vrlo šarenoliki tako da još uvek postoje nedoumice o načinu i jačini efekta ovog polimorfizma (Risch et al, 2009; Karg et al, 2011). Tim povodom je Caspi koji je 2010. godine prvi objavio studiju sa pozitivnim nalazom interakcije kratkog alela 5-HTTLPR i stresa u razvoju depresije, sa saradnicima objavio pregledni rad u kojem je pokušao da objasni razloge za mnogobrojne studije koje nisu replikovale taj nalaz (Caspi et al, 2010.). Caspi i sar. (2010) navode da su sve studije u kojima je postojao direktan kontakt lekara sa obolelom osobom i preciznija kao i objektivnija mera doživljenog stresa, imale pozitivan nalaz, dok su velike studije koje su rađene telefonski ili poštom davale mešovite rezultate. Takođe, studije koje su istraživanje vršile sa osobama koje su preživele vrlo jasan, konkretan stres (bolest ili zlostavljanje u detinjstvu) imale su značajno veći postotak pozitivnih nalaza od studija koje su se zasnivale na životnim događajima uopšte. Pored toga, autori navode da se odmah nakon prvog nalaza pojavio veliki broj replikacija studije koje su imale negativne nalaze, a koje su bile obrada postojećih rezultata spremljenih za druga istraživanja i koja kao takva metodološki nisu bila fokusirana na istraživanje interakcije genoma i okoline, tako da je njihova preciznost posledično manja.

Mnogobrojna istraživanja su rađena sa ciljem da se istraži uticaj 5-HTTLPR na morfologiju i aktivnost mozga. U zdravoj populaciji kod kratkog alela 5-HTTLPR uočen je smanjen volumen sive mase amigdala i perigenualnog cinguluma (Pezawas et al, 2005), uz pojačanu aktivnost amigdala, kako u miru (Rao et al, 2005.), tako i kao reakcija na stimulse koje potenciraju strah (Hariri et al, 2002.). Opisana je i pojačana povezanost amigdala sa ventromedijalnim prefrontalnim korteksom (Heinz et al, 2005), kao i smanjena frakciona anizotropija u fascikulusu uncinatusu (neuronski put koji povezuje amigdale sa orbitalnim i medijalnim prefrontalnim korteksom) (Pacheco et al, 2009). Ti nalazi su replikovani i u istraživanjima na pacijentima obolelim od depresije (Dannlowski et al, 2007.).

Niz istraživanja je takođe pokazalo da osobe sa kratkim alelom 5-HTTLPR imaju pojačanu sekreciju kortizola u stanjima stresa (Gotlib et al, 2008.; Way et al, 2010), što može potencijalno biti pravac ka spajanju monoaminske hipoteze i hipoteze o poremećaju hipotalamo-hipofizne ose u nastanku depresije (Pariante et al, 2008.).

Ipak, neophodan je oprez u tumačenju rezultata svih istraživanja koja izučavaju polimorfizame (pa tako i 5-HTTLPR), iz najmanje dva razloga:

1. Uticaj etničke pripadnosti i značajne razlike u frekvenci alela među različitim rasama. Prema nekim istraživanjima nađeni su čak i dijametralno suprotni efekti kratkog i dugog alela 5-HTTLPR međurazličitim etničkim grupama. Tako je novo istraživanje u kineskoj populaciji koja, za razliku od evropske populacije, ima veću frekvencu kratkog alela, pokazalo da je u ovoj populaciji dugi alel onaj koji razvija predispoziciju ka anksioznom ponašanju (Hanetal, 2013).
2. Mogućnost da aleli nisu prosto „dobri“ i „loši“, kako često čak i naučnici vole da koncipiraju rezultate zbog jednostavnosti, već da deluju kroz složene interakcije, koje tek treba da se razumeju. Tako je nedavno istraživanje pokazalo da osobe koje su imale stresno detinjstvo i boluju od bipolarnog poremećaja, imaju značajno češće pokušaje samoubistva ukoliko imaju kratki alel. To je u skladu sa većinom dosadašnjih istraživanja, ali u slučaju da nema značajnijeg stresa u detinjstvu bipolarni pacijenti sa kratkim alelom imaju značajno manju verovatnoću za pokušaj samoubistva, tako da u relativno bezbednim, nestresogenim okolnostima dugi alel postaje opasniji i pogoršava prognozu (Benedetti et al, 2014).

1.2.2.2. Neurotropni faktor dobijen iz mozga

Neurotropni faktor dobijen iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*; BDNF) je neurotrofin kodiran od strane istoimenog gena. On pripada familiji neurotrofičnih faktora, zajedno sa nervnim faktorom rasta (engl. *nerve growth factor*; NGF), neurotrofinom-3 (engl. *neurotrophin-3*; NT3) i neurotrofinom-4 (engl.

neurotrophin-4; NT4 ili NT-4/5). Pokazano je da oni promovišu rast i preživljavanje neurona u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Huang et al, 2001.). Vezuju se za p75NTR receptor i za 3 člana familije tirozin kinasnih receptora (Trk) sa različitim afinitetom (NGF je specifičan za TrkA, BDNF i NT4 za TrkB, i NT3 za TrkC)(Reichardt, 2006). BDNF je drugi otkriveni neurotrofični faktor i do danas je najviše izučavan (Barde et al, 1982). Ono što ga donekle izdvaja i čemu duguje takvu “popularnost” u naučnim krugovima je široka paleta bolesti koje su povezane sa promenama njegove ekspresije ili nekim od do sada otkrivenih polimorfizama gena koji ga kodira (Tabela 3).

Tabela 3. Bolesti i reference u kojima je izučavan i pokazan značaj BDNF

Astma	Andiappan et al, 2011.
Gojaznost	Cordeira et al, 2014.
Rettov sindrom	Ben Zeev et al, 2009.
Hantingtonova bolest	Zajac et al, 2010.
Demencija	Weinstein et al, 2013.
Alchajmerova bolest	Nagata et al, 2013.
Epilepsija	Hong et al 2013.
Shizofrenija	Niitsu et al, 2013.
Bipolarni poremećaj	Grande et al,2013.
Opsesivno kompulzivni poremećaj	Hemmings et al, 2013.
Zavisničko ponašanje	McGinty et al, et al, 2010.

To se lako može povezati sa njegovom ulogom u mozgu i na periferiji koja ga čini nužnim za preživljavanje jedinke (Erickson et al, 1996). Kao i drugi neurotrofični faktori i BDNF ima uticaj na preživljavanje i rast neurona i do sada je otkriveno da taj efekat ispoljava u vestibularnom ganglionu (Fan et al, 2000), hipokampusu (Minichiello et al, 1996.), cerebelumu (Minichiello et al, 1996), slojevima korteksa II, III, V i VI (Alcatara et al, 1997), strijatumu (Alcatara et al, 1997), talamusu (Alcatara et al, 1997) i vizuelnom korteksu (Ernfors et al, 1994). Ubrizgavanje BDNF u specifične delove mozga miševa

pospešivalo je razvoj olfaktornog bulbusa (Zigova et al, 1998) i hipotalamusa (Pencea et al, 2001). Između ostalog, BDNF ima direktan uticaj na memoriju izazivanjem neurogeneze u nukleusu dentatusu hipokampusa (Bekinschtein et al, 2008).

1.2.2.2.1. Gen koji kodira neurotropni faktor dobijen iz mozga

Gen koji kodira protein takođe nosi naziv *BDNF* i nalazi se na hromozomu 11p. On transkribuje 8 iRNK koje imaju suptilne razlike u strukturi i mestu transkripcije (mozak, srce ili pluća) (Timmusk et al, 1993). Brojni funkcionalni polimorfizmi otkriveni su i istraživani u okviru BDNF (Binder et al, 2004), a najviše istraživan je Val66Met polimorfizam (rs62659 u okviru kojeg se na kodonu 66 nalazi valin ili metionin zavisno od toga da li je u DNK nizu prisutan guanin ili adenin čime se ta šifra menja).

1.2.2.2.2. Neurotropni faktor dobijen iz mozga i depresivni poremećaj

Depresija je jedna od bolesti koja je povezivana sa sekrecijom BDNF. Već sredinom devedestih godina prošlog veka ustanovljena je veza između smanjenja sekrecije BDNF u hipokampusu pod uticajem hroničnog stresa (Smith et al, 1995). Uočeno je da to direktno dovodi do atrofije hipokampusa što i jeste jedan od nalaza kod pacijenata sa depresijom (Fisch et al, 2012). U istraživanjima je pokazano da infuzije BDNF direktno u mozak životinja kod kojih je u stresnim uslovima izazvan model depresije, uzrokuju povlačenje depresije (Siuciak et al, 1997). Nalazi da antidepresivi i fizička aktivnost povećavaju koncentraciju BDNF u hipokampusu životinja (Russo-Neustadt et al, 2000), dodatno su učvrstili pretpostavljenu vezu i čak inicirale „neurotrofinsku hipotezu“ nastanka depresije (Duman et al, 1997). Iste korelacije pokazane su i kod pacijenata lečenih elektrokonvulzivnom terapijom (Okamoto et al, 2008) ili deprivacijom spavanja (Gorgulu et al, 2009). Ipak, ni hipoteza sa BDNF nije bez kontroverzi, tako da je nedavna meta analiza potvrdila da postoji veza depresivnog

poremećaja i koncentracije BDNF u serumu, ali i da je povezanost značajno slabija nego što se prvobitno pretpostavljalo (Molendijk et al, 2013).

Neke studije pokazale su da fiziološki endofenotipovi koji su posledica Val66Met polimorfizma pokazuju slične karakteristike i uticaj na hipokampus (Savitz et al, 2009) što je povezivano sa depresivnim poremećajem (Rybakowski, 2008; Brown et al, 2013). Ipak, nova meta analiza je osporila taj nalaz (Harrisberger et al, 2014). Istraživanja uticaja ovog polimorfizma u depresiji su takođe često oprečna. Meta analiza 14 studija pokazala je da met alel val66met polimorfizam povećava predispoziciju ka razvoju depresije, ali samo u muškoj populaciji, dok u ukupnom uzorku nije dobijen pozitivan nalaz (Verhagen et al, 2010). Druga meta analiza pokazala je povezanost met alela u interakciji sa stresnim događajima ka razvoju depresije (Hosang et al, 2014), dok treća nije našla povezanost depresije i val66met polimorfizma (Gyekis et al, 2013). Takođe, nalazi nekih studija pokazali su da je val alel onaj koji razvija povećan rizik ka depresivnom poremećaju (Chen et al, 2013.).

1.2.2.3. Katehol-O-metiltransferaza

Katehol-O-metiltransferaza (engl. *catechol-O-methyltransferase*; COMT) je enzim koji služi za degradaciju kateholaminskih neurotransmitera (dopamin, epinefrin, norepinefrin) putem metilacije (drugi način degradacije kateholamina je deaminacija posredstvom monoamine oksidaze). COMT je otkriven još 1957. godine (Axelrod, 1957), ali zbog izuzetno značajne uloge je do danas predmet izučavanja. Posebno su brojni radovi koji povezuju varijacije u genu koji kodira COMT (*COMT*) i njihova uloga u shizofreniji (Green et al, 2014) i kod osoba koje zloupotrebljavaju kanabis (Batalla et al, 2013), kao i u interakcijiova tri faktora (Vinkers et al, 2013). Usled uočene uloge dopamina i prefrontalnog korteksa u razvoju hiperkinetskog poremećaja (šifra F90 prema MKB-10 klasifikaciji) prirodno je sledovalo istraživanje uloge COMT gena u nastanku ovog poremećaja (Sun et al, 2013.). U neurologiji je značajna uloga COMT u terapiji parkinsonizma (Yin et al, 2013). Pokazana je i veza između genetskih varijacija

COMT i različitih vrsta memorije (pre svega radne) (Julio-Costa et al, 2013) i bola (Cargnin et al, 2013).

1.2.2.3.1. Gen koji kodira za katehol-O-metiltransferazu

COMT kodira istoimeni gen koji se nalazi na hromozomu 22. Kao i *SERT* i *BDNF* i *COMT* ima brojne izučavane polimorfizme, od kojih se po broju objavljenih pozitivnih nalaza ističe Val158Met (rs4680), gde se nalazi funkcionalna mutacija valina u metionin u poziciji 158. Enzim sa valinom vrši katabolizam dopamina četiri puta brže od varijante sa metioninom (Chen et al, 2004), ali je ekspresija met varijante češća u mozgu (Zhu et al, 2004).

1.2.2.3.2. Gen koji kodira za katehol-O-metiltransferazu i depresivni poremećaj

Neke od sfera koje su najčešće poremećene kod depresivnih pacijenata su povezane sa funkcijom dopamina: emocije i motivacija (Ashby et al, 1999; Blackburn et al, 1992), osećaj nagrađenosti (Wise, 1978) i pažnja (Nieoullon, 2002). I u praksi se pokazalo da supstance koje smanjuju količinu dopamina u mozgu ili su dopaminski antagonisti, dovode do depresivnog raspoloženja (Bressan et al, 2002; Verhoeff et al, 2003). Posledično su se mnoge studije usmerile na izučavanje COMT gena u depresiji, a posebno Val156Met polimorfizma.

Rezultati su bili raznovrsni. Veliki broj studija nije našao direktnu vezu u učestalosti neke od alelskih varijanti i depresije (Frisch et al, 1999; Henderson et al, 2000; Cusin et al, 2002; Serretti et al, 2006; Wray et al, 2008; Kunugi et al, 1997), ali postoje i one sa pozitivnim nalazima. Nažalost, pozitivni nalazi su nedovoljno jasni, uz postojanje i onih koje ukazuju na Met alel kao varijantu koja povećava podložnost za depresiju (Mandelli et al, 2007; Ohara et al, 1998), ali i suprotnih koje su dobile Val varijantu kao alel podložnosti za depresiju (Massat et al, 2011; Massat et al, 2005). Druga vrsta često

rađenih studija sa ovim genom su studije koje su izučavale kako ovaj polimorfizam utiče na terapijski odgovor na antidepresive. Ponovo, rezultati su heterogeni: neke studije ukazuju na Met homozigotijukao prediktor bržeg reagovanja (Baune et al, 2008; Benedetti et al, 2009; Benedetti et al, 2010; Spronk et al, 2011), dok su druge pokazale da pacijenti sa Val homozigotnom varijantom brže i bolje reaguju na antidepresive (Szegedi et al, 2005; Arias et al, 2006), uz nekoliko negativnih rezultata (Gudayol-Ferre et al, 2010; Illi et al, 2010;).

Morfološke studije ukazuju da postoje suštinske razlike u aktivaciji mozga kod pacijenata sa jednom ili drugom varijantom. Tako nosioci Met alela imaju jaču aktivaciju moždanog stabla, dorzomedijalnog prefrontalnog korteksa, amigdala, bazalnih ganglija i prednjeg cingularnog korteksa kada osećaju strah, a smanjenje prilikom osećanja sreće (Williams et al, 2010). Dve studije su na isti način dobile rezultat da Met homozigoti imaju jaču aktivaciju desnog ili bilateralnih amigdala prilikom prikazivanja neprijatnih slika (Rasch et al, 2010; Lonsdorf et al, 2011).

1.3. Morfološke osnove depresije

1.3.1. Tehnike magnetne rezonance

Magnetna rezonanca (MR) je vizuelizaciona tehnika snimanja unutrašnjosti tela. Prvi snimak načinjen MR-om objavljen je početkom sedamdesetih godina prošlog veka (Lauterbur, 1973). Koristi se istraživački u anatomiji (strukturna) i fiziologiji (funkcionalna), dok u kliničkim granama medicine služi za otkrivanje patoloških promena, procesa, povreda i sl. MR radi po principu magnetnog polja i ekscitacije atoma vodonika u telu. Naime, aparat stvara jako magnetno polje oko dela tela koje je predviđeno za snimanje. To ekscitira atome vodonika koji su sastavni deo molekula vode. Tako ekscitirani atomi vodonika stvaraju radio talase koje mašina detektuje. Orijentacija snimka se kontroliše variranjem osnovnog magnetnog polja gradijentnim namotajem koji

se veoma brzo uključuje i isključuje i stvara karakterističan šum NMR snimanja. Kontrast između dva različita tkiva se određuje brzinom kojom se ekscitirani atomi vraćaju u stanje ekvilibrijuma. Jačina magnetnog polja zavisi od aparata, meri se u Teslama (T) i kreće se između 0,7-7 T. Aparat koji je korišćen u našem istraživanju ima 1,5 T, što je i najčešće korišćena jačina aparata u dosadašnjim istraživanjima. Kontraindikacije za snimanje MR su kohlearni implant, srčani pejsmejker, određeni hirurški implanti, šrapneli ili drugi metalni strani objekti u telu. Samo snimanje se smatra bezbednim i bez značajnih neželjenih efekata za pojedinca.

U toku snimanja ili obradi samih rezultata postoje značajne varijacije zavisno od rezultata koji se žele postići ili fenomena koji se žele istraživati.

Za otkrivanje patoloških promena tipa karcinoma često se koristi MR sa kontrastom. Oralnim ili intravenoznim ubrizgavanjem kontrastnog sredstva (najčešće zasnovano na gadolinijumu) menja se vreme relaksacije atoma u tkivu.

Funkcionalnom magnetnom rezonancom mogu da se detektuju promene u količini krvi koje određeno tkivo prima čime se meri reagovanje delova mozga na stimuluse. To se zasniva na ideji da deo mozga koji se u trenutku koristi ima veću potrebu za kiseonikom, što se obezbeđuje povećanjem protoka krvi. Mašina zatim registruje povećanje protoka krvi u tom delu mozga usled povećane količine kiseonika koja dolazi sa tom krvlju.

U ovom istraživanju korišćena je metoda morfometrije zasnovane na vokselu, frakciona anizotropija i analiza anizotropije koja se zove traktografija, kao i izučavanje debljine sive mase.

1.3.1.1. Morfometrija zasnovana na vokselima

Morfometrija zasnovana na vokselima je metoda obrade snimaka mozga načinjenih MR-om (Ashburner&Friston, 2000). Prvi put je opisana 1995 (Wright et al, 1995). To je automatizovana metoda koja koristi statističke modele za uočavanje razlika u veličini određenih struktura mozga među grupama (najčešće pacijenata i kontrola). Zasebno analizira belu masu, sivu masu i cerebrospinalni likvor, zavisno od interesa istraživača. Statistički se obrađuje svaki voksel pojedinačno u snimku da bi se uočile razlike među grupama. Da bi se izbegle greške usled standardnih razlika u veličini mozga među pojedincima i polovima, u okviru metode se uvek radi specijalna normalizacija, koja omogućava da mozgovi različitih veličina mogu da se porede jedni sa drugima. Ranije je za izučavanje svake željene oblasti mozga (regija od interesa; engl. „*region of interest*“ ili ROI; npr. ROI amigdale, hipokampusa itd.) ona morala manuelno da bude obeležena na snimku, dok danas postoji metoda automatizovanog razdvajanja i obeležavanja moždanih snimaka na 34 ROI (Desikan et al, 2006.).

1.3.1.2. Frakciona anizotropija i traktografija

Frakciona anizotropija (FA) i traktografija je metoda koja se koristi za analizu bele mase (engl. *diffusion tensor imaging*; DTI). U kliničkoj praksi koristi se od sredine devedestih godina prošlog veka, a danas je broj istraživanja koja koriste ovu metodu preko 1000 godišnje. Ova metoda koristi karakteristiku kretanja vode u beloj masi, koja će dominantno ići niz i uz akson, a ređe ka membranama i zove se anizotropija. Ovim se postiže da se u beloj masi definišu putanje aksona i samim tim uoče veći neuronski putevi i njihovo stanje bilo pojedinačno ili u grupi. Metoda obrade difuzionih snimaka kojom se meri stanje tih puteva zove se traktografija (Catani et al., 2012). Postoje 4 parametra koje traktografija meri: a) frakciona anizotropija, b) srednja difuzivnost, c) radijalna difuzivnost, d) aksijalna difuzivnost. Vrednost aksijalne difuzivnosti se smanjuje kada su aksoni oštećeni ishemijom. Vrednost radijalne difuzivnosti se povećava kod

demijelinizujućih bolesti (Shizukuishi et al, 2013). Dve osnovne tehnike se kotiste za analizu DTI: a) regije od interesa, b) analiza zasnovana na vokselima. Prva se fokusira na specifične oblasti mozga, dok druga analizira celokupan mozak. Ipak, ROI tehnika je senzitivnija od standardne analize zasnovane na vokselima. Ta razlika unazad nekoliko godina ne postoji, od uvođenja «*tract-based spatial statistics*» (TBSS) softverskog paketa za analizu zasnovanu na vokselima (Chanraud et al, 2010).

1.3.1.3. Debljina sive mase

Metoda kojom se automatizuje merenje debljine kore tj. sive mase celog mozga i statistički obrađuju razlike među grupama, uključujući zasebno obrađivanje za sivu masu u različitim delovima mozga, zove se određivanje debljine sive mase (engl. *cortical thickness*) (Fischl&Dale, 2000). Ova metoda je zasnovana na proceni granica bele i sive mase i sive mase i pie mater pomoću «multiscale analysis».

1.3.2. Dosadašnja saznanja o depresiji korišćenjem nuklearne magnetne rezonance

Veliki problem u izučavanju depresivnog poremećaja nuklearnom magnetnom rezonancom je mala ponovljivost pozitivnih nalaza, kao i česti negativni nalazi.

Najrasprostranjenija metoda u istraživanju depresivnog poremećaja je morfometrija zasnovana na vokselu. Značajan broj radova ukazao je na smanjen volumen hipokampusa, frontalnog režnja, orbitofrontalnog korteksa, strijatuma i cingulatnog korteksa kod pacijenata sa depresijom (predominantno prednjeg), što je potvrdio i veći broj meta analiza (Kempton, 2011; Laio, 2013).

Studije DTI ukazale su na smanjenu FA kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u oba frontalna režnja, desnom fuziformnom girusu i desnom okcipitalnom režnju. Takođe, ukazano je da kod pacijenata sa depresijom postoji poremećaj desnog donjeg longitudinalnog fascikulusa, desnog donjeg fronto-okcipitalnog fascikulusa, desne

posterioarne talamičke radijacije i intrahemisferičnih vlakana koja idu kroz koleno (genu) i telo korpusa kalozuma (Liao et al, 2013).

Debljina sive mase je metoda koja značajno dobija na zamahu u poslednje tri godine, te stoga još uvek ne postoje meta analize, a do sada objavljena istraživanja su raznolikih rezultata i dizajna.

Regije kore mozga koje su se u dosadašnjim istraživanjima depresije razlikovale u odnosu na kontrolne osobe su: smanjenje zapremine orbitofrontalnog korteksa i povećanje zapremine temporalnih polova, prednjeg kaudatusa i posteriornog cingulatnog korteksa (Eijndhoven et al, 2013), smanjenje zapremine desnog dorzomedijalnog prefrontalnog korteksa, gornjeg temporalnog girusa, srednjeg/posteriornog cingulatnog korteksa i dorzolateralnog prefrontalnog korteksa (van Tol MJ et al, 2013), smanjenje zapremine kaudalnog prednji cingulatni girus (Han et al, 2014), tanji medijalni orbitofrontalni korteks, prednjeg cingulatnog korteksa, dorzolateralnog i dorzomedijalnog prefrontalnog korteksa, posteriornog temporalnog i parijetookcipitalnog korteksa, kao i bazalnih ganglija i cerebeluma (Grieve et al, 2013). Opisane su i razlike među samim pacijentima u vidu smanjenja zapremine sive mase u levom dorzolateralnom i ventrolateralnom prefrontalnom korteksu, kao i u prednjem cingulatnom girusu kod suicidalnih u odnosu na nesuicidalne pacijente (Wagner et al, 2012). U istraživanju razlika kod pacijenata sa depresivnim poremećajem sa ranim i kasnim početkom, nakon kontrolisanja za broj epizoda, trajanje bolesti, težinu kliničke slike i pol, uočene su razlike u oba zadnja cingulatna girusa, parahipokampalnim girusima, desnom prekuneusu, desnom lingvalnom i desnom fuziformnom girusu (Truong et al, 2013). Lan je u svom istraživanju ukazao na različite promene u debljini sive mase između pacijenata sa depresivnim i bipolarnim poremećajem (Lan et al, 2014).

1.3.3. Transkranijalna ultrasonografija

Transkranijalna (parenhimska) ultrasonografija (TCS) je ultrazvučna metoda kojom se snima moždano tkivo i njegova ehogenost kroz lobanju. Koristi se u istraživačke

svrhe već preko dve decenije (Becker et al, 1994), dominantno za vizuelizaciju srednjeg mozga, ali i bazalnih ganglija, prednje i lateralnih komora (Berg et al, 2008).

1.3.3.1. Dosadašnja saznanja o depresiji korišćenjem transkranijalne ultrasonografije

U depresiji je ova do sada malo upotrebljavana metoda, pre svega fokusirana na hipohogenost sistema rafe jedara u moždanom stablu kao potencijalnog markera depresivnosti (Berg et al, 2008). Iako je do sada urađen relativno mali broj istraživanja sa TCS u depresiji, sve osim jedne pokazale su značajno smanjenu ehogenost kod depresivnih pacijenata u poređenju sa kontrolama (Becker et al, 1994; Becker et al, 1995; Walter et al, 2007; Walter et al, 2007a; Budišić et al, 2010; Ghourchian et al, 2014; Zhang et al, 2015). Važno je istaći da do sada nisu kombinovana istraživanja genetske osnove depresije i TCS nalaza.

1.3.4. Morfološka istraživanja korišćenjem modela interakcije gena

Dosada su se samo dva istraživanja bavila interakcijom BDNF Val66Met, COMT Val158Met i SERT 5-HTTLPR polimorfizama, koji su korišćeni u ovom istraživanju. Grupa Pezawasa posmatrala je uticaj aditivnog efekta ova tri polimorfizma na hipokampus u zdravoj populaciji (Rabl et al, 2014). Drugo istraživanje je na malom uzorku (26 depresivnih pacijenata i 27 kontrola) istraživalo interakciju ova tri polimorfizma na zapreminu hipokampusa, ali bez pozitivnog nalaza (Phillips et al, 2015).

Pored ova dva istraživanja koja su izučavala sva tri alela zajedno, objavljeno je još svega 6 radova koji su izučavali morfološke promene nastale interakcijom dva (bilo koja) gore nabrojana polimorfizma i sva su rađena isključivo u zdravoj populaciji.

Dva istraživanja izučavala su međusobne efekte alela *5-HTTLPR* i *BDNF* val66met. Jedno od istraživanja je koristilo samo zdrave pojedince i morfometriju zasnovanu na vokselu (Pezawas et al, 2008.), a drugo zdrave pojedince i osobe u remisiji

od depresivnog poremećaja uz upotrebu funkcionalne magnetne rezonance (Wang et al, 2012.). Prvo je našlo da je volumen prednjeg cingulatnog girusa značajno smanjen kod osoba koje su nosioci kratkog (s) alela *5-HTTLPR*, ali samo u prisustvu *BDNF* val homozigotije, zaključujući da je ovo kombinacija koja povećava rizik za razvoj depresivnog poremećaja. S druge strane, istraživanje rađeno funkcionalnom magnetnom rezonancom koje je koristilo tehniku prezentovanja slika (od kojih su neke bile tužne) i beleženja koji delovi mozga se aktiviraju na date stimuluse, je dobilo da su osobe koje su nosioci s alela *5-HTTLPR* i met alela val66met *BDNF* imale izraženiju aktivaciju na tužne stimuluse u subgenualnem cingulatnom korteksu i posteriornom cingulatnom girusu. Ova grupa autora je ovu kombinaciju akcentovala kao rizičnu.

Tri rada su istraživala interakciju *5-HTTLPR* i *COMT* val158met. Prvo objavljeno nije imalo pozitivan nalaz (Lonsdorf et al, 2011). Sledeće godine je objavljeno istraživanje koje je ukazivalo na interakciju kratkog alela *5-HTTLPR* i Met alela *COMT* Val158Met. Istraživanje je rađeno korišćenjem funkcionalne magnetne rezonance kod zdravih osoba i uz pokazivanje slika sa izrazima lica koja prikazuju strah, tugu, sreću i ljutnju. Osobe koje su nosioci ova dva alela su pri obradi slika sa uplašenim facijalnim ekspresijama imale smanjenu efektivnu konektivnost obostrano u fuziformnim/unutrašnjim okcipitalnim regionima, desnom gornjem temporalnom girusu/gornjem temporalnom sulkusu, inferiornom/srednjem prefrontalnom korteksu i desnoj amigdali (Surguladze et al, 2012). Poslednje do sada objavljeno istraživanje je koristilo morfometriju zasnovanu na vokselima i ustanovilo je da osobe koje susimultani nosioci met alela *COMT* Val158Met i kratkog (s) alela *5-HTTLPR* imaju istemorfološke karakteristike kao i osobe koje su simultano homozigoti za val alel *COMT* Val158Met i homozigoti za dugi (l) alel *5-HTTLPR*, u poređenju sa osobama koje imaju intermedijarnu kombinaciju alela (val homozigot/s nosioc; met nosioc/l homozigot). Ta razlika se ogleda u smanjenom volumenu sive mase obostrano u parahimpokampalnom girusu, amigdali, hipokampusu, vermisu cerebeluma i desnom putamenu/insuli kod prve grupe (Radua et al, 2014).

Jedino istraživanje interakcije *BDNF* i *COMT* korišćenjem MR je urađeno 2015. godine (Wang et al, 2015). Istraživači su se u ovoj studiji koncentrisali isključivo na frontostrijatalni sistem kod zdravih pojedinaca i na uticaj interakcije dva funkcionalna polimorfizma na tu oblast. Pokazali su da ovi aleli međusobno epistatski intereaguju na funkcionalnu konekciju ventralnog strijatuma i anteriornog cinguluma.

2. Ciljevi istraživanja

1. Utvrđivanje morfoloških razlika pacijenata sa depresijom u odnosu na kontrolnu grupu.
2. Utvrđivanje učestalosti BDNF Val66Met, COMT Val158Met i SERT 5-HTTLPR alela u depresivnoj i kontrolnoj grupi.
3. Utvrđivanje da li postoje specifične interakcije ili akumulacije alela koje su češće kod pacijenata sa depresivnim poremećajem nego kod kontrola.
4. Definisane homogenih grupa pacijenata i kontrola po genetskom profilu.
5. Utvrđivanje specifičnih kliničkih ili sociodemografskih karakteristika ovih homogenih grupa pacijenata i kontrola.
6. Utvrđivanje specifičnih morfoloških (VBM, traktografija, debljina sive mase) parametara ovih homogenih podgrupa.
7. Upoređivanje nalaza akumulacionog modela sa rezultatima svakog polimorfizma zasebno radi isključivanja lažno pozitivnih rezultata.
8. Utvrđivanje specifičnih morfoloških (VBM, traktografija, debljina sive mase) i kliničkih razlika depresivnih pacijenata sa i bez komorbiditeta anksioznog poremećaja.
9. Utvrđivanje genetskih, sociodemografskih i kliničkih parametara koji utiču na nalaz rafe jedra transkranijalnom ultrasonografijom kod depresivnih pacijenata.

3. Materijal i metode

3.1. Metod

Istraživanje je koncipirano kao hibridna studija, koja se zasnivala na studiji preseka i studiji slučajeva i kontrola.

Studija se odvijala u Institutu za mentalno zdravlje (IMZ; Beograd), Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije (KCS; Beograd), Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Scientific Institute and University Hospital San Raffaele u Milanu (Italija) u periodu od jula 2011. do septembra 2013. godine.

Istraživanje je sprovedeno po svim principima *dobre naučne prakse* Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Instituta za mentalno zdravlje i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1.1. Uzorak

U studijsku grupu uključeno je 85 konsektivnih, hospitalizovanih pacijenata Instituta za mentalno zdravlje (Beograd), kojima je postavljena klinička dijagnoza *prve depresivne epizode* ili *rekurentnog depresivnog poremećaja* (F32 i F33 prema MKB-10 klasifikaciji), starosti od 18 do 65 godina. Kriterijumi isključenja bili su sledeći: postojanje neurološkog komorbiditeta, mentalna retardacija, psihotične karakteristike (halucinacije i sumanutosti), alkoholizam, postojanje bilo kojeg psihijatrijskog komorbiditeta izuzev anksioznih poremećaja (konkretno generalizovani anksiozni poremećaj, panični

poremećaj, agorafobija i socijalna fobija) i poremećaja ličnosti, ugrađeni metalni predmeti u telo usled kojih snimanje MR-om ne bi bilo moguće, kao i sumnja na zloupotrebu medicinske službe sa ciljem sticanja tercijarne dobiti.

Istorija psihijatrijskog lečenja i poremećaja dobijena je autoanamnezom, ali i heteroanamnezom, kad god je to bilo moguće, uz kontinuiran napor da se tako dobijeni podaci uporede sa podacima iz dostupnih istorija bolesti i kartona, posebno u okviru dokumentacije Instituta za mentalno zdravlje (Beograd). Od 85 pacijenata, 81 su se tokom života lečili isključivo od nepsihotičnih depresivnih epizoda, anksioznih poremećaja i poremećaja ličnosti. Preostala četiri pacijenta lečila su se od opsesivno-kompulsivnog poremećaja, post-traumatskog stresnog poremećaja, alkoholizma i anoreksije nervoze, ali sve četvoro bili su najmanje 2 decenije u remisiji od pomenutih poremećaja, tako da je odlučeno da budu uključeni u aktuelno istraživanje. Svi pacijenti su u trenutku uključivanja u istraživanje uzimali psihijatrijsku terapiju. Svi su primali antidepresivne lekove, dok su svi osim dvoje uporedo primali i antipsihotike i/ili stabilizatore i/ili anksiolitike. Dodatno, 5 pacijenata dobijalo je kardiološku terapiju, jedan pacijent primao je antidijabetičnu terapiju, četiri pacijenta su u večernjim časovima primala hipnotike, dok je jedan pacijent uz dijabetičnu i kardiološku primao i terapiju eritromicinom, kao i hipnotik uvečernjim časovima.

Kontrolna grupa je uključivala 73 zdrava dobrovoljca, koja nisu imali podatke o bilo kakvom psihijatrijskom poremećaju i koji su upareni po polu i godinama sa studijskom grupom, tj. pacijentima sa depresivnim poremećajem.

3.1.2. Instrumenti kliničke procene

Dijagnoza je postavljana na osnovu kliničkog intervjua i sledećih instrumenata:

1. *Strukturisani dijagnostički intervju za kliničke sindrome I DSM IV-TR (SCID I)* (First et al., 2002) sprovodi ispitivač. Dijagnoze se postavljaju na osnovu DSM

IV-R (*Diagnostic and Statistics Manual IV-R*) i to isključivo za osovину I. Postoje tri verzije: za pacijente (engl. patient edition), za pacijente sa skriningom za psihotične simptome (engl. patient edition, with psychotic screening) i verzija za osobe koje nisu pacijenti (engl. non-patient edition).

2. *Hamiltonova skala depresivnosti* (HAMD) (Hamilton, 1960) je skala koja ne služi za postavljanje dijagnoze, već kod dijagnostikovanih individua kvantifikuje stepen depresivnosti. Skalu tokom intervjua popunjava ispitivač. Postoji više verzija, a u našem istraživanju je korišćena skala sa 21 skorom (veći ukupni skor, izraženija depresija). Iako je ova skala jedna od najkorišćenijih, postoje zamerke obzirom na nedostatak konsenzusa po pitanju interpretacije skorova (Kriston et al, 2011).
3. *Hamiltonova skala anksioznosti* (HAMA) (Hamilton, 1959) je skala koju je konstruisao isti autor koje je konstruisao i HAMD, a koja takođe ne služi za dijagnostikovanje, već za kvantifikovanje anksioznosti. I nju popunjava ispitivač i ima 14 skorova (veći ukupni skor, izraženija anksioznost).
4. *Bekov upitnik depresivnosti* (engl. Beck depression inventory; BDI) (Beck, 1961) je upitnik samoprocene depresivnih osećanja. Sastoji se od 21 tvrdnje, koja su prezentovane u 4 različite rečenice koje gradacijski iskazuju emocionalno stanje osobe koja popunjava upitnik. Za svako pitanje treba da se odabere jedna od ponuđenih tvrdnji za koju osoba misli da najbolje opisuje njena razmišljanja ili osećanja. Iako je ovaj upitnik veoma korišćen kako u kliničkoj praksi, tako i u istraživanjima, često se dovodi u pitanje validnost upitnika samoprocene (Gilbody et al, 2011).
5. *Upitnik o postojanju zlostavljanja u detinjstvu* (engl. Childhood Trauma Questionnaire; CTQ) (Bernstein et al, 2003) je retrospektivni upitnik samoprocene zlostavljanja u detinjstvu. Ova skala sa 28 pitanja ispituje potencijalno postojanje emocionalnog zlostavljanja, emocionalnog zapostavljanja, fizičkog zlostavljanja, fizičkog zapostavljanja i seksualnog zlostavljanja, uz inkorporirana tri pitanja minimizacije/poricanja.

3.2. Protokol istraživanja

Svim pacijentima bi se nakon što im se usmeno objasni istraživanje, dalo da pročitaju informisani pristanak i potpišu ga u slučaju da su saglasni da učestvuju u istraživanju. Popunjavanjem socio-demografskog upitnika i detaljnim semistrukturisanim intervjuom dobijani su podaci od značaja za ličnu i porodičnu anamnezu, kao i klinički tok i istorija prethodnih bolesti. Zatim bi ispitivač primenio skale SCID I, HAMD i HAMA. Nakon toga pacijenti su dobijali BDI i CTQ, sa mogućnošću da ih nose u svoje bolesničke sobe i vrate u narednih nekoliko dana kada ih popune. Dobijeni podaci čuvaju se kao poverljivi.

Zdravim dobrovoljcima je takođe prvo usmeno objašnjeno istraživanje, dobili bi da pročitaju informisani pristanak i potpišu ga u slučaju da su saglasni da učestvuju u istraživanju. Za razliku od pacijenata koji su bili ispitani svim instrumentima procene, kontrole su popunjavale samo socio-demografski upitnik, BDI i CTQ.

Svim kontrolama i pacijentima bi se izvadila krv u laboratoriji Instituta za mentalno zdravlje ili na Klinici za neurologiju odmah nakon potpisivanja informisanog pristanka. Krv su vadile medicinske sestre ustanove u kojoj je vađena krv.

Pacijentima i kontrolama rađen je NMR endokranijuma u Kabinetu za nuklearnu magnetnu rezonancu Klinike za neurologiju KCS po protokolu. Radili su se morformetrija zasnovana na vokselu, difuzioni tenzorski imadžing (engl. *diffusion tensor imaging*; DTI) i debljina kore mozga. Za pacijente je bio rezervisan termin četvrtkom u Kabinetu za nuklearnu magnetnu rezonancu Klinike za neurologiju KCS, tako da je maksimalna dužina između uključivanja u istraživanje i NMR snimanja pacijenta bila 7 dana, ali najčešće značajno kraće. Kontrole su dolazile do Kabineta za magnetnu

rezonancu gde bi prvo bio urađen kratak intervju sa dr M. Kostićem ili dr A. Munjizom da se provere isključujući kriterijumi i popunili socio-demografski podaci. Zatim bi pacijenti dobili da popune upitnike samoprocene BDI i CTQ i na kraju bi bio snimljen NMR.

3.3. Molekularno genetičke analize polimorfizama

Radene su molekularno genetičke analize 3 polimorfizma: rs6265; rs4680; 5-HTTLPR. U prvom koraku izvršena je izolacija DNK iz uzoraka periferne krvi ispitanika. Analiza polimorfizama rs6265 i rs4680 izvršena je primenom real-time PCR i korišćenjem TaqMan metodologije za genotipizaciju. Genotipizacija 5-HTTLPR je rađena kombinovanjem standardne PCR metode (za razlikovanje alela prema dužini) i restrikcione digestije (za određivanje prisustva varijante u okviru dužeg alela).

3.3.1. Izolacija genomske DNK

Kao biološki materijal za sprovođenje molekularno-genetičkih analiza, u ovoj studiji je korišćena genomska DNK iz limfocita periferne krvi. Izolacija genomske DNK je vršena upotrebom jednog od dva navedena komercijalna kompleta: QIAamp DNA mini kit (proizvođač QIAGEN, Nemačka) ili PureLink™ Genomic DNA Mini Kit INVITROGEN (proizvođač Life Technologies, USA). Prema specifikaciji proizvođača, ovi kompleti su namenjeni za brzu izolaciju ukupne DNK iz pune krvi, plazme, seruma, taloga leukocita, kosne srži, drugih telesnih tečnosti, kultivisanih ćelija, tkiva i forenzičkih uzoraka.

3.3.2. Protokol za brzu izolaciju genomske DNK komercijalnim kitovima

Procedura izolacije DNK iz limfocita periferne krvi upotrebom QIAamp DNA mini kit-a obuhvata nekoliko koraka i izvođena je prema uputstvu proizvođača, na sledeći način:

I korak – liziranje ćelija (limfocita) puferom za lizu (AL pufer) u prisustvu proteinaze K

- 20 µl proteinaze K se pipetom nanosi na dno mikrotube od 1,5 ml.
- Dodaje se 200 µl uzorka periferne krvi i 200 µl AL pufera i smeša se pulsno vorteksuje oko 15 sekundi.
- Inkubacija se vrši na 56°C u trajanju od 10 minuta, a zatim se kratko centrifugira.
- U smešu se dodaje 200 µl 96% etanola i pulsno se vorteksuje oko 15 s.

II korak – vezivanje molekula DNK za silikonsku membranu „mini spin“ kolonica

- Ukupna smeša od oko 620µl se pipetom prebacuje u QIAamp mini spin kolonicu.
- Kolonica se, sa postavljenom kolekcionom tubom, centrifugira 1 minut na 8000 rpm.
- Nakon centrifugiranja se odbaci kolekciona tuba sa tečnošću, dok se kolonica prebaci u čistu kolekcionu tubu.

III korak – ispiranje DNK radi odstranjivanja proteina i inhibitora PCR reakcija

- Dodaje se 500 µl pufera za ispiranje I i centrifugira se 1 minut na 8000 rpm.
- Odbaci se kolekciona tuba sa tečnošću i kolonica se prebaci u čistu kolekcionu tubu.
- Dodaje se 500 µl pufera za ispiranje II i centrifugira se 3 minuta na 13000 rpm.
- Odbaci se kolekciona tuba sa tečnošću i kolonica se prebaci u mikrotubu od 1,5 ml.

IV korak – eluiranje DNK

- Dodaje se 200 µl redestilovane vode u kolonicu i inkubira na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minuta.
- Centrifugira se 1 minut na 8000 rpm i odbaci se mini spin kolonica.
- Mikrotuba od 1,5 ml sa tečnošću (izolovana DNK, rastvorena u vodi) se čuva na +4 °C do određivanja koncentracije DNK, a zatim na -20°C na duži vremenski period.

Izolacija DNK primenom PureLink™ Genomic DNA Mini Kit-a je, takođe izvođena prema uputstvu proizvođača i u protokolu uključuje neznatne razlike koje se u glavnom odnose na vreme trajanja i broj obrtaja centrifugiranja. Pored toga, u prvom koraku koji

predstavlja liziranje ćelija u smešu se dodaje i 20 μ l supstance RNase A, dok su količine drugih primenjenih hemikalija ne razlikuju.

Prema specifikaciji proizvođača, ukoliko se kao materijal koristi 200 μ l pune krvi, očekuje se prinos od 6 μ g DNK. Količina dobijene DNK, kao i njen kvalitet su merene primenom metode spektrofotometrije.

3.3.3. Određivanje koncentracije ukupne DNK

Spektrofotometrija je metoda koja se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti ispitivane supstance u UV oblasti, odnosno merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Talasna dužina na kojoj nukleinske kiseline apsorbuju maksimum svetlosti je 260 nm, tako da količina apsorbovane svetlosti na toj talasnoj dužini odgovara koncentraciji DNK u ispitivanom uzorku.

Spektrofotometrijski se može utvrditi i čistoća samog uzorka DNK i na taj način proveriti uspešnost prečišćavanja tokom postupka izolacije. Na različitim talasnim dužinama UV spektra svetlost apsorbuju druge supstance koje se mogu naći u uzorku. Na talasnoj dužini od 230 nm, svetlost apsorbuju fenolni anjoni, tiocijanat i peptidi, na 280 nm najveća apsorpcija je od strane fenola i proteina, dok na prisustvo soli u uzorku ukazuje apsorbanca na 330 nm.

3.3.4. Protokol za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNK

Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane DNK je vršeno na aparatu BioPhotometer (proizvođač Eppendorf, Nemačka) i obuhvatalo je sledeće korake:

- 5 μ l uzorka DNK je razblaženo u redestilovanoj vodi u odnosu 1:10,
- Spektrofotometar je podešen za merenje dvolančane DNK koja je razblažena u navedenom odnosu,

- u plastičnu kivetu (proizvođač Eppendorf, Nemačka) je naneto 50 µl redestilovane vode,
- izmerena je apsorbance redestilovane vode, koja predstavlja rastvarač i podešena na aparatu kao „blank“,
- u plastičnu kivetu je naneto 50 µl razblaženja uzorka DNK,
- izmerena je apsorbance uzorka i prikazana je njegova koncentracija.

Nakon merenja apsorbance, osim koncentracije DNK, dobija se i podatak o odnosu apsorbanci na 260 nm i 280 nm, zatim na 230 nm i 260 nm, kao i apsorbance na 340 nm. Ukoliko je uzorak DNK dobrog kvaliteta prvi odnos A_{260}/A_{280} treba da bude između 1,8 i 2,0, dok drugi odnos A_{230}/A_{260} treba da bude manji od 0,5. Apsorbance izmerena na 340 nm (A_{340}) treba da bude što bliža nuli.

3.3.5. Analiza rs6265 i rs4680 metodom Real-time PCR (RT-PCR)

Real-time PCR (PCR u realnom vremenu) je postupak koji se temelji na standardnom PCR-u, ali se analiza produkata vrši kontinuirano tokom procesa amplifikacije, što omogućava pouzdanu kvantifikaciju. RT-PCR metodom detekcija PCR amplifikacije vrši se u eksponencijalnoj fazi, u kojoj se amplifikacija najbrže dešava, a reakcija je u ovoj fazi visoko specifična i precizna. U svakom ciklusu vrši se merenje fluorescencije, emitovane od strane fluorescentne boje, koja se koristi kao sistem za detekciju. RT-PCR pouzdaniji je od tradicionalnog PCR-a jer omogućava detekciju razlike u prinosu amplifikacije ispitivanih uzoraka od samo 2x, dok običan PCR detektuje razliku u amplifikaciji tek ako je ona 50x ili veća.

Polimorfizam koji potiče od razlike u jednom/ pojedinačnom nukleotidu (SNP), može se analizirati primenom RT-PCR metode. U tu svrhu najčešće se koristi TaqMan metodologija, koja podrazumeva da se pored specifičnih prajmera u sistemu nalazi i oligonukleotidna proba, koja je komplementarna tačno određenom segmentu DNK

lociranom između prajmera. TaqMan proba na svom 5' kraju ima vezanu reportersku boju (R), dok na 3' kraju ima prigušivač (Q). Kada je TaqMan proba slobodna u reakcionoj smeši ili vezana za DNK molekul, prigušivač blokira emisiju fluorescencije sa reporterske boje. Nakon denaturacije DNK u fazi hlađenja, kada se za DNK matricu vezuju prajmeri, dolazi do vezivanja i TaqMan probe za specifičan region na DNK (jedna TaqMan proba po jednom molekulu DNK matrice). Nakon toga u fazi elongacije Taq polimeraza 5'-3' polimeraznom aktivnošću dodaje nukleotide u nosintetisani lanac. U trenutku kada Taq polimeraza dospe do 5' kraja TaqMan probe, zahvaljujući svojoj 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti enzim uklanja prvi nukleotid probe sa DNK matrice. Ovim procesom udaljava se reporter od prigušivača i emituje se fluorescencija od strane reporterske boje.

U cilju genotipizacije kod polimorfizma pojedinačnih nukleotida kreiraju se dve TaqMan probe koje odgovaraju SNP alelima. Probe se razlikuju u jednoj bazi od interesa i obeležene su različitim bojama, te emituju različitu fluorescenciju. Ukoliko aparat detektuje samo jednu boju – prisutan je jedan alel u homozigotnom ili hemizigotnom obliku, dok detekcija obe boje označava prisustvo heterozigota. U ovoj studiji korišćeni su komercijalno dostupni TaqMan SNP Genotyping Assays za SNP rs6265 i rs4680 (Life Technology, USA) sa po dve TaqMan probe obeležene „VIC®“ i „FAM®“ fluorescentnom bojom. Setovi prajmera i probakreirani su od strane proizvođača na osnovu podataka o sekvencama humane DNK dostupnim u bazi National Center for Biotechnology Information. U reakciji amplifikacije upotrebljen je takođe komercijalno dostupan TaqMan RT-PCR Universal Master Mix (Life Technologies, USA). Analize su urađene na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), a rezultati RT-PCR su obrađeni primenom programa 7500 Software (Applied Biosystems, U.S.A.) koji je integrisan u uređaj.

Reakciona smeša je imala ukupan volumen od 15 µl, i sastav:

- 2x TaqMan RT-PCR master mix 7,50 µl
- 20x TaqMan assay (primer and probe mix) 0,75 µl

- DNK 2,25 mcl
- reH₂O do 15,00 mcl

3.3.6. Analiza polimorfizma 5-HTTLPR

Inserciono/delecioni polimorfizam 5-HTTLPR analiziran je metodom PCR (polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerizacije DNK) sa sledstvenom gel elektorforezom PCR produkata.

PCR reakcija omogućava amplifikaciju ciljanog regiona DNK uz upotrebu specifičnih oligonukleotidnih prajmera i termostabilnog enzima Taq polimeraze. Metoda je zasnovana na principima replikacije molekula DNK, a odvija se kroz tri osnovna koraka (denaturacija DNK, hibridizacija prajmera i sinteza novog lanca) koji se ciklično ponavljaju.

U PCR reakciji za analiza polimorfizma 5-HTTLPRsu korišćeni prajmeri sledeće sekvence (Maron et al, 2009):

Fw: 5'- TCCTCCGCTTTGGCGCCTCTTCC -3'

Rev: 5'- TGGGGGTTGCAGGGGAGATCCTG -3'

Ukupni volumen reakcione smeše za PCR je bio 15mcl, sa sledećim sastavom:

- Long Taq buffer 1,5mcl,
- dNTP mix (10mM) 0,3mcl
- LongTaq polymerase enzyme mix (Fermentas, 5 Units/mcl) 0,08mcl
- Prajmeri Fw i Rv (10pmol) po 0,5mcl,
- DNK 1,0 mcl
- re H₂O 11,12mcl

PCR reakcija je vršena u aparatu Verity (Life Technologies, USA). Uslovi PCR reakcije po „touch-down“ protokolu su bili:

1. početna denaturacija 95°C/10 min.,
2. 10 ciklusa: denaturacija 95°C/1 min., hibridizacija prajmera 65°C/1min.,elongacija72°C/1 min.,
3. 20 ciklusa: denaturacija 95°C/1 min., hibridizacija prajmera 65°C do 55°C (smanjenje temperature za 0,5°C po ciklusu) /1 min.,elongacija72°C/1 min.,
4. 10 ciklusa: denaturacija 95°C/1 min., hibridizacija prajmera 55°C/1 min.,elongacija72°C /1 min.,
5. završna elongacija 72°C/ 8 min.

PCR produkti su razdvajani putem gel-elektroforeze na 2% agaroznom gelupripremljenom sa fluorescentnom bojom SYBR® Safe (*Thermofisher*) Detaljan protokol je dat niže. Alelske varijante detektovane na osnovu dužine fragmenta su bile: „S“ (short) = 469bp, i „L“ (long) = 512bp. Genotipovi ispitanika su označavani kao: S/S,S/L ili L/L.

Kod nosilaca L alela je ispitivan i lokus rs25531, koji karakteriše polimorfizam jednog nukletida (A>G).Primenjen je restrikcioni enzim HpaII(*Fermentas*) sa sledstvenom gel-elektroforezom restrikcionih fragmenata. Enzim HpaII prepoznaje G alel i iseca PCR produkt, a veličina fragmenta je: $L_G = 404\text{bp} + 108\text{ bp}$

Ukupan volumen smeše za restrikcionu digestiju je iznosio 10mcl, a sastav je bio:

- 10xbuffer 1mcl
- HpaII 0,4mcl
- PCR produkt 8mcl
- re H₂O 0,5mcl

Smeša se inkubira preko noći na 37°C, a potom se restrikcioni fragmenti razdvajaju na 2,5% agaroznom gelu.

3.3.7. Protokol za pripremu i izvođenje agarozne gel elektroforeze

Dve osnovne komponente agarozne elektroforeze su agarozni gel i pufer za elektroforezu. U ovom istraživanju su korišćeni 1xTBE pufer (45mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8.0) i 2% (tj. 2,5%) gel od agaroze.

Priprema i izvođenje elektroforeze su vršeni na sledeći način:

- 0,6 g (tj. 0,75 g za 2,5% gel) agaroze je rastvoreno u 30ml 1xTBE pufera i zagrejano do ključanja,
- dodato je 3 μ l SYBR® Safe-a i smeša je ohlađena na približno 50 °C,
- dok je još uvek u tečnom stanju gel je izliven u kalup i postavljen je takozvani češalj kojim se u gelu prave udubljenja u koja se nalivaju uzorci,
- nakon hlađenja, češalj je uklonjen i gel je prebačen u kadicu za elektroforezu napunjenu 1xTBE puferom,
- prilikom nalivanja uzoraka na gel, 5 μ l svakog uzorka je pomešano sa bojom (bromfenolplavo i glicerol) koja omogućava uspešnije nalivanje uzoraka na gel i praćenje elektroforeze,
- uključeno je strujno kolo i podešeni su parametri elektroforeze na 80V u trajanju od 15 minuta,
- vizuelizacija rezultata je vršena tako što je gel izložen UV svetlosti, a dokumentacija rezultata fotografisanjem osvetljenog gela u mraku.

Sistem koji je korišćen za elektroforezu je HE 33 Mini Submarine (proizvođač GE Healthcare, Švedska), dok je za vizelizaciju korišćen UV Transilluminator (proizvođač HVD life sciences, Austrija).

3.4. Snimanja metodom nuklearne magnetne rezonance

Za snimanje mozga metodom MR korišćen je aparat jačine 1,5 T (Achieva, Philips Medical Systems, Best, Holandija). Kod svih ispitanika primenjene su sledeće sekvence MR:

1. Dual-eho (DE) spin-eho (SE) (engl. dual-echo turbo spin echo) sa sledećim parametrima: vreme ponavljanja (ili vreme repeticije) [TR]=3124 ms; vreme eha [TE]=0.02/0.1 sekundi; ugao odklona=90°; 88 susednih aksijalnih preseka debljine 3mm; veličine matriksa=256 × 246; polje snimanja (FOV)=240 mm².
2. Trodimenzionalna (3D) T1-TFE (engl. transient field echo) sekvenca sa antero-posteriornim smerom faze i sledećim parametrima: TR=7.09 ms; TE=3.23 ms; ugao odklona (engl. flip angle; FA)=8°; 180 susednih aksijalnih preseka veličine voksel=1 x 1 x 1 mm³; veličine matriksa=256 x 256x180; FOV=256 x 256 mm²; i
3. *Pulsed-gradient SE echo planar with sensitivity encoding* sekvenca sa sledećim parametrima: TR=6714 ms; TE=86 ms; 3300 susednih aksijalnih preseka debljine 2,6mm; broj akvizicija=1; posle rekonstrukcije SENSE, dimenzija matrice svakog preseka bila je 112×112, sa veličinom piksela u ravni=2x2x2,6 mm; i FOV=224×224 mm². Korišćeni su difuziono-kodirani gradijenti primenjeni u 65 nekolinearnih pravaca, korišćenjem sheme gradijenta koja je standard na ovom sistemu (prekomerni magnetni gradijent) i koja je optimalizovana da se vreme eha skрати što je moguće više (b faktor 1000 s/mm²). Obavljeno je zasićenje mastima da bi se izbegli artefakti zbog hemijskih pomeranja. Svi preseki su postavljeni da budu paralelni sa linijom koja povezuje krajnje inferoanteriorne i inferoposteriorne delove korpus kalozuma (CC).

3.4.1. Analiza snimaka dobijenih magnetnom rezonancom

Analizu snimaka MR obavljao je iskusni stručnjak koji nije znao identitet ili dijagnozu ispitanika. Opterećenje hiperintenzivnim lezijama bele mase BM (HLBM)

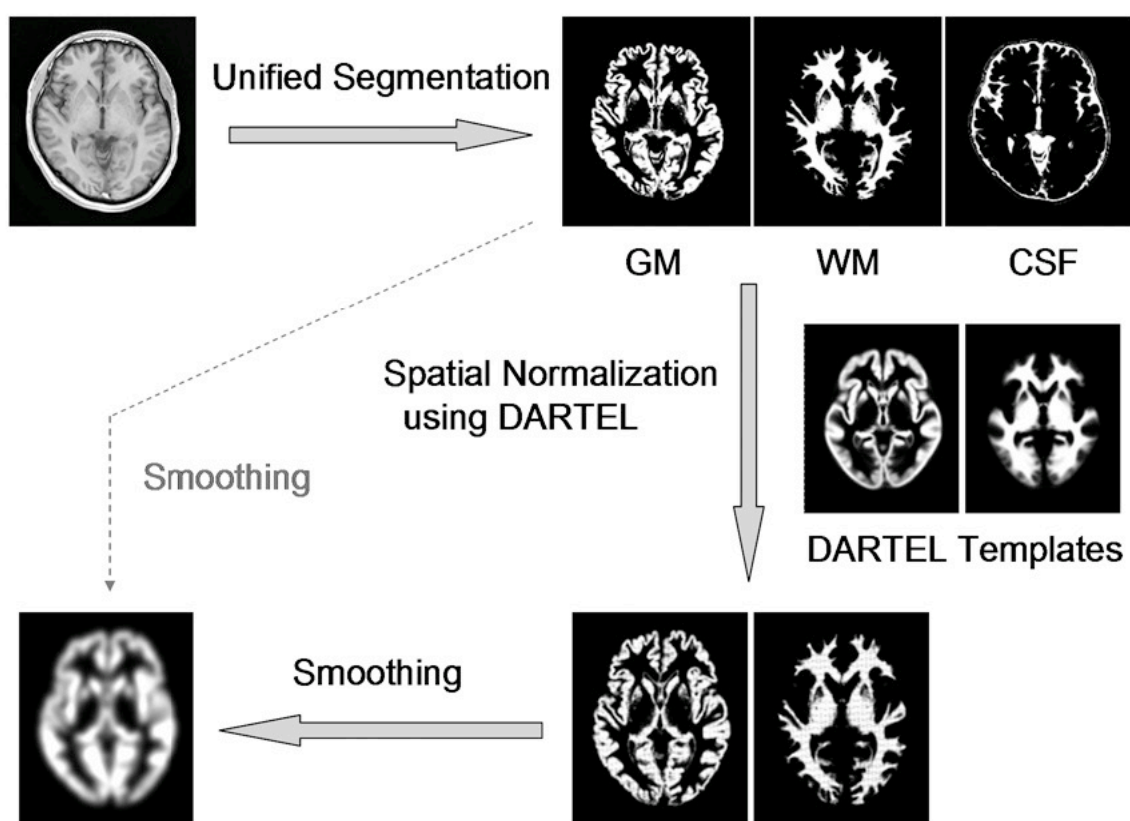
mereno je na snimcima T2 sekvence, korišćenjem softverskog paketa Jim (Verzija 5.0, Xinapse Systems, Northants, UK, <http://www.xinapse.com>).

3.4.1.1 Morfometrija zasnovana na vokselu (VBM)

Morfometrija zasnovana na vokselu (VBM) omogućava poređenje zapremine sive (SM) i bele mase (BM) između grupa ispitanika na osnovu broja vokselu koji se u ovim regionima detektuju. U ovoj studiji VBM je rađena korišćenjem SPM8 softvera (Statistical Parametric Mapping; Welcome Department of Imaging Neuroscience; London, VB) i difeomorfne anatomske registracije korišćenjem Liejeve eksponencijalne algebre (Diffeomorphic Anatomical Registration Exponentiated Lie Algebra; DARTEL) (Ashburner, 2007), čime se poboljšava lokalizacija i senzitivnost analize. Korišćeni su snimci dobijeni T1 sekvencom. Postupak obuhvata nekoliko koraka.

Prvo, pojedinačni snimci T1 sekvence segmentirani su pomoću standardnog modela segmentacije (Ashburner and Friston, 2005), takoda se dobiju mape verovatnoće SM, BM i cerebrospinalnu tečnost (CST), uz odstranjivanje tkiva skalpa, lobanje i venskih sinusa dure. Potom je izvršena prostorna transformacija i parametri segmentacije importovani su u DARTEL i striktno poravnate, a dobijena slika je segmentovana na SM, BM i CST korišćenjem parametara iz prethodnog koraka. Slike su potom prilagođene izotropnom vokselu veličine 1,5 mm. Segmenti SM su potom simultano registrovani pomoću brzog difeomorfog algoritma za registraciju slike (Ashburner, 2007). Dobijen je obrazac DARTEL, striktno poravnati segmenti su zatim iskrivljeni da bi se uklopili u zajednički DARTEL prostor, a dobijene slike su potom modulirane korišćenjem Jakobijanske determinante, kako bi se otklonile prostorne transformacije zapremine određenih delova mozga, koje se manifestuju u procesu normalizacije. Budući da se DARTEL proces uključuje u zajednički prostor koji je manji od prostora MNI, obavljene su i sledeće transformacije: modulirani snimci iz DARTEL-a su normalizovani na obrazac MNI korišćenjem metode fine transformacije procenjene iz DARTEL uzorka SM i a

priorimape verovatnoće za SM bez prilagođavanja izotropnom vokselu (<http://brainmap.wisc.edu/normalizeDARTELtoMNI>) (McLaren et al, 2010). Pre statističkih izračunavanja, slike su izravnate Gausovim filterom sa FWHM (engl. *full-width half-maximum*) od 8 mm. Tako se dobija usrednjena vrednost slike usklađena sa izotropnim vokselom. Svaki voksel tako predstavlja lokalnu „koncentraciju“ tkiva, uz vrednosti koje se kreću od 0 do 1. Ovim postupkom se osigurava konačna klasifikacija vokselu u odgovarajuće delove mozga (SM, BM i CST) (Slika 1).



Slika 1. Kompjuterska obrada snimaka morfometrije zasnovane na vokselima kroz procese segmentacije, normalizacije i izravnavanja
 Prema Takao H, Ohtomo K. Computational analysis of brain structure. ECR 2011, poster C-0763; doi 10.1594/ecr2011/C-0763

3.4.1.2. Merenje debljine kore mozga

Kortikalna rekonstrukcija i debljina korteksa (CT) određivani su na osnovu FFE 3D snimaka zasnovanih na T1 relaksacionom vremenu korišćenjem programa FreeSurfer za analizu slike, verzija 5.0 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>)_ENREF_36 (Fischl, 2000). Posle registracije Talairachovog prostora i normalizacije intenziteta, ovaj proces je uključio i automatsko skidanje nepotrebnih podataka sa lobanje, čime su uklonjene ekstracerebralne strukture, cerebelum i moždano stablo, korišćenjem hibridne metode koja kombinuje algoritme razvođa i površinske modele koji se mogu deformisati. Slike su potom pažljivo kontrolisane da bi se uočile eventualne greške u skidanju nepotrebnih podataka. Posle ovog koraka, slike su segmentirane u sivu masu (SM), belu masu (BM), cerebrospinalnu tečnost (CST), cerebralne hemisphere su odvojene, a subkortikalne strukture odvojene od kortikalnih komponenti. Granica BM/SM je izravnata, a površina deformisana po gradijentima intenziteta da bi se optimalno postavile granice između BM/SM i SM/CST - na taj način smo dobili površinu BM pia mater. Rezultati ovog postupka segmentacije vizuelno su kontrolisani, pa ako je bilo neophodno, doradjeni su ručno dodavanjem kontrolnih tačaka. Posle toga, rađena je inflacija površine i registrovanje u sferni atlas, a cerebralni korteks je podeljen u 34 regiona po hemisferi, na osnovu struktura girusa i sulkusa, kako su to opisali Desikan i saradnici (Desikan et al, 2006). I na kraju, CT je procenjen kao prosečna najkraća udaljenost između granice BM i površine pia mater. Mape površine generisane su po registrovanju kortikalnih rekonstrukcija svih ispitanika u zajedničku prosečnu površinu, koja je potom izravnavana korišćenjem Gausovog jezgra na bazi površina sa širinom polu-maksimuma od 10 mm.

3.4.1.3. Difuzioni tenzorski imidžing (DTI)

Snimci dobijeni difuzionom sekvencom korigovani su pomoću algoritma (white.stanford.edu/newlm/index.php-DTI_Preprocessing#dti) (Rohde et al, 2004) da bi se isključile distorzije usled vrtložnih struja i pokreta glave. Slike su potom

transformisane u MNI prostor. Šest akvizicija sa različitom orijentacijom difuzionog gradijenta spojeno je u jednu sliku.

Analiza snimaka DT MRI obavljena voksel po voksel korišćenjem alata DTIfit toolbox, koji je deo softverske biblioteke FMRIB Diffusion Toolbox u sklopu FSLv4.1.7. (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FDT>) i softvera JIM5 software (korekcija Edijevih struja) (Verzija 5.0, Xinapse Systems, Northants, UK, <http://www.xinapse.com>). Sa podataka ponderisanih difuzijom skinuti su svi nepotrebni podaci sa lobanje korišćenjem alata Brain Extraction koji je primenjen u FMRIBSoftwareLibrarypoznatijemkao FSL. Tako su dobijene mape srednje difuzivnosti (MD), frakcione anizotropije (FA), a izračunate su i mape aksijalne (axD) i radijalne difuzivnosti (radD) (Basser et al., 1996).

3.4.1.3.1 Traktografija

Startni voksel (engl. seed) za traktografiju cingulatnog snopa, korpusa kalozuma (ceo trakt, uključujući koleno, telo i splenijum), gornji longitudinalni (SLF), donji longitudinalni (ILF) i uncinatni fascikuli definisani su u prostoru Montreal Neurological Institute (MNI) na obrascu FA koji je odbijen od FSL, kako je već opisano (Agosta et al, 2013). Praćenje vlakana obavljeno je u nativnom prostoru DT MRI korišćenjem algoritma verovatnoće traktografije koji je implementiran u FSL (probtrackx), a koji se zasniva na Bajesovoj proceni parametara difuzije (Bedpostx) (Behrens et al, 2007). Praćenje vlakana započinjano je od svih voksela unutar maske startnog voksela u prostoru difuzije, da bi se dobilo 5,000 pojednostavljenih uzoraka dužine od 0,5 mm sa pragom krivine od 0,2. Mape trakta su potom normalizovane uzimajući u obzir broj voksela u maski startnog voksela. Dobijene maske su bile pragovi na vrednosti jednakoj 40% 95. percentila distribucije vrednosti intenziteta voksela uključenih u trakt. Ovaj postupak normalizacije omogućio nam je korekciju mogućih razlika između traktova zbog različitih veličina startnog voksela. Na ovaj način, isključen

je pozadinski šum i izbegnuto prekomerno restriktivno postavljanje praga kada je vrednost maksimalnog intenziteta bila ekstremna. Korišćenjem pristupa “jednog startnog voksel”, dobijena je rekonstrukcija celokupnog korpusa kalozuma, uključujući koleno, telo i splenijum, kao i bilateralnog anteriornog cinguluma, parahipokampalnog trakta, SLF, ILF i uncinatnog fascikulusa. Grupne mape verovatnoće dobijene su za svaki trakt da bi se vizuelno kontrolisala njihova anatomska tačnost za sve ispitanike. Za svaki trakt, u nativnom prostoru izračunavani su MD, FA, axD, i radD.

3.5. Transkranijalna parenhimska sonografija tkiva mozga

Za transkranijalnu sonografiju moždanog tkiva koristili smo kolor kodirani fazno organizovani ultrazvučni sistem, opremljen jednim transduktorom (sondom) od 2,5 MHz (ProSound Alpha 10, Aloca, Japan). Odabrani ultrazvučni parametri bili su dubina penetracije od 14-16cm i dinamički raspon od 45-50 dB. Jasnoća slike, kontrast i kompenzacija vremena podešeni su da se dobije najbolja slika. Pregled je obavljan kroz akustični otvor preaurikularne kosti i infratentorialne oblasti mozga u aksijalnim ravnima naginjanjem sonde. Ehogenost pontomezencefaličnog rafe sistema moždanog stabla procenjivana je bilateralnim transkranijalnim ultrazvukom (za dalje analize koristila se strana sa koje je vidljivost struktura bila bolja). Korišćenjem ehogenosti crvenog jedra (RN) kao reference, ehogenost rafe je semikvantitativno klasifikovana kao normalna (jednak intenzitet signala kao i RN) ili abnormalna ako (a) nije bilo rafe signala (nije bio vidljiv), ili (b) ako je bio oslabljene ehogenosti (ehogena linija rafe je bila prekinuta ili izgledala abnormalno kratka i tanka) (Walter et al, 2002, Krogias et al, 2011). Sve procene TCS radili su iskusni ispitivači koji nisu bili upoznati sa kliničkim podacima (slepi princip). U slučaju različite procene, ispitivači su zajednički dolazili do konsenzusa.

3.6. Statistička analiza

Za klinička merenja i merenja CT i DT MRI, rađene se analize varijanse (ANOVA) između grupa, uz Bonferonijevu korekciju ukoliko je poređeno više grupa istovremeno. Razlike u kategorijskim promenljivima procenjujane su korišćenjem testa hi kvadrata. Imajući u vidu potencijalno pridruženo dejstvo ukupne intrakranijalne zapremine (TICV), godina starosti i obrazovanja, u modelima logističke regresione analize izvršena su odgovarajuća podešavanja u cilju kontrole potencijalnih konfaunding faktora. Nivo verovatnoće od $p < 0,05$ smatran je statistički značajnim.

U obradi rezultata transkranijalne ultrasonografije, razlike u demografskim i kliničkim karakteristikama između grupa sa hipoehogenošću rafe, ili bez nje, procenjujane su analizom varijanse za kontinuiranu i neparametrijsku statistiku (test hi kvadrata i Man-Vitni test) za kategorijske podatke. Postepena diskriminaciona analiza korišćena je da se razvije model za predviđanje prisustva/odsustva hipoehogenosti rafe, gde su prediktori bili pol, prisustvo generalizovanog anksioznog poremećaja, socijalne fobije, paničnih napada, stavke 5 na Hamiltonovoj skali anksioznosti i učestalost kratkog polimorfizma 5-HTTLPR. Prediktori su rangirani po verovatnoći Valdovog testa hi kvadrata. Rezultati su smatrani statistički značajnim na nivou $p < 0,05$.

Kod pacijenata, Spirmanova korelacija je izvedena između debljine sive mase i difuziono tenzornih NMR rezultata (samo između regija koje su se pokazale kao značajne između grupa). Godine života su dodate u cilju kontrole konfaundinga.

Za statističku analizu korišćen je softverski paket za statistiku SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. Rezultati

4.1. Kliničke i sociodemografske karakteristike

Osnovne demografske i kliničke karakteristike ukupnog broja pacijenata i kontrola se nalaze u tabeli 4. Pacijenti imaju niže obrazovanje od zdravih kontrola. Pacijenti takođe imaju viši hereditet, zlostavljanje i depresivne skorove u odnosu na kontrole što su očekivani rezultati.

Tabela 4. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i kontrola

	Pacijenti	Kontrole	p
N	77	66	-
Starost u godinama	44,6 ± 10,6 (22-63)	45,4 ± 10,8 (23-63)	0,63
Godine početka simptoma	36,1 ± 12,7 (11-59)	-	-
Ženski pol	46 (60%)	35 (53%)	0,73
Obrazovanje	3,2 ± 1,0 (1-5)	4,4 ± 1,2 (2-6)	<0,001
Hereditet	28 (36.4%)	7 (10.6%)	<0,001
Ukupan skor Hamiltonove skale	22,9 ± 4,8 (11-36)	-	-
Ukupan skor Bekove skale	30,4 ± 12,2 (5-59)	2,2 ± 3,4 (0-21)	<0,001

4.2. Rezultati genetskih analiza

Od 85 pacijenata uključenih u istraživanje i 73 kontrole, osam pacijenata (9%) i 7 zdravih kontrola (9,5%) nisu imali urađenu potpunu genetsku, magnetnu ili kliničku

analizu. Prema tome, uzorak koji je korišćen za genetsko-morfološku analizu uticaja akumulacije gena sastojao se od 77 pacijenata i 66 kontrola.

S obzirom na relativno malu veličinu uzorka, za konačnu analizu nisu rađena oba homozigot alela i heterozigoti kao tri varijante koju može imati svaki učesnik istraživanja. Umesto toga ispitanici su podeljeni u dve grupe: nosioce alela (i homozigoti i heterozigoti sa određenim alelom) i homozigote za drugi alel. Tako posmatrano, svaki polimorfizam ima dve moguće kombinacije (npr. za BDNF bi jedna kombinacija bila Val homozigot i Met nosilac, a druga potencijalna kombinacija bila bi Met homozigot i Val nosilac). Obe potencijalne kombinacije su statistički analizirane za svaki polimorfizam i upoređena je učestalost polimorfizama kod pacijenata u odnosu na kontrole. Zatim su izabrane kombinacije koje su imale izraženiju razliku u učestalosti među pacijentima i kontrolama (tabela 5). U ispitivanom uzorku to su Val homozigot/Met nosilac za BDNF, Val homozigot/Met nosilac za COMT i S homozigot/L' nosilac za SERT.

Tabela 5. Raspodela alela na homozigote i nosioce i značajnost

<i>BDNF</i>	N (%)	N (%)	P razlike
Val66Val; Val66Met/Met66Met	53 (69%); 24 (31%)	32 (48%); 34 (52%)	0,01
Val66Val/Val66Met; Met66Met	71 (92%); 6 (8%)	65 (98%); 1 (2%)	0,12
<i>COMT</i>			
Val158Val; Val158Met/Met158Met	14 (18%); 63 (82%)	21 (32%); 45 (68%)	0,04
Val158Val/Val158Met; Met158Met	59 (77%); 18 (23%)	51 (77%); 15 (23%)	1
<i>SERT</i>			
5-HTTLPR S'S'; L'S'/L'L'	12 (16%); 65 (84%)	19 (29%); 47 (71%)	0,04

5-HTTLPR S'S'/L'S'; L'L'	64 (83%); 13 (17%)	52 (79%); 14 (21%)	0,53
-----------------------------	-----------------------	-----------------------	------

Sledeći korak bio je analiza interakcija ove tri potencijalne kombinacije u celokupnom uzorku. Na taj način dobijeno je 8 mogućih interakcija (Tabela 6).

Tabela 6. Raspodela mogućih 8 kombinacija sva tri alela i značajnost u distribuciji u poređenju pacijenata sa kontrolama

Redom BDNF-COMT-SERT alel	Broj i % pacijenata	Broj i % kontrola	P
VVS	3 (4%)	3 (5%)	0,85
VVL	6 (8%)	7 (11%)	0,56
VMS	4 (5%)	5 (8%)	0,56
VML	40 (52%)	17 (26%)	0,001
MVS	0 (0%)	2 (3%)	0,12
MVL	5 (6%)	9 (13%)	0,16
MMS	5 (6%)	9 (13%)	0,16
MML	14 (19%)	14 (21%)	0,65

BDNF: Val-Val/Met nosilac; COMT: Val-Val/Met nosilac; SERT: S'S'/L' nosilac

Najprevalentnija kombinacija i kod pacijenata i kod kontrola bila je Val homozigot BDNF, Met nosilac COMT i L nosilac SERT (u daljem tekstu VML). Ukupno 40 pacijenata (52%) i 17 kontrola (26%) imalo je kombinaciju ta tri alela. Ta kombinacija je upravo i jedina dala statistički značajnu razliku u učestalosti polimorfizma između pacijenata i kontrola ($p=0,001$) sa značajno češćom pojavom te kombinacije među

pacijentima nego među kontrolama usled čega smo smatrali tu kombinaciju kao visoko rizičnu.

Koristeći ovaj rezultat pacijente i kontrole su podeljeni u po 3 grupe (6 ukupno). Dve grupe, koje su nazvane Visoko rizične grupe (VRG) sačinjavali su 40 pacijenata sa VML kombinacijom (VRG pacijenata) i 17 kontrola sa istom kombinacijom (VRG kontrola). Druge dve grupe su činile osobe koje su imale bilo koja dva od tri alela iz VML kombinacije. Te grupe su nazvane Intermedijarne grupe (IG). Poslednje dve grupe su činili pacijenti ili kontrole sa jednim ili nijednim alelom iz VML kombinacije i nazvane su Nisko rizične grupe (NRG). Ova podela je nazvana akumulacioni model jer je zasnovana na neselektivnoj akumulaciji alela koji su definisani kao rizični.

U daljoj analizi kliničkih i morfoloških karakteristika ovih šest grupa pored njihovog međusobnog poređenja rađena je i dodatna analiza pozitivnih rezultata sa svakim pojedinačnim polimorfizmom. S obzirom na homogenost VRG grupe (samo VML kombinacija) u odnosu na IG i NRG grupe (sačinjene od nekoliko različitih kombinacija) postojala je mogućnost da su pozitivni rezultati posledica prevalencije pojedinih alela u VRG i donekle NRG grupi (s obzirom na to da je ona imala dominaciju alela suprotnih od VML). U slučaju da je neka oblast ili klinički parametar imao statistički značajnu razliku u odnosu na neku drugu u modelu akumulacije gena od 6 grupa, za tu oblast ili kliničku sliku bila urađena analiza za svaki od pojedinačnih polimorfizama. U slučaju da je onda samo jedan od tri polimorfizma ispao pozitivan sa istim pravcem i pandanom kao u akumulacionom modelu (npr. ako VRG pacijenata ima značajno veći skor od NRG grupe kontrola u nekoj oblasti, onda bi pravac i pandan bio da su npr. pacijenti sa Val homozigotom BDNF imaju taj skor veći od kontrola Met nosilaca – ili bilo koji od ostala dva polimorfizma po istom principu), taj rezultat je smatran posledicom monogenetskog, a ne akumulacionog dejstva. U slučaju da nijedan polimorfizam pojedinačno nije dao statistički značajnu razliku ili da je više polimorfizama dalo istu razliku sa istim pravcem i pandanom, taj rezultat je smatran kao autentična posledica akumulacije.

4.3. Kliničke i sociodemografske karakteristike akumulacionog modela

Osnovne demografske i kliničke karakteristike svih 6 grupa akumulacionog modela mogu se videti u tabeli 7. Svaka od akumulacionih grupa pacijenata zasebno, imaju niže obrazovanje od zdravih kontrola. Pacijenti svake grupe akumulacionog modela imaju viši hereditet, zlostavljanje i depresivne skorove u odnosu na kontrole što su očekivani rezultati.

Kada se uporede akumulacione grupe pacijenata, one su bile vrlo dobro mešovane (Tabela 7).

Tabela 5. Demografske i kliničke karakteristike akumulacionog modela

	Pacijenti			Kontrole		
	VRG	IRG	NRG	VRG	IRG	NRG
N	40	24	13	17	26	23
Starost u godinama	43.5±10.1 (24-62)	45.5±11.7 (22-60)	46.3±10.0 (28-63)	47.3±8.8 (28-59)	44.2±11.1 (23-63)	45.4±12.1 (24-62)
Godine početka simptoma	34.8±11.2 (11-59)	39.1±12.5 (21-59)	37.8±13.5 (12-53)	-	-	-
Ženski pol	30 (75%)	19 (79.2%)	11 (84.6%)	11 (64.7%)	22 (84.6%)	20 (87%)
Obrazovanje	3.2±1.0 (1-5)*	3.2±1.0 (1-5)*	3.1±1.0 (2-5)*	4.4±1.1 (2-6)	4.4±1.3 (2-6)	4.4±1.1 (2-6)
HBMO [ml]	0.13±0.6 (0-3.8)	0.21±0.6 (0-2.8)	0.17±0.4 (0-1.3)	0.09±0.2 (0-0.6)	0.10±0.2 (0-0.8)	0.04±0.1 (0-0.6)
Hereditet	22 (55.0%)	6 (25.0%)##	5 (38.5%)	1 (5.9%)##°	4 (15.4%)##	2 (8.7%)##°
HDRS	22.6±4.9 (11-30)	23.2±4.5 (16-36)	23.0±5.6 (12-33)	-	-	-
BDI	29.5±11.5 (7-59)*	29.6±13.9 (5-56)*	34.3±11.1 (15-51)*	3.2±5.3 (0-21)	1.3±2.1 (0-9)	2.6±2.5 (0-9)
Dužina trajanja lečenja u danima	73.5±95.0 (1-420)	57.2±65.5 (1-240)	77.9±72.1 (5-240)	-	-	-

Cifre označavaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (raspon ili učestalost). *=značajno različito u poređenju sa svakom kontrolnom grupom; ##= značajno različito u poređenju sa pacijentima sa hfSP. Značajnost je utvrđena na nivou $p < 0,05$, u ostalim slučajevima ° označava $p < 0,001$.

Skraćenice: BDI=Bekov inventar depresivnosti; FH=pozitivna porodična anamneza za psihijatrijske bolesti; H/I/NRG=polimorfizmi visoko/srednje/nisko frekventne osetljivosti; HDRS=Hamiltonova skala za merenje depresije; MDD=teški depresivni poremećaj; HBMO= Opterećenje hiperintenziteta bele mase. Obrazovna skala: 1= nije pohađao školu; 2= osnovna škola; 3= srednja škola; 4= viša škola; 5= fakultet; 6= magistarski ili doktorski nivo.

Akumulacione grupe pacijenata među sobom su se razlikovale u dva klinička skora i po hereditetu. U pitanju 11 BDI (iritabilnost) VRG i NRG pacijenti su se značajno

razlikovali ($p=0,024$). VRG grupa imala je 31,4% sa skorom 0 i 56,7% sa skorovima 0 ili 1, dok je NRG grupa imala 76,9% sa skorom 2 ili 3. Drugi klinički skor koji je iskočio je HAMD pitanje 18 (diurnalna varijacija) ($p=0,020$). VRG pacijenti su imali značajno veću varijaciju od NRG (Tabela 8).

Tabela 6. HAMD pitanje 18

HAMD 18 skor	VRG	NRG
0	8 (20,0%)	7 (53,8%)
1	11 (27,5%)	3 (23,1%)
2	21 (52,5%)	3 (23,1%)
Zbir	40	13

Treći parametar koji je iskočio između grupa pacijenata je hereditet koji je opet bio značajno viši kod VRG u odnosu na IG i NRG zajedno (Tabela 9).

Tabela 7. Hereditet

Grupa Hereditet	VRG pacijenti	IG+NRG pacijenti	VRG kontrole	IG+ NRG kontrole
Bez herediteta	18	26	16	42
Pozitivan hereditet	22	11	1	7

Usled malog uzorka kada se posmatraju zasebno grupe IG i NRG ne dobija se statistički značajna razlika.

4.4. Rezultati snimaka magnetnom rezonancom

4.4.1. Morfometrija zasnovana na vokselima

VRG pacijenti su imali smanjen volumen u odnosu na NRG kontrole u bilateralnom inferiornom frontalnom korteksu, bilateralnom srednjem orbitofrontalnom girusu i insuli bilateralno, kao i u levom superiornom frontalnom girusu, levom srednjem cingularnom korteksu i levom inferiornom temporalnom girusu. Svi rezultati su izdržali proveru sa pojedinačnim polimorfizmima (Tabela 10). Za razliku od ovako značajnih rezultata dobijenih akumulacionim modelom, kada su upoređeni sve pacijente sa svim kontrolama dobijen je manji volumen desnog superiornog frontalnog režnja kod pacijenata.

Tabela 8. Regije sa redukcijom sive mase zabeležene metodom morfometrije zasnovane na vokselima kod pacijenata u poređenju sa kontrolama uzimajući u obzir efekat svakog pojedinačnog polimorfizma

	Pol mozga	Veličina klastera	MNI koordinate			T vrednost
			x	y	z	
<i>Svi pacijenti u odnosu na sve kontrole</i>						
Precentralni girus	L	123	-36	-28	60	5.68
Superiorni frontalni girus	R	35	13	46	33	5.38
Medijalni superiorni frontalni girus	R	42	11	61	1	5.3
<i>BDNF Vall66Met SP pacijenti u odnosu na neSP kontrole</i>						
Superiorni frontalni girus	R	16	14	50	22	5.57
<i>COMT Val158Met SP pacijenti u odnosu na neSP kontrole</i>						
Superiorni frontalni girus	R	29	11	61	1	5.45
Insula	R	34	36	11	10	5.27
<i>5-HTTLPR SP pacijenti u odnosu na neSP kontrole</i>						
Srednji temporalni girus	L	213	-58	-47	-11	5.63
Precentralni girus	L	69	-34	-28	61	5.17
<i>5-HTTLPR SP pacijenti u odnosu na SP kontrole</i>						
Anteriorni cingulatni korteks	R	180	14	50	20	5.94
Medialni superiorni frontalni girus	R	46	2	56	18	5.3

Koordinate MNI su 3D voksel lokacije vršne vrednosti T. Veličina klastera označava broj vokselu u značajnom klasteru. Skraćenice: L=levo; D=desno; MNI= Institut za neurologiju u Montrealu; SP: suseptibilni polimorfizam, odnosno polimorfizam koji se nalazi u VML kombinaciji.

4.4.2 Traktografija

I VRG i NRG pacijenti imali su smanjenu frakcionu anizotropiju korpus kalozuma (KK), posebno izraženo u telu KK, u odnosu na VRG kontrole.

U analizi pojedinačnih polimorfizama ta regija bila je bez statistički značajne razlike.

4.4.3. Debljina sive mase

VRG pacijenti imali su značajno redukovanu debljinu sive mase u rostralnom srednje frontalnom girusu bilateralno u odnosu i na VRG kontrole i NRG kontrole. Pored toga, imali su stanjen desni lateralni okcipitalni režanj u odnosu na VRG kontrole i levi frontalni pol u poređenju sa IG kontrolama. Pored ovih nalaza, NRG kontrole imale su i povećanu debljinu sive mase u levom inferiornom parietalnom korteksu u poređenju sa VRG i NRG pacijentima. Poslednji nalaz bio je da su NRG pacijenti imali značajno tanju sivu masu desnog precentralnog korteksa u odnosu na VRG pacijente.

Kada smo uradili obradu pojedinačnih polimorfizama za te oblasti jedino rezultat desnog precentralnog girusa nije izdržao dodatnu analizu (Tabela 11).

Tabela 9. Regije sa redukcijom debljine sive mase uzimajući u obzir efekat svakog pojedinačnog polimorfizma

Anatomska regija i polimorfizam	Relacija statistički značajne razlike	Vrednost p
BDNF Val66Met		
L frontalni pol	1<3	0,003
L inferiorno parietalni	1<3	0,021
L rostralni srednji	1<3	0,002
L rostralni srednji	1<4	0,017
D rostralni srednji	1<3	0,002
D lateralni okcipitalni	1<3	0,012
COMT Val158Met		
L frontalni pol	1<3	0,019
L rostralni srednji	1<3	0,039
L rostralni srednji	1<4	0,015
D rostralni srednji	1<4	0,008
SERT 5-HTTLPR		
L inferiorni parietalni	2<3	0,005
L inferiorni parietalni	2<4	0,004
L rostralni srednji	1<3	0,032
D lateralni okcipitalni	2<3	0,018
D precentralni	2<1	0,005
D precentralni	2<3	0,005
D precentralni	2<4	0,005

L – levi; D – desni; 1 pacijenti/3 kontrole – Val homozigot BDNF/Met nosilac COMT/L nosilac SERT; 2 pacijenti/4 kontrole – Met nosilac BDNF/Val homozigot Met COMT/S homozigot SERT.

4.5. Rezultati morfoloških karakteristika kod pacijenata sa i bez komorbiditeta sa generalizovanim anksioznim poremećajem

4.5.1. Demografske i kliničke karakteristike

Sedamdeset jedan pacijent i sedamdeset jedna zdrava kontrola uključeni su u posebnu analizu morfoloških i kliničkih karakteristika depresivnih pacijenata (MDD) sa i bez komorbiditeta generalizovanog anksioznog poremećaja (GAP). Pacijenti su podeljeni u dve grupe - 50 samo depresivnih pacijenata (70,42%) i 21 pacijent sa komorbiditetom GAP (29,57%). Grupe su bile ujednačene u pogledu pola i starosti. Zdrave kontrole su imale viši stepen obrazovanja od obe grupe pacijenata. Grupe pacijenata su imale sličan nivo težine depresije, a razlikovali su se u anksioznosti, jer su pacijenti sa MDD-GAP imali veće skorove na skali HAMA (22.1 ± 6.6 (6-37) u odnosu na 28.1 ± 7.7 (12-39)).

4.5.2. Debljina korteksa

U poređenju sa zdravim kontrolama, pacijenti sa MDD su pokazali manju volumen korteksa u bilateralnom rostralnom srednjemfrontalnom ($p=0,003$ levo i $0,021$ desno), desnom hipokampusu ($0,005$), desnom lateralnom orbitofrontalnom ($0,031$), desnom istmusnom cingulatnom korteksu ($0,013$), levom frontalnom polu ($0,042$), levom medijalnom orbitofrontalnom korteksu ($0,046$), levom inferiornom parijetalnom ($0,038$) i supramarginalnom korteksu ($0,028$). U poređenju sa zdravim kontrolama, pacijenti sa MDD-GAP su pokazali stanjenje korteksa u bilateralnom rostralnom srednjem frontalnom ($0,024$ levo i $0,031$ desno) i medijalnom orbitofrontalnom korteksu ($0,021$ levo i $0,027$ desno), desnom pars orbitalis ($0,036$), desnom fuziformnom korteksu ($0,001$), levom frontalnom polu ($0,031$), levom pars opercularis ($0,006$) i levom lateralnom okcipitalnom korteksu ($0,025$). U poređenju sa MDD, pacijenti sa MDD-GAP su pokazali kortikalno

stanjivanje u desnom medijalnom orbitofrontalnom korteksu (0,027), desnom fuziformnom korteksu (0,010), levom temporalnom polu (0,023) i levom lateralnom okcipitalnom girusu (0,018). Stanjivanje korteksa nije zabeleženo kod pacijenata sa MDD u poređenju sa onima koji su patili od MDD-GAD.

Analiza po verteksu (Slika 3). Vršne vrednosti kortikalnog stanjivanja zabeležene su kod pacijenata sa MDD-GAP u poređenju sa pacijentima sa MDD i zdravim kontrolama, uglavnom u frontotemporalnom korteksu. U poređenju sa pacijentima sa MDD-GAP, kod pacijenata sa MDD zabeležena je samo jedna vršna vrednost kortikalnog stanjivanja u desnom rostralnom srednjm frontanom korteksu. Kod pacijenata sa MDD nije zabeleženo kortikalno stanjivanje u poređenju sa pacijentima sa MDD-GAP.

4.5.3. Traktografija

U poređenju sa zdravim kontrolama, kod pacijenata sa MDD, MD i axD bili su povećani bilateralno u superiornom longitudinalnom fascikulusu (SLF) (MD $p=0,048$; axD $p=0,042$). Zabeležen je i povećani radD u desnom parahipokampusnom traktu ($p=0,033$). Nisu zabeležene razlike između MDD-GAP i zdravih kontrola, niti između grupa pacijenata (Slika 3).

4.5.4. Korelacije između kortikalne debljine i mera DT MRI

Kod svih pacijenata, kortikalno stanjivanje levog inferiornog parijetalnog korteksa je pokazalo korelaciju sa oštećenjem bele mase SLF bilateralno (desni SLF FA, Spearman-rho[S-r]: 0,415, $p=0,007$; desno SLF MD, S-r: 0,384, $p=0,032$; desno SLF radD, S-r: 0,455, $p=0,040$; levo SLF MD, S-r: 0,366, $p=0,042$; levo SLF radD, S-r: 0,390, $p=0,013$). Štaviše, stanjivanje korteksa hipokampusa obostrano bilo je povezano sa FA levog parahipokampusnog trakta [PH] (debljina hipokampusa levo -levo PH FA, S-r: 0,348, $p=0,019$; debljina hipokampusa desno -levo PH FA: S-r: 0,398; $p=0,015$).

4.6. Rezultati transkranijalne ultrasonografije

Od ukupnog broja od 85 pacijenata i 73 kontrole, 58 pacijenata i 54 kontrole su uradile transkranijalnu ultrasonografiju. Od 58 pacijenata, 5 (8,6%) je imalo neprozirne temporalne koštane prozore tako da procedura nije mogla da se uradi. Dakle, ovo istraživanje je imalo 53 pacijenta i 54 zdrave kontrole sa urađenom transkranijalnom ultrasonografijom. S obzirom na to da je taj broj značajno manji od prethodnih rezultata sa magnetnom rezonancom, na ovom uzorku nije bilo mogućnosti da se radi akumulacija ili interakcija, već se analiza završila na pojedinačnim polimorfizmima.

Hipoehogenost rafe kod pacijenata je bila značajno češća u odnosu na kontrole (35 od 53; 66% u odnosu na 5 od 56; 9%) ($p=0,003$). Nije bilo statistički značajne razlike između pacijenata sa hipoehogenošću rafe i pacijenata sa normalnom rafe ehogenošću u nijednom od sociodemografskih parametara, hereditetu kao i detaljima vezanim za istoriju bolesti. Jedini klinički parametar koji je iskočio je pitanje broj 5 na Hamiltonovoj skali anksioznosti (poremećaj koncentracije, oslabljeno pamćenje) koje je bilo lošije za pacijente sa hipoehogenošću rafe. Pacijenti sa hipoehogenošću su, takođe, imali dvostruko veću verovatnoću da imaju komorbiditet anksioznog poremećaja (15 od 35; 43% u odnosu na 4 od 18; 22%) ali usled malog uzorka ova razlika nije dostigla statističku značajnost ($p=0,138$). Nije postojala statistički značajna razlika u raspodeli BDNF Val66Met i COMT Val158Met alela u okviru pacijenata sa i bez hipoehogenosti rafe. Jedino su homozigoti za S alelom 5-HTTLPR bili značajno češći kod pacijenata sa hipoehogenošću rafe, u odnosu na pacijente bez hipoehogenosti ($p=0,048$). Izvučene su 5 varijabli (5-HTTLPR polimorfizam, HAMA pitanje 5, komorbiditet generalizovanog anksioznog poremećaja, socijalne fobije i paničnih napada) koje su pokazale da mogu imati uticaj na ehogenost rafe i urađena je stepwise diskriminaciona analiza. Ovom analizom utvrđena su 4 prediktora koja su zajednički uticala na ehogenost rafe kod pacijenata: HAMA pitanje 5 ($F(1,47)= 9,812$; $p = 0,002$), komorbiditet socijalne fobije

($F(1,47) = 6,72, p=0,012$), S homozigot 5-HTTLPR ($F(1,47)=6,17; p= 0,016$) i komorbiditet generalizovanog anksioznog poremećaja ($F(1,47)=5,69; p=0,021$).

5. DISKUSIJA

Rezultate našeg istraživanja možemo podeliti u 4 kategorije:

- a) Nalazi genetskog ispitivanja svakog od tri izučavana polimorfizma navedeni su ponaosob, kao I potom oformljeni akumulacioni model kojim smo ustanovili prevalencije VML kombinacije kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u odnosu na kontrole. U okviru toga analizirali smo i korelirali kliničke i socio-demografske karakteristike.
- b) Morfološki nalazi magnetnom rezonancom izučavani su u okviru akumulacionog modela i rađeni su u 3 modaliteta: morfometrija zasnovana na vokselu, debljina sive mase i traktografija.
- c) Odvojeno smo analizirali morfološke nalaze dobijene nuklearnom magnetnom rezonancom (traktografija, debljina sive mase, morfometrija zasnovana na vokselima) i poredili ih između depresivnih pacijenata sa i bez komorbiditeta generalizovanog anksioznog poremećaja prema kriterijumima DSM-IV-R.
- d) Najzad, analizirali smo nalaze transkranijalnog parenhimskog ultrazvuka (sistem rafe jedara) i utvrđivali kliničke i genetske razlike kod pacijenata sa i bez hipohogenog nalaza rafe jedara.

Zajednički elementi za sve 4 kategorije su:

- i. usmerenost na biološke uzroke depresivnog poremećaja, prevashodno na morfološke i genetske supstrate depresivnog poremećaja;
- ii. posmatranje depresivnog poremećaja ne kao homogenog poremećaja, već kao heterogenog entiteta. Dakle, u sve četiri kategorije upoređivanje depresivnih pacijenata sa kontrolama bio je samo prvi korak koji je davao smernice za dalje formiranje što homogenijih podgrupa pacijenata sa depresivnim poremećajem. U prvoj i drugoj kategoriji genetski nalazi korišćeni su za formiranje akumulacionog modela kojim su

izučavane razlike između 3 grupe depresivnih pacijenata koje se međusobno razlikuju po prevalenci određenih polimorfizama. U drugoj kategoriji korišćen je klinički model i utvrđivanje razlika među pacijentima zavisno od postojanja komorbiditeta generalizovanog anksioznog poremećaja. U četvrtoj kategoriji korišćen je morfološki model, odnosno razlike među pacijentima u zavisnosti od nalaza ehosonografije rafe jedara.

Sva dosadašnja genetska istraživanja depresije govore u prilog tome da je depresivni poremećaj poligenско oboljenje. Dakle, ne postoji jedan gen ili mutacija koja uzrokuje simptome koje vidamo kod depresivnih pacijenata. Iz dosadašnjih istraživanja predložen je model po kojem ne postoje čak ni nužni polimorfizmi za razvoj depresije (Singleton and Hardy, 2011). Najverovatnije se radi o situaciji u kojoj je veliki broj gena zaslužan za mali deo efekta pojedinačno, ali koji će akumulacijom doseći relevantni prag za kliničku ekspresiju (sam ili u sadejstvu sa drugim epigenetskim faktorima i faktorima spoljne sredine) i uzrokovati ispoljavanje simptoma i pojavu depresivnog poremećaja. Ali nijedan od njih sam nije dovoljan ni nužan, i većina će ispoljiti ovaj efekat samo u specifičnim okolnostima (npr. najčešće izučavano zlostavljanje u detinjstvu (Caspi et al., 2003) ili interakcijama sa drugim genima (Wang et al., 2012). To samu jednačinu čini nemerljivo komplikovanijom.

Poslednja stvar koju je potrebno imati u vidu kada se suočavamo sa genetskom osnovom depresije je da čak i geni koji povećavaju podložnost za razvoj depresije nisu nužno podeljeni na svoje «dobre» i «loše» varijante. Naime, radi se o funkcionalnim, a ne patološkim polimorfizmima koji su vrlo rasprostranjeni u populaciji i smatraju se normalnim varijantama. Oni su se održali u populaciji upravo zato što imaju određena svojstva koja ih čine korisnim za preživljavanje. Njihova korisna svojstva stoga nadmašuju ono negativno što oni potencijalno takođe mogu nositi sa sobom. Vrlo plastičan primer su polimorfizmi koji određuju količinu melanina u koži (Sturm et al, 2001). Tako, osobe sa belom kožom imaju veću verovatnoću za razvoj melanoma, ali se, naravno, polimorfizmi koji to uzrokuju ne smatraju patološkim. Drugo, treba naglasiti

interakciju gena sa životnim okolnostima i sredinom. Tako, na primer, 5-HTTLPR polimorfizam u genu za serotoninski transporter, koji smo i mi istraživali, ima dve varijante, dugu i kratku, koje funkcionalno utiču na intenzitet aktivnosti serotoninskog transportera. U nedavnom istraživanju pokazano je da pacijenti sa bipolarnim poremećajem i sa kratkom varijantom imaju povišenu suicidalnost kada je postojalo zlostavljanje u detinjstvu, ali da kada zlostavljanje nije bilo prisutno, osobe sa dugom varijantom imaju veći rizik za suicidalnost (Phelps, 2015). Prema tome, obe varijante imaju potencijal da utiču negativno na zdravlje ako su prisutne adekvatne životne okolnosti. U našem istraživanju trudili smo se da, gde god je to moguće, izučavamo efekat više gena istovremeno, a da nam monogeniski pristup bude samo korekcija i smernica.

U našem istraživanju odlučili smo se za tri polimorfizma koja su često izučavana u depresiji, ali i mnogim drugim oboljenjima centralnog nervnog sistema. Sva tri polimorfizma imaju značajan efekat na aktivnost kodiranih proteina i sva tri su vezana za moždane funkcije. COMT i SERT geni utiču na dostupnost monoamina (dopamina i serotonina) u mozgu, a BDNF transkribuje vrlo značajni neurotrofin koji utiče na plastičnost mozga.

Zbog veličine uzorka svi pacijenti i kontrole su podeljeni u nosioce ili homozigote za bilo koju od dve varijante polimorfizma. Takođe, s obzirom na brojna oprečna istraživanja u pogledu uticaja svake varijante ova tri polimorfizma nismo želeli da unapred određujemo koje kombinacije ćemo istraživati.

Kada smo posmatrali BDNF Val66Met, odnos Met homozigota u odnosu na Val nosioce nije statistički bio značajno različit kod pacijenata (92%/8%) i kontrola (98%/2%). Sa druge strane, Val homozigoti su značajno češći kod pacijenata (69%/31%) u odnosu na kontrole (48%/52%) ($p=0,01$). Istraživanje iz 2005. godine pokazalo je da zdrave osobe koje su Val homozigoti imaju povišenu bazičnu anksioznost i neuroticizam u odnosu na Met homozigote i heterozigote (Lang et al, 2005). Chen sa saradnicima je na

uzorku blizanaca u Kini ustanovio da su nosioci Val polimorfizma (i homozigoti i heterozigoti) u okolnostima povišenih stresnih životnih situacija podložniji razvoju depresivnih simptoma (Chen et al, 2013). Ipak postoje i oprečna istraživanja, među kojima je i meta analiza koja je pokazala da met alel povećava podložnost za depresiju, ali samo u muškom polu (Verhagen et al, 2010), dok je naš uzorak predominantno ženskog pola (77,9%).

U COMT Val156Met nismo ni u jednoj varijanti dobili statistički značajnu razliku, ali su Met nosioci bili češći kod pacijenata sa depresivnim poremećajem, ali su rezultati bili na ivici statističke značajnosti ($p=0,058$). Rezultati istraživanja koja su izučavala ovaj polimorfizam su najheterogenija u pogledu definisanja da li je Val ili Met alel taj koji povećava podložnost za depresiju. Dva istraživanja su dobila da je Met alel češći kod pacijenata sa depresijom (Mandelli et al, 2007, Ohara et al, 1998), ali postoje istraživanja i sa suprotnim nalazima (Massat et al, 2011, Massat et al, 2005).

Najhomogenije dosadašnje rezultate, u poređenju sa druga dva polimorfizma koja smo izučavali, imaju istraživanja sa SERT 5-HTTLPR. Ona dominantno ukazuju na to da je kratki S alel, bilo kao homozigot ili nosilac, onaj koji izaziva podložnost za depresiju (Collier et al, 1996). Treba naglasiti da se ovaj rezultat gotovo isključivo dobija kada se uzme u interakciji sa stresnim događajima, dok posmatran samostalno u populaciji retko daje različitu proporciju u odnosu na L alel (Karg et al, 2011). Ipak, u našem uzorku su upravo L nosioci bili češći kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u odnosu na kontrole, mada je ta razlika bila na nivou trenda ($p=0,056$). Kada smo posmatrali L homozigote, razlika nije bila statistički značajna ($p=0,500$). Ovo se može objasniti na više načina. Prvo, veličina našeg uzorka nije bila dovoljno velika i sa većim uzorkom bi se ova razlika izgubila: u apsolutnim brojevima odnos pacijenata i kontrola L nosilac/S homozigot je 65(84%)/12(16%) prema 47(71%)/19(29%). Svega nekoliko novih pacijenata ili kontrola je dovoljno da potpuno neutrališe i tu malu razliku koja postoji. Drugo objašnjenje se tiče uopšte samih funkcionalnih gena i pitanja da li nužno postoje

samo pojedinačne varijante koje izazivaju podložnost za depresiju. Tako, na primer, postoje i druga istraživanja u kojima je dobijeno da je L alel onaj koji izaziva podložnost (Long et al, 2013). Poslednje što treba uzeti u obzir je da u ovoj analizi nismo koristili zlostavljanje u detinjstvu ili neke druge stresne događaje kao dodatni faktor interakcije, što je bio nužan uslov u većini prethodnih istraživanja da bi se S alel dobio kao faktor podložnosti za razvoj depresije.

U sledećem koraku odlučili smo da utvrdimo da li postoji neka specifična kombinacija homozigota i nosilaca ova tri polimorfizma koja je češća kod pacijenata u odnosu na kontrole ili obrnuto. Kada smo uključili svih 8 potencijalnih kombinacija, upravo je trostruka kombinacija BDNF Val homozigot/COMT Met nosilac/SERT L nosilac (VML) bila visoko statistički značajno češća kod pacijenata (0,001). Preko 50% pacijenata i 25% kontrola imali su ovu kombinaciju. Učestalost nijedne druge kombinacija nije bila statistički značajna, mada bi sa većim uzorkom neke potencijalno mogle da ispolje. Tako, na primer, potpuno suprotna varijanta od VML BDNF Met nosilac/COMT Val homozigot/SERT S homozigot (MVS) ne pojavljuje se ni kod jednog pacijenta, dok je dve kontrole imaju ($p=0,120$). Kombinacije koje imaju samo jednu od tri alela podložnosti, MVL i MMS su preko dva puta češće kod kontrola nego kod pacijenata (6% prema 13% u oba slučaja; $p=0,160$), ali zbog malog ukupnog broja ispitanika nisu dostigle statističku značajnost. Ovakve naše rezultate nismo imali sa mnogo čime da uporedimo s obzirom na to da takvo istraživanje do sada nije rađeno. Rađeno je više istraživanja sa jednim ili maksimalno dva polimorfizma u depresivnom poremećaju, ali nijedno dosadašnje istraživanje nije ispitivalo sva tri. Postoji samo jedno istraživanje koje je izučavalo interakciju ili akumulaciju sva tri polimorfizma. Nažalost, njega nije moguće direktno uporediti sa našim rezultatima, jer je rađeno samo na zdravoj populaciji i direktno su posmatrane samo substrukture hipokampusa, što u našem istraživanju nije rađeno (Rabl et al, 2014).

Odlučili smo da upotrebimo upravo VML grupu (VRG) kao osnovnu grupu našeg istraživanja i na osnovu nje smo definisali druge dve grupe koje su se razlikovale za jedan (IRG) odnosno dva i/ilitri alela (NRG). Ovakvu kaskadnu podelu smo nazvali *akumulacioni model*. Pacijenti sa VML kombinacijom bili su pod najvećim rizikom za razvoj depresije, srednja grupa je bila intermedijarna, a treća je bila najzaštićenija. U skladu sa pretpostavkom da je depresija heterogen poremećaj, jednako su nas interesovale i osobe koje su pod visokim rizikom, kao i osobe koje bi trebalo da su zaštićene svojim genetskim profilom. Pre svega, želeli smo da saznamo da li je depresija različitih grupa klinički ili morfološki specifična i na koji način se međusobno ove grupe razlikuju.

Prvo su analizirani socio-demografski i klinički parametri. Upoređivani su svi ukupni skorovi, dijagnoze, socio-demografske specifičnosti, zlostavljanje u detinjstvu, ali i svaki pojedinačan skor na HAMD, HAMA i BDI, kako bi se otkrile i eventualne suptilne razlike u ispoljavanju depresije.

Kao vrlo važan parametar razlikovanja pokazao se hereditet. VRG pacijenti imali su značajno veći hereditet od IRG i NRG grupa. To govori u prilog pretpostavke da je akumulacija faktora rizika povećavala verovatnoću da se u stablu te iste osobe nađu preci ili rođaci sa istom kombinacijom, te da je usled toga depresivni poremećaj učestaliji kod osobe iz VRG grupe u odnosu na druge dve grupe. To potvrđuje značaj genetskih faktora u razvoju depresivnosti kod ove grupe. Za depresiju se nedvosmisleno zna da je delom genetski uslovljena (Kendler et al, 2006), ali je zanimljiv koncept da nije svaka depresija jednako nasledna, niti sve depresije imaju isto genetsko opterećenje (Flint & Kendeler, 2014), što potvrđuju i naši rezultati.

Među nekliničkim rezultatima izdvojila su se još tri koja su već opisana u drugim radovima. Prvo, hereditet je značajno veći kod pacijenata u odnosu na kontrole i to kako za celu grupu, tako i za akumulacioni model, ali i za svaki polimorfizam posmatran pojedinačno. Takođe, zlostavljanje u detinjstvu je značajno češće kod

pacijenata u odnosu na kontrole, ali u našem uzorku nije bilo značajnije razlike u učestalosti zlostavljanja među grupama pacijenata ni u akumulacionom modelu, niti za svaki pojedinačno posmatran polimorfizam. To verovatno govori u prilog tome da je zlostavljanje značajan uzročni faktor u kasnijem razvoju depresivnosti (Caspi et al, 2003), mada postoje i ograde u vidu negativne percepcije realnosti i prošlosti depresivnih pacijenata, tzv. greške prisećanja (engl. recall bias), usled čega je moguće da su depresivni pacijenti skloniji da se sećaju ili preuveličavaju ovakve događaje iz prošlosti u odnosu na zdrave kontrole (Fattahi et al, 2015). Poslednje što je značajno u našem uzorku je da su sve tri grupe pacijenata iz akumulacionog modela imale značajno češće enurezu u detinjstvu u odnosu na NRG kontrole, što bi ukazivalo da su još od detinjstva ove tri grupe pokazivale povećan dečiji neuroticizam (Altschul, 1990). Da li je on genetski uslovljen ili je posledica zlostavljanja nije moguće ovako retrogradno utvrditi.

Iako se za analizu kliničkih parametara mora prihvatiti određena zadržka u zaključivanju s obzirom na relativno mali uzorak, u akumulacionom modelu su se izdvojila dva parametra.

U BDI upitniku na pitanju o razdražljivosti (pitanje broj 11), NRG pacijenti su imali značajno više skorove od VRG pacijenata. Ovo je iznenađujuće s obzirom na to da je jedno istraživanje iz 2013. godine povezalo povišene skorove iritabilnosti sa izraženijom kliničkom slikom depresije i lošijom dugoročnom prognozom praćenom većom verovatnoćom za hronifikaciju poremećaja. Uz to je kod razdražljivijih pacijenata prisutna slabija kontrola impulsa, češći komorbiditet anksioznih poremećaja, antisocijalnog poremećaja ličnosti i zavisnosti (Judd et al, 2013). Ovaj primer ilustruje da to što neko ima veću verovatnoću za razvoj depresije na osnovu genetskog profila, ne znači da će ta depresija nužno imati i težu kliničku sliku i lošiju prognozu. Zanimljivo je da razdražljivost, i pored toga što je vrlo čest simptom u depresiji, ne spada u dijagnostičke DSM kriterijume.

Drugi nalaz je pitanje o diurnalnim varijacijama (pitanje broj 18) u HAMD-21, gde su VRG pacijenti imali izraženije dnevne varijacije od NRG pacijenata. Međutim, treba imati u vidu da u HAMD upitniku nije razgraničeno kada su u dnevnom obrascu izraženete varijacije. Dakle, ovde su visoko skorovani svi pacijenti koji su verbalizovali izražen i jasan obrazac dnevnog raspoloženja, bilo da je to značilo da se osoba oseća lošije ili bolje ujutru. To je značajno istaći jer donekle ublažava značaj nalaza s obzirom na to da postoje teorije koje pretpostavljaju da postoji jasna razlika u osnovi depresije kod osoba sa jutarnjim u odnosu na osobe sa večernjim pogoršanjem (Wirz-Justice, 2003). Ipak, ovaj nalaz je donekle očekivan s obzirom na uticaj koji sva tri gena koja smo izučavali imaju na cirkadijalni ritam. Cirkadijalni ritam je interni vremenski mehanizam koji u okviru 24 časa reguliše spavanje, ali ima uticaj i na ponašanje, fiziologiju i raspoloženje (Jones and Benca, 2015). Tako serotonin moduliše odgovor cirkadijalnog ritma na svetlost. To čini uticajem na centralni časovnik organizma kroz povratnu informaciju lokomotorne aktivnosti i psihičkog uzbuđenja (Morin, 1999). Polimorfizam Val158Met povezan je sa povećanom pospanošću kod zdravih kontrola i pacijenata sa narkolepsijom (Dauviliers et al, 2011). Na kraju, diurnalni nivoi BDNFa u plazmi imaju uticaj na žene sa funkcionalnom hipotalamičkom amenorejom (Drakopoulos et al, 2015). Važno je istaći da je uticaj na diurnalni ritam ispoljen samo kada imamo akumulaciju alela, jer u analizi svakog polimorfizma samostalno ovaj nalaz nije postojao.

Pitanje broj 10 u HAMD - psihološki doživljaj anksioznostise, takođe, statistički značajno razlikovalo u akumulacionom modelu, ali je isti nalaz bio prisutan i kada smo posmatrali COMT polimorfizam samostalno, tako da smo ga smatrali artefaktom homogenosti VRG grupe.

U analizi kliničkih karakteristika pojedinačnih polimorfizama SERT nije ispoljio statistički značajnu razliku između L nosilaca i S homozigota ni u jednom parametru. Pacijenti koji su Val homozigoti BDNF imaju povišenu agitiranost, ali ta razlika zaslužuje komentar. Obe grupe imaju preko 40% ispitanika sa skorom nula, ali Val homozigoti

imaju 35% sa skorom 2, nasuprot 40% sa skorom 1 kod Met nosilaca. Dakle, raspodela ne pokazuje jasan trend i moguće je da je ovaj nalaz artefakt, iako to nije sa sigurnošću moguće utvrditi i tek sa većim uzorkom slika bi bila jasnija. Najveće razlike smo dobili u u COMT, gde Met nosioci imaju povišenu anksioznost, a Val homozigoti češće imaju sniženje libida i poremećaje menstrualnog ciklusa. S obzirom na to da u našoj studiji nismo radili korekciju za terapiju koju pacijenti dobijaju, ovo može biti slučajan nalaz, u zavisnosti od primenjene medikacije. Tako npr. Benzodiazepini, koji su česta adjuvantna terapija, direktno utiču na simptome anksioznosti, dok antidepresivi koji se najčešće koriste (i u našem uzorku su najzastupljeniji) imaju neželjene efekte utičući na libido (Montejo et al, 2015). Najzad, ti rezultati mogu biti i pokazatelj kvalitativne razlike među pacijentima zavisno od COMT alela koji poseduju.

Morfološke promene mozga proučavali smo magnetnom rezonancom korišćenjem tri metoda. Traktografijom smo posmatrali promene bele mase, dok su debljina sive mase i morfometrija zasnovana na vokselima vizualizovali sivu masu.

Istraživanja morfologije bele mase u depresiji počela su 2007. godine. Analiziranjem dosadašnjih rezultata pojavila su se dva problema. Prvi je korišćenje dve različite metode analize traktografije - analiza zasnovana na vokselima koja je starija i TBSS koji je savremenija i koju smo i mi koristili. Drugi problem leži u velikoj nekonzistentnosti i heterogenosti dosadašnjih nalaza (Tabela 12). Pored toga, većina dosada objavljenih radova ima vrlo mali broj ispitanika.

Tabela 10. Do sada urađena istraživanja traktografije u depresiji

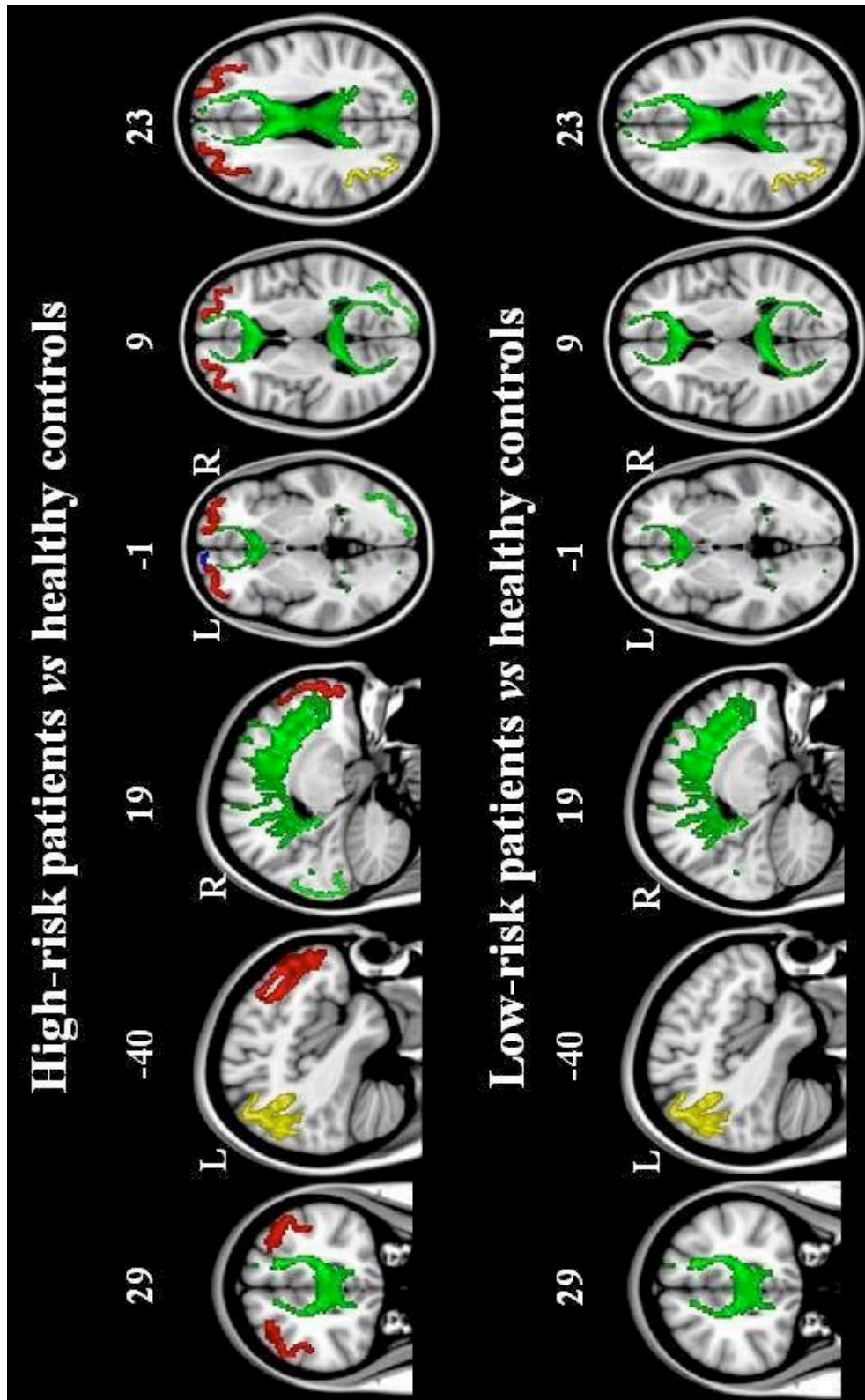
	Pacijenti n	Kontrole n	Metoda	Rezultati
Olvet et al, 2015	139	39	TBSS	Bez razlike
Choi et al, 2014	134	54	VBM/TBSS	Bez razlike
Tha et al, 2013	19	19	VBM	Redukcija: bilateralno frontalno, desni thalamus, bilateralne cerebelarne hemisfere, anteriorni kraci interne kapsule, putamen
Cole et al, 2012	66	66	TBSS/ROI	Redukcija - splenium, genu i telo korpus kalozuma, bilateralni superiorni longitudinalni fasciculus, anteriorna i posteriorna korona radiata, anteriorni i posteriorni kraci interne kapsule
Zhu et al, 2011	25	25	TBSS	Redukcija - levi anteriorni krak interne kapsule, desni parahipokampalni girus, levi posteriorni cingulatni korteks
Wu et al, 2011	21	23	VBM	Redukcija - desni superiorni longitudinalni fasciculus, desni srednji frontalni, levi inferiorni parijetalni
Korgaonkar et al, 2011	39	29	TBSS	Bez razlike
Abe et al, 2010	42	21	VBM	Bez razlike
Kieseppa et al, 2010	20	16	TBSS	Bez razlike
Cullen et al, 2010	14	14	TBSS	Bez razlike
Blood et al, 2010	22	22	ROI	Redukcija dorzolateralni prefrontalni korteks, levi precentralni girus; povećanje - ventralna tegmentalna area, substancija nigra, desni kalkanini korteks
Zou et al, 2008	45	45	VBM	Redukcija - levi anteriorni krak interne kapsule, levi superiorni fascikulus
Ma et al, 2007	14	14	VBM	Redukcija - desni srednji frontalni girus, levi lateralni okcipitotemporalni girus, desni parijetalni režanj, desni angularni girus

Dva najveća istraživanja i jedina koja imaju preko 100 pacijenata uključena u analizu su bez pozitivnih nalaza (Choi et al, 2014; Olvet et al, 2015). Ipak, i jedna i druga grupa autora u svojim radovima naglašavaju da je verovatan problem svih dosadašnjih studija heterogenost depresivnog poremećaja i ostavljaju mogućnost da se nekakve podgrupe sa specifičnim lezijama bele mase mogu naći u budućnosti. Naše istraživanje je našlo da i pacijenti VRG i NRG imaju poremećaj mikrostrukture bele mase u korpusu kalozumu (posebno izraženo u telu korpusa kalozuma) u odnosu na VRG kontrole i to u vidu smanjenja frakcione anizotropije. Ovaj nalaz je posebno zanimljiv iz razloga što ne upućuje na potencijalni specifični model patologije za neku od podgrupa, već ukazuje na

potencijalne razloge rezilijentnosti VRG kontrola. Pojačane veze između polova korteksa samo kod VRG kontrola mogu upućivati na protektivni faktor ovog nalaza kod ove grupe za koju bismo očekivali da je pod povećanim rizikom za razvoj depresije na osnovu genetskog profila. Dakle, mogući odgovor na pitanje zašto VRG kontrole nisu postale depresivne leži u nekim faktorima (drugim genetskim koje nismo istraživali ili socijalnim koje nismo uzimali u obzir) koji su uticali, pre svega, na pojačane veze u korpusu kalozumu. S druge strane, poremećaj mikrostrukture bele mase kod dve od tri grupe pacijenata govori u prilog tome da je ovaj nalaz verovatno posledica samog depresivnog poremećaja i makar donekle nezavisan od genetskog profila ili, konkretnije, ovih polimorfizama koje smo mi posmatrali.

Korpus kalozum je najveća mijelinizovana inter-hemisferična struktura. Poznato je da su povrede ove mase uticale na interhemisfersku integraciju u oblasti kognicije i emocija. Telo korpusa kalozuma koje je u našem istraživanju posebno pogođeno sadrži aksone koji povezuju primarne motorne kortekse, premotorne kortekse i asocijativne regije kao što je parijetalni korteks. Ako pogledamo tabelu 12 videćemo da je do sada samo jedno istraživanje (Cole et al, 2012) našlo razliku u ovoj oblasti kod MDD pacijenata, mada je još jedno u dodatnoj analizi samo melanholičnih pacijenata našlo isti poremećaj frakcione anizotropije korpusa kalozuma (Korgaonkar et al, 2011). Pored istraživanja navedenih u tabeli 12 postoje po dva istraživanja koja su posmatrala samo adolescentnu populaciju i samo populaciju osoba sa depresijom kasnog početka. Zanimljivo je da su oba rada sa adolescentima navela korpus kalozum kao jednu od oblasti sa smanjenom frakcionom anizotropijom (Aghajani et al, 2014, LeWinnetal, 2014), dok nijedna studija sa starom populacijom nije dobila taj rezultat (Tadayonnejadetal, 2014; Guoetal, 2014). Zdravi adolescent sa hereditetom depresivnog poremećaja takođe imaju ovaj nalaz (Huangetal, 2011). S obzirom na to da je naš uzorak vrlo heterogen što se godina subjekata tiče i da je prosečna starost 44,6 za pacijente i 45,4 za kontrole, nismo sigurni da li to može imati nekakve povezanosti sa našim nalazom.

Od posebnog interesa za nas mogu biti i istraživanja pojedinačnih polimorfizama, s obzirom na to da interakcije do sada nisu izučavane. Tri istraživanja su radila ovakve analize, jedno sa COMT Val158Met (Seok et al, 2013), jedno sa BDNF Val66Met (Carballedo et al, 2012), jedno sa oba ova polimorfizma (Hayashi et al, 2014), ali bez analize interakcije zbog malog uzorka. Nijedno istraživanje nije izučavalo traktografiju kod depresivnih pacijenata u korelaciji sa SERT 5-HTTLPR polimorfizmom. Nijedno od tri navedena istraživanja nije imalo pozitivan rezultat u okviru korpusa kalozuma.



Slika 2. Distribucija smanjenja debljine sive mase (obeleženo žuto i crveno) i oštećenja puteva bele mase (obeležene zeleno) kod pacijenata u odnosu na kontrole

Debljina sive mase moždane kore je relativno novija metoda utvrđivanja morfologije sive mase, koja je tehnički drugačija od morfometrije zasnovane na vokselu. U našem istraživanju izdvajamo tri posebno značajna rezultata.

1. VRG pacijenti imaju stanjenu sivu masu moždane kore obostrano u rostralnim srednjim frontalnim girusima u odnosu na VRG i NRG kontrole. Ova oblast je deo dorzolateralnog prefrontalnog korteksa (DLPFC), koji je od ključnog značaja za egzekutivne funkcije, radnu memoriju, aktivnosti usmerene ka cilju, apstraktno mišljenje, usmeravanje pažnje i za regulaciju negativnih emocija kroz strategija ponovne procene/potiskivanja (Broche-Perez, 2015). Redukcija DLPFC je korelirala sa depresivnim poremećajem (Wang et al, 2015). Pored toga, ova oblast je povezivana sa mnogim problematičnim pitanjima vezanim za depresivni poremećaj. Naime, hemodinamske promene u ovoj oblasti povezane su sa potencijalnim razlikovanjem suicidalnih od nesuicidalnih depresivnih pacijenata (Pu et al, 2015), a fMRI je ukazao na strukturne razlike u ovoj oblasti između depresivnih i bipolarnih pacijenata (He et al, 2015). DLPFC je povezan i sa neuroticizmom (Kong et al, 2015) i apatijom u starijem dobu (Yuen et al, 2014). Jedno istraživanje, koje je takođe koristilo metodu merenja debljine sive mase moždane kore, utvrdilo je redukciju većeg dela prefrontalnog korteksa, uključujući rostralni srednji frontalni girus, kod depresivnih pacijenata (Tu et al, 2012). Smanjena aktivnost DLPFC je toliko čest nalaz da je čak iskorišćen kao terapijska meta u vidu stimulacije te oblasti transkranijalnom magnetnom stimulacijom (George, 2010).

U genetskim studijama i BDNF Val66Met i COMT Val158Met polimorfizmi su nadjeni u poremećajima funkcije DLPFC. Jedno istraživanje je utvrdilo da je debljina sive mase u rostralnom srednjem frontalnom girusu pod uticajem BDNF polimorfizma (Legge et al, 2015). Ipak, za razliku od našeg istraživanja, autori su dobili potpuno suprotan rezultat, tj. nosioci Met alela bili su pod povećanim rizikom od redukcije sive mase moždane kore u ovoj oblasti (Legge et al, 2015). Za razliku od ovog istraživanja, dva istraživanja koja su se usredsredila na COMT polimorfizam su, kao i naše istraživanje, ukazala na Met alel kao alel koji povećava sklonost ka poremećenom procesiranju emocija (emotional

processing)(Mier et al, 2010) i smanjenoj aktivaciji prilikom testiranja radne memorije (Opmeer et al, 2013). Za polimorfizam 5-HTTLPR nije do sada pokazano da ima direktan uticaj na ovu oblast, ali je kod osoba pod povećanim rizikom za razvoj depresivnog poremećaja zabeleženo 35% umanjeње vezivanja serotonina za serotoninski transporter (Frokjaer et al, 2009).

2. Stanjenje sive mase zabeleženo je i u desnom lateralnom okcipitalnom girusu, ali samo u odnosu na VRG kontrole. U poslednje vreme sve više se obraća pažnja na ulogu gama-aminobuterne kiseline (GABA) u depresiji. Upravo su prefrontalni i okcipitalni korteks pogođeni smanjenjem nivoa GABA kod depresivnih pacijenata (Hasler et al, 2007; Sanacora et al, 1999). Pored toga, smanjen broj GABA-ergičkih neurona zabeležen je u okcipitalnoj regiji kod depresivnih pacijenata u postmortalnim studijama (Maciag et al, 2010; Rajkowska et al, 2007).

Pacijenti koji imaju specifičnu kombinaciju VML u našem uzorku imaju značajnije stanjenje rostralnog srednjeg frontalnog girusa i desnog lateralnog okcipitalnog korteksa. To može značiti da VRG pacijenti potencijalno imaju veći ispad u GABA-ergičkoj transmisiji i veći poremećaj prefrontalnog korteksa od NRG pacijenata. Takođe, za razliku od rostralnog srednjeg frontalnog korteksa koji je smanjen u odnosu na dve od tri grupe kontrola, desni lateralni okcipitalni korteks je stanjen samo u odnosu na VRG kontrole. Kao i kod korpusa kalozuma u traktografiji, ovo može govoriti u prilog hipotetičkih protektivnih mehanizama, koji čine da je VRG grupa „otporna“ na depresivni poremećaj zbog faktora koji utiču i na ovu kortikalnu oblast.

3. Treći nalaz koji se izdvaja u našem istraživanju je da VRG i NRG pacijenti imaju istanjen levi donji parijetalni korteks u odnosu na NRG kontrole. Uloga parijetalnog režnja je pretpostavljena kod osoba pod povećanim rizikom od razvoja depresije (Mannie et al, 2010). Nedavna meta analiza je ukazala da je upravo oštećenje frontoparijetalne veze najkonzistentniji nalaz u depresivnom poremećaju (Kaiser et al, 2015). Prema tome, i ovde kao i kod korpusa kalozuma, vidimo da je stanjenje sive mase u levom donjem parijetalnom girusu pre posledica samog depresivnog poremećaja nego specifičan efekat genetskog profila. Ipak, s obzirom da samo NRG kontrole imaju pojačanu debljinu ove

oblasti govori o uticaju ove genetske kombinacije u protektivnom smislu na levi donji parijetalni korteks.

Za razliku od traktografije i morfometrije zasnovane na vokselu, u analiziranju rezultata debljine sive mase u pojedinačnim polimorfizmima smo imali najveći problem u definisanju rezultata koji su autentično posledica akumulacije dejstva polimorfizama (Tabela 11). Tako, na primer, rostralni srednji frontalni girus je istanjen u sva tri polimorfizma kada se pojedinačno posmatraju. Zbog toga smo pretpostavili da je ovde verovatnije da su uzroci promena akumulacija ili interakcija polimorfizama, nego da svaki polimorfizam ima potpuno nezavisan uticaj na istu oblast. Levi donji parijetalni girus je stanjen i u BDNF Val66Met i u SERT 5-HTTLPR, ali su ovde rezultati takvi da ne ukazuju na zaključke i relacije koje smo postavili u akumulacionom modelu, te smo i ovde smatrali da je rezultat akumulacionog modela u objašnjenju dejstva polimorfizama autentičan. Najproblematičnije su bile promene u desnom lateralnom okcipitalnom girusu. Pacijenti sa BDNF Val homozigotijom imali su tanju sivu masu kore u odnosu na Val homozigotne kontrole, dok su pacijenti sa SERT S homozigotijom imali stanjenu sivu masu ove kortikalne regije u odnosu na L nosioce. Ipak, s obzirom na to da oba polimorfizma govore u prilog postojanja protektivnog efekta kod VRG kontrola, navedeni rezultati su svrstani kao pozitivni, mada se ne mogu isključiti dve moguće greške:

1) da je u pitanju samostalni efekat BDNF polimorfizma koji se zbog homogenosti VML grupe kao artefakt ispoljio i u akumulacionom modelu; i 2) da nije u pitanju pun VML efekat, već da se radi o posedicama delovanja samo BDNF i SERT polimorfizama.

Jedini rezultat koji je apsolutno sigurno efekat samo pojedinačnog polimorfizma je uticaj SERT 5-HTTLPR na desni precentralni girus gde pacijenti sa S homozigotijom imaju vrlo izražen nalaz stanjene kore u ovoj oblasti i u odnosu na pacijente L nosioce i u odnosu na obe grupe kontrola. Jedan rad na muškim, starijim

osobama koje imaju depresivne simptome, ali ne ispunjavaju kriterijume za depresiju je pronašao kod njih smanjen volumen ove oblasti u odnosu na kontrole (Taki et al, 2005).

S obzirom na tehničke specifičnosti, morfometrija zasnovana na vokselu je jedina metoda u kojoj smo pored akumulacionog modela, analizirali i sva tri pojedinačna polimorfizma ponaosob, a ne samo kao korekciju za akumulacioni model. Za razliku od debljine sive mase ovde nije bilo preklapanja akumulacionog modela i pojedinačnih polimorfizama. Uz to, poredili smo i sve pacijente sa svim kontrolama.

U akumulacionom modelu VRG pacijenti u odnosu na NRG kontrole imaju obostrano smanjen volumen u donjem frontalnom korteksu, srednjem orbitofrontalnom girusu i insuli, kao i u levom superiornom frontalnom girusu, levom srednjem cingularnom korteksu i levom donjem temporalnom girusu. Pojednostavljeno, poređena je najrizičnija grupa, pacijenti sa VML kombinacijom (tj. prisustvom sva tri alela koja izazivaju podložnost za depresiju), i najzaštićeniju grupu, kontrole sa jednim ili nijednim takvim alelom (dakle, ovi pacijenti imaju dva ili tri alela BDNF Met nosilac, COMT Val homozigot i SERT S homozigot). Drugim rečima, teorijski dva ekstrema našeg modela su zaista pokazala najizraženije razlike. Te razlike su dominantno u frontalnom delu, sa bilateralnom zahvaćenošću donjeg frontalnog korteksa, srednjeg orbitofrontalnog girusa i insule.

Orbitofrontalni korteks, deo inferiornog frontalnog korteksa, ima ulogu u odlučivanju i integraciji čulnih doživljaja (Kringelbach, 2005). Povezivan je sa ekstroverzijom koja se smatra protektivnim faktorom za depresivni poremećaj (Cremers et al, 2011), a smanjen volumen je i direktno povezivan sa depresivnim poremećajem (Bremner et al, 2002). I genetske studije sa BDNF i COMT pokazale su da ova dva gena imaju uticaj na funkciju ove oblasti. Kao i u našem uzorku, jedna studija je ukazala na smanjen volumen orbitofrontalnog korteksa kod BDNF Val homozigota (Cardoner et al, 2013). U istraživanju koje je izučavalo sistem nagrade kod zdravih osoba, COMT met

homozigoti pokazali su najveću aktivaciju orbitofrontalnog korteksa u trenutku dobijanja nagrade (Dreher et al, 2009). Pacijenti sa COMT Met alelom pokazali su i povećanu aktivaciju i reaktivnost kortiko limbičkih puteva, što može da govori o predispoziciji za nefleksibilno obrađivanje afektivnih stimulusa (Drabant et al, 2006). Za razliku od ova dva istraživanja, pacijenti sa paničnim poremećajem imali su pojačanu aktivaciju orbitofrontalnog korteksa kada su bili izloženi slikama uplašanih lica, ukoliko su bili Val nosioci (Domsche et al, 2008). Do sada nije značajnije izučavana ili sugerisana veza serotoninskog transportera i orbitofrontalne kore.

Meta analiza morformetrije zasnovane na vokselu u depresivnom poremećaju sa 20 radova, 543 pacijenta i 750 kontrola izdvojila je donji frontalni girus kao jednu od oblasti koja je smanjena u depresiji (Du et al, 2012). Ova oblast je i u našem istraživanju bila bilateralno smanjena.

Promene u insuli i temporalnom režnju su retki nalazi u depresivnom poremećaju iako je poznato da je insula glavni centar za registrovanje i reaktivnost na negativni emocionalni nadražaj. Zanimljivo je da su dva rada koja ih povezuju sa depresijom rađena na starijoj populaciji i pacijentima koji boluju od Alchajmerove bolesti sa komorbiditetnom depresijom (Hwang et al, 2010; Son et al, 2013).

Cingulatni korteks je deo limbičkog sistema i vrlo je važan u formiranju i obrađivanju emocija (Hadland et al, 2003). Upravo je ova oblast, i to gotovo po pravilu njen prednji deo, posebno često dovođena u vezu sa depresivnim poremećajem (Drevets et al 2008).

Može se pretpostaviti da to što su upravo VRG pacijenti i NRG kontrole dve krajnosti u pogledu ekstenzivnosti morfoloških razlike, ukazuje na dvojaki mogući uzrok takvog nalaza:

1. Promene su posledica genetske podložnosti i specifičnosti: osobe sa VML kombinacijom će imati najizraženiju atrofiju frontalnog režnja, posebno njegovog donjeg dela. Kontrole nisu sve jednako zaštićene i NRG kontrole imaju najveći volumen ovih oblasti kao posledicu svog genetskog profila.

2. Promene su posledica i samog poremećaja, donekle nezavisno od genetskog profila. Činjenica da se IRG i NRG pacijenti ne razlikuju značajno različiti po atrofiji od VRG pacijenata govori u prilog tome da i kod njih postoji određen stepen smanjenja volumena, koji je ipak nešto manjeg intenziteta. Takođe, činjenica da IRG i VRG kontrole nisu statistički značajno različite od NRG kontrola govori u prilog relativnoj, mada nešto manjoj, očuvanosti volumena kod ovih kontrola.

Zanimljivo je primetiti da, iako i morfometrija zasnovana na vokselu i debljina sive mase moždane kore vizuelizuju sivu masu, rezultati ove dve NMR tehnike se ni najmanje ne preklapaju. Ovo nije neuobičajeno, opisano je u prethodnih teorijskim radovima (Winkler et al, 2010) i ukazuje na njihovu komplementarnost.

Svi pacijenti su imali smanjen volumen u levom precentralnom girusu, desnom gornjem frontalnom girusu i desnom medialnom gornjem frontalnom girusu. Od pojedinačnih polimorfizama i COMT Met nosioci u odnosu na Val homozigotne kontrole i BDNF Val homozigoti u odnosu na kontrole Met nosioce, imali su smanjen volumen desnog gornjeg frontalnog girusa kao i svi pacijenti zajedno, ali ovaj nalaz se ne ističe u akumulacionom modelu, već je levi superiorni frontalni girus u akumulacionom modelu smanjenog volumena. To može značiti da u desnom superiornom frontalnom girusu L alel 5-HTTLPR ne samo da nema akumulacioni efekat sa BDNF i COMT, već da potencijalno ima donekle protektivno svojstvo, dok se atrofija leve strane postiže samo u uslovima akumulacije. Uloga ove oblasti još uvek nije potpuno jasna. Postoje zanimljiva istraživanja koja govore da stimulacija prednjeg dela leve suplementarne motorne aree, koja je deo levog gornjeg frontalnog korteksa (dela koji je atrofirani u akumulacionom modelu, a nije smanjen kod pojedinačnih i u ukupnom uzorku) izaziva smeh (Fried et al, 1998).

Celokupan superiorni frontalni girus odgovoran je za samosvest i samoprocenjivanje (engl. self-awareness) (Goldberg et al, 2006).

U našem istraživanju pacijenti sa Met alelom COMT, između ostalog, imaju smanjen volumen desne insule. S obzirom na to da je u akumulacionom modelu ovaj nalaz obostran, moguće je da je ovde akumulacioni model zaista dominantan, ali da u njemu nemaju svi aleli jednak efekat i da Met alel ima dominantan uticaj na ovu atrofiju kod pacijenata.

Naši nalazi pokazuju da pacijenti koji su nosioci L alela imaju smanjen levi srednji temporalni girus i levi precentralni girus u odnosu na S homozigot kontrole. Takođe, imaju smanjen desni medijalni superiorni frontalni girus i desni anteriorni cingulatni korteks u odnosu na L homozigote kontrole. Dakle, promene kod ovih pacijenata su kvalitativno potpuno različite u odnosu na dve grupe kontrola. Možemo smatrati da promene u odnosu na S homozigote predstavljaju dominantno genetske promene, dok promene u odnosu na L nosioce predstavljaju dominantno promene koje su posledica samog poremećaja. I zaista je, na primer, atrofija anteriornog cinglatnog korteksa značajno češće opisivana u literaturi koja je posmatrala depresivne pacijente u odnosu na kontrole bez analiziranja genetike u odnosu na desni temporalni girus i precentralni girus koji su značajno ređi nalazi (Kempton, 2011; Laio, 2013).

Naša studija je prva u kojoj se ispituju integritet sive i bele mase na velikom uzorku pacijenata sa depresivnim poremećajem uz prateći generalizovani anksiozni poremećaj, ili bez njega. Po našim nalazima obe grupe pacijenata imaju zajedničke karakteristike cerebralnih promena u ventralnom i medijalnom regionu prefrontalnog korteksa. Pored toga, imaju i fenotipske specifičnosti. Tako su izrazitija kortikalna oštećenja lateralnih prefrontalnih i parijetalnih regija kod pacijenata koji imaju samo depresivni poremećaj, dok su izrazitija kortikalna oštećenja u anteriornom cingulatnom korteksu, insuli, temporalnim i okcipitalnim korteksima zabeležena samo kod pacijenata sa komorbiditetom GAP. Što se tiče bele mase, samo su pacijenti sa depresijom pokazali

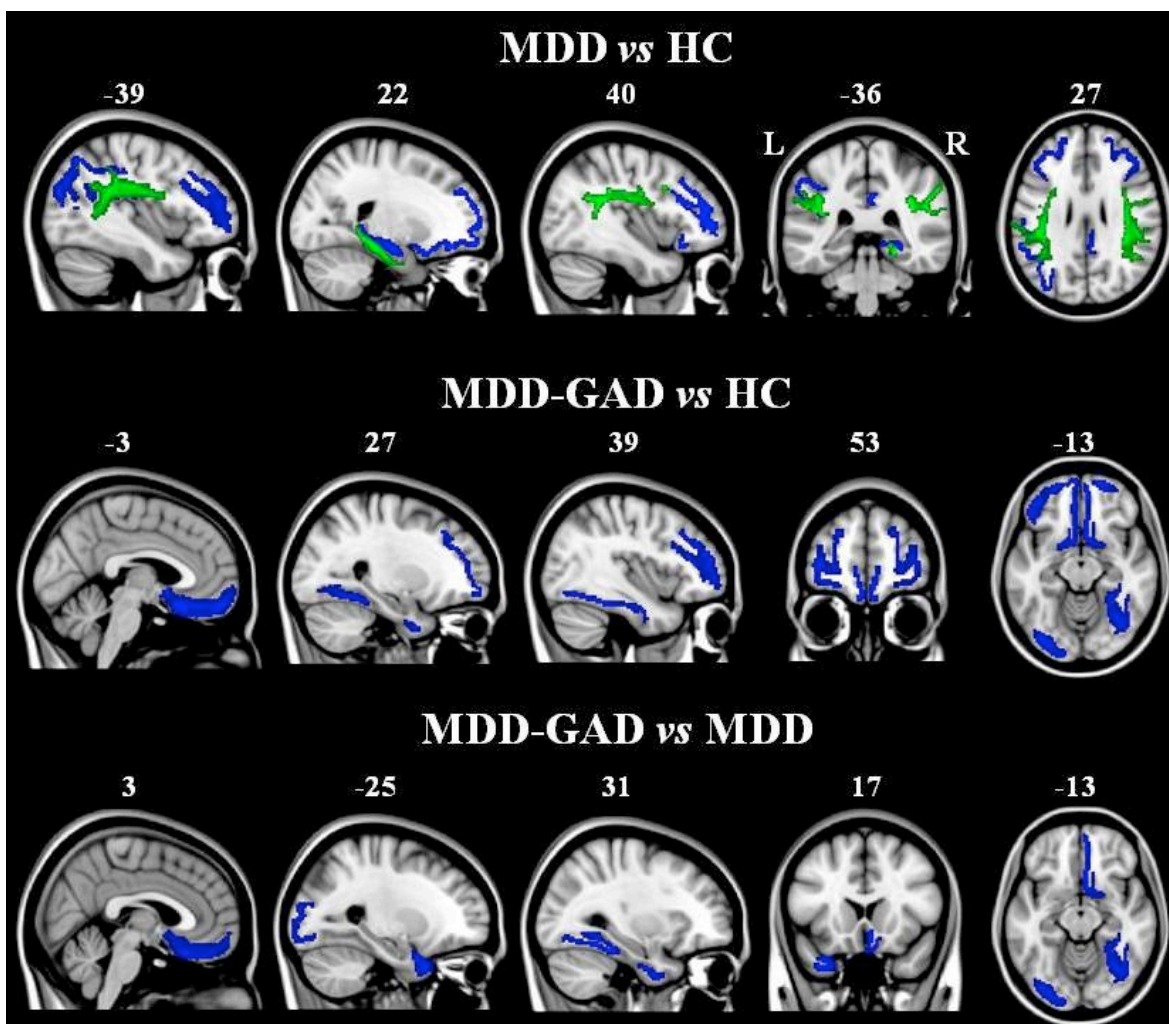
mikro strukturne promene. One su locirane u superiornom longitudinalnom fascikulusu i u parahipokampalnom traktu, i povezane su sa stanjivanjem sive mase u inferiornom parijetalnom režnju, odnosno hipokampusu.

U poređenju sa kontrolama, i pacijenti sa MDD, i oni sa MDD-GAD pokazali su stanjivanje korteksa u bilateralnom rostralnom srednjem frontalnom korteksu, medijalnom frontalnom girusu, i frontalnom polu. Naši rezultati ponovili su mnogobrojne prethodne nalaze o sivoj masi u srednjem frontalnom korteksu i kod pacijenata sa MDD i onih sa GAP jer ovaj region, kao deo ventromedijalnog prefrontalnog korteksa, podržava emocionalne procese, bihejvioralnu inicijativu i motivaciju, i dobro je poznato da igra kritičnu ulogu u poremećajima raspoloženja (Shang et al, 2014; Etkin et al, 2011; Hilbert et al; 2014, Koenigs et al, 2009). S druge strane, dorzolateralni prefrontalni korteks povezan je sa kognitivnijim aspektima ponašanja i deo je frontoparijetalnih neuronskih krugova u mozgu (Brzezicka, 2013). Kod MDD, uključenost parijetalnog režnja uz lateralni prefrontalni korteks već je dokazana (Kowatch et al, 1999) i izgleda da je povezana s oslabljenom pažnjom i egzekutivnom disfunkcijom kod ovih pacijenata (Brzezicka, 2013). Parijetalni režanj je povezan s dorzolateralnim prefrontalnim korteksom kroz SLF, dugi asocijativni trakt bele mase koji povezuje perisilvijanov frontalni, parijetalni, i temporalni korteks (Catani et al, 2002). U poređenju sa kontrolama, pacijenti sa MDD pokazali su stanjivanje korteksa u oblastima lateralnog orbitofrontalnog korteksa, inferiornog parijetalnog i supramarginalnog korteksa, kao i mikrostrukturne promene bele mase u SLF. Štaviše, utvrđen je i odnos između stanjivanja inferiornog parijetalnog korteksa i oštećenja SLF, što ukazuje da prekid veze u frontoparijetalnom neuronskom krugu igra važnu ulogu u MDD što je nedavno i pokazano velikom meta analizom (Kaiser et al, 2015). U skladu sa ovim, u nekoliko studija sa DTI zabeležen je oslabljeni integritet bele mase u frontalnom regionu (Li et al, 2007; Ma et al, 2007), subgirusnom i angularnom girusnom parijetalnom režnju (Ma et al, 2007), i inferiornom parijetalnom delu SLF (Zou et al, 2008).

Jedan od najčešćih nalaza u istraživanju depresivnog poremećaja (Sheline et al, 2003; Campbell et al, 2004; Sheline et al, 1996) registrovali smo i u našem uzorku, te su pacijenti sa MDD pokazali smanjene zapremine sive mase u hipokampusu i smanjeni integritet parahipokampusnog trakta bele mase u poređenju sa kontrolama. Kada su regioni mozga u pitanju, ako se porede i sa pacijentima sa MDD i sa zdravim kontrolama, pacijenti sa MDD-GAP u našem istraživanju pokazuju dodatno stanjivanje desnog medijalnog orbitofrontalnog girusa, inferiornog frontalnog girusa, desnog fuziformnog girusa, levog temporalnog pola i levih lateralnih okcipitalnih korteksa. Međutim, u našoj studiji, manifestno je veće oštećenje sive mase kod pacijenata sa MDD-GAP u poređenju sa pacijentima sa MDD u parametrima verteksne analize kortikalne debljine (mereno voksel tehnikom) nego na regionalnom nivou (ekstrakcija mere kortikalne debljine) i uključene su dodatne promene u rostralnom anteriornom cingulatnom korteksu, insuli, precentralnom girusu, superiornom i inferiornom parijetalnom režnju i prekuneusu.

Ovaj dodatni model atrofije sive mase koji smo zabeležili kod pacijenata sa MDD-GAD konkretno oslikava anatomske neuronske krugove anksioznosti. Ukratko, registrovanje i reaktivnost na negativni emocionalni nadražaj obavlja se u insuli (a ne u amigdali), što je ključna limbička struktura (Carson i Mujica-Parodi, 2010). Ovaj region može da usmeri aktivnost u hipokampus (da se zabeleže emocionalne i kontekstualne uspomene) i u senzorni korteks (kao što je motorni- precentralni girus i vizuelni- fuziformni i lateralni okcipitalni korteksi). Dalje praćenje i procena negativnih nadražaja obavlja se u anteriornom cingulatnom korteksu i dorzalno/medijalnom prefrontalnom korteksu. Angažovanje ovih struktura dovodi do detaljne procene i svesnog poimanja emocionalnog nadražaja što ne mogu subkortikalne strukture. Ovi regioni, za uzvrat, daju povratnu informaciju za regulisanje primereno kontekstu, što može da dovede do inhibicije ili pojačanja limbičke obrade (Etkin, 2010). Može se pretpostaviti da kod pacijenata sa MDD-GAP ova emocionalna obrada ne može propisno da se registruje u insuli, niti može da se modulira kortikalnom kontrolom odozgo nadole (zbog atrofije anteriornog cingulatnog i prefrontalnog korteksa), što dovodi do prekomerne obrade od strane senzornih korteksa,

i odsustva inhibicije straha do čega dolazi u periodima anksioznosti. Što je izraženija atrofija sa svake strane ovog neuronskog kruga, izraženija je i ova disregulacija (Shang et al, 2014).



Slika 3. Distribucija smanjenja debljine sive mase (obeležene plavo) i oštećenja puteva bele mase (obeležene zeleno) kod: Prvi red – depresivni bez GAP u odnosu na kontrole; Drugi red – depresivni komorbiditetni sa GAP u odnosu na kontrole; Treći red – depresivni komorbiditetni sa GAP u odnosu na depresivne bez GAP

U našem istraživanju, u poređenju sa kontrolama, samo su pacijenti sa MDD pokazali abnormalnosti u beloj masi u desnom parahipokampusnom traktu i bilateralno u SLF, dok kod pacijenata sa MDD-GAP nije bilo promena u beloj masi. Priroda oštećenja

bele mase u MDD i dalje je predmet diskusija. Većina ispitivanja MDD na autopsijskom materijalu obavljena je na prefrontalnom korteksu i zabeleženo je smanjenje veličine neurona i smanjenje broja i gustine glije (Cotter et al, 2002), gustine oligodendrocita (Uranova et al, 2004) i oštećenja mijelina u dorzolateralnom i ventromedijalnom prefrontalnom korteksu (Regenold et al, 2007). U izvesnom broju ovakvih postmortem ispitivanja zabeležena je inflamacija kao patološki marker ishemijskih lezija kod ovih pacijenata što je išlo u prilog teoriji depresije kao vaskularnog problema (Thomas et al, 2002a; Thomas et al, 2002b). Duboki hipertenziviteti bele mase nađeni su češće kod pacijenata nego kod kontrola (O'Brien et al, 1996) i povezani su sa težim oblikom bolesti, kognitivnim deficitima i lošijim odgovorom na antidepresive (Heiden et al 2005; Iosifescu et al, 2005; Videbech et al, 2004). Međutim, u našem istraživanju pažljivo smo isključili pacijente sa hipertenzivitetima WM vidljivim na sekvencama T2. Prema tome, iako nismo mogli da isključimo mikrovaskularnu prirodu oštećenja bele mase kod depresivnih pacijenata, oštećenje koje smo zabeležili kod pacijenata sa MDD po svojoj prilici oslikava gubitak aksona ili mijelina zbog primarnog oštećenja bele mase ili sekundarnog oštećenja usled atrofije sive mase (Basser and Pierpaoli, 1996).

Naša studija potvrdila je nalaze prikazane u velikoj većini dosadašnjih istraživanja - značajno češću hipoehogenost rafe jedara kod depresivnih pacijenata u odnosu na kontrole (Tabela 13). Naše istraživanje razlikuje se po tome što je najveće do sada urađeno i što je uključilo i genetske faktore.

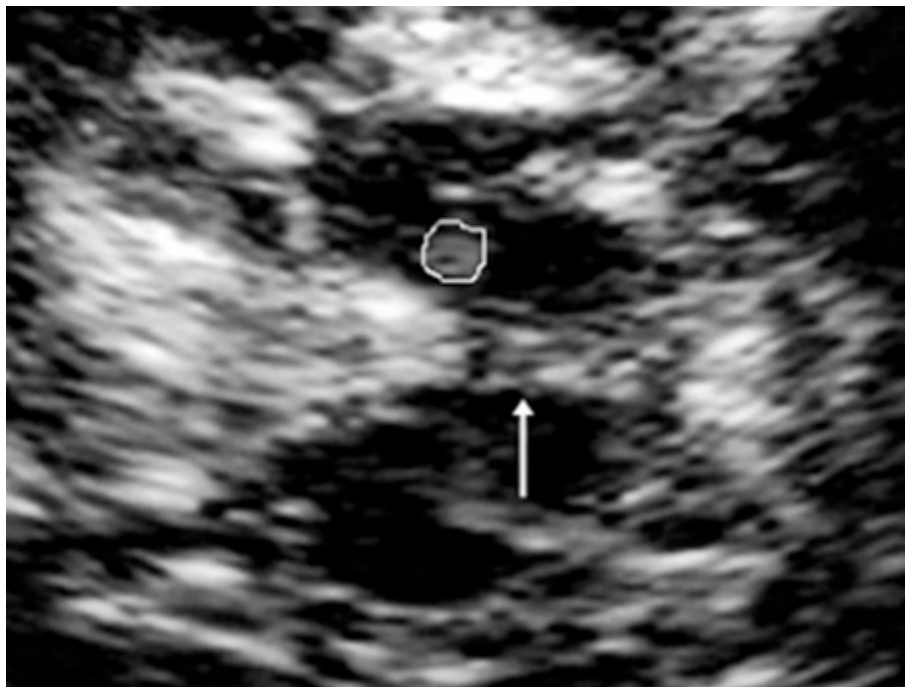
Tabela 11. Dosada urađena istraživanja ehogenosti rafe jedara u depresiji

Istraživanje	Broj ispitanika (depresivni+kontrole)
Becker et al, 1994.	20+20
Becker et al, 1995.	40+40
Steele et al, 2005.	15+14
Walter et al, 2007.	37+50
Walter et al, 2007.	40+55
Budišić et al, 2010.	31+40
Ghourchian et al, 2014.	30+30
Zhang et al, 2015.	41+43

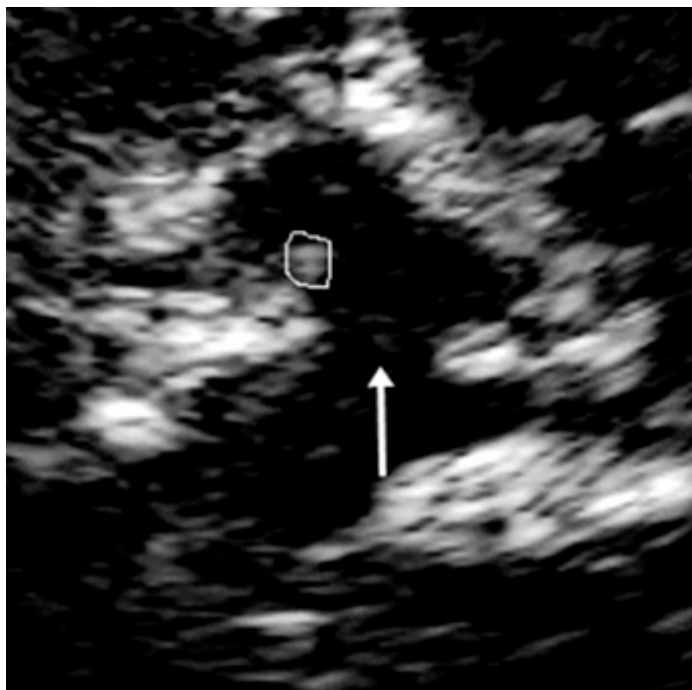
Još uvek nije u potpunosti jasan uzrok ovog nalaza, ali jedna od mogućnosti je poremećaj mikroarhitekture rafe jedara (Becker et al, 2001). U prilog strukturnoj patologiji kao osnovi nalaza ide i istraživanje koje je pokazalo povećanje intenziteta signala srednje linije moždanog stabla na «T2-weighted» NMR kod depresivnih pacijenata u poređenju sa kontrolama (nalaz i u studijama bipolarnog poremećaja (Berg et al, 1999). Ne postoji direktna korelacija ehogenosti rafe i težine depresivne epizode ili poremećaja (Becker et al, 1994; Becker et al, 1995; Walter et al, 2007a; Walter et al, 2007c), te su Walter i saradnici (Walter et al, 2007a) predložili da nalazi ultrasonografije potencijalno ukazuju na vulnerabilnost za razvoj depresije.

Rafe jedra su centar serotonergičkih neurona i pretpostavlja se da ehogenost rafe ukazuje na intenzitet serotoninske (5-HT) transmisije (Meyer et al, 2006). Tako su serotoninski neuroni u dorzalnog i medijalnog rafe nukelus glavnog izvora ascendentnih 5-HT projekcija u prednji mozak, limbički sistem, strijatum i druge kortikalne regije (Becker et al, 2001; Brooks and Piccini, 2006). Studija sa «single photon emission computed tomography» srpski pronašla je smanjeno vezivanje za 5-HT 1A receptor u rafe jedrima (Malison et al, 1998), dok su druge studije našle smanjenu dostupnost serotonina

u rafe kod depresivnih pacijenata (Drevets et al, 1999; Parsey et al, 2006). Patoanatomska studija dorzalnog rafe nukleusa pokazala je smanjenje 5-HT 1A receptora kod depresivnih osoba koje su izvršile suicid (Arango et al, 2001). Do sada jedina klinička veza serotoninskog sistema sa nalazom ehogenosti rafe pokazala je da smanjena ehogenost ukazuje na bolji terapijski odgovor na ihbitore ponovnog preuzimanja serotonina (SSRI) sa pozitivnom vrednošću predikcije 88% (Walter et al, 2007a). Ipak, i pored svega ovoga treba imati u vidu da srednja linija mezencefalona koja se vidi na preseku transkranijalnom ultrazvučnom sonografijom predstavlja regiju gde se pored serotoninski nalaze i bidirekcionni putevi koji su centralne komponente bazalnog limbičkog sistema (Becker et al, 2001). Dakle, poremećaj ehogenosti koji se uočavam može biti uzrokovan poremećajem serotoninske transmisije, ali i bazalnog limbičkog sistema.



Slika 4. Normalan nalaz rafe



Slika 5. Hipoehogen nalaz rafe

U našem istraživanju otišli smo korak dalje i pokušali da utvrdimo koji klinički ili genetski faktori predviđaju hipoehogen nalaz rafe. BDNF Val66Met i COMT Val158Met funkcionalni polimorfizmi u našem uzorku nisu se pokazali kao značajni. Nažalost, zbog veličine uzorka nismo mogli da radimo model akumulacije ili interakcije. Naši pacijenti koji su homozigoti za S alel imali su značajno češći nalaz hipoehogenosti od pacijenata L nosioca ($p=0,048$).

Uradili smo diskriminantnu analizu koja je pokazala da su značajni prediktori hipoehogenosti rafe kombinovano prisustvo komorbidnog anksioznog poremećaja, visoki skorovi na pitanju 5 HAMA upitnika (poremećaj koncentracije i memorije) i homozigotnost za S alel 5-HTTLPR polimorfizma.

Komorbiditet anksioznih poremećaja bio je skoro dvostruko češći kod pacijenata sa hipoehogenošću u odnosu na pacijente sa normalni nalazom. Ipak, ova razlika zbog

veliĉine uzorka nije dostigla statistiĉku znaĉajnost. Sliĉan nalaz je zabeležen i u prethodnom istraživaju koje je posmatralo depresivni poremećaj u Parkinsonovoj bolesti. Naime, i tu je anksioznost bila znaĉajno češća kod pacijenata sa hipoehogenošću rafe (41% u odnosu na 29%) (Stanković et al, 2015). Ovome u prilog ide i istraživaje koje je pokazalo smanjenu serotoninsku aktivnost i u anksioznim poremećajima, kao i u depresivnim (Eison and Eison, 1994). Poznato je da je dorzalni rafe nukleus aktiviran stimulusima koji izazivaju anksioznost i da je povezan sa strukturama prednjeg mozga koje kontrolišu anksioznost (Lowry et al, 2008). Pored anksioznosti, uključili smo i S homozgot 5-HTTLPR u analizu. Pokazano je da ovaj alel utiĉe na transkripciju serotoninskog transportera smanjujući ekspresiju gena za ovaj transporter (Praschak-Rieder et al, 2007). Pored već opisane povezanosti ovog alela sa depresivnim poremećajem, on je povezivan i sa povećanom podložnošću za generalizovani anksiozni poremećaj (You et al, 2005) i socijalni anksiozni poremećaj (Reinelt et al, 2014). Lesch i saradnici (Lesch et al, (1996) prvi su ukazali na povezanost S alela i depresivnih, anksioznih i agresivnih crta liĉnosti. Neke studije povezale su S alel sa slabljenjem radne memorije (Weiss et al, 2014), kao i pamćenja kod žena (Price et al, 2013). Tu upravo može biti veza sa našim nalazom - pored anksioznosti i S alela, kao faktor koji povećava predikciju pojave hipoehogenosti registrovali smo i skor 5 u HAMA upitniku (problemi sa koncentracijom i memorijom).

Dakle, kada uzmemo ove kliniĉke i genetske parametre u kombinaciji sa transkranijalnim ultrazvukom vidimo da pacijenti sa depresivnim poremećajem i hipoehogenošću rafe jedara mogu predstavljati zasebnu podgrupu sa specifiĉnim fenotipom i genotipom. Taj genotip karakteriše S alel homozgot za 5-HTTLPR funkcionalni polimorfizam, a fenotip se karakteriše češćim komorbiditetom anksioznog poremećaja i slabijom koncentracijom i pamćenjem.

Naše istraživaje ima nekoliko ograniĉenja. Ima relativno mali uzorak. To je posebno došlo do izražaja sa podelom grupe pacijenata i kontrola na po tri podgrupe od kojih je najmanja imala 13 ispitanika.

Drugo ograničenje je delimična nehomogenost intermedijerne i nisko rizične grupe. Idealno bi bilo da naše istraživanje ima 8 grupa sa svim potencijalnim interakcijama, ali smo se, usled nedovoljnog broja ispitanika, odlučili za kompromisno rešenje akumulacionog modela gde je samo visoko rizična grupa potpuno homogena, nisko rizična grupa dominantno homogena, ali ne potpuno, i intermedijerna grupa potpuno heterogena.

Pored toga, napravili smo još jedno kompromisno rešenje u našem modelu: alele smo delili na dve varijante, homozigote i nosioce, dok bi preciznije bilo da su se sastojali iz tri grupe: homozigot za jedan alel, heterozigot i homozigot za drugi alel. Opet, zbog broja ispitanika morali smo da se odlučimo na ovaj potez.

Neujednačenost kontrola u odnosu na pacijente u obrazovnom statusu je jedini značajniji sociodemografski faktor koji je mogao da utiče na krajnje rezultate. Ipak, ujednačenost u toj oblasti, kada se porede podgrupe pacijenata međusobno ili odvojeno podgrupe kontrola, međusobno je donekle umanjilo ovaj efekat jer je naš primarni cilj upravo bio utvrđivanje razlika među pacijentima, a ne u odnosu na kontrole.

U našem istraživanju nismo razmatrali uticaj terapije na rezultate. S obzirom na veliki broj različitih lekova koje su naši pacijenti u većini slučajeva primali, smatrali smo da bi to bilo nemoguće učiniti, a da se dobiju bilo kakvi verodostojni rezultati. Mnogobrojna istraživanja pokazuju da antidepresivi mogu imati uticaj na morfologiju mozga te ovo predstavlja ograničenje našeg istraživanja (Gudayol i Ferre, 2015).

Nismo razmatrali uticaj poremećaja ličnosti. Postojanje komorbiditeta sa poremećajima ličnosti može uticati na težinu kliničke slike, odgovor na antidepresive i na morfologiju. Zbog svega toga bi ova mera bila dobrodošla u analiziranju rezultata morfoloških, genetskih i kliničkih rezultata i nedostatak ove dijagnostike je ograničenje ovog istraživanja.

Pozitivan nalaz herediteta može se smatrati dominantno verodostojnim, ali postoji mogućnost da su pacijenti bolje obavješteni o svom hereditetu zbog svoje bolesti i posledične veće zainteresovanosti za takve informacije u odnosu na kontrole. Ipak, ovaj faktor ne bi trebalo da utiče na visoku razliku u hereditetu među ispitivanim grupama pacijenata.

Naše istraživanje je prvo koje je izučavalo uticaj akumulacije više od dva alela funkcionalnih polimorfizama u depresivnom poremećaju. Korišćenjem tri različite NMMR tehnike i transkranijalne ultrazvučne sonografije, dobijena je opsežna morfološka slika kojom su analizirani uticaji kako svakog alela ponaosob, tako i u akumulaciji sa drugim alelima. Ovakav pristup kompleksnom analiziranju depresivnog poremećaja kao poligenetskog oboljenja značajno usložnjava metodologiju, ali i doprinosi verodostojnosti rezultata i smanjivanju verovatnoće lažno pozitivnih nalaza usled veće homogenosti grupa pacijenata i kontrola na osnovu objektivnih parametara kao što je genetski profil (u odnosu na dosada najčešće korišćen subjektivni pristup psihijatrijske dijagnoze).

6. Zaključci

1. Utvrđeno je da je Val homozigot BDNF Val66Met značajno češći kod pacijenata u odnosu na kontrole.
2. U našem uzorku, nijedna varijanta COMT Val156Met nije statistički značajno češća kod pacijenata u odnosu na kontrole ili obrnuto. Osobe koje su Met nosioci su bile češći kod pacijenata u odnosu na kontrole, ali su rezultati bili na ivici statističke značajnosti.
3. Kada se posmatra gen za serotoninski transporter, L nosioci su bili češći kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u odnosu na kontrole, ali je i ovde razlika na nivou trenda.
4. Trostruka kombinacija BDNF Val homozigot/COMT Met nosilac/SERT L nosilac (VML) je bila visoko statistički značajno češća kod pacijenata u odnosu na kontrole. Ova kombinacija nam je poslužila za pravljenje akumulacionog modela i daljeg izučavanja uticaja interakcije ova tri alela. Dve grupe, koje smo nazvali Visoko rizične grupe, su grupa pacijenata i grupa kontrola sa VML kombinacijom. Dve grupe, pacijenti i kontrole sa bilo koja dva od tri alela iz VML kombinacije, smo nazvali Intermedijarne grupe (IG). Poslednje dve grupe su činili pacijenti ili kontrole sa jednim ili nijednim alelom iz VML kombinacije i nazvane su Nisko rizične grupe (NRG). Ovu podelu smo nazvali akumulacioni model jer je zasnovana na neselektivnoj akumulaciji alela koje smo definisali kao rizične.
5. Visoko rizična grupa je imala značajno veći hereditet u odnosu na intermedijernu i nisko rizičnu grupu grupa.
6. Nisko rizična grupa pacijenata je imala značajno više skorove na 11 pitanju (razdražljivost) Bekovog upitnika depresivnosti u odnosu na visoko rizične pacijente.

7. Visoko rizična grupa je imala izraženiju dnevnu varijaciju raspoloženja (pitanje broj 18 u HAMD-21) u odnosu na nisko rizičnu grupu.
8. Tri česta nalaza u istraživanjima depresivnog poremećaja su bila pozitivna i u našem uzorku. Svi pacijenti posmatrani zajedno su imali češći hereditet, zlostavljanje u detinjstvu i enurezu u odnosu na kontrole.
9. Naše istraživanje je našlo da i visoko rizični i nisko rizični pacijenti imaju poremećaj mikrostrukture bele mase u korpusu kalozumu (posebno izraženo u telu korpusa kalozuma) u odnosu na visoko rizične kontrole i to u vidu smanjenja frakcione anizotropije. Ovaj nalaz upućuje na potencijalne razloge rezilijentnosti visoko rizičnih kontrola.
10. Visoko rizični pacijenti imaju stanjenu sivu masu moždane kore obostrano u rostralnim srednjim frontalnim girusima u odnosu na visoko rizične i nisko rizične kontrole. Ova oblast je deo dorzolateralnog prefrontalnog korteksa i može ukazivati na specifične patološke mehanizme nastanka depresije u ovoj podgrupi.
11. Visoko rizični pacijenti imaju stanjenje sive mase u desnom lateralnom okcipitalnom girusu u odnosu na visoko rizične kontrole. Ovo može ukazivati na uzrok rezilijentnosti visoko rizičnih kontrola, ali i na patološke mehanizme pacijenata iste grupe.
12. I visoko rizični i nisko rizični pacijenti imaju istanjen levi donji parijetalni korteks u odnosu na samo nisko rizične kontrole. Ovaj nalaz potencijalno ukazuje na uticaj ove genetske kombinacije u protektivnom smislu na levi donji parijetalni korteks.
13. Visoko rizični pacijenti imaju obostrano smanjen volumen u donjem frontalnom korteksu, srednjem orbito frontalnom girusu i insuli, kao i u levom superiornom frontalnom girusu, levom srednjem cingularnom korteksu i levom donjem temporalnom girusu u odnosu na nisko rizične kontrole. Dakle upravo najzaštićenije oblasti nisko rizičnih kontrola (dominantno u prednjem mozgu) su najizloženije atrofiji kod visoko rizičnih pacijenata.
14. I pacijenti sa komorbiditetom depresivnog i generalizovanog anksioznog poremećaja i depresivni pacijenti bez tog komorbiditeta imaju zajedničke

karakteristike cerebralnih promena u ventralnom i medijalnom regionu prefrontalnog korteksa. Pored ovih promena, postoje i promene koje su specifične za svaku grupu i posledica fenotipske specifičnosti. Pacijenti koji boluju samo od depresivnog poremećaja imaju kortikalna oštećenja lateralnih prefrontalnih i parijetalnih regija, kao i mikrostrukturne promene locirane u superiornom longitudinalnom fascikulusu i u parahipokampalnom traktu. Pacijenti sa komorbiditetom imaju kortikalna oštećenja u anteriornom cingulatnom korteksu, insuli, temporalnim i okcipitalnim korteksima.

15. Depresivni pacijenti imaju značajno češću hipoehogenost rafe jedara u odnosu na kontrole. Značajni prediktori hipoehogenosti rafe su kombinovano prisustvo komorbidnog anksioznog poremećaja, visoki skorovi na pitanju 5 HAMA upitnika (poremećaj koncentracije i memorije) i homozigotnost za S alel 5-HTTLPR polimorfizma. Dakle naše istraživanje je pokazalo da određeni pacijenti imaju veću verovatnoću da ispolje ovaj nalaz, ukazujući na potencijal da ova metoda ukaže na patološke podgrupe depresivnog poremećaja.
16. BDNF Val66Met i COMT Val158Met funkcionalni polimorfizmi nisu pokazali uticaj na ehogenost rafe jedara.
17. Naše istraživanje je pokazalo da je model izučavanja depresivnog poremećaja kroz genetske akumulacije ili interakcije obećavajući i da ima potencijal da prikaže suptilne, ali potencijalno etiološki, patološki i terapijski značajne razlike među samim depresivnim pacijentima ili ukaže na faktore koji utiču na rezilijentnost nebolesne populacije.

7. Literatura

1. Abe O, Takao H, Gono W, Sasaki H, Murakami M, Kabasawa H, Kawaguchi H, Goto M, Yamada H, Yamasue H, Kasai K, Aoki S, Ohtomo K. Voxel-based analysis of the diffusion tensor. *Neuroradiology*. 2010;52:699–710.
2. Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 1995;374:450–453.
3. Aghajani M, Veer IM, van Lang ND, Meens PH, van den Bulk BG, Rombouts SA, Vermeiren RR, van der Wee NJ. Altered white-matter architecture in treatment-naive adolescents with clinical depression. *Psychol Med*. 2014;44(11):2287-2298.
4. Agosta F, Kostic VS, Davidovic K, Kresojević N, Sarro L, Svetel M, Stanković I, Comi G, Klein C, Filippi M. White matter abnormalities in Parkinson's disease patients with glucocerebrosidase gene mutations. *Mov Disord*. 2013;28(6):772-778.
5. Alcantara S, Frisen J, del Rio JA, Soriano E, Barbacic M, Silos-Santiago I. TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J Neurosci*. 1997;17:3623–3633.
6. Altschul S. *The adulthood of the neurotic child: Developmental perspectives*. Lanham, MD: Jason Aronson, 1990.
7. Amad A, Ramoz N, Thomas P, Jardri R, Gorwood P. Genetics of borderline personality disorder: Systematic review and proposal of an integrative model. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;40C:6-19.

8. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text rev.). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
9. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fifth ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013.
10. Andiappan AK, Parate PN, Anantharaman R, Suri BK, Wang de Y, Chew FT. Genetic variation in BDNF is associated with allergic asthma and allergic rhinitis in an ethnic Chinese population in Singapore. *Cytokine*. 2011;56(2):218-223.
11. Andreasen NC, Black DW. Introductory textbook of psychiatry, 3rd edition. American Psychiatric Publishing, Inc, 2001.
12. Angst J, Gamma A, Baldwin DS, Ajdacic-Gross V, Rössler W. The generalized anxiety spectrum: prevalence, onset, course and outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2009;259:37-45.
13. Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*. 2001;25:892-903.
14. Arias B, Serretti A, Lorenzi C, Gasto C, Catalan R, Fananas L. Analysis of COMT gene (Val 158 Met polymorphism) in the clinical response to SSRIs in depressive patients of European origin. *J. Affect. Disord*. 2006;90:251–256.
15. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-Based Morphometry — The Methods. *NeuroImage* 2000;11(6):805–821.
16. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*. 2007;38(1):95-113.
17. Ashby FG, Isen AM, Turken AU. A neuropsychological theory of positive affect and its influence on cognition. *Psychol. Rev*. 1999;106:529–550.
18. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn.: American Psychiatric Press, 2000.

19. Axelrod J. O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols in vitro and in vivo. *Science* 1957;126(3270):400–401.
20. Bandura A. *Social learning theory*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1977.
21. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1:549–553.
22. Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B* 1996;111:209-219.
23. Batalla A, Soriano-Mas C, López-Solà M, Torrens M, Crippa JA, Bhattacharyya S, Blanco-Hinojo L, Fagundo AB, Harrison BJ, Nogué S, de la Torre R, Farré M, Pujol J, Martín-Santos R. Modulation of brain structure by catechol-O-methyltransferase Val(158) Met polymorphism in chronic cannabis users. *Addict Biol.* 2014;19(4):722-732.
24. Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, Domschke K. Association of the COMT val158met Variant with Antidepressant Treatment Response in Major Depression. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(4):924–932.
25. Beck AT. *Depression: Causes and treatment*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1967.
26. Becker G, Becker T, Struck M, Lindner A, Burzer K, Retz W, Bogfahn U, Beckmann H. Reduced echogenicity of brainstem raphe specific to unipolar depression: a transcranial colorcoded real-time sonography study. *Biol. Psychiatry.* 1995;38:180-184.
27. Becker G, Becker T, Struck M, Lindner A, Burzer K, Retz W, Bogfahn U, Beckmann H. Reduced echogenicity of brainstem raphe specific to unipolar depression: a transcranial colorcoded real-time sonography study. *Biol. Psychiatry.* 1995;38:180-184.

28. Becker G, Berg D, Lesch KP, Becker T. Basal limbic system alteration in major depression: a hypothesis supported by transcranial sonography and MRI findings. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2001;4:21–31.
29. Becker G, Struck M, Bogdahn U, Becker T. Echogenicity of the brainstem raphe in patients with major depression. *Psychiatry. Res.* 1994;55:75–84.
30. Becker G, Struck M, Bogdahn U, Becker T. Echogenicity of the brainstem raphe in patients with major depression. *Psychiatry. Res.* 1994;55:75–84.
31. Behrens TE, Berg HJ, Jbabdi S, Rushworth MF, Woolrich MW. Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain? *Neuroimage.* 2007;34(1):144-155.
32. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(7):2711–2716.
33. Benedetti F, Colombo C, Pirovano A, Marino E, Smeraldi E. The catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism affects antidepressant response to paroxetine in a naturalistic setting. *Psychopharmacology* 2009;203:155–160.
34. Benedetti F, Dallaspesia S, Colombo C, Lorenzi C, Pirovano A, Smeraldi E. Effect of catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism on antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Eur. Psychiatry* 2010;25:476–478.
35. Benedetti F, Riccaboni R, Poletti S, Radaelli D, Locatelli C, Lorenzi C, Pirovano A, Smeraldi E, Colombo C. The serotonin transporter genotype modulates the relationship between early stress and adult suicidality in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2014;16(8):857-866.
36. Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet. Neurol* 2008;7:1044-1055.
37. Berg D, Supprian T, Hofmann E, Zeiler B, Jäger A, Lange KW, Reiners K, Becker T, Becker G. Depression in Parkinson's disease: brainstem midline alteration on

- transcranial sonography and magnetic resonance imaging. *J. Neurol.* 1999;246:1186-1193.
38. Bernstein DP, Stein JA, Newcomb MD, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T, Stokes J, Handelsman L, Medrano M, Desmond D, Zule W. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl.* 2003;27(2):169-90.
39. Bernstein DP, Stein JA, Newcomb MD, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T, Stokes J, Handelsman L, Medrano M, Desmond D, Zule W. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl.* 2003;27(2):169-190.
40. Berrios GE. Melancholia and depression during the 19th century: A conceptual history. *British Journal of Psychiatry* 1988;153(3):298–304.
41. Bibring E. The mechanism of depression. In: Greenacre P, editor. *Affective disorders*. New York: International Universities Press; 1953, pp. 13-48.
42. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 2004;22(3):123–131.
43. Blackburn JR, Pfaus JG, Phillips AG. Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. *Prog. Neurobiol.* 1992;39:247–279.
44. Bloch MH, Landeros-Weisenberger A, Sen S, Dombrowski P, Kelmendi B, Coric V, Pittenger C, Leckman JF. Association of the serotonin transporter polymorphism and obsessive-compulsive disorder: systematic review. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(6):850-858.
45. Blood AJ, Iosifescu DV, Makris N, Perlis RH, Kennedy DN, Dougherty DD, Kim BW, Lee MJ, Wu S, Lee S, Calhoun J, Hodge SM, Fava M, Rosen BR, Smoller JW, Gasic GP, Breiter HC; Phenotype Genotype Project on Addiction and Mood Disorders. Microstructural abnormalities in subcortical reward circuitry of subjects with major depressive disorder. *PLoS one.* 2010;5(11):e13945.

46. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Nazeer A, Adil J, Khan S, Staib LH, Charney DS. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry*. 2002;51(4):273-279.
47. Bressan RA, Costa DC, Jones HM, Ell PJ, Pilowsky LS. Typical antipsychotic drugs–D(2) receptor occupancy and depressive symptoms in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2002;56:31–36.
48. Broche-Pérez Y, Herrera Jiménez LF, Omar-Martínez E. Neural substrates of decision-making. *Neurologia*. 2015 May 11. [Epub ahead of print].
49. Brooks DJ, Piccini P. Imaging of Parkinson's disease: the role of monoamines in behavior. *Biol. Psychiatry*. 2006;59:908-918.
50. Brown SM, Hariri AR. Neuroimaging studies of serotonin gene polymorphisms: exploring the interplay of genes, brain, and behavior. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2006;6:44-52.
51. Brown GW, Craig TK, Harris TO, Herbert J, Hodgson K, Tansey KE, Uher R. Functional polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene interacts with stressful life events but not childhood maltreatment in the etiology of depression. *Depress Anxiety* 2014;31(4):326-334.
52. Bruce SE, Yonkers KA, Otto MW, Eisen JL, Weisberg RB, Pagano M, Shea MT, Keller MB. Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: a 12-year prospective study. *Am J Psychiatry* 2005;162:1179-1187.
53. Brzezicka A. Integrative deficits in depression and in negative mood states as a result of fronto-parietal network dysfunctions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2013;73:313-325.
54. Budisic M, Karlovic D, Trkanjec Z, Lovrencic-Huzjan A, Vukovic V, Bosnjak J, Demarin V. Brainstem raphe lesion in patients with major depressive disorder and in patients with suicidal ideation recorded on transcranial sonography. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 2010;260:203-208.

55. Budisic M, Karlovic D, Trkanjec Z, Lovrencic-Huzjan A, Vukovic V, Bosnjak J, Demarin V. Brainstem raphe lesion in patients with major depressive disorder and in patients with suicidal ideation recorded on transcranial sonography. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 2010;260:203-208.
56. Burton R. *The Anatomy of Melancholy*. Vintage Books, New York, 1977.
57. Cabelli RJ, Shelton DL, Segal RA, Shatz CJ. Blockade of endogenous ligands of trkB inhibits formation of ocular dominance columns. *Neuron.* 1997;19:63-76.
58. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2004;161:598-607.
59. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2004;161:598-607.
60. Carballedo A, Amico F, Ugwu I, Fagan AJ, Fahey C, Morris D, Meaney JF, Leemans A, Frodl T. Reduced fractional anisotropy in the uncinate fasciculus in patients with major depression carrying the met-allele of the Val66Met brain-derived neurotrophic factor genotype. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012;159B(5):537-548.
61. Cardoner N, Soria V, Gratacòs M, Hernández-Ribas R, Pujol J, López-Solà M, Deus J, Urretavizcaya M, Estivill X, Menchón JM, Soriano-Mas C. Val66Met BDNF genotypes in melancholic depression: effects on brain structure and treatment outcome. *Depress Anxiety.* 2013;30(3):225-233.
62. Cargnin S, Magnani F, Viana M, Tassorelli C, Mittino D, Cantello R, Sances G, Nappi G, Canonico PL, Genazzani AA, Raffaelli W, Terrazzino S. An opposite-direction modulation of the COMT Val158Met polymorphism on the clinical response to intrathecal morphine and triptans. *J Pain.* 2013;14(10):1097-1106.
63. Carlson JM, Mujica-Parodi LR. A disposition to reappraise decreases anterior insula reactivity during anxious anticipation. *Biol Psychol.* 2010;85(3):383-5.

64. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;301(5631):386-389.
65. Castrén E, Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):289-297.
66. Catani M, Dell'acqua F, Bizzi A, Forkel SJ, Williams SC, Simmons A, Murphy DG, Thiebaut de Schotten M. Beyond cortical localization in clinico-anatomical correlation. *Cortex.* 2012;48(10):1262-1287.
67. Catani M, Howard RJ, Pajevic S, Jones DK. Virtual in vivo interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. *Neuroimage* 2002;17:77-94.
68. Chanraud S, Zahr N, Sullivan EV, Pfefferbaum A. MR diffusion tensor imaging: a window into white matter integrity of the working brain. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(2):209-225.
69. Chen J, Li X, McGue M. The interacting effect of the BDNF Val66Met polymorphism and stressful life events on adolescent depression is not an artifact of gene-environment correlation: evidence from a longitudinal twin study. *J Child Psychol Psychiatry.* 2013;54(10):1066-1073.
70. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *American Journal of Human Genetics* 2004;75(5):807-821.
71. Chodoff P. The depressive personality: A critical review. *Archives of General Psychiatry.* 1972;27(5):666-673.
72. Choi KS, Holtzheimer PE, Franco AR, Kelley ME, Dunlop BW, Hu XP, Mayberg HS. Reconciling variable findings of white matter integrity in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 2014;39(6):1332-1339.

73. Cole CE, Patterson RM, Craig JB, Thomas WE, Ristine LP, Stahly M, Pasamanick B. A Controlled Study of Efficacy of Iproniazid in Treatment of Depression. *AMA Arch Gen Psychiatry* 1959;1(5):513-518.
74. Collier DA, Stöber G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Müller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* 1996;1(6):453-460.
75. Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 1967;113:1237-1264.
76. Cordeira JW, Felsted JA, Teillon S, Daftary S, Panessiti M, Wirth J, Sena-Esteves M, Rios M. Hypothalamic dysfunction of the thrombospondin receptor $\alpha 2\delta$ -1 underlies the overeating and obesity triggered by brain-derived neurotrophic factor deficiency. *J Neurosci.* 2014;34(2):554-565.
77. Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* 2002;12:386-394.
78. Cullen KR, Klimes-Dougan B, Muetzel R, Mueller BA, Camchong J, Hourii A, Kurma S, Lim KO. Altered white matter microstructure in adolescents with major depression: a preliminary study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010;49:173-183 e171.
79. Cusin C, Serretti A, Lattuada E, Lilli R, Lorenzi C, Smeraldi E. Association study of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with illness time course in mood disorders. *Am. J. Med. Genet.* 2002;114:380-390.
80. Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, Kugel H, Baune BT, Hohoff C, Kersting A, Arolt V, Heindel W, Deckert J, Suslow T. Serotonergic genes modulate amygdala activity in major depression. *Genes Brain Behav* 2007;6:672-676.
81. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2009;29:247-264.

82. Dauvilliers Y, Neidhart E, Lecendreux M, Billiard M, Tafti M. MAO-A and COMT polymorphisms and gene effects in narcolepsy. *Molecular psychiatry* 2001;6:367-372.
83. Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 2006;31(3):968-980.
84. Domschke K, Ohrmann P, Braun M, Suslow T, Bauer J, Hohoff C, Kersting A, Engelien A, Arolt V, Heindel W, Deckert J, Kugel H. Influence of the catechol-O-methyltransferase val158met genotype on amygdala and prefrontal cortex emotional processing in panic disorder. *Psychiatry Res.* 2008;163(1):13-20.
85. Drabant EM, Hariri AR, Meyer-Lindenberg A, Munoz KE, Mattay VS, Kolachana BS, Egan MF, Weinberger DR. Catechol O-methyltransferase val158met genotype and neural mechanisms related to affective arousal and regulation. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(12):1396-1406.
86. Drakopoulos P, Casarosa E, Bucci F, Piccinino M, Wenger JM, Nappi RE, Polyzos N, Genazzani AR, Pluchino N. Diurnal Variation of Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Women with Functional Hypothalamic Amenorrhea. *Neuroendocrinology* 2015;101(3):256-262.
87. Dreher JC, Kohn P, Kolachana B, Weinberger DR, Berman KF. Variation in dopamine genes influences responsivity of the human reward system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):617-622.
88. Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol. Psychiatry.* 1999;46:1375-1387.
89. Drevets WC, Savitz J, Trimble M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. *CNS spectrums* 2008;13(8):663-681.

90. Du MY, Wu QZ, Yue Q, Li J, Liao Y, Kuang WH, Huang XQ, Chan RC, Mechelli A, Gong QY. Voxelwise meta-analysis of gray matter reduction in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;36(1):11-16.
91. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54(7):597-606.
92. Eisch AJ, Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 2012;338(6103):72-75.
93. Eison AS, Eison MS. Serotonergic mechanisms in anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1994;18:47-62.
94. Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci*. 1996;16:5361–5371.
95. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature (London)* 1994;368:147–150.
96. Etkin A, Egner T, Kalisch R. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci* 2011;15:85-93.
97. Etkin A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr Top Behav Neurosci* 2010;2:251-277.
98. Fan G, Copray S, Huang EJ, Jones K, Yan Q, Walro J, Jaenisch R, Kucera J. Formation of a full complement of cranial proprioceptors requires multiple neurotrophins. *Dev Dyn*. 2000;218(2):359–370.
99. Fattahi Asl A, Ghanizadeh A, Mollazade J, Aflakseir A. Differences of biased recall memory for emotional information among children and adolescents of mothers with MDD, children and adolescents with MDD, and normal controls. *Psychiatry Res*. 2015;228(2):223-227.
100. First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition With Psychotic

- Screen (SCID-I/P W/ PSY SCREEN). Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, 2002.
101. First, MB, Gibbon M, Spitzer RL, Williams, JBW, Benjamin LS. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Personality Disorders, (SCID-II). Washington, D.C.: American Psychiatric Press, Inc., 1997.
 102. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):11050-11055.
 103. Fournier JC, DeRubeis RJ, Hollon SD, Dimidjian S, Amsterdam JD, Shelton RC, Fawcett J. Antidepressant Drug Effects and Depression Severity A Patient-Level Meta-analysis. *JAMA.* 2010;303(1):47-53.
 104. Frankl V. *Man's Search for Meaning.* Beacon Press, 2006.
 105. Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med.* 1954;251(25):1006-1008.
 106. Freud S. *Mourning and Melancholia (1917).* The Standard Edition of the Complete Works of Sigmund Freud (ed. J. Strachey). Hogarth Press and the Institute of Psychoanalysis, 1953-1974, vol. 14, pp.243-258.
 107. Fried I, Wilson CL, MacDonald KA, Behnke EJ. Electric current stimulates laughter. *Nature.* 1998;391(6668):650.
 108. Frisch A, Postilnick D, Rockah R, Michaelovsky E, Postilnick S, Birman E, Laor N, Rauchverger B, Kreinin A, Poyurovsky M, Schneidman M, Modai I, Weizman R. Association of unipolar major depressive disorder with genes of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Mol. Psychiatry* 1999;4:389-392.
 109. Frokjaer VG, Vinberg M, Erritzoe D, Svarer C, Baare W, Budtz-Joergensen E, Madsen K, Madsen J, Kessing LV, Knudsen GM. High familial risk for mood disorder is associated with low dorsolateral prefrontal cortex serotonin transporter binding. *NeuroImage* 2009;46:360-366.
 110. Gatt JM, Burton KL, Williams LM, Schofield PR. Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J Psychiatr Res.* 2015;60:1-13.

111. George MS. Transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression. *Expert Rev Neurother.* 2010;10(11):1761-1772.
112. Ghourchian S, Zamani B, Poorkosary K, Malakouti SK, Rohani M. Raphe nuclei echogenicity changes in major depression. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 2014;28:9.
113. Ghourchian S, Zamani B, Poorkosary K, Malakouti SK, Rohani M. Raphe nuclei echogenicity changes in major depression. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 2014;28:9.
114. Gilbody S, House AO, Sheldon TA. Screening and case finding instruments for depression. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(4):CD002792.
115. Goldberg I, Harel M, Malach R. When the brain loses its self: prefrontal inactivation during sensorimotor processing. *Neuron* 2006;50(2):329–339.
116. Goldberg JS, Bell CE Jr, Pollard DA. Revisiting the monoamine hypothesis of depression: a new perspective. *Perspect Medicin Chem.* 2014;6:1-8.
117. Gorgulu Y, Caliyurt O. Rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy correlates with serum BDNF changes in major depression. *Brain Res. Bull.* 2009;80(3):158–162.
118. Gorman JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 1996;4:160-168.
119. Gotlib IH, Joormann J, Minor KL, Hallmayer J. HPA axis reactivity: a mechanism underlying the associations among 5-HTTLPR, stress, and depression. *Biol Psychiatry* 2008;63:847-851.
120. Grande I, Magalhães PV, Chendo I, Stertz L, Fries GR, Cereser KM, Cunha AB, Góí P, Kunz M, Udina M, Martín-Santos R, Frey BN, Vieta E, Kapczinski F. Val66Met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: an open-label trial. *Acta Psychiatr Scand.* 2014;129(5):393-400.
121. Green MJ, Chia TY, Cairns MJ, Wu J, Tooney PA, Scott RJ, Carr VJ. Australian Schizophrenia Research Bank. Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype

- moderates the effects of childhood trauma on cognition and symptoms in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2014;49:43-50.
122. Gressier F, Calati R, Balestri M, Marsano A, Alberti S, Antypa N, Serretti A. The 5-HTTLPR polymorphism and posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *J Trauma Stress.* 2013;26(6):645-653.
123. Grieve SM, Korgaonkar MS, Koslow SH, Gordon E, Williams LM. Widespread reductions in gray matter volume in depression. *Neuroimage Clin.* 2013;3:332-339.
124. Gudayol-Ferre E, Herrera-Guzman I, Camarena B, Cortes-Penagos C, Herrera-Abarca JE, Martinez-Medina P, Cruz D, Hernandez S, Genis A, Carrillo-Guerrero MY, Aviles Reyes R, Guardia-Olmos J. The role of clinical variables, neuropsychological performance and SLC6A4 and COMT gene polymorphisms on the prediction of early response to fluoxetine in major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 2010;127:343-351.
125. Gudayol-Ferré E, Peró-Cebollero M, González-Garrido AA, Guàrdia-Olmos J. Changes in brain connectivity related to the treatment of depression measured through fMRI: a systematic review. *Front Hum Neurosci.* 2015;9:582.
126. Guo W, Liu F, Xun G, Hu M, Guo X, Xiao C, Chen H, Chen J, Zhao J. Disrupted white matter integrity in first-episode, drug-naive, late-onset depression. *J Affect Disord.* 2014;163:70-75.
127. Gyekis JP, Yu W, Dong S, Wang H, Qian J, Kota P, Yang J. No association of genetic variants in BDNF with major depression: a meta- and gene-based analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013;162B(1):61-70.
128. Hadland KA, Rushworth MF, Gaffan D, Passingham RE. The effect of cingulate lesions on social behaviour and emotion. *Neuropsychologia* 2003;41(8):919-931.
129. Hamilton M. A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1960;23:56-62.
130. Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol* 1959;32:50-55.

131. Han KM, Choi S, Jung J, Na KS, Yoon HK, Lee MS, Ham BJ. Cortical thickness, cortical and subcortical volume, and white matter integrity in patients with their first episode of major depression. *J Affect Disord.* 2014;155:42-48.
132. Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, Egan MF, Weinberger DR. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science* 2002;297:400-404.
133. Harrisberger F, Spalek K, Smieskova R, Schmidt A, Coynel D, Milnik A, Fastenrath M, Freytag V, Gschwind L, Walter A, Vogel T, Bendfeldt K, de Quervain DJ, Papassotiropoulos A, Borgwardt S. The association of the BDNF Val66Met polymorphism and the hippocampal volumes in healthy humans: A joint meta-analysis of published and new data. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;42:267-278.
134. Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Archives of general psychiatry* 2007;64:193-200.
135. Hayashi K, Yoshimura R, Kakeda S, Kishi T, Abe O, Umene-Nakano W, Katsuki A, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Watanabe K, Ide S, Ueda I, Moriya J, Iwata N, Korogi Y, Kubicki M, Nakamura J. COMT Val158Met, but not BDNF Val66Met, is associated with white matter abnormalities of the temporal lobe in patients with first-episode, treatment-naïve major depressive disorder: a diffusion tensor imaging study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014;10:1183-1190.
136. He H, Yu Q, Du Y, Vergara V, Victor TA, Drevets WC, Savitz JB, Jiang T, Sui J, Calhoun VD. Resting-state functional network connectivity in prefrontal regions differs between unmedicated patients with bipolar and major depressive disorders. *J Affect Disord.* 2016;190:483-493.

137. Heiden A, Kettenbach J, Fischer P, Schein B, Ba-Ssalamah A, Frey R, Naderi MM, Gulesserian T, Schmid D, Trattinig S, Imhof H, Kasper S. White matter hyperintensities and chronicity of depression. *J Psychiatr Res* 2005;39:285-293.
138. Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*. 1996;66(6):2621-2624.
139. Heinz A, Braus DF, Smolka MN, Wrase J, Puls I, Hermann D, Klein S, Grusser SM, Flor H, Schumann G, Mann K, Buchel C. Amygdala-prefrontal coupling depends on a genetic variation of the serotonin transporter. *Nat Neurosci* 2005;8:20-21.
140. Hemmings SM, Lochner C, van der Merwe L, Cath DC, Seedat S, Stein DJ. BDNF Val66Met modifies the risk of childhood trauma on obsessive-compulsive disorder. *J Psychiatr Res*. 2013;47(12):1857-1863.
141. Henderson AS, Korten AE, Jorm AF, Jacomb PA, Christensen H, Rodgers B, Tan X, Easteal S. COMT and DRD3 polymorphisms, environmental exposures, and personality traits related to common mental disorders. *Am. J. Med. Genet*. 2000;96:102–107.
142. Heninger G, Delgado P, Charney D. The revised monoamine theory of depression: A modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 1996;29:2–11.
143. Henriksson S, Asplund R, Boethius G, Hällström T, Isacson G. Infrequent use of antidepressants in depressed individuals (an interview and prescription database study in a defined Swedish population 2001-2002). *Eur Psychiatry*. 2006;21:355-60.
144. Hilbert K, Lueken U, Beesdo-Baum K. Neural structures, functioning and connectivity in Generalized Anxiety Disorder and interaction with neuroendocrine systems: a systematic review. *J Affect Disord* 2014;158:114-126.
145. Hirschfeld RM. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*. 2014;169(1); S12–S16.

146. Hong Z, Li W, Qu B, Zou X, Chen J, Sander JW, Zhou D. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol*. 2014;21(1):57-64.
147. Horgan J. *The undiscovered mind: How the human brain defies replication, medication, and explanation*. New York: Free Press, 1999.
148. Hosang GM, Shiles C, Tansey KE, McGuffin P, Uher R. Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2014;12:7.
149. Huang CH, Santangelo SL. Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008;147B(6):903-913.
150. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
151. Huang H, Fan X, Williamson DE, Rao U. White matter changes in healthy adolescents at familial risk for unipolar depression: a diffusion tensor imaging study. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(3):684-691.
152. Hwang JP, Lee TW, Tsai SJ, Chen TJ, Yang CH, Lirng JF, Tsai CF. Cortical and subcortical abnormalities in late-onset depression with history of suicide attempts investigated with MRI and voxel-based morphometry. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(3):171-184.
153. Illi A, Setälä-Soikkeli E, Kampman O, Viikki M, Nuolivirta T, Poutanen O, Huhtala H, Mononen N, Lehtimäki T, Leinonen E. Catechol-O-methyltransferase val108/158met genotype, major depressive disorder and response to selective serotonin reuptake inhibitors in major depressive disorder. *Psychiatry Res*. 2010;176:85-87.
154. International Marketing Services Health. Year-end U.S. Prescription and sales information and commentary. (Connecticut): Fairfield. International Marketing Services Health, 2004. Available: http://www.imshealth.com/ims/portal/front/articleC/0,2777,6599_3665_69890098,00.html Accessed 14 October 2005.

155. Iosifescu DV, Papakostas GI, Lyoo IK, Lee HK, Renshaw PF, Alpert JE, Nierenberg A, Fava M. Brain MRI white matter hyperintensities and one-carbon cycle metabolism in non-geriatric outpatients with major depressive disorder (Part I). *Psychiatry Res* 2005;140:291-299.
156. Jacquart D. *The Influence of Arabic Medicine in the Medieval West*. Morrison & Rashed, 1996.
157. Jones SG, Benca RM. Circadian Disruption in Psychiatric Disorders. *Sleep Med Clin*. 2015;10(4):481-493.
158. Judd LL, Schettler PJ, Coryell W, Akiskal HS, Fiedorowicz JG. Overt Irritability/Anger in Unipolar Major Depressive Episodes, Past and Current Characteristics and Implications for Long-term Course. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(11):1171-1180.
159. Júlio-Costa A, Antunes AM, Lopes-Silva JB, Moreira BC, Vianna GS, Wood G, Carvalho MR, Haase VG. Count on dopamine: influences of COMT polymorphisms on numerical cognition. *Front Psychol*. 2013;4:531.
160. Kaiser RH, Andrews-Hanna JR, Wager TD, Pizzagalli DA. Large-Scale Network Dysfunction in Major Depressive Disorder: A Meta-analysis of Resting-State Functional Connectivity. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(6):603-611.
161. Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68(5):444-454.
162. Kempton MJ. Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(7):675-690.
163. Kennedy N, Abbott R, Paykel ES. Longitudinal syndromal and sub-syndromal symptoms after severe depression: 10-year follow-up study. *Br J Psychiatry*. 2004; 184:330-6.

164. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:617-627.
165. Kieseppa T, Eerola M, Mantyla R, Neuvonen T, Poutanen VP, Luoma K, Tuulio-Henriksson A, Jylhä P, Mantere O, Melartin T, Rytsälä H, Vuorilehto M, Isometsä E. Major depressive disorder and white matter abnormalities: a diffusion tensor imaging study with tract-based spatial statistics. *J Affect Disord.* 2010;120:240–244.
166. Kino T. Stress, glucocorticoid hormones, and hippocampal neural progenitor cells: implications to mood disorders. *Front Physiol.* 2015;6:230.
167. Klein M. Psychogenesis of manic-depressive states: contributions to psychoanalysis. London: Hogarth, 1934.
168. Koenigs M, Grafman J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 2009;201:239-243.
169. Kong X, Wei D, Li W, Cun L, Xue S, Zhang Q, Qiu J. Neuroticism and extraversion mediate the association between loneliness and the dorsolateral prefrontal cortex. *Exp Brain Res.* 2015;233(1):157-164.
170. Korgaonkar MS, Grieve SM, Koslow SH, Gabrieli JD, Gordon E, Williams LM. Loss of white matter integrity in major depressive disorder: evidence using tract-based spatial statistical analysis of diffusion tensor imaging. *Hum Brain Mapp.* 2011;32:2161–2171.
171. Kowatch RA, Devous MD, Sr, Harvey DC, Mayes TL, Trivedi MH, Emslie GJ, Weinberg WA. A SPECT HMPAO study of regional cerebral blood flow in depressed adolescents and normal controls. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23:643-656.
172. Kringelbach ML. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(9):691-702.

173. Kriston L, Von Wolff A. Not as golden as standards should be: Interpretation of the Hamilton Rating Scale for Depression. *Journal of Affective Disorders* 2011;128(1-2):175-177.
174. Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *The American Journal of Psychiatry* 1958;115(5):459-464.
175. Kunugi H, Vallada HP, Hoda F, Kirov G, Gill M, Aitchison KJ, Ball D, Arranz MJ, Murray RM, Collier DA. No evidence for an association of affective disorders with high- or low-activity allele of catechol-o-methyltransferase gene. *Biol. Psychiatry* 1997;42:282-285.
176. Lai CH. Gray matter volume in major depressive disorder: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Psychiatry Res.* 2013;211(1):37-46.
177. Lan MJ, Chhetry BT, Oquendo MA, Sublette ME, Sullivan G, Mann JJ, Parsey RV. Cortical thickness differences between bipolar depression and major depressive disorder. *Bipolar Disord.* 2014;16(4):378-388.
178. Lang UE, Hellweg R, Kalus P, Bajbouj M, Lenzen KP, Sander T, Kunz D, Gallinat J. Association of a functional BDNF polymorphism and anxiety-related personality traits. *Psychopharmacology (Berlin)* 2005;180(1):95-99.
179. Lauterbur PC. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples of Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* 1973;242(5394):190-191.
180. Legge RM, Sendi S, Cole JH, Cohen-Woods S, Costafreda SG, Simmons A, Farmer AE, Aitchison KJ, McGuffin P, Fu CH. Modulatory effects of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on prefrontal regions in major depressive disorder. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science* 2015;206:379-384.
181. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996;274:1527-1531.

182. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996;274(5292):1527-1531.
183. Lesch KP. Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: Is serotonin the link? *Eur J Pharmacol.* 2005;526(1-3):113-124.
184. LeWinn KZ, Connolly CG, Wu J, Drahos M, Hoeft F, Ho TC, Simmons AN, Yang TT. White matter correlates of adolescent depression: structural evidence for frontolimbic disconnectivity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2014;53(8):899-909.
185. Lewinsohn PM. A behavioral approach to depression. In: Friedman RJ, Katz MM, editors. *Psychology of Depression: Contemporary theory and research.* Oxford, England: Wiley; 1974. pp. 157–178.
186. Li L, Ma N, Li Z, Tan L, Liu J, Gong G, Shu N, He Z, Jiang T, Xu L. Prefrontal white matter abnormalities in young adult with major depressive disorder: a diffusion tensor imaging study. *Brain Res* 2007;1168:124-128.
187. Liao Y, Huang X, Wu Q, Yang C, Kuang W, Du M, Lui S, Yue Q, Chan RC, Kemp GJ, Gong Q. Is depression a disconnection syndrome? Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in patients with MDD. *J Psychiatry Neurosci.* 2013;38(1):49-56.
188. Liciano J, Dong C, Wong ML. Novel Sequence Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Association With Major Depression and Antidepressant Treatment Response. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66(5):488-496.
189. Lisulov R, Nedić A. Problemi dijagnostike i lećenja depresivnih poremećaja u ustanovama primarne zdravstvene zaštite u AP Vojvodini. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, 2006.
190. Long H, Liu B, Hou B, Wang C, Li J, Qin W, Wang D, Zhou Y, Kendrick KM, Yu C, Jiang T. The long rather than the short allele of 5-HTTLPR predisposes Han Chinese to anxiety and reduced connectivity between prefrontal cortex and amygdala. *Neurosci Bull.* 2013;29(1):4-15.

191. Long H, Liu B, Hou B, Wang C, Li J, Qin W, Wang D, Zhou Y, Kendrick KM, Yu C, Jiang T. The long rather than the short allele of 5-HTTLPR predisposes Han Chinese to anxiety and reduced connectivity between prefrontal cortex and amygdala. *Neurosci Bull.* 2013;29(1):4-15.
192. Lonsdorf TB, Golkar A, Lindstöm KM, Fransson P, Schalling M, Ohman A, Ingvar M. 5-HTTLPR and COMT val158met genotype gate amygdala reactivity and habituation. *Biol Psychol.* 2011;87(1):106-112.
193. Lonsdorf TB, Golkar A, Lindstöm KM, Fransson P, Schalling M, Ohman A, Ingvar M. 5-HTTLPR and COMT val158met genotype gate amygdala reactivity and habituation. *Biol Psychol.* 2011;87(1):106-112.
194. Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 2008;1148:86-94.
195. Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci* 2008;11:752–753.
196. Ma N, Li L, Shu N, Liu J, Gong G, He Z, Li Z, Tan L, Stone WS, Zhang Z, Xu L, Jiang T. White matter abnormalities in first-episode, treatment-naive young adults with major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 2007;164:823-826.
197. Ma N, Li L, Shu N, Liu J, Gong G, He Z, Li Z, Tan L, Stone WS, Zhang Z, Xu L, Jiang T. White matter abnormalities in first-episode, treatment-naive young adults with major depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 2007;164:823–826.
198. Maciag D, Hughes J, O'Dwyer G, Pride Y, Stockmeier CA, Sanacora G, Rajkowska G. Reduced density of calbindin immunoreactive GABAergic neurons in the occipital cortex in major depression: relevance to neuroimaging studies. *Biological psychiatry* 2010;67:465-470.
199. Malison RT, Price LH, Berman R, van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter C, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Rajeevan N, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression

- as measured by [¹²³I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol. Psychiatry*. 1998;44:1090-1098.
200. Mandelli L, Serretti A, Marino E, Pirovano A, Calati R, Colombo C. Interaction between serotonin transporter gene, catechol-O-methyltransferase gene and stressful life events in mood disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007;10:437-447.
201. Maslow AH. *Towards a psychology of being*. Princeton: D. Van Nostrand Company, 1962.
202. Massat I, Kocabas NA, Crisafulli C, Chiesa A, Calati R, Linotte S, Kasper S, Fink M, Antonijevic I, Forray C, Snyder L, Bollen J, Zohar J, De Ronchi D, Souery D, Serretti A, Mendlewicz J. COMT and age at onset in mood disorders: a replication and extension study. *Neurosci. Lett.* 2011;498:218-221.
203. Massat I, Souery D, Del-Favero J, Nothen M, Blackwood D, Muir W, Kaneva R, Serretti A, Lorenzi C, Rietschel M, Milanova V, Papadimitriou GN, Dikeos D, Van Broekhoven C, Mendlewicz J. Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Mol. Psychiatry* 2005;10:598-605.
204. McGinty JF, Whitfield TW Jr, Berglind WJ. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res.* 2010;1314:183-193.
205. Mendels J, Stinnett J, Burns D, Frazer A. Amine precursors and depression. *Arch Gen Psychiatry* 1975;32:22-30.
206. Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: An explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006;63:1209-1216.

207. Mier D, Kirsch P, Meyer-Lindenberg A. Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. *Molecular psychiatry* 2010;15:918-927.
208. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732-741.
209. Minichiello L, Klein R. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev*. 1996;10:2849-2858.
210. Moffitt TE, Caspi A, Taylor A, Kokaua J, Milne BJ, Polanczyk G. How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychol Med*. 2010;40:125-129.
211. Moffitt TE, Harrington H, Caspi A, Kim-Cohen J, Goldberg D, Gregory AM, Poulton R. Depression and generalized anxiety disorder: cumulative and sequential comorbidity in a birth cohort followed prospectively to age 32 years. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:651-660.
212. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry* 2014;19(7):791-800.
213. Molnár Z. Timeline: Thomas Willis (1621-1675), the founder of clinical neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 2004;5(4):329-335.
214. Moncrieff J, Wessely S, Hardy R. Active placebos versus antidepressant for depression. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD003012.
215. Montejo AL, Montejo L, Navarro-Cremades F. Sexual side-effects of antidepressant and antipsychotic drugs. *Curr Opin Psychiatry*. 2015;28(6):418-423.
216. Morin LP. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med*. 1999;31(1):12-33.

217. Nieoullon A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog. Neurobiol.* 2002;67:53–83.
218. Niitsu T, Ishima T, Yoshida T, Hashimoto T, Matsuzawa D, Shirayama Y, Nakazato M, Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. A positive correlation between serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor and negative symptoms in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2014;215(2):268-273.
219. Notaras M, Hill R, van den Buuse M. The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: progress and controversy. *Molecular Psychiatry.* 2015;20:916-930.
220. O'Brien J, Desmond P, Ames D, Schweitzer I, Harrigan S, Tress B. A magnetic resonance imaging study of white matter lesions in depression and Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 1996;168:477-485.
221. Ohara K, Nagai M, Suzuki Y. Low activity allele of catechol-o-methyltransferase gene and Japanese unipolar depression. *Neuroreport* 1998;9:1305–1308.
222. Okamoto T, Yoshimura R, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Inoue Y, Ueda N, Nakamura J. Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008; 32(5):1185–1190.
223. Olvet DM, Delaparte L, Yeh FC, DeLorenzo C, McGrath PJ, Weissman MM, Adams P, Fava M, Deckersbach T, McInnis MG, Carmody TJ, Cooper CM, Kurian BT, Lu H, Toups MS, Trivedi MH, Parsey RV. A Comprehensive examination of white matter tracts and connectometry in major depressive disorder. *Depress Anxiety.* 2016;33(1):56-65.
224. Opmeer EM, Kortekaas R, van Tol MJ, van der Wee NJ, Woudstra S, van Buchem MA, Penninx BW, Veltman DJ, Aleman A. Influence of COMT val158met genotype on the depressed brain during emotional processing and working memory. *PloS one* 2013;8(9):e73290.

225. Pacheco J, Beevers CG, Benavides C, McGeary J, Stice E, Schnyer DM. Frontal-limbic white matter pathway associations with the serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism. *J Neurosci* 2009;29:6229-6233.
226. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 2008;31(9):464-468.
227. Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, Huang YY, Simpson N, Arcement J, Huang Y, Ogden RT, Van Heertum RL, Arango V, Mann JJ. Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am. J. Psychiatry.* 2006;163:52-58.
228. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* 2001;21(17):6706-6717.
229. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 2005;8:828-834.
230. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Goldman AL, Verchinski BA, Chen G, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. *Mol Psychiatry.* 2008;13(7):709-716.
231. Phillips JL, Batten LA, Tremblay P, Aldosary F, Du L, Blier P. Impact of monoamine-related gene polymorphisms on hippocampal volume in treatment-resistant depression. *Acta Neuropsychiatr.* 2015;27(6):353-61.
232. Praschak-Rieder N, Kennedy J, Wilson AA, Hussey D, Boovariwala A, Willeit M, Ginovart N, Tharmalingam S, Masellis M, Houle S, Meyer JH. Novel 5-HTTLPR allele associates with higher serotonin transporter binding in putamen: a [¹¹C] DASB positron emission tomography study. *Biol. Psychiatry.* 2007;62:327-321.

233. Price JS, Strong J, Eliassen J, McQueeney T, Miller M, Padula CB, Shear P, Lisdahl K. Serotonin transporter gene moderates associations between mood, memory and hippocampal volume. *Behav. Brain. Res.* 2013;242:158-165.
234. Pu S, Nakagome K, Yamada T, Yokoyama K, Matsumura H, Yamada S, Sugie T, Miura A, Mitani H, Iwata M, Nagata I, Kaneko K. Suicidal ideation is associated with reduced prefrontal activation during a verbal fluency task in patients with major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2015;181:9-17.
235. Rabl U, Meyer BM, Diers K, Bartova L, Berger A, Mandorfer D, Popovic A, Scharinger C, Huemer J, Kalcher K, Pail G, Haslacher H, Perkmann T, Windischberger C, Brocke B, Sitte HH, Pollak DD, Dreher JC, Kasper S, Praschak-Rieder N, Moser E, Esterbauer H, Pezawas L. Additive gene-environment effects on hippocampal structure in healthy humans. *J Neurosci.* 2014;34(30):9917-9926.
236. Radden J. Is this dame melancholy? Equating today's depression and past melancholia. *Philosophy, Psychiatry, & Psychology* 2003;10(1):37-52.
237. Radua J, El-Hage W, Monté GC, Gohier B, Tropeano M, Phillips ML, Surguladze SA. COMT Val158Met x SLC6A4 5-HTTLPR interaction impacts on gray matter volume of regions supporting emotion processing. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2014;9(8):1232-1238.
238. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, Haroon E, Miller AH. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(1):31-41.
239. Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2007;32:471-482.
240. Rasch B, Spalek K, Buholzer S, Luechinger R, Boesiger P, de Quervain DJ, Papassotiropoulos A. Aversive stimuli lead to differential amygdala activation and

- connectivity patterns depending on catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype. *Neuroimage* 2010;52:1712–1719.
241. Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Gearhart L, Viens CH, Hisley KC. Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Res* 2007;151:179-188.
242. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-1564.
243. Reinelt E, Aldinger M, Stopsack M, Schwahn C, John U, Baumeister SE, Grabe HJ, Barnow S. High social support buffers the effects of 5-HTTLPR genotypes within social anxiety disorder. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 2014;264:433-439.
244. Ressler KJ, Mayberg HS. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* 2007;10:1116-1124.
245. Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA* 2009;301(23):2462-2471.
246. Rush AJ, Zimmerman M, Wisniewski SR, Fava M, Hollon SD, Warden D, Biggs MM, Shores-Wilson K, Shelton RC, Luther JF, Thomas B, Trivedi MH. Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: demographic and clinical features. *J Affect Disord* 2005;87:43-55.
247. Russo-Neustadt AA, Beard RC, Huang YM, Cotman CW. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2000;101(2):305-312.
248. Rybakowski JK. BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia. *Pharmacogenomics* 2008;9(11):1589-1593.

249. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, Berman RM, Charney DS, Krystal JH. Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Archives of general psychiatry* 1999;56:1043-1047.
250. Savitz JB, Drevets WC. Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience* 2009;164(1):300-330.
251. Schaffer A, McIntosh D, Goldstein BI, Rector NA, McIntyre RS, Beaulieu S, Swinson R, Yatham LN; Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Task Force. The CANMAT task force recommendations for the management of patients with mood disorders and comorbid anxiety disorders. *Ann Clin Psychiatry* 2012;24:6-22.
252. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1965;7:524-533.
253. Schneider K. Die Schichtung des emotionalen Lebens und der Aufbau der Depressionszustände. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1920;59:281-86.
254. Seidman LJ, Wencil HE. Genetically mediated brain abnormalities in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2003;5(2):135-144.
255. Seligman ME. *Depression and learned helplessness.* John Wiley & Sons, 1974.
256. Seok JH, Choi S, Lim HK, Lee SH, Kim I, Ham BJ. Effect of the COMT val158met polymorphism on white matter connectivity in patients with major depressive disorder. *Neurosci Lett.* 2013;545:35-39.
257. Serretti A, Rotondo A, Lorenzi C, Smeraldi E, Cassano GB. Catechol-O-methyltransferase gene variants in mood disorders in the Italian population. *Psychiatr. Genet.* 2006;16:181-182.
258. Seyfried LS, Marcus SM. Postpartum mood disorders, *International Review of Psychiatry* 2003;15(3):231-242.

259. Shang J, Fu Y, Ren Z, Zhang T, Du M, Gong Q, Lui S, Zhang W. The common traits of the ACC and PFC in anxiety disorders in the DSM-5: meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *PLoS One* 2014;9(3):e93432.
260. Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 2003;160:1516-1518.
261. Sheline YI. Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry* 1996;1:298-299.
262. Shizukuishi T, Abe O, Aoki S. Diffusion tensor imaging analysis for psychiatric disorders. *Magn Reson Med Sci.* 2013;12(3):153-159.
263. Singleton N, Bumpstead R, O'Brien M. *Psychiatric Morbidity Among Adults Living in Private Households, 2000.* London: The Stationery Office; 2001.
264. Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;56(1):131-137.
265. Smith MA, Makino S, Kvetnanský R, Post RM. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;771:234-239.
266. Son JH, Han DH, Min KJ, Kee BS. Correlation between gray matter volume in the temporal lobe and depressive symptoms in patients with Alzheimer's disease. *NeurosciLett.* 2013;548:15-20.
267. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene PR, Vagg PR, Jacobs GA. *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory.* Consulting Psychologists Press, 1983.
268. Spronk D, Arns M, Barnett KJ, Cooper NJ, Gordon E. An investigation of EEG, genetic and cognitive markers of treatment response to antidepressant medication in patients with major depressive disorder: a pilot study. *J. Affect. Disord.* 2011;128:41-48.
269. Stanković I, Stefanova E, Žiropadja L, Mijajlović M, Pavlović A, Kostić VS. Transcranial midbrain sonography and depressive symptoms in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2015;262:689-695.

270. Steele JD, Bastin ME, Wardlaw JM, Ebmeier KP. Possible structural abnormality of the brainstem in unipolar depressive illness: a transcranial ultrasound and diffusion tensor magnetic resonance imaging study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2005;76(11):1510–1515.
271. Steele JD, Bastin ME, Wardlaw JM, Ebmeier KP. Possible structural abnormality of the brainstem in unipolar depressive illness: a transcranial ultrasound and diffusion tensor magnetic resonance imaging study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2005;76:1510-1515.
272. Steele JD, Bastin ME, Wardlaw JM, Ebmeier KP. Possible structural abnormality of the brainstem in unipolar depressive illness: a transcranial ultrasound and diffusion tensor magnetic resonance imaging study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2005;76:1510-1515.
273. Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: Identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 2001;277(1–2):49–62.
274. Sun H, Yuan F, Shen X, Xiong G, Wu J. Role of COMT in ADHD: a Systematic Meta-Analysis. *Mol Neurobiol*. 2014;49(1):251-261.
275. Surguladze SA, Radua J, El-Hage W, Gohier B, Sato JR, Kronhaus DM, Proitsi P, Powell J, Phillips ML. Interaction of catechol O-methyltransferase and serotonin transporter genes modulates effective connectivity in a facial emotion-processing circuitry. *Translational Psychiatry* 2012;2:e70.
276. Szczepankiewicz A. Evidence for single nucleotide polymorphisms and their association with bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:1573-1582.
277. Szegedi A, Rujescu D, Tadic A, Muller MJ, Kohnen R, Stassen HH, Dahmen N. The catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism affects short-term treatment response to mirtazapine, but not to paroxetine in major depression. *Pharmacogenomics J*. 2005;5:49–53.
278. Tadayonnejad R, Yang S, Kumar A, Ajilore O. Multimodal brain connectivity analysis in unmedicated late-life depression. *PLoS One*. 2014;9(4):e96033.

279. Taki Y, Kinomura S, Awata S, Inoue K, Sato K, Ito H, Goto R, Uchida S, Tsuji I, Arai H, Kawashima R, Fukuda H. Male elderly subthreshold depression patients have smaller volume of medial part of prefrontal cortex and precentral gyrus compared with age-matched normal subjects: a voxel-based morphometry. *J Affect Disord.* 2005;88(3):313-320.
280. Thomas AJ, O'Brien JT, Davis S, Ballard C, Barber R, Kalaria RN, Perry RH. Ischemic basis for deep white matter hyperintensities in major depression: a neuropathological study. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:785-792.
281. Thomas AJ, Perry R, Barber R, Kalaria RN, O'Brien JT. Pathologies and pathological mechanisms for white matter hyperintensities in depression. *Ann N Y Acad Sci* 2002;977:333-339.
282. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron.* 1993;10:475-489.
283. Truong W, Minuzzi L, Soares CN, Frey BN, Evans AC, MacQueen GM, Hall GB. Changes in cortical thickness across the lifespan in major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2013;214(3):204-211.
284. Tu PC, Chen LF, Hsieh JC, Bai YM, Li CT, Su TP. Regional cortical thinning in patients with major depressive disorder: a surface-based morphometry study. *Psychiatry Res.* 2012;202(3):206-213.
285. Tu PC, Chen LF, Hsieh JC, Bai YM, Li CT, Su TP. Regional cortical thinning in patients with major depressive disorder: a surface-based morphometry study. *Psychiatry Res.* 2012;202(3):206-213.
286. Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* 2004;67:269-275.
287. van Eijndhoven P, van Wingen G, Katzenbauer M, Groen W, Tepest R, Fernández G, Buitelaar J, Tendolkar I. Paralimbic cortical thickness in first-

- episode depression: evidence for trait-related differences in mood regulation. *Am J Psychiatry*. 2013;170(12):1477-1486.
288. van Tol MJ, Li M, Metzger CD, Hailla N, Horn DI, Li W, Heinze HJ, Bogerts B, Steiner J, He H, Walter M. Local cortical thinning links to resting-state disconnectivity in major depressive disorder. *Psychol Med*. 2014;44(10):2053-2065.
289. van Tol MJ, van der Wee NJ, van den Heuvel OA, Nielen MM, Demenescu LR, Aleman A, Renken R, van Buchem MA, Zitman FG, Veltman DJ. Regional brain volume in depression and anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2010;67:1002-1011.
290. Vanhoutte PM, Cohen RA, Van Nueten JM. Serotonin and arterial vessels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6 Suppl 2:S421-428.
291. Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PA, Janzing JG, Arias-Vásquez A, Buitelaar JK, Franke B. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry* 2010;15(3):260-271.
292. Verhoeff NP, Christensen BK, Hussey D, Lee M, Papatheodorou G, Kopala L, Rui Q, Zipursky RB, Kapur S. Effects of catecholamine depletion on D2 receptor binding, mood, and attentiveness in humans: a replication study. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2003;74:425-432.
293. Videbech P, Ravnkilde B, Gammelgaard L, Egander A, Clemmensen K, Rasmussen NA, Gjedde A, Rosenberg R. The Danish PET/depression project: performance on Stroop's test linked to white matter lesions in the brain. *Psychiatry Res* 2004;130:117-130.
294. Vinkers CH, Van Gastel WA, Schubart CD, Van Eijk KR, Luykx JJ, Van Winkel R, Joëls M, Ophoff RA, Boks MP, Genetic Risk and Outcome of Psychosis (GROUP) Investigators, Bruggeman R, Cahn W, de Haan L, Kahn RS, Meijer CJ, Myin-Germeys I, van Os J, Wiersma D. The effect of childhood maltreatment and cannabis use on

- adult psychotic symptoms is modified by the COMT Val¹⁵⁸Met polymorphism. *Schizophr Res.* 2013;150(1):303-311.
295. Wagner G, Schultz CC, Koch K, Schachtzabel C, Sauer H, Schlösser RG. Prefrontal cortical thickness in depressed patients with high-risk for suicidal behavior. *J Psychiatr Res.* 2012;46(11):1449-1455.
296. Walter U, Hoepfner J, Prudente-Morrissey L, Horowski S, Herpertz SC, Benecke R. Parkinson's disease-like midbrain sonography abnormalities are frequent in depressive disorders. *Brain.* 2007;130(Pt 7):1799-1807.
297. Walter U, Hoepfner J, Prudente-Morrissey L, Horowski S, Herpertz SC, Benecke R. Parkinson's disease-like midbrain sonography abnormalities are frequent in depressive disorders. *Brain.* 2007;130:1799-1807.
298. Walter U, Prudente-Morrissey L, Herpertz SC, Benecke R, Hoepfner J. Relationship of brainstem raphe echogenicity and clinical findings in depressive states. *Psychiatry Res.* 2007;155, 67-73.
299. Walter U, Prudente-Morrissey L, Herpertz SC, Benecke R, Hoepfner J. Relationship of brainstem raphe echogenicity and clinical findings in depressive states. *Psychiatry. Res.* 2007;155:67-73.
300. Wang C, Liu B, Long H, Fan L, Li J, Zhang X, Qiu C, Yu C, Jiang T. Epistatic interaction of BDNF and COMT on the frontostriatal system. *Neuroscience* 2015;298:380-388.
301. Wang K, Wei D, Yang J, Xie P, Hao X, Qiu J. Individual differences in rumination in healthy and depressive samples: association with brain structure, functional connectivity and depression. *Psychol Med.* 2015;45(14):2999-3008.
302. Wang L, Ashley-Koch A, Steffens DC, Krishnan KR, Taylor WD. Impact of BDNF Val66Met and 5-HTTLPR polymorphism variants on neural substrates related to sadness and executive function. *Genes Brain Behav.* 2012;11(3):352-359.
303. Waraich P, Goldner EM, Somers JM, Hsu L. Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature. *Can J Psychiatry.* 2004;49(2):124-38.

304. Way B, Taylor S. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with cortisol response to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 2010;67:487-492.
305. Weiner D. Philippe Pinel's "Memoir on Madness" of December 11, 1794: a fundamental text of modern psychiatry. *Am J Psychiatry* 1992;149(6):725-732.
306. Weiss EM, Schuler G, Fink A, Reiser EM, Mittenecker E, Niederstätter H, Nagl S, Parson W, Papousek I. Influences of COMT and 5-HTTLPR polymorphisms on cognitive flexibility in healthy women: inhibition of prepotent responses and memory updating. *PLoS. One.* 2014;9:e85506.
307. Wesley D. Smith. Hippocrates. Free full-text article from Encyclopædia Britannica Online. Last accessed 24 April 2012.
308. Williams LM, Gatt JM, Grieve SM, Dobson-Stone C, Paul RH, Gordon E, Schofield PR. COMT Val(108/158)Met polymorphism effects on emotional brain function and negativity bias. *Neuroimage* 2010;53(3):918-925.
309. Winkler AM, Kochunov P, Blangero J, Almasy L, Zilles K, Fox PT, Duggirala R, Glahn DC. Cortical thickness or grey matter volume? The importance of selecting the phenotype for imaging genetics studies. *Neuroimage.* 2010;53(3):1135-1146.
310. Wirz-Justice A. Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci.* 2008;10(3): 337-343.
311. Wise RA. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res.* 1978;152:215-247.
312. Wittchen HU, Jacobi F. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15(4):357-76.
313. Wray NR, James MR, Dumenil T, Handoko HY, Lind PA, Montgomery GW, Martin NG. Association study of candidate variants of COMT with neuroticism, anxiety and depression. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008;147B:1314-1318.

314. Wright IC, McGuire PK, Poline JB, Traverre JM, Murray RM, Frith CD, Frackowiak RS, Friston KJ. A voxel-based method for the statistical analysis of gray and white matter density applied to schizophrenia. *Neuroimage*. 1995;2(4):244-252.
315. Wu F, Tang Y, Xu K, Kong L, Sun W, Wang F, et al. Whiter matter abnormalities in medication-naive subjects with a single short-duration episode of major depressive disorder. *Psychiatry Res*. 2011;191:80-83.
316. Yin B, Chen Y, Zhang L. Association Between Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Gene Polymorphisms, Parkinson's Disease, and Levodopa Efficacy. *Mol Diagn Ther*. 2013 Nov 15. [Epub ahead of print].
317. You JS, Hu SY, Chen B, Zhang HG. Serotonin transporter and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in Chinese patients with generalized anxiety disorder. *Psychiatr. Genet*. 2005;15:7-11.
318. Yuen GS, Gunning-Dixon FM, Hoptman MJ, AbdelMalak B, McGovern AR, Seirup JK, Alexopoulos GS. The salience network in the apathy of late-life depression. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014;29(11):1116-1124.
319. Zajac MS, Pang TY, Wong N, Weinrich B, Leang LS, Craig JM, Saffery R, Hannan AJ. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus* 2010;20(5):621-636.
320. Zeev BB, Bebbington A, Ho G, Leonard H, de Klerk N, Gak E, Vecsler M, Christodoulou J. The common BDNF polymorphism may be a modifier of disease severity in Rett syndrome. *Neurology* 2009;72(14):1242-1247.
321. Zhang H, Xu M, Xia J, Qin RY. Association between serotonin transporter (SERT) gene polymorphism and idiopathic pulmonary arterialhypertension: a meta-analysis and review of the literature. *Metabolism*. 2013;62(12):1867-1875.
322. Zhang YC, Hu H, Luo WF, Sheng YJ, Chen XF, Mao CJ, Xiong KP, Yu LF, Zhang Y, Liu CF. Alteration of brainstem raphe measured by transcranial sonography in

- depression patients with or without Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2016;37(1):45-50.
323. Zhu G, Lipsky RH, Xu K, Ali S, Hyde T, Kleinman J, Akhtar LA, Mash DC, Goldman D. Differential expression of human COMT alleles in brain and lymphoblasts detected by RT-coupled 5' nuclease assay. *Psychopharmacology* 2004;177(1-2):178-184.
324. Zhu X, Wang X, Xiao J, Zhong M, Liao J, Yao S. Altered white matter integrity in first-episode, treatment-naive young adults with major depressive disorder: a tract-based spatial statistics study. *Brain Res.* 2011;1369:223-229.
325. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998;11(4):234-245.
326. Zou K, Huang X, Li T, Gong Q, Li Z, Ou-yang L, Deng W, Chen Q, Li C, Ding Y, Sun X. Alterations of white matter integrity in adults with major depressive disorder: a magnetic resonance imaging study. *J Psychiatry Neurosci.* 2008;33:525-530.
327. Zou K, Huang X, Li T, Gong Q, Li Z, Ou-yang L, Deng W, Chen Q, Li C, Ding Y, Sun X. Alterations of white matter integrity in adults with major depressive disorder: a magnetic resonance imaging study. *J Psychiatry Neurosci.* 2008;33:525-530.

Biografija autora

Milutin Kostić, rođen 09.08.1982. godine u Beogradu. Upisao Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2001. godine. Diplomirao 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,69. Od juna 2008. godine na Institutu za mentalno zdravlje volontirao, bio klinički lekar i završio specijalizaciju 31.10.2014. Bio u Londonu na Modzli klinici pri odeljenju za Psihoze ranog početka u funkciji kliničara posmatrača (engl. clinical attachment), 3 meseca od oktobra do januara 2011. godine. Doktorske studije iz Molekularne medicine upisao 2008. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Dušice Lečić-Toševski. Tokom jula, avgusta i septembra 2013. godine bio u Milanu, Italiji pri Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Scientific Institute and University Hospital San Raffaele gde je aktivno radio na obradi i analizi snimaka magnetnom rezonancom koji su upotrebljeni u izradi doktorske disertacije. Izabran 23.12.2015. godine za kliničkog asistenta na predmetu psihijatrije pri Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Milutin Kostić
broj upisa _08-DS-MM-01

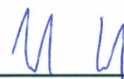
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom **Utvrđivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem**

- 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, 11.04.2016. g.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milutin Kostić

Broj upisa: 08-DS-MM-01

Studijski program: Doktorske studije iz Molekularne medicine

Naslov rada: Utvrđivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem

Mentor: Prof. Dr Dušica Lečić Toševski

Potpisani Milutin Kostić

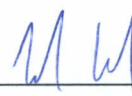
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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, 11.04.2016. g.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **Utvrdjivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem** 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 poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 11.04.2016. g.