

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Filozofski fakultet

Odsjek za psihologiju

Kornelija Mikulaj

## **Epigenetska osnova velikog depresivnog poremećaja**

Završni rad

Društvene znanosti, polje psihologija, biološka psihologija

Mentor: prof. dr.sc. Hrvoje Lepeduš

Osijek, 2017.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ETIOLOGIJA DEPRESIJE.....	3
3. EPIGENETSKI MEHANIZMI REGULACIJE GENSKE AKTIVNOSTI.....	6
4. EPIGENETSKI MEHANIZMI I DEPRESIVNI POREMEĆAJ.....	13
6. EPIGENETSKI UČINCI ANTIDEPRESIVA.....	15
7. LITERATURA.....	17

**Sažetak:**

Veliki depresivni poremećaj (eng. *Major Depressive Disorder*; MDD) jedan je od najčešćih psihosomatskih poremećaja koji pokazuje izraženu tendenciju porasta, zbog čega se predviđa da bi do 2020. godine mogao postati drugi najveći zdravstveni svjetski problem. Klinička fenotipizacija depresivnog poremećaja vrlo je heterogena, što ukazuje na njegovu etiološku složenost. Mogući razlozi za ovakav ishod jesu ti što u etiologiji depresivnog poremećaja najvjerojatnije sudjeluje veliki broj gena s malim pojedinačnim doprinosom kliničkim fenotipovima. Rastući broj istraživanja u posljednjih 10-ak godina ukazuje na mogućnost da bi epigenetski mehanizmi regulacije genske ekspresije (međuovisne promjene obrazaca metilacije/demetilacije DNA molekule i acetilacije/deacetilacije histonskih proteina, te djelovanje različitih nekodirajućih molekula RNA), mogli imati ključnu ulogu u nastanku i liječenju ovog psihičkog poremećaja, kao poveznica između bioloških i ostalih čimbenika koji uzrokuju depresiju. Rezultati istraživanja pokazuju da mnogi antidepresivi koji se koriste u terapiji depresivnog poremećaja imaju direktni epigenetski učinak, čime se otvara potpuno novo poglavlje u razumijevanju patogeneze depresivnog poremećaja i učinkovitosti terapije antidepresivima. Također očekuje se i razvoj novih psihofarmaka čije bi se djelovanje temeljilo na epigenetskim modifikacijama visoko specifičnim za depresivni poremećaj, što bi omogućilo efikasniju terapiju i bolje praćenje učinka liječenja i eventualnih nuspojava.

**Ključne riječi:** antidepresivi, depresija, epigenetika, MDD

**Abstract:**

Major Depressive Disorder (MDD) represents one of the most common psychosomatic disorder and it reveals the strong increase tendency. So, it would be expect to become second major world health problem by the year 2020. The clinical phenotyping of MDD reveals great heterogeneity of MDD what points to its etiological complexity. Probable cause for such outcome was due to large number of genes with minor solitary contribution to MDD etiology and clinic phenotypes. Increasing number of MDD research during last decade indicated that epigenetic regulatory mechanisms of genes expression (mutual changes in methylation/de-methylation of DNA and histone acetylation/de-acetylation patterns on the other side, as well as the role of different non-coding RNA molecules) might have the crucial role in pathogenesis and healing this mental disorder, since they were highlighted as probable link between biological and other MDD causing factors. Further, it was shown that most of usually utilized antidepressants used in MDD therapy had direct epigenetic effects what open completely new chapter in the appreciation of the MDD pathogenesis and antidepressant performance. Correspondingly, the development of new psychoactive drugs that should have epigenetic action mechanism highly specific for MDD would enable much efficient therapy as well as better monitoring of its results and possible side-effects.

**Key words:** antidepressants, depression, epigenetics, MDD

## 1. UVOD

Veliki depresivni poremećaj (eng. *Major Depressive Disorder*; MDD) ili kolokvijalno, depresija (lat. *depressio, depressus* – nizak; *deprimere* – pritisnuti, utisnuti), jedan je od najčešćih psihosomatskih poremećaja današnjice. Posebna pozornost depresiji posvećuje se u 21. stoljeću, iako zanimanje za ovaj poremećaj seže unazad više od 2000 godina. Trenutno od depresije boluje oko 350 milijuna osoba u svijetu, različitih dobnih skupina, a broj oboljelih je u stalnom porastu. Predviđa da bi do 2020. godine depresija mogla postati drugi najveći zdravstveni svjetski problem (<http://www.who.int>).

Simptomi depresije mogu biti emocionalni, kognitivni i somatski. Tipični simptomi depresije (skupina A) su tjeskoba, gubitak interesa i zadovoljstva u uobičajenim aktivnostima te smanjena životna energija. Drugi česti simptomi (skupina B) su poremećaji spavanja, apetita, koncentracije i pažnje, smanjeno samopoštovanje i samopouzdanje, ideje krivnje i bezvrijednosti, pesimizam, ideje o samoozljeđivanju ili samoubojstvu. Somatski simptomi depresije su anhedonija, nedostatak reaktivnosti na uobičajeno ugodnu okolinu i događaje, rano buđenje, jutarnje pogoršanje depresije, psihomotorna usporenost ili nemir, gubitak apetita, gubitak tjelesne mase, te smanjenje libida.

U hrvatskom zdravstvenom sustavu za dijagnozu depresije koristi se MKB-10 klasifikacija, što znači da se za postavljanje dijagnoze depresije depresivno stanje pojavljuje u epizodama a prvi simptomi traju minimalno dva tjedna. Ukoliko nakon minimalnog razdoblja od 2 mjeseca bez simptoma dođe do nove depresivne epizode tada se radi o ponavljajućem depresivnom poremećaju.

Glavni cilj ovog završnog rada jest dati pregled novih spoznaja o molekularno-biološkim aspektima velikog depresivnog poremećaja (MDD), što bi trebalo poslužiti upotpunjenju slike o aktualnim teorijama nastanka ove bolesti. U poglavlju *Etiologija depresije* bit će opisane dvije glavne skupine teorija nastanka depresije (psihosocijalne i biološke teorije) s posebnim naglaskom na skupinu bioloških teorija, koje će biti detaljnije opisane. Poglavlje *Epigenetski mehanizmi regulacije genske aktivnosti* donosi opis glavnih epigenetskih procesa u stanici – međuovisne promjene obrazaca metilacije/demetilacije DNA molekule i acetilacije/deacetilacije histonskih proteina, te djelovanje različitih nekodirajućih molekula RNA. U slijedećem poglavlju, *Epigenetski mehanizmi i depresivni poremećaj* biti će izloženi i raspravljani rezultati recentnih istraživanja uloge epigenetskih mehanizama regulacije genske aktivnosti u pacijenata s

depresivnim poremećajem. Konačno, posljednje poglavlje, *Epigenetski učinci antidepressiva* ukazat će da mnogi antidepressivi koji se koriste u terapiji depresivnog poremećaja direktno moduliraju epigenom, što s jedne strane objašnjava dosadašnje nejasnoće u razumijevanju njihovog djelovanja na pacijente s depresivnim poremećajem, te, s druge strane, daje nove smjernice za razvoj novih psihofarmaka čije bi se djelovanje temeljilo na epigenetskim modifikacijama visoko specifičnim za učinkovitu terapiju depresivnog poremećaja.

## 2. ETIOLOGIJA DEPRESIJE

S obzirom na činjenice da je rizik za obolijevanje od depresije oko 15%, da pogađa različite starosne skupine, da je dva puta češća kod žena nego li kod muškaraca te da se simptomatski eksprimira vrlo heterogeno i uzrokuje značajne psihosocijalne teškoće povezane s financijskim opterećenjem zdravstvenih sustava, postavilo se pitanje uzroka ovog poremećaja. Tijekom posljednjih pola stoljeća razvijene su brojne teorije o nastanku depresije, koje se mogu kategorizirati u dvije osnovne skupine: psihosocijalne i biološke.

Biološke teorije naglasak daju na različite istraživačke smjerove. Neurobiokemijska istraživanja fokusirana su na regulaciju razine različitih neurotransmitora, kao što su npr. monoaminski (serotonin, dopamin, norepinefrin) – tzv. monoaminska teorija. Pri tome su moguća dva scenarija. U prvom je razina monoaminskih neurotransmitora promijenjena uslijed poremećaja biosinteze, pohrane ili oslobađanja u sinaptičku pukotinu a u drugom je razina neurotransmitora optimalna no djelovanje postsinaptičkih receptora je poremećeno, kao i provođenje signala u postsinaptičkim neuronima. Monoaminski neurotransmitori moduliraju emocije, kogniciju i pažnju (frontalni korteks), apetit, libido, osjećaj zadovoljstva (hipotalamus), motoriku pokreta (mali mozak) i ponašanje vezano uz nagrađivanje i motivaciju (nucleus acumbens i prefrontalni korteks). Iz tog razloga se dugo vremena mislilo da su odgovorni za pojavu različitih simptoma depresije. Nadalje i neke druge molekule (GABA, glutamat, neuroaktivni steroidi, opiodi, kolekistokinin, histamin i nikotin) također bi mogle bit uključene u nastanak depresije. Iako se kod dijela pacijenata upotrebom različitih antidepresiva koji moduliraju razinu određenih neurotransmitora stanje popravilo, ne postoji jasan dokaz da bi neki od neurotransmitora ili njihovih prekursora mogao imati centralnu ulogu u etiologiji depresije (Kharade i sur. 2010). Ostale biološke teorije usredotočile su se na neuroendokrine promjene koje su pratile pojavu depresije kod jednog dijela pacijenata, poput povišene razine kortizola i cirkadijanog ritma njegovog lučenja te poremećeno funkcioniranje osi hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna žlijezda (HHN) i osi hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda (HHT) (Bondy, 2002).

Razvojem preciznih i korisnih slikovnih tehnika (MRI, fMRI, PET...) biološki aspekt istraživanja depresije dobija na važnosti, jer su do tad patoanatomska istraživanja na ljudima bila moguća jedino *post mortem* na suicidalnim pacijentima kojima je prethodno bio dijagnosticiran depresivni poremećaj. Patološke promjene mozga funkcionalno povezane s depresijom obuhvaćaju promjene

u amigdalama (smanjena gustoća glija stanica, povećan protok krvi i povišena metabolička aktivnost), prefrontalnom korteksu (smanjenje volumena sive tvari, slabiji protok krvi, snižen metabolizam te povećanje lezija u bijeloj tvari), hipokampusu (smanjena aktivnost povezana sa smanjenjem volumena sive tvari i broja neurona, slabiji protok krvi i vezanje serotonina te snižen metabolizam), prednjem cingulatnom korteksu (slabiji protok krvi i snižen metabolizam posebno u dorzalnoj regiji) te bazalnim ganglijima u području striatuma (smanjeni volumen, gustoća neurona, protok krvi i snižena metabolička aktivnost) (Kasala i sur. 2014). Najbolje istražen dio mozga povezan s depresijom je hipokampus, zbog svoje uloge u učenju i pamćenju. Također, podražaji iz okoliša mogu uzrokovati neprikladne emocionalne reakcije u slučaju poremećaja u funkcioniranju hipokampusa (Palazidou, 2012). Najnovija istraživanja pokazuju da pogoršanje sinaptičke plastičnosti u hipokampusu mogu biti ključni za razvoj depresije. Abnormalna neurološka plastičnost povezuje se s promjenama razine neurotrofnih čimbenika (npr. sniženje razine BDNF čimbenika, eng. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) što može dovesti do smanjenja volumena hipokampusa, uslijed atrofije CA3 neurona u hipokampusu. Nadalje, BDNF čimbenik se povezuje *de novo* neurogenezom u mozgu odraslih, do koje dolazi npr. uslijed stanične proliferacije u dentatnom girusu hipokampusa. Upotrebom antidepresiva dolazi do pojačane ekspresije BDNF čimbenika u ovim dijelovima mozga te do povećanja volumena hipokampusa (Kharade i sur. 2010). Konačno, činjenica da se depresivni poremećaj pojavljuje s povišenom učestalošću u nekim obiteljima, čak i s do 2-3 puta većim rizikom o prvoj filijalnoj generaciji u odnosu na obitelji s nižom učestalošću depresije, ukazuje na moguć važan utjecaj genetskih čimbenika u nastanku depresije (Sullivan i sur. 2000). Nadalje, istraživanja obitelji s učestalom pojavom depresije pokazala su značajan komorbiditet s ostalim afektivnim poremećajima (anksiozni poremećaj, bipolarni poremećaj) što upućuje na zajedničke nasljedne čimbenike rizika (Rush i sur. 2005).

Osim spomenutog epidemiološkog pristupa, genetska istraživanja uglavnom su fokusirana na identifikaciju genetskih lokusa odgovornih za nastanak depresije. U tu svrhu se obilno koristila analiza genomskih asocijacija (eng. *Genome-Wide Association Studies*; GWAS) koja se većinom temelji na analizi polimorfizama pojedinačnih nukleotida (eng. *Single-Nucleotide Polymorphisms*; SNPs). Za razliku od nekih drugih psihičkih bolesti i poremećaja (npr. shizofrenija), ovaj pristup nije polučio željeni rezultat, budući da nije ustanovljen niti jedan lokus koji bi bio značajan za objašnjenje nastanka depresije. Mogući razlozi za ovakav ishod jesu ti što u etiologiji depresivnog poremećaja najvjerojatnije sudjeluje veliki broj gena s malim pojedinačnim doprinosom kliničkim fenotipovima, te što klinička fenotipizacija ne uspijeva uvijek jasno razlučiti niti koji oblik



depresivnog poremećaja je u pitanju, niti da li se određeni klinički simptomi mogu pripisati isključivo depresivnom poremećaju ili se javljaju paralelno s nekim drugim psihičkim poremećajem (Flint i Kendler, 2014). Također, relativno visoke stope razilaženja među identičnim blizancima (nasljednost je oko 37%), kod depresije i drugih sindroma povezanih sa stresom, jasno upućuju na važnost dodatnih etioloških mehanizama, kao što su okolišni čimbenici, u prvom redu stres (posebno kronični), koji povećava rizik od razvoja depresije (Roy i sur, 2014).

Posljednjih 10-ak godina dogodio se veliki pomak u razumijevanju interakcije gena i okoliša u razvoju psihičkih poremećaja. Nove spoznaje molekularne biologije pružaju nove uvide u djelovanje epigenetskih čimbenika koji su posebno osjetljivi na utjecaje iz okoliša što dovodi do promjena u genskoj aktivnosti bez utjecaja na sekvencu DNA (Roth, 2013). Izloženost takvim utjecajima iz okoliša uzrokuje promjene u ekspresiji gena, funkciji neurona, i, na kraju, promjene u ponašanju (Nestler i sur, 2016). Također, sve više istraživanja pokazuje da bi upravo epigenetika mogla biti poveznica između bioloških i ostalih čimbenika koji uzrokuju depresiju (Graff i Mansuy, 2006). Temeljem rezultata recentnih istraživanja, moguće je zaključiti da depresija kao poremećaj ima više uzroka najčešće usko vezanih uz genetske faktore i stres, koji djeluju međusobno pomoću niza psihopatoloških mehanizama (Palazidou, 2012).

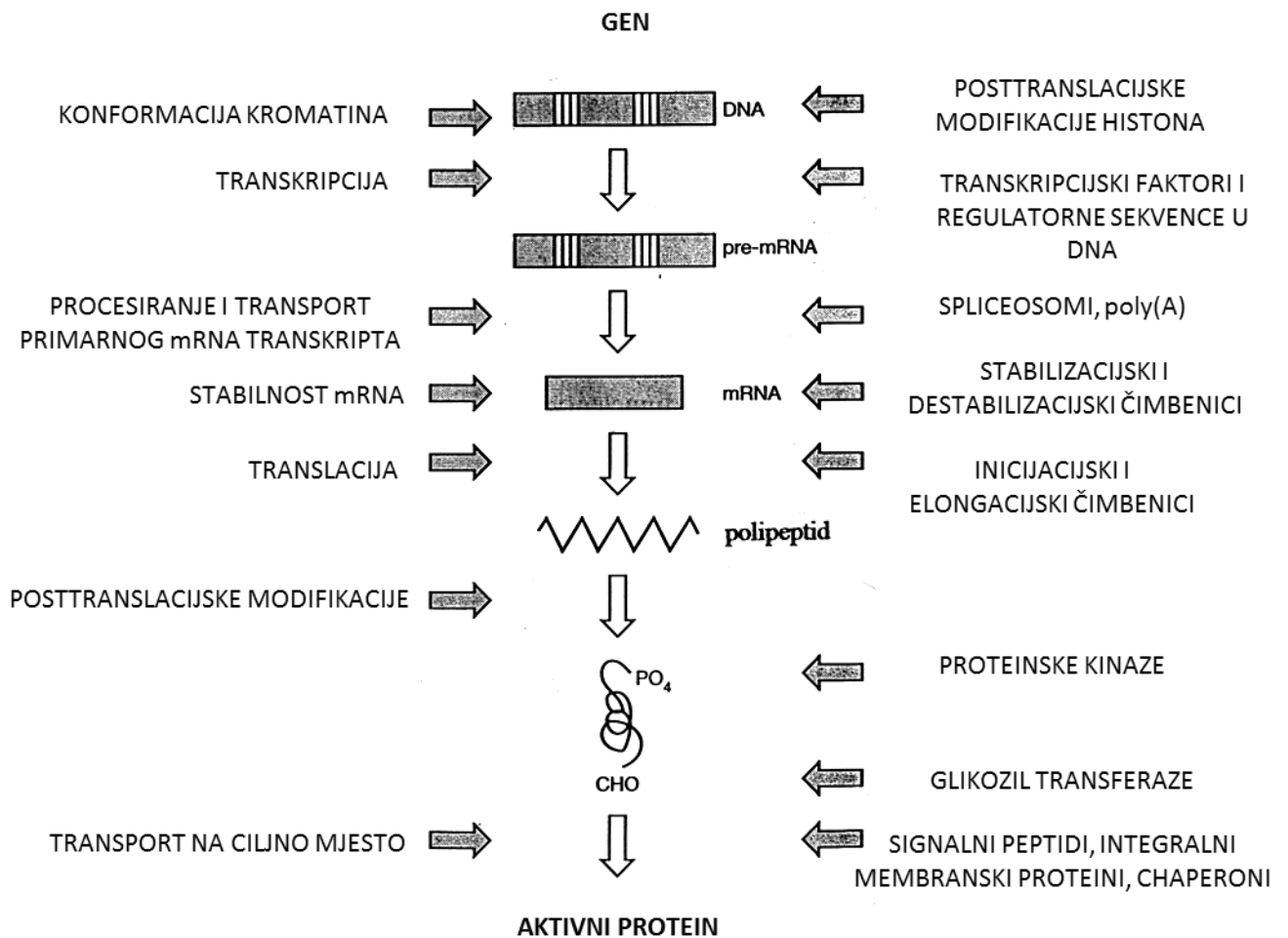
### 3. EPIGENETSKI MEHANIZMI REGULACIJE GENSKE AKTIVNOSTI

Jedno od glavnih pitanja molekularne biologije jest što određuje koji će geni u određenom vremenskom periodu razvoja nekog organizma, u kojim tkivima i na kojoj razini biti eksprimirani. S obzirom na interakciju ogromnog broja različitih signala iz okoliša i iz samog organizma s velikim brojem gena prisutnih u genomima različitih organizama, te mogućnosti njihovog alternativnog prekrajanja, ovo pitanje je zasjalo u svojoj kompleksnosti u postgenomskoj eri.

Pojam genske ekspresije u svom pojednostavljenom prikazu se najčešće svodi na procese transkripcije (sinteze RNA molekula prema DNA kalupu, tj. uputi sadržanoj u molekuli DNA) te translaciju (biosintezu proteina). Međutim, tijekom godina briljantnih i vrlo kompleksnih molekularno-bioloških istraživanja, postalo je razvidno da je genska aktivnost regulirana na nekoliko različitih razina koje obuhvaćaju niz dodatnih bioloških procesa (slika 1.). Tako npr. prije same transkripcije DNA, kromatin mora zauzeti odgovarajuću konformaciju koja će RNA-polimerazi omogućiti pristup ciljnog genu koji treba biti transkribiran. Regulacijski mehanizmi koji kontroliraju razinu kondenzacije kromatina obuhvaćaju postranlacijske modifikacije histonskih proteina, o čemu će kasnije biti više riječi. Već spomenuti proces transkripcije, kojeg provodi enzim RNA-polimeraza, reguliran je putem transkripcijskih faktora proteinske prirode koji interagiraju s ciljnim regulacijskim sekvencama u molekulama DNA. Rezultat transkripcije jest nastanak tzv. primarnog RNA transkripta koji još uvijek nije funkcionalna mRNA molekula. Za nastanak funkcionalne mRNA molekule (tzv. sazrijevanje) potrebne su posttranskripcijske modifikacije primarnog transkripta. Ove modifikacije obuhvaćaju dodavanje G<sup>+</sup>-kape, formiranje poliadenilatnog repa, te izrezivanje introna i spajanje egzona. Nakon ovih biokemijskih zahvata primarni mRNA transkript postaje funkcionalna mRNA molekula koja se kroz multiproteinske komplekse jezgrinih pora transportira iz jezgre u citoplazmu. U citoplazmi je zrela mRNA izložena djelovanju različitih nukleaza koje imaju sposobnost cijepanja mRNA molekule. Da bi se mRNA molekula mogla upotrijebiti u procesu translacije, neophodno je održati njenu stabilnost tijekom određenog vremenskog perioda. Biosinteza proteina odvija se na staničnim strukturama koji se nazivaju ribosomima. Sam proces translacije reguliran je različitim inicijacijskim i elongacijskim čimbenicima. Nascentni polipeptid najčešće se višestruku posttranslacijski modificira djelovanjem različitih enzima, te, u konačnici, transportira na ciljno mjesto u stanici gdje će obavljati svoju biološku funkciju. Transport polipeptida na ciljno mjesto u stanici reguliran je interakcijom

signalnih peptidnih dijelova polipeptida s različitim receptorskim (membranski proteini) i drugim pomoćnim proteinima (tzv. chaperoni).

**Slika 1.** Shematski prikaz procesa uključenih u gensku ekspresiju (modificirao prof. dr. sc. H. L. prema Hughes 1996).

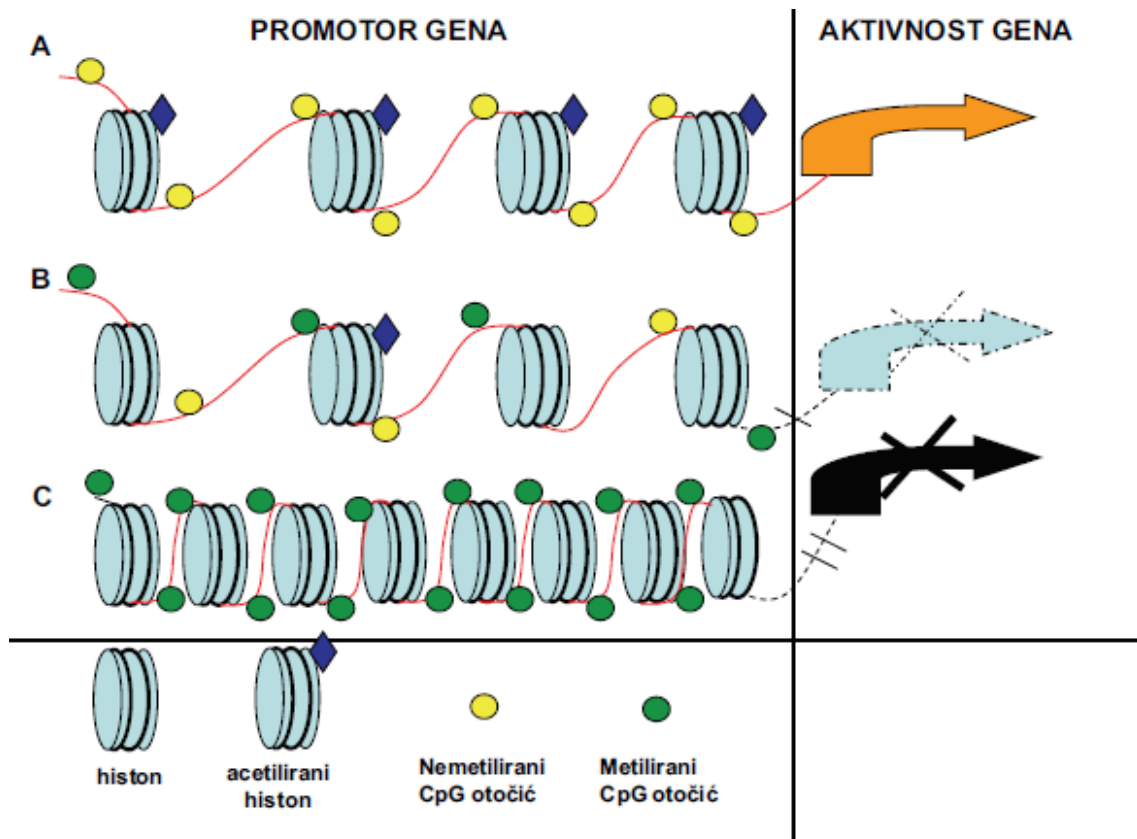


Tri glavna epigenetska mehanizma regulacije genske ekspresije obuhvaćaju metilaciju DNA molekule, posttranslacijske modifikacije histonskih proteina (poput metilacije, acetilacije, fosforilacije...) te utišavanje gena djelovanjem malih interferirajućih RNA molekula (Gall Trošelj i sur. 2009). Pri tome je vrlo važno istaknuti koordinirano djelovanje ovih mehanizama u stanici, čime se postiže vrlo precizno usklađivanje kompleksnih staničnih procesa.

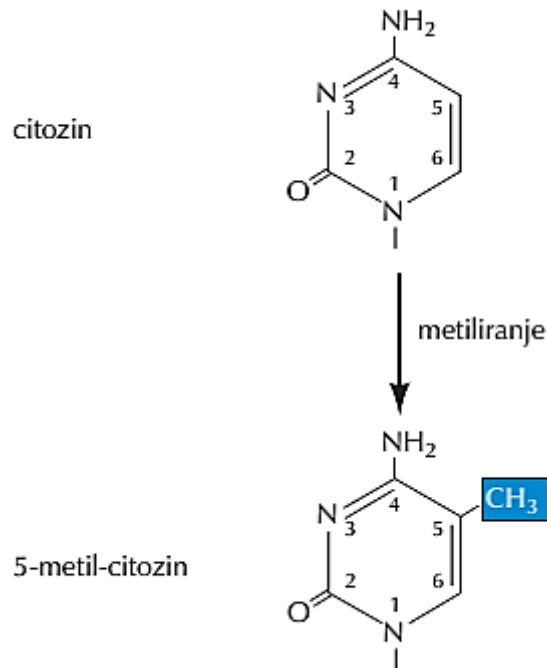
Pretpostavlja se da oko 56% gena čovjeka u svojim promotorima posjeduje tzv. CpG otočiće (područja bogata citozinom i gvaninom) (Antequera i Bird, 1993). CpG otočići su područja dulja od 500 parova nukleotida s više od 55% nukleotida s bazama G + C. U zdravim stanicama, ta su područja pretežito nemetilirana, osim u promotorima upisanih gena, područjima kromosoma X koja su povezana s njegovom nasumičnom inaktivacijom, kao i u područjima transpozona (Jaenisch i Bird, 2003). Metilacija molekule DNA se primarno istražuje na razini transkripcije gena (Gall Trošelj i sur. 2009) pri čemu se regulacija genske aktivnosti odvija na dvije razine: ukoliko je promotor metiliran, tada je gen utišan, dok je u slučaju nemetiliranog promotora gen aktivan (slika 2).

Ovaj proces metilacije i demetilacije citozina predstavlja jedan od temeljnih razvojnih mehanizama u svih vrsta. Metilacija DNA molekule odvija se kovalentnim vezanjem metilne skupine na 5. atom ugljika citozina u otočiću CpG (slika 3). Povišena razina metilacije promotora nekog gena može uzrokovati njegovo utišavanje. Ovakav učinak metilacije na utišavanje gena temelji se na dvije činjenice: 1. metilacija uzrokuje promjenu konformacije dijela DNA molekule (iz A-DNA u Z-DNA) uslijed čega veliki uticaj u DNA molekuli postaje plošan i transkripcijski faktori gube mjesto prepoznavanja specifičnih sekvenci i mogućnost vezanja za njih; te 2. dodatni osigurač koji prevenira vezanje transkripcijskih faktora u promotorskim regijama jest vezanje MeCP2 proteina (engl. *Methyl Cytosine Binding Proteins*) na metilirane CpG otočiće.

**Slika 2.** Shematski prikaz epigenetskih promjena u genu čiji je promotor bogatom CpG otočićima. A) Histoni su acetilirani, CpG otočići su nemetilirani, gen je aktivan. B) Dio histona je izgubio acetilne skupine, dio CpG otočića je metiliran, gen nije aktivan ali je promjena reverzibilna. C) Histoni su hipoacetilirani, a CpG otočići metilirani. Gen je utišan, promjena je ireverzibilna (prema Gall Trošelj i sur. 2009).

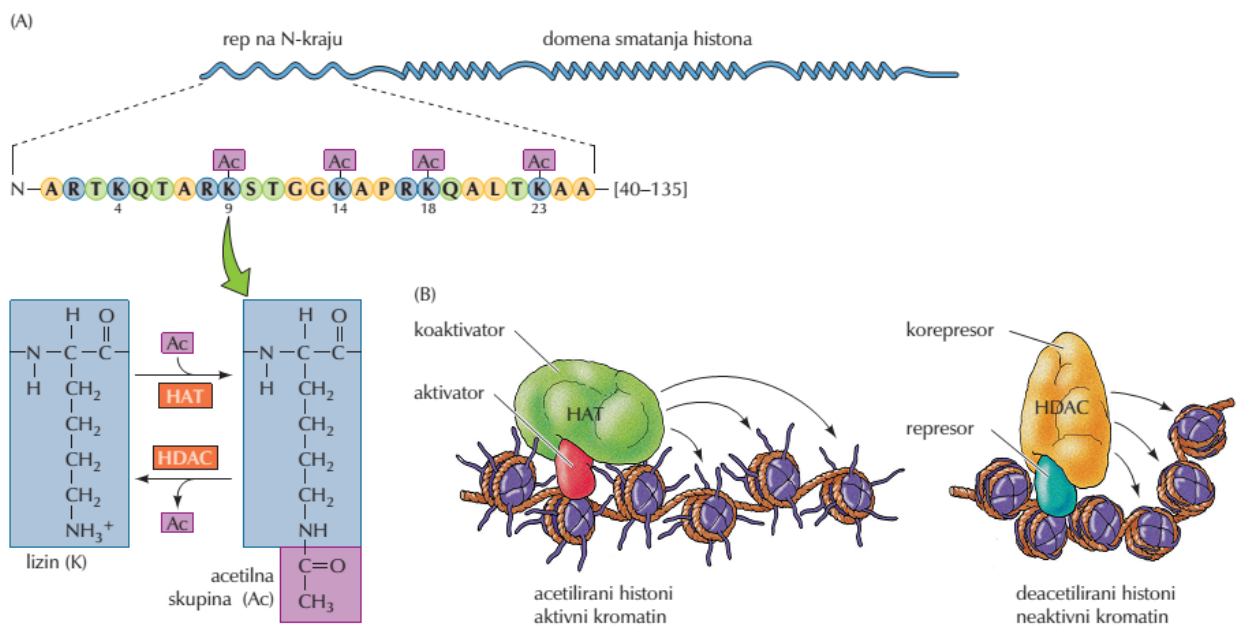


**Slika 3.** Metiliranje C5 atoma citozina rezultira nastajanjem 5-metil-citozina (prema Cooper i Hausmann 2004).



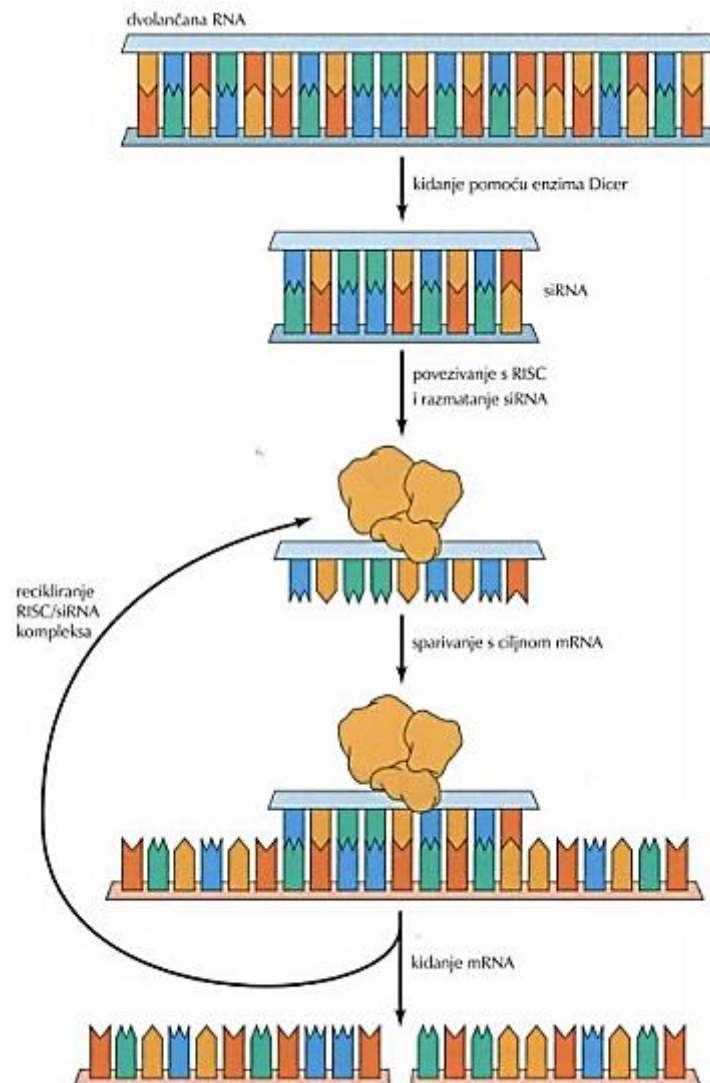
Osim metilacije DNA molekula, dva dodatna epigenomska mehanizma remodeliranja kromatina su promjene koda histona i razine malih molekula RNA. Promjene koda histona uključuju različite pottranslacijske modifikacije, poput acetilacije, fosforilacije, metilacije i drugih. Možda najbolje proučen primjer jest proces deacetilacije i acetilacije histonskih proteina u histonskom oktameru (slika 4). Enzimi histonske deacetilaze (HDAC) uklanjaju acetilne skupine iz histonskih repova, što uzrokuje kondenzaciju kromatina u područjima promotora te onemogućava vezanje transkripcijskih faktora i, posljedično, utišava ekspresiju gena. Paralelno, histonska deacetilacija aktivira DNA metiltransferaze, što putem lokalne hipermetilacije DNA molekule u području promotora dodatno utišava ciljani gen. Suprotno, enzimi histonske acetilaze (HAC), koje se još nazivaju i histonskim acetil-transferazama (HAT) će aktivirati gen tako da će, s jedne strane potaknuti vezanje transkripcijskih faktora, a s druge strane, onemogućiti pristup DNA-metiltransferazama molekuli DNA.

**Slika 4.** Acetiliranje histona. A) Acetilna skupina dodaje se na lizilni ostatak u repu histonskog proteina. B) Transkripcijski aktivatori i represori združeni su s ko-aktivatorima (histonske acetiltransferaze; HAT) i ko-represorima (histonske deacetilaze; HDAC) (prema Cooper i Hausman 2004).



Posljednji značajan mehanizam regulacije genske ekspresije, ovisan o malim RNA molekulama naziva se RNA interferencijom (RNAi) (slika 5). Ovim mehanizmom dolazi do utišavanja ekspresije određenih gena na posttranskripcijskoj razini, na više načina – cijepanje transkripta, inhibicija translacije te povišenjem razine kondenzacije kromatina (Vialou i sur. 2013).

**Slika 5.** Mehanizam RNA interferencije (prema Cooper i Hausman 2010).





#### 4. EPIGENETSKI MEHANIZMI I DEPRESIVNI POREMEĆAJ

Rastući broj epigenetskih istraživanja pokazala su da bi upravo epigenetski mehanizmi mogli dati odgovore na određena pitanja vezana za depresivni poremećaj, kao što su npr. načini nasljeđivanja depresije i poteškoće u identifikaciji gena koji sudjeluju u razvoju bolesti, razilaženje u studijama blizanaca, veću prevalenciju za depresiju kod žena nego li kod muškaraca, te općenito ulogu stresa kao jednog od glavnih prepoznatih uzroka depresije baziranih na interakciji genoma i okoliša (Mill i Petronis, 2007).

Većina epigenetskih studija depresivnog poremećaja bazirana je na istraživanje obrazaca metilacije DNA. Sabunciyani i sur. (2012), proveli su prvu veliku EWAS (eng. *Epigenome-Wide Association Studies*; EWAS) *post mortem* studiju metilacije DNA iz frontalnog korteksa 39 pacijenata kojima je dijagnosticiran depresivni poremećaj te 26 kontrolnih pacijenata. Analizirali su 3.5 milijuna CpG otočića, od čega su izdvojili 224 CpG bogate regije koje su bile povezane s neuralnim rastom i razvojem, a koje su pokazivale povišenu metilaciju DNA praćenu sa sniženom ekspresijom gena prisutnim u dotičnim regijama. Najveća razlika (12%-15% u povišenju metilacije u pacijenata s depresivnim poremećajem u odnosu na kontrolu) utvrđena je za gen *Proline Rich Membrane Anchor 1* (PRIMA1), čija je uloga organiziranje acetilkolinesteraze u tetramere koji interagiraju s neuronskim staničnim membrana. Snižena akumulacija ovog proteina u pacijenata s depresivnim poremećajem, nastala uslijed povišene metilacije DNA, vjerojatno doprinosi smanjenoj funkcionalnosti ovog enzima što je u skladu s njihovom kliničkom slikom. Osim relativne jednostavnosti ovog pristupa u usporedbi s metodologijom ostalih epigenetskih procesa, olakotna okolnost jest i to što je za neke biokemijske biljege depresije pokazala podudarnost obrazaca metilacije DNA u uzorcima krvi s uzorcima mozga dobivenih *post mortem* (Saavedra i sur. 2016). Snižena razina metilacije DNA iz leukocita periferne krvi na preko 360 CpG mjesta utvrđena je u pacijenata kojima je dijagnosticiran depresivni poremećaj (ali nisu bili pod terapijom) u odnosu na kontrolnu skupinu. Neki od tih lokusa pripadali su promotorima gena čija je povišena ekspresija prethodno povezana s depresivnim poremećajem (npr. geni *Cell Cycle Associated Protein 1*; CAPRN1, *cAMP-response element binding protein/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain-2*; CITED2, *Diacylglycerol Kinase*; DGKH, *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*; GSK3B i *Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1*;

SGK1) (Numata i sur. 2015). Nadalje, usporedbom obrazaca metilacije DNA između identičnih blizanaca utvrđena je značajna razlika u određenim genima (npr. gen *WD Repeat Domain 26*; *WDR26*). Bez obzira da li je utvrđena razlika stohastička ili je uvjetovana nekim određenim okolišnim utjecajem, ovi dokazi predstavljaju do sad najčvršće objašnjenje u razilaženju epidemioloških podataka depresije u blizanaca. Također, vrlo su značajna istraživanja metilacije gena koji kodira BDNF čimbenik, a koji je uključen u preživljavanje neurona te za neuralnu plastičnost i kognitivne funkcije. U usporedbi s kontrolnom skupinom, kod pacijenata kojima je dijagnosticiran depresivni poremećaj utvrđena je povišena razina metilacije DNA u promotoru *BDNF* gena što je negativno koreliralo s razinom BDNF proteina i u uzorcima krvi i u *post mortem* uzorcima mozga (Duclot i Kabbaj, 2015).

Istraživanja modifikacija histona ukazala su na značajnost njihovog orkestriranog djelovanja s metilacijom DNA u nastanku depresije. Povišena ekspresija gena koji kodiraju histonske deacetilaze (*HDAC2* i *HDAC5*) utvrđena je u perifernoj krvi pacijenata s depresivnim poremećajem (koji nisu bili pod terapijom antidepresivima) u odnosu na kontrolnu skupinu (Hobara i sur. 2010; Iga i sur. 2007). U prilog ovim spoznajama o ulozi histonskih acetilaza idu i dokazi o sniženoj razini *HDAC2* u *post mortem* tkivima mozga depresivnih pacijenata (Covington i sur. 2009). Nadalje, dokazano je da je trimetilacija četvrtog lizinskog repa na histonu H3 (*H3K4me3*), modifikacija koja omogućava vezanje transkripcijskih faktora u promotorskim regijama, korelirana s *post mortem* povišenom razinom ekspresije gena *SYN2* (gen kodira protein *SYN2* iz obitelji sinapsina koji imaju izuzetno važnu ulogu u nastanku različitih neuropsihijatrijskih poremećaja) (Cruceanu i sur. 2013). Budući da *H3K4me3* modifikacija ostaje stabilna tijekom stanične autolize, ovi rezultati su od posebnog značaja za epigenetske *post mortem* studije.

U potpunjavanju slike o epigenetskoj regulaciji nastanka depresivnog poremećaja dobiveno je razjašnjenjem uloga različitih nekodirajućih molekula RNA. Istraživanja neuronskih staničnih kultura i na animalnih modela pokazala su da prekomjerna ekspresija određenih micro RNA molekula (*miR-18a* i *miR-124a*) djeluje represivno na akumulaciju glukokortikoidnih receptora (Uchida i sur. 2008; Vreugdenhil i sur. 2009). Ova istraživanja djelomično objašnjavaju potencijalnu povezanost depresije s fiziologijom stresa, s obzirom da je smanjena razina glukokortikoidnih receptora i povišena razina kortizola ustanovljena u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini depresivnih pacijenata. Istraživanja miRNA u prefrontalnom korteksu suicidalnih pacijenata s dijagnozom depresivnog poremećaja (koji nisu bili pod terapijom antidepresivima)

pokazala su sniženu ekspresiju 21 miRNA molekule, u odnosu na kontrolu (Smalheiser i sur. 2012).

## 5. EPIGENETSKI UČINCI ANTIDEPRESIVA

Etiološka složenost depresivnog poremećaja i posljedična nemogućnost egzaktnog utvrđivanja uzroka ovog poremećaja otvorila je put različitim psihosocijalnim i kognitivno-bihevioralnim pristupima liječenja, koji su, posebice u odrasloj i starijoj dobi, uslijed učestalog komorbiditeta rezultirali vrlo heterogenim kliničkim slikama (Mimica i Kušan Jukić 2013). Uslijed smanjenog lučenja noradrenalina i serotonina u depresivnih pacijenata, najčešće se kao antidepresivi koriste neselektivni i selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI), neselektivni inhibitori monoamino oksidaze (MAOI) te selektivni inhibitori monoamino oksidaze tipa A. U pravilu, pacijent osjeća poboljšanje nakon nekoliko tjedana uzimanja. Pri tome se posebno ističe da je *„...uputno je slijediti uobičajena pravila dobre kliničke prakse koja se tiču izbora antidepresiva i njegova profila nuspojava i interakcija s drugim lijekovima u starijih osoba.“*

S druge strane, upravo su takvi pokušaji psihoterapije u kombinaciji s farmakoterapijom produbili potrebu razjašnjenja biološkog mehanizma patogeneze depresije. Planiranje istraživanja epigenetske regulacije depresivnog poremećaja su u jednom dijelu uključivala pacijente koji su bili izloženi terapiji antidepresivima. Pokazalo se da mnogi od njih imaju direktne epigenetske učinke tako što potiču demetilaciju molekule DNA. Npr. triciklički antidepresivi amitriptilin i imipranim snizili su stopu metilacije DNA u promotorskim regijama primarnih astrocita u štakora. Zatim, stabilizator raspoloženja i antikonvulzant valproat potaknuo je globalnu redukciju metilacije DNA u ljudskim embrionalnim stanicama bubrega te u jetrenim stanicama štakora. Nadalje, antipsihotici sulpirid i klopazipin potaknuli su demetilaciju DNA u frontalnom korteksu i striatumu (Menke i Binder, 2014). Veliku pažnju privukla je činjenica da antidepresivi skupine SSRI povisuju razinu serumskog BDNF u pacijenata s depresijom (Molendijk i sur. 2011). Nekoliko studija je pokazalo da se epigenetski mehanizam ovakvog djelovanja antidepresiva temelji na sniženoj trimetilaciji lizinskog ostatka u histonu H3 (H3K27me3) u promotoru egzona IV gena koji kodira BDNF (Lopez i sur. 2014; Chen i sur. 2011). Osim toga, djelovanje SSRI antidepresiva escitaloprama tijekom 12 tjedana terapije uzrokovalo je diferencijalnu ekspresiju 30 miRNA molekula, od čega su 28 bile povišeno a 2 izrazito sniženo eksprimirane. Za neke od

povišeno eksprimiranih miRNA molekula (miR-132, miR-26a, miR26b i miR-183) poznato je da su uključene u regulaciju neurogeneze i plastičnosti sinapsa, te regulaciju razine BDNF proteina (Bocchio-Chiavetto i sur. 2013).

Iako su epigenetska istraživanja depresije u ekspanziji i daleko su od kompletne slike, predloženi dokazi idu u prilog hipotezi da bi epigenetski mehanizmi regulacije ekspresije određenih gena (metilacija/demetilacija molekule DNA, modifikacije histonskih proteina i diferencijalna ekspresija različitih nekodirajućih RNA molekula) mogli biti ključni kako u razumijevanju patogeneze depresivnog poremećaja, tako i djelovanja terapije antidepresivima. Stoga se u narednom periodu očekuje da će epigenetsko profiliranje omogućiti predviđanje prevalencije i bolje razumijevanje patofiziologije depresije te poboljšanje dijagnostičkih mogućnosti u pacijenata s depresivnim poremećajem. Također, predviđa se i razvoj novih psihofarmaka čije bi se djelovanje temeljilo upravo na epigenetskim modifikacijama visoko specifičnim za depresivni poremećaj, što bi omogućilo efikasniju terapiju i bolje praćenje učinka liječenja i eventualnih nuspojava.

## 6. LITERATURA:

- Antequera F, Bird A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11995-11999.
- Bocchio-Chiavetto L, Maffioletti E, Bettinsoli P, Giovannini C, Bignotti S, Tardito D, et al. (2013). Blood microrna changes in depressed patients during antidepressant treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23: 602-611.
- Bondy, B. (2002). Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues Clin Neurosci*, 4:7-20.
- Chen ES, Ernst C, Turecki G. (2011). The epigenetic effects of antidepressant treatment on human prefrontal cortex BDNF expression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14: 427-29.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2010). Stanica – molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada.
- Covington HE III, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, et al. (2009). Antidepressant Actions of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Neurosci*, 29(37):11451–11460.
- Cruceanu C, Alda M, Nagy C., Freemantle E, Rouleau GA, Turecki G. (2013). H3k4 tri-methylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar disorder and major depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16: 289-299.
- Duclot F, Kabbaj M. (2015). Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants. *J Exp Biol*, 218: 21-31.
- Flint J, Kendler KS. (2014). The Genetics of Major Depression. *Neuron*, 81 (5): 484-503
- Gall Trošelj K, Novak Kujundžić R, Grbeša I. (2009). Epigenetika i fiziologija gena. *Medicina*, 45(2): 127-135.
- Graff J, Mansuy I.M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res*, 192: 70-87.
- Hobara T, Uchida S, Otsuki K, Matsubara T, Funato H, Matsuo K, et al. (2010). Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res*, 44: 263-270.
- Hughes, M. (1996). Plant Molecular Genetics. Edinburgh Gate, Harlow: Addison Wesley Longman.
- Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Kinouchi S, Tayoshi-Shibuya S, et al. (2007). Altered hdac5 and creb mrna expressions in the peripheral leukocytes of major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31: 628-632.

- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrate intrinsic and environmental signals. (2003). *Nat Genet*, 33(Suppl): 245-254.
- Kasala ER, Bodduluru LN, Maneti Y, Thipparaboina R. (2014). Effect of meditation on neurophysiological changes in stress mediated depression. *Complement Ther Clin Pract*, 20: 74-80.
- Kharade SM, Gumate DS, Naikwade NS. (2010). A review: hypothesis of depression and role of antidepressant drugs. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(4):3-6.
- Lopez JP, Lim R, Cruceanu C, Crapper L, Fasano C, Labonte B, et al. (2014). Mir-1202 is a primate-specific and brain-enriched microRNA involved in major depression and antidepressant treatment. *Nat Med*, 20: 764-768.
- Menke A, Binder EB. (2014). Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci*, 16(3): 395-404.
- Mill J, Petronis A. (2007). Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry*, 12: 799-814.
- Mimica N, Kušan Jukić M. (2013). Depresija u osoba starije životne dobi: specifičnosti kliničke slike i smjernice za liječenje. *Medix*, 106: 213-218.
- Molendijk ML, Bus BA, Spinhoven P, Penninx BWJH, KenisG, Prickaerts J, Voshaar RCO, et al. (2011). Serum levels of brain derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol Psychiatry*, 16:1088-1095.
- Nestler EJ, Pena CJ, Kundakovic M, Mitchell A, Akbarian S. (2016). Epigenetic basis of mental illness. *Neuroscientist*, 22(5): 447-463.
- Numata S, Ishii K, Tajima A, Iga J, Kinoshita M, Watanabe S, et al. (2015). Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using multiplex DNA methylation profiles: Discovery and validation. *Epigenetics*. 10: 135-141.
- Palazidou, E.(2012). The neurobiology of depression. *Br Med Bull*, 101(1):127-145.
- Roth TL. (2013). Epigenetic mechanisms in the development of behaviour. *Dev Psychopathol*, 25; 1279-1291.
- Roy M, Tapadia MG, Joshi S, Koch B. (2014). Molecular and genetic basis of depression. *J Genet*, 93(3): 879-892.
- Rush AJ, Zimmerman M, Wisniewski SR, Fava M, Hollon SD, Warden D et al. (2005). *Affect Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: demographic and clinical*

features. *J Disord*, 87:43-55.

- Saavedra K, Molina-Márquez AM, Saavedra N, Zambrano T, Salazar LA. (2016). Epigenetic Modifications of Major Depressive Disorder. *Int J Mol Sci*, 17: 1279; doi:10.3390/ijms17081279.
- Sabunciyan S, Aryee MJ, Irizarry RA, Rongione M, Webster MJ, Kaufman WE, et al. (2012). Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder. *PLoS ONE*, 7: e34451.
- Smalheiser NR, Lugli, G, Rizavi HS, Torvik VI, Turecki G, Dwivedi Y. (2012). Microrna expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLoS ONE*, 7: e33201.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS.(2000). Genetics epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 157: 1552-1562.
- Uchida S, Nishida A, Hara K, Kamemoto T, Suetsugi M, Fujimoto M, et al. (2008). of microrna- Characterization of the vulnerability to repeated stress in fischer 344 rats: Possible involvement mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci*, 27: 2250-2261.
- Vialou V, Feng J, Robinson AJ, Nestler EJ. (2013). Epigenetic mechanism of depression and antidepressant action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53:59-87.
- Vreugdenhil E, Verissimo CS, Mariman R, Kamphorst JT, Barbosa JS, Zweers T, et al. (2009). Microrna 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: Implications for Glucocorticoid responsiveness in the brain. *Endocrinology*, 150: 2220-2228.
- World Health Organization.(2017). *Depression*, preuzeto 8.9.2017. s <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>.