



Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Πατρών

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη συσχέτισης του SNP rs4432027 του γονιδίου GALANIN με
συμπτώματα άγχους και κατάθλιψης και με αισθήματα συνοχής και ζωτικής
εξάντλησης σε νεοσύλλεκτους βασικής υποχρεωτικής στρατιωτικής
εκπαίδευσης**



ΜΑΡΙΑ Γ. ΤΟΠΤΣΗ

ΑΜ: 1816063

ΠΑΤΡΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2023

Μελέτη συσχέτισης του SNP rs4432027 του γονιδίου GALANIN με συμπτώματα άγχους και κατάθλιψης και με αισθήματα συνοχής και ζωτικής εξάντλησης σε νεοσύλλεκτους βασικής υποχρεωτικής στρατιωτικής εκπαίδευσης

Association between GALANIN gene rs4432027 SNP and variations in depressive and anxiety symptoms, sense of coherence and vital exhaustion in the real-life setting of mandatory basic military training

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ιωάννη Κ. Ζαρκάδη.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ:

Ιωάννης Κ. Ζαρκάδης (Επιβλέπων): Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Σαραφίδου Θεολογία (Συνεπιβλέπουσα): Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλεξόπουλος Παναγιώτης (Πάνος) (Μέλος τριμελούς): Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Ψυχιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Εικόνα εξωφύλλου: GALR2 υποδοχέας συνδεδεμένος με GALANIN (με πορτοκαλί χρώμα, στα δεξιά), σε σύμπλοκο με G-πρωτεΐνη Gq (PDB, Released 2022-06-29)

Περιεχόμενα	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η Κατάθλιψη	10
1.2 Το Άγχος	10
1.3 Επιδημιολογικά στοιχεία του άγχους και της κατάθλιψης για την Ελλάδα	11
1.4 Το γονίδιο GALANIN	11
1.5 Προϊόντα του γονιδίου GALANIN	13
1.5.1 Το πεπτίδιο Galanin Message Associated Peptide	13
1.5.2 Η πρωτεΐνη GALANIN	13
1.5.3 Το πεπτίδιο GAL(1-15)	17
1.6 Βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κατάθλιψη και το άγχος	18
1.6.1 Ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου (Gut-Brain axis, GBA)	19
1.6.2 Μονοαμινεργικό μονοπάτι και γαλανίνη (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, HPAA)	19
1.6.4 LHRH και φυλοεξαρτώμενη έκφραση	22
1.6.5 Άλλα μονοπάτια και αλληλεπίδραση με αντικαταθλιπτικούς παράγοντες	23
1.7 Το περιβάλλον στην εμφάνιση κατάθλιψης και άγχους	23
1.7.1 Στρεσογόνες εμπειρίες ζωής	24
1.8 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)	26
1.8.1 Ο πολυμορφισμός rs4432027	27
1.8.2 Ο απλότυπος rs948854_rs4432027	28
2. ΣΚΟΠΟΣ	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
3.1 Νευροψυχιατρική αξιολόγηση και Δειγματοληψία	35
3.1.1 Πληθυσμός, Βιομετρικά και Δημογραφικά χαρακτηριστικά	35
3.1.2 Νευροψυχιατρική αξιολόγηση	35
3.2 Εργαστηριακές διεργασίες	36
3.2.1 Τράπεζες δεδομένων και Προγράμματα βιοπληροφορικής	36
3.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	37
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης	39
3.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	42

3.2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	46
3.2.6 Ανίχνευση του SNP με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης.....	48
3.2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενζυμικής κατάτμησης και γονοτύπηση	50
3.2.8 Αλληλούχηση DNA.....	51
3.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1 Πληθυσμός	55
4.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου GALANIN με PCR.....	55
4.3 Κατάτμηση των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση BlnI	56
4.4 Αλληλούχηση τριών γονοτύπων.....	57
4.5 Γενετικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού	58
4.6 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	59
4.6.1 Κατάθλιψη – BDI.....	59
4.6.2 Άγχος – STAI X	60
4.6.3. Αίσθημα Συνοχής – SOC	62
4.6.4 Ζωτική Εξάντληση – MQ.....	63
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της πτυχιακής μου εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Ζαρκάδη, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών, που δέχτηκε να πραγματοποιήσω υπό την επίβλεψή του την εργασία μου, αν και δεν ήμουν φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Πατρών και μου εμπιστεύτηκε αυτή τη μελέτη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης για τις γνώσεις που μου πρόσφερε, την κατανόηση και την συνεχή του ενθάρρυνση αλλά και την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της.

Ταυτόχρονα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλεξόπουλο Παναγιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών για τη συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή, τις συμβουλές του και το ενδιαφέρον που έδειξε για την εργασία μου. Ακόμα, πολύτιμη ήταν και η βοήθεια του κ. Οικονόμου Πολυχρόνη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών που πραγματοποίησε τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Ευχαριστώ επιπλέον την κ. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχθηκε να είναι συνεπιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και για το ενδιαφέρον και τη συνεργασία της.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τους/τις μεταπτυχιακές/ούς φοιτήτριες/ές των ερευνητικών ομάδων των Καθηγητών κ. Ι. Ζαρκάδη, Ζ. Λυγερού και Β. Ρούκου του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας και ιδιαίτερα την Κωνσταντίνα Φράγκου και τον Σωτήρη Μαυρομάτη για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Γεώργιο και Δήμητρα, στα αδέρφια μου Παναγιώτα και Μιχάλη, στη θεία μου Αναστασία και στην καλή μου φίλη Όλγα, γιατί χωρίς τη δική τους στήριξη και αγάπη, δεν θα είχα φτάσει μέχρι εδώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άγχος και η κατάθλιψη είναι πολυπαραγοντικές ασθένειες που πλήττουν μεγάλο μέρος του πληθυσμού παγκοσμίως. Έχουν αλληλεπικαλυπτομένους φαινοτύπους και εμφανίζονται συνήθως ως απόκριση του οργανισμού στο περιβαλλοντικό στρες. Η γενετική και η μοριακή βάση τους είναι ακόμα άγνωστη σε μεγάλο βαθμό. Έχει παρατηρηθεί ότι το νευροπεπτίδιο γαλανίνη έχει ρυθμιστικό ρόλο στην εκδήλωση των συμπτωμάτων των διαταραχών της διάθεσης. Ορισμένοι πολυμορφισμοί στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου GALANIN έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με διαφοροποιήσεις της σοβαρότητας των συμπτωμάτων των διαταραχών αυτών.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs4432027 (C>T), που εδράζεται στην 5' περιοχή, 2kb ανοδικά του γονιδίου GALANIN. Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση 149 υγιών νεοσύλλεκτων ανδρών με RFLP, για τους οποίους έγινε νευροψυχιατρική αξιολόγηση, σε τρία χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της 19μερούς βασικής υποχρεωτικής στρατιωτικής τους εκπαίδευσης, ώστε να παρατηρηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις στις μεταβολές των συμπτωμάτων κατάθλιψης, άγχους και των αισθημάτων συνοχής και ζωτικής εξάντλησης, σε σχέση με την παρουσία των διαφορετικών αλληλομόρφων του SNP. Οι φέροντες το T αλληλόμορφο βίωσαν μείωση στα συμπτώματα κατάθλιψης (Skillings-Mack p-value= 0.04862<0.05), σε σχέση με τους φέροντες το C αλληλόμορφο. Επιπλέον, οι ομοζυγώτες για το T αλληλόμορφο και γενικότερα οι φέροντες T αλληλόμορφο παρουσίασαν μια μικρή στατιστικά σημαντική αύξηση των συμπτωμάτων ζωτικής εξάντλησης κατά την περίοδο παρακολούθησης (Skillings-Mack p-value= 0.04584 και 0,03334 αντίστοιχα), σε αντίθεση με τους υπόλοιπους γονοτύπους (αλληλόμορφο C), για τους οποίους δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Για όλες τις υπόλοιπες διαταραχές, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση του SNP με τη μεταβολή των συμπτωμάτων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη συσχέτιση του T αλληλομόρφου με ανθεκτικότητα στην ανάπτυξη συμπτωμάτων κατάθλιψης μετά από στρεσογόνες εμπειρίες ζωής, η οποία αντισταθμίζεται από αυξημένη ζωτική εξάντληση.

Παρ' όλα αυτά, λόγω του μικρού πλήθους των ατόμων που μελετήθηκαν και της ανισορροπίας σύνδεσης του πολυμορφισμού rs4432027 με τον SNP rs948854 αλλά και με άλλους SNPs της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου GALANIN, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

ABSTRACT

Depression and anxiety are complex multifactorial disorders that affect a large part of the world's population. These disorders exhibit overlapping phenotypes and usually occur as a response to environmental stress. However, their genetic and molecular etiology is still not fully understood. Previous studies have shown that the galanin neuropeptide regulates mood disorders. Single nucleotide polymorphisms (SNP) in the regulatory region of the GALANIN gene have been associated with variations in symptom severity of these disorders.

In the present work, the SNP rs4432027 (C>T), located in the 5' region, 2kb upstream of the GALANIN gene was studied. RFLP genotyping was performed on 149 healthy male recruits. Additionally, neuropsychiatric evaluations were conducted at three intervals during their 19-day basic military training, to observe possible variations in depression and anxiety symptoms, as well as their sense of coherence and vital exhaustion, based on their SNP status. Results indicated that T-allele carriers experienced a statistically significant decrease in the severity of depression symptoms (Skillings-Mack p-value= 0.04862<0.05), compared to C-allele carriers. Moreover, both T-allele homozygous individuals and T-allele-carriers, in general, exhibited increased levels of vital exhaustion during the observation period (Skillings-Mack p-value= 0.04584 and 0.03334 respectively), in contrast to C-allele carriers, for whom no statistically significant change was observed. No association of SNP rs4432027 with change in anxiety symptoms or sense of coherence was observed. These findings suggest a possible association between the T-allele and lower severity of depressive symptoms and higher severity of vital exhaustion symptoms, following exposure to environmental stressors and stressful life experiences.

However, it is important to note that, due to the small number of study subjects and the linkage disequilibrium between rs4432027 and rs948854 polymorphisms but also with other SNPs of the regulatory region of GALANIN gene, additional studies are needed, to confirm the above results.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Διαταραχές της διάθεσης, όπως το άγχος και η κατάθλιψη πλήττουν άτομα όλων των ηλικιών παγκοσμίως, με τις περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από αυτές να αυξάνεται συνεχώς. Οι διαταραχές αυτές επιβαρύνουν την ψυχική και σωματική υγεία των ατόμων που πάσχουν, καθώς έχουν συσχετιστεί με σωματικές βλάβες και αυτοκτονίες (Kurcova et al., 2022; Okdeh et al., 2023).

Σύμφωνα με μια συστηματική μελέτη που αφορούσε στις ασθένειες και τους τραυματισμούς που έχουν επιβαρύνει τον ανθρώπινο πληθυσμό σε μεγαλύτερο βαθμό τα τελευταία 30 χρόνια (Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019, GBD, Lancet, 2020), η κατάθλιψη και οι αγχώδεις διαταραχές ήταν μέσα στις 10 πιο συχνές αιτίες προβλημάτων σε άτομα 10-49 ετών και ειδικά τις γυναίκες 50-74 ετών, ενώ η αγχώδης διαταραχή ήταν μέσα στις 3 πρώτες για τις γυναίκες 10-24 ετών. Πριν το 2020, 2,58-10,33% των ευρωπαίων έπασχε από κλινική κατάθλιψη, με συνολικό μέσο όρο το 6,38% (de la Torre et al., 2021). Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, των επιδράσεων της πανδημίας του COVID-19 στον παγκόσμιο πληθυσμό, οι Salari et al. (2020) ανέφεραν έναν συνολικό επιπολασμό 31,9% για το άγχος και 33,7% για την κατάθλιψη, με τις διαταραχές αυτές να πλήττουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τις γυναίκες. Ακόμα και πριν την πανδημία, είχε παρατηρηθεί μια σχετική αύξηση των ασθενών κατάθλιψης και πάλι με μεγαλύτερη επίδραση στις γυναίκες (Markkula et al., 2017). Όπως φαίνεται όμως, η πανδημία έπληξε σε μεγάλο βαθμό την ψυχική υγεία του παγκόσμιου πληθυσμού και ιδιαίτερα τις χώρες μεσαίου και χαμηλού εισοδήματος, με τα ποσοστά της κατάθλιψης να παρουσιάζουν αύξηση 27,6% και του άγχους 25,6% (Santomauro et al., 2021). Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι οι νευροψυχιατρικές διαταραχές και ειδικότερα το άγχος και η κατάθλιψη αποτελούν ένα σοβαρό, παγκόσμιο πρόβλημα.

Ο τρόπος και τα αίτια εμφάνισης του άγχους και της κατάθλιψης ποικίλουν, όπως ποικίλουν και τα αντικειμενικά και υποκειμενικά συμπτώματα και τα χαρακτηριστικά τους, κάτι που καθιστά δύσκολη τη μελέτη τους (Kurcova et al., 2022). Αυτές οι διαταραχές άλλωστε, συχνά συνυπάρχουν με προβλήματα υγείας και προβληματικές συμπεριφορές. Όπως παρατηρήθηκε σε μελέτες που αφορούσαν άτομα που έπασχαν από καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και ιατρικό προσωπικό (Cohen et al., 2015 ; Dyrbye et al., 2006 ; Syrjala et al., 2017), τα συμπτώματα και η σοβαρότητά τους, παρουσίαζαν διαφορές ανάλογα με το φύλλο και το επάγγελμα των ατόμων, ενώ είχαν ξεκάθαρα μεγαλύτερη ένταση στα άτομα με υποκείμενα νοσήματα. Έχει παρατηρηθεί επίσης, άτομα που πάσχουν από αυτές τις διαταραχές να στρέφονται και σε εθιστικές ουσίες με ηρεμιστικές και αγχολυτικές ιδιότητες, όπως η νικοτίνη και το αλκοόλ, για την καταπολέμηση του άγχους και του θυμού, οι οποίες μελλοντικά μπορούν να επιφέρουν τις αντίθετες συνέπειες. Είναι λοιπόν συχνή η κλινική εικόνα στην οποία συνυπάρχει το άγχος, η κατάθλιψη και ο εθισμός, χωρίς να είναι απόλυτα γνωστό αν πρόκειται απόλυτα για θέμα συμπεριφοράς ή υπάρχει κάποια γενετική προδιάθεση για τις τρεις αυτές διαταραχές, καθώς κοινά βιοχημικά μονοπάτια εμπλέκονται και στις τρεις συμπεριφορές (Kurcova et al., 2022).

Τόσο η κατάθλιψη, όσο και το άγχος, είναι πολύπλοκες και πολυπαραγοντικές ασθένειες που οφείλονται σε γενετικούς, κοινωνικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, χωρίς όμως να

είναι απόλυτα γνωστοί οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για αυτές (da Conceicao Machado et al., 2018).

1.1 Η Κατάθλιψη

Η κατάθλιψη είναι μια εξουθενωτική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από κακή διάθεση και ανηδονία (Howard et al., 2019). Με τον όρο κατάθλιψη, χαρακτηρίζονται διαφορετικές διαταραχές, όπως η Μείζονα Κατάθλιψη, η Επίμονη Καταθλιπτική Διαταραχή, η Περιγεννητική Κατάθλιψη, η Εποχική Συναισθηματική Διαταραχή, αλλά και η κατάθλιψη που συνυπάρχει με σοβαρότερες ασθένειες όπως η ψύχωση και η διπολική διαταραχή. Όλα τα είδη αυτά περιλαμβάνουν κοινά συμπτώματα θλίψης, απαισιοδοξίας, αισθήματα απογοήτευσης και ενοχές καθώς και σωματικά συμπτώματα όπως η κόπωση, η μειωμένη ενέργεια και οι διαταραχές ύπνου. (United States, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Mental Health).

Η κληρονομησιμότητα της κατάθλιψης εξαρτάται από τη σοβαρότητα της διαταραχής και είναι 37% στο γενικό πληθυσμό (Sullivan et al., 2000). Η κληρονομησιμότητα που διαπιστώθηκε σε μελέτη ασθενών Μείζονος κατάθλιψης σε σχέση με τα δίδυμα, ίδιου φύλου αδέλφια τους, ήταν 48-75% (McGuffin et al., 1996). Ο κίνδυνος ανάπτυξης κατάθλιψης είναι πιο μεγάλος σε άτομα 18-29 ετών αλλά αφορά και άλλες ηλικίες. Ακόμα και παιδιά χωρίς κάποια προφανή αιτιολογία, είναι δυνατόν να πάσχουν από κατάθλιψη (Wittchen et al., 1994). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν είναι γυναίκες, με το λόγο ανδρών προς γυναίκες ασθενείς να είναι περίπου 1:2 (Tang & Zhang, 2022). Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός. Υπάρχουν υποθέσεις που συνδέουν την ευαισθησία στην κατάθλιψη με βιολογικά αλλά και κοινωνικά αίτια, καθώς σε προεφηβικά άτομα τα ποσοστά των πασχόντων είναι όμοια και αυξάνονται στα θηλυκά άτομα μετά την εφηβεία (Chaplin et al., 2008; Tang & Zhang, 2022).

1.2 Το Άγχος

Οι διαταραχές άγχους αποτελούν τις πιο κοινές ψυχιατρικές διαταραχές στα περισσότερα κράτη του κόσμου (Mathew et al., 2008; Okdeh et al., 2023). Εκδηλώνονται με ένα ευρύ φάσμα σωματικών και συναισθηματικών συμπτωμάτων και μεταβολές στην συμπεριφορά και την αντίληψη, ενώ συχνά οδηγούν σε λειτουργικές και σωματικές βλάβες. (Okdeh et al., 2023; Beesdo et al., 2009). Σε αντίθεση με το άγχος που βιώνουν οι περισσότεροι άνθρωποι, οι αγχώδεις διαταραχές περιλαμβάνουν επίμονα, μακροχρόνια και ιδιαίτερα έντονα αισθήματα πίεσης, νευρικότητας, φόβου, ευερεθιστότητας, δυσκολία στη συγκέντρωση αλλά και σωματικά συμπτώματα όπως η κόπωση, πόνος και διαταραχές ύπνου. Περιλαμβάνουν διαταραχές όπως τη Γενικευμένη Αγχώδη Διαταραχή, την Διαταραχή Πανικού, την Κοινωνική Αγχώδη Διαταραχή καθώς και επιμέρους φοβίες. (United States, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Mental Health).

Σύμφωνα με μελέτη που αφορούσε στην παρουσία αγχώδων διαταραχών παγκοσμίως το διάστημα 1990-2019 (Yang et al., 2021), οι αγχώδεις διαταραχές είναι ιδιαίτερα κοινές στα άτομα 10-24 ετών, αλλά γενικά πλήττουν άτομα όλων των ηλικιών. Το 2019, έγιναν 45.82 εκατομμύρια νέες διαγνώσεις, με το πλήθος τους να έχει αυξηθεί σταθερά κατά τη διάρκεια των 30 τελευταίων ετών και το συνολικό ποσοστό ασθενών να είναι 37.8 %. Η κατανομή των διαταραχών αυτών είναι ιδιαίτερα δύσκολο να προσδιοριστεί καθώς δεν είναι ομοιόμορφη σε όλες τις χώρες, αλλά πλήττει ιδιαίτερα τις πιο ανεπτυγμένες χώρες, έως και τρεις φορές περισσότερο. Οι αγχώδεις διαταραχές φαίνεται να πλήττουν τι γυναίκες σε μεγαλύτερο βαθμό, 1.6 φορές περισσότερο από τους άνδρες. Με μετα-ανάλυση μελετών οικογενειών και διδύμων, υπολογίστηκε γενετική κληρονομησιμότητα της Γενικευμένης Αγχώδους Διαταραχής 31.6% και λόγος σχετικού κινδύνου (odds ratio) 2.1-2.6 για διάγνωση της διαταραχής σε απογόνους ατόμων που πάσχουν, μη λαμβάνοντας υπόψη απογόνους με Μείζονα διαταραχή και άλλες αγχώδεις διαταραχές (Gottschalk et al., 2017).

Η κατάθλιψη και το άγχος σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες συνήθως συνυπάρχουν, καθώς στην κλινική πράξη σπάνια απαντώνται ξεχωριστά, με τη διάγνωση «Αγχώδης κατάθλιψη» να αφορά αυτές τις περιπτώσεις (Beesdo et al., 2009 ; Domschke et al., 2012; Gonda et al., 2018).

1.3 Επιδημιολογικά στοιχεία του άγχους και της κατάθλιψης για την Ελλάδα

Όσον αφορά στην Ελλάδα, δεν υπάρχουν πρόσφατα δεδομένα. Τα νεότερα δεδομένα προέρχονται από έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το Υπουργείο Υγείας το 2010 και αφορούσε τυχαίο δείγμα 4900 ενηλίκων 18-74 ετών. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, 6% του πληθυσμού (αναλογικά για συνολικό πληθυσμό 10 εκατομμύρια και πληθυσμό ενηλίκων 6,5 εκατομμύρια, 600.000 άτομα) έπασχε από Μείζονα Κατάθλιψη και 15% (1.500.000 άτομα) από αγχώδεις διαταραχές. Η κατανομή των ατόμων που έπασχαν δεν ήταν ομοιόμορφη, με τις ευαίσθητες κοινωνικές ομάδες (άνεργοι, συνταξιούχοι, άτομα με οικονομικές δυσκολίες) να πλήττονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. (Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Υγείας, Εθνικό Σχέδιο Δράσης για την Ψυχική Υγεία 2021-2030). Τα ποσοστά αυτά αναμένεται να έχουν αυξηθεί, καθώς έχει επέλθει η οικονομική κρίση στη χώρα και η υγειονομική κρίση του 2020-2021.

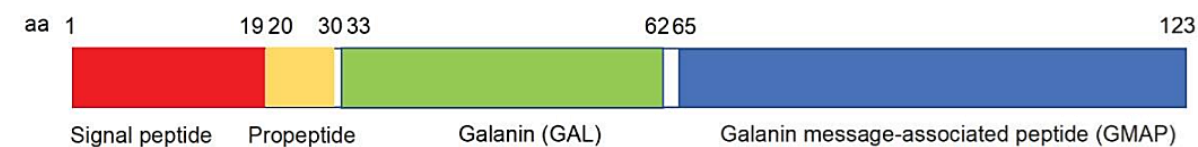
1.4 Το γονίδιο GALANIN

Η κληρονομησιμότητα της κατάθλιψης και του άγχους, υποδεικνύει ένα σύνολο γενετικών τόπων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εκδήλωσή τους. Το νευροπεπτίδιο GALANIN και διαταραχές του γαλανινεργικού συστήματος έχουν συσχετιστεί με την κατάθλιψη, το άγχος και το στρες, σε αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Στη GWAS ανάλυση της Μείζονος κατάθλιψης, μετά από gene-based tests, το γονίδιο της γαλανίνης ήταν ένα από τα γονίδια που συσχετίστηκαν με Μείζονα Κατάθλιψη (Wray et al., 2012).

Το γονίδιο GALANIN (Galanin and GMAP prepropeptide Gene) εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του 11ου χρωμοσώματος του ανθρώπου, στο γενετικό τόπο 11q13.3–q13.5 (Unschuld et al., 2008) . Εκτείνεται σε ένα τμήμα του χρωμοσώματος μήκους 6632 bp και αποτελείται από 6 εξόνια, με συνολικό μήκος 6 kb. Η κωδική περιοχή του εκτείνεται από το δεύτερο εξόνιο έως και το έκτο, με συνολικό μήκος 372 bp. (Gene Bank, Gene ID: 51083, updated on 29-Mar-2023).

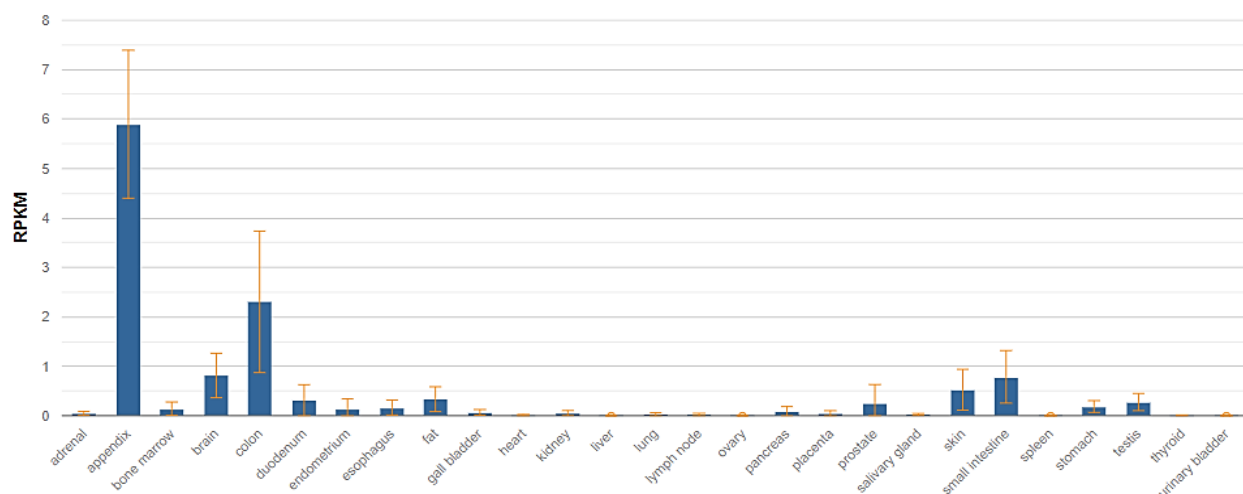
Το γονίδιο GALANIN είναι συντηρημένο σε πολλά είδη (Karlsson et al., 2006). Μεταγράφεται στο galanin-and-GMAP-prepropeptide-mRNA το οποίο μεταφράζεται σε πρόδρομο πεπτίδιο, την προ-προ-γαλανίνη (pre-pro galanin, ppGAL) ή αλλιώς προ-πρωτεΐνη των πεπτιδίων της γαλανίνης. Η προ-προγαλανίνη αποτελείται από 123 αμινοξέα. Μετά την σύνθεσή της, το αμινοτελικό άκρο αποκόπτεται και προκύπτουν το σηματοδοτικό μόριο GAL(1-15) (N-terminal fragment) (Lang et al., 2015) και η προ-γαλανίνη. Η προ-γαλανίνη στη συνέχεια διασπάται και προκύπτει το πεπτίδιο της γαλανίνης και ένα τμήμα του C-τελικού άκρου που αποτελείται από 59 αμινοξέα, το galanin-message associated peptide (GMAP) (Koffer et al., 1996) [Εικόνα 1.4.i].

Το γονίδιο GALANIN εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και στο Περιφερειακό Νευρικό σύστημα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια και το ουρογεννητικό σύστημα [Εικόνα 1.4.ii] (Gene Bank, Gene ID: 51083, updated on 29-Mar-2023).



Εικόνα 1.4.ι: Η δομή της προ-προ-γαλανίνης. Το N-τελικό σηματοδοτικό μόριο είναι το GAL(1-15), ακολουθεί η γαλανίνη και το C-τελικό πεπτίδιο GMAP. (Zhu et al., 2022)

- Project title: HPA RNA-seq normal tissues
- Description: RNA-seq was performed of tissue samples from 95 human individuals representing 27 different tissues in order to determine tissue-specificity of all protein-coding genes
- BioProject: [PRJEB4337](#)
- Publication: [PMID 24309898](#)
- Analysis date: Wed Apr 4 07:08:55 2018



Εικόνα 1.4.ii: Κανονικοποιημένα αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων RNA του GAL, σε RPKM (Reads Per Kilobase Million). Διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GALANIN στους ανθρώπινους ιστούς. (Gene Bank, Gene ID: 51083, updated on 29-Mar-2023).

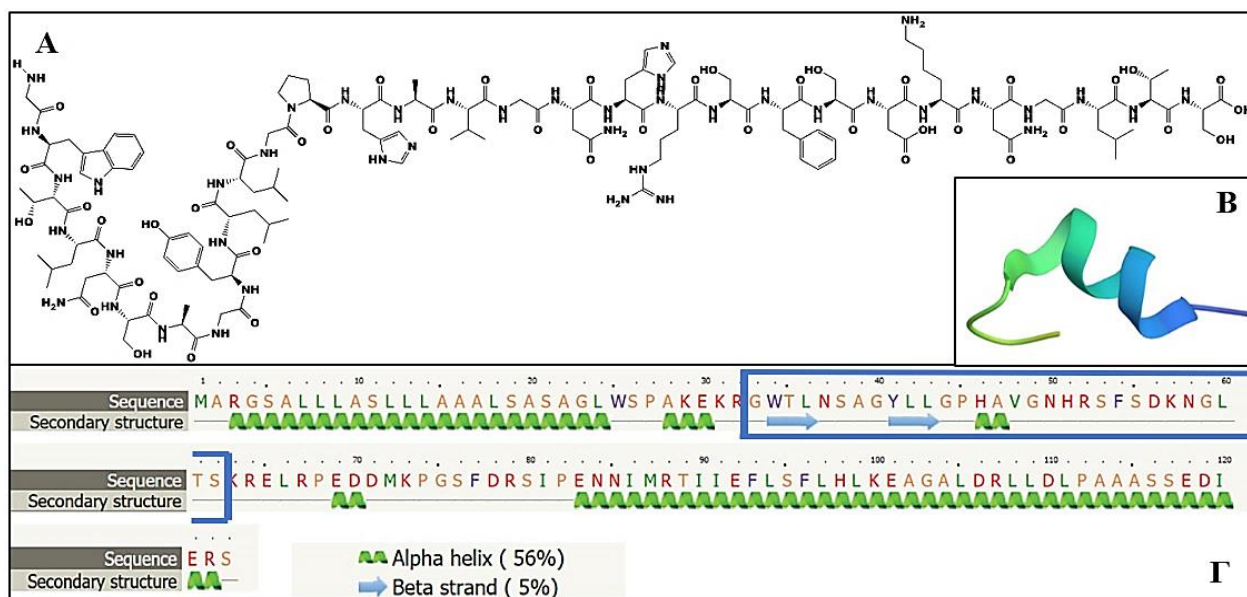
1.5 Προϊόντα του γονιδίου GALANIN

1.5.1 Το πεπτίδιο Galanin Message Associated Peptide

Το GMAP (Galanin Message Associated Peptide) είναι ένα πεπτίδιο 59 αμινοξέων που προκύπτει από το C-τελικό άκρο της προ-γαλανίνης. Ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα γνωστός. Έχει πιο περιορισμένη κατανομή στους ιστούς από τη γαλανίνη και φαίνεται να μεταβάλλει την αντίληψη του πόνου στην σπονδυλική στήλη (Lang & Kofler, 2011), ενώ πιθανώς αποτελεί και μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπου έχει αντιμικροβιακή δράση (Zhu et al., 2022). Η δράση του, όπως και των υπόλοιπων πεπτιδίων του γονιδίου GALANIN, διαμεσολαβείται από την πρόσδεσή του στους υποδοχείς της γαλανίνης GALR.

1.5.2 Η πρωτεΐνη GALANIN

Η γαλανίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο, δηλαδή μια μικρή πρωτεΐνη που απελευθερώνεται από τους νευρώνες και επιδρά σε νευρικά και μη νευρικά κύτταρα. Το όνομα γαλανίνη προέρχεται από την παρουσία ενός N-τελικού καταλοίπου γλυκίνης και ενός C-τελικού καταλοίπου αλανίνης στα υπόλοιπα θηλαστικά (Hökfelt, 2008), ενώ στον άνθρωπο, όπου έχει μήκος 30 αμινοξέα, στο C-τελικό άκρο υπάρχει μια σερίνη (Branchek et al. 2000; Gopalakrishnan et al., 2021; Schmidt et al., 1991) [Εικόνα 1.5.2].



Εικόνα 1.5.2: Δομή της γαλανίνης.

(A): Συντακτικός τύπος της ανθρώπινης γαλανίνης (<https://www.quantabiodesign.com>).

(B): Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της προ-προγαλανίνης. Στο μπλε πλαίσιο περικλείεται η αλληλουχία της γαλανίνης (Zhu et al., 2022).

(C): Μοντέλο της τρισιδιάστατης δομής του ανθρώπινου πεπτιδίου της γαλανίνης, το οποίο έχει προκύψει με Cryo-EM. (RCSB, Cryo-EM structure of the galanin-bound GALR2-miniGq complex, PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb7XJK/pdb>)

Η γαλανίνη πρώτη φορά απομονώθηκε από έντερο χοίρου, από τους Tatemoto et al. το 1983 (Tatemoto et al., 1983). Συντίθεται κυρίως στο μεταίχμιακό σύστημα του εγκεφάλου, στην αμυγδαλή και τον υποθάλαμο, ενώ σε μικρότερα επίπεδα εκφράζεται και στο Περιφερειακό Νευρικό Σύστημα, στη σπονδυλική στήλη, το ενδοκρινικό και το γαστρεντερικό σύστημα, στο πάγκρεας, στα επινεφρίδια, στα κερατινοκύτταρα, τους ιδρωτοποιούς αδένες, γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία και στο ουρογεννητικό σύστημα (Gopalakrishnan et al., 2021; alliancegenome.org). Στα θηλαστικά η γαλανίνη μετά τη σύνθεσή της κατανέμεται σε μεγάλο βαθμό στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και στο Περιφερειακό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) (Lang & Kofler, 2011; Rauch et al., 2007).

Η γαλανίνη είναι ανασταλτικό νευροπεπτίδιο και συν-διαβιβαστής (Keszler et al., 2019). Η σηματοδότηση μέσω της ενδογενούς γαλανίνης είναι υπεύθυνη στον οργανισμό για πληθώρα βιολογικών δράσεων που αφορούν στην αντίληψη των ερεθισμάτων πόνου (Liu & Hökfelt, 2002), στις γνωστικές λειτουργίες (Kinney et al. 2003) στον νευροενδοκρινικό έλεγχο, στη διατροφή και το ενεργειακό ισοζύγιο, στη μεταβολική και ωσμωτική ομοιόσταση (Gundlach, 2002) και στη συμπεριφορά που σχετίζεται με την κατάθλιψη και το άγχος, ενώ φαίνεται να αποτελεί συνεκτικό κρίκο μεταξύ της απόκρισης του οργανισμού στο στρες, τη διατροφή και διάφορες νευροψυχιατρικές διαταραχές. (Barrera et al., 2006 ; Holmes et al., 2003 ; Kuteeva et al., 2005 ; Kuteeva et al., 2007). Στην αμυγδαλή του εγκεφάλου, η γαλανίνη φαίνεται να ευνοεί

την ανάπτυξη εθισμού σε ουσίες όπως το αλκοόλ (Morilak et al. 2003), ενώ οι γαλανινεργικοί νευρώνες του υποθαλάμου ρυθμίζουν τη διάρκεια και διακοπή του ύπνου (Lim et al., 2014). Διαταραχές στο γαλανινεργικό σύστημα έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Alzheimer, την επιληψία, το σακχαρώδη διαβήτη και τον χρόνιο πόνο (Branchek et al., 2000; Juhasz et al., 2014; Lang et al., 2007). Σε έρευνες όπου έχει εγχυθεί γαλανίνη σε διαφορετικά τμήματα της αμυγδαλής του εγκεφάλου, παρατηρήθηκε αύξηση της όρεξης και της κατανάλωσης τροφής, με προτίμηση στις τροφές με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος αλλά και αύξηση της κατανάλωσης αιθανόλης (Karatajev, 2009; Leibowitz et al., 2004; Lewis, 2004).

Γαλανίνη και κατάθλιψη

Ενδοφλέβια χορήγηση γαλανίνης στον άνθρωπο έχει ταχεία αντικαταθλιπτική δράση (Unschuld et al., 2008). Οι Wang et al. (2014), παρατήρησαν ότι σε ασθενείς με κλινική κατάθλιψη (Major Depressive Disorder, MDD) τα επίπεδα της γαλανίνης στο πλάσμα ήταν υψηλότερα, σε σχέση με υγιή αδέρφια τους ή άλλους υγιείς-controls. Το ίδιο ίσχυε ακόμα και για πρώην ασθενείς. Ειδικά στις γυναίκες υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της γαλανίνης και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων της κατάθλιψης, κάτι που όμως δεν παρατηρήθηκε στους άνδρες. Επιπλέον, ενδοφλέβια χορήγηση γαλανίνης σε 10 ασθενείς που έπασχαν από κατάθλιψη και ήταν υπό αγωγή με το αντικαταθλιπτικό φάρμακο τριμιπραμίνη είχε αντικαταθλιπτική επίδραση (Murck et al., 2004).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kuteeva et al. το 2008 στο FST (Forced Swim Test) μοντέλο της κατάθλιψης σε αρουραίους, παρατηρήθηκε ότι έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες ευνοούσε την απελευθέρωση GALANIN.

1.5.2.2 Γαλανίνη και άγχος

Μικροέγχυση γαλανίνης στο δικτυωτό σχηματισμό αρουραίων, στο EPM (Elevated Plus Maze) μοντέλο, μείωσε την δημιουργία άγχους (πχ. την αποφυγή των ανοιχτών βραχιόνων της ανυψωμένης συσκευής), χωρίς να εμποδίζει τον φόβο (δηλαδή την αδυναμία των αρουραίων να βγουν από τους ανοιχτούς βραχίονες), πράγμα το οποίο υποδεικνύει την αναστολή των συμπτωμάτων άγχους (Soars et al., 2015). Οι Bing et al. (1993) μελέτησαν αρουραίους στο μοντέλο για το άγχος Vogel punished drinking test, μετά από ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση γαλανίνης και παρατήρησαν μείωση του άγχους. Αντίθετα, μικροέγχυσή της στην αμυγδαλή προκάλεσε αύξηση άγχους στους αρουραίους (Möller et al., 1999). Έγχυση γαλανίνης στον ιππόκαμπο αρσενικών αρουραίων, ενίσχυσε την αγχώδη συμπεριφορά στο EPM μοντέλο για το άγχος (Funck et al., 2018).

1.5.2.3 Υποδοχείς της γαλανίνης

Οι βιολογικές δράσεις της γαλανίνης και του πεπτιδίου GAL(1-15) και συνεπώς και η επίδρασή τους στο άγχος και την κατάθλιψη (Okdeh et al., 2023), επιτυγχάνονται μέσω της πρόσδεσής τους σε ειδικούς υποδοχείς: τους GALR1, GALR2 και GALR3 (Lang & Kofler, 2010). Η οικογένεια των υποδοχέων της γαλανίνης, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο και τους περιφερειακούς ιστούς και παρουσιάζουν μερικώς διαφορετική κατανομή στις περιοχές του μεσεγκεφάλου και των μεταιχμιακών περιοχών που διαμεσολαβούν τις συναισθηματικές συμπεριφορές (Karlsson & Holmes, 2006). Οι υποδοχείς αυτοί είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς της υπερικογένειας Υποδοχέων που Συνδέονται με G-Πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, GPCRs). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας, μετά από πρόσδεση σε αυτούς των καταλλήλων προσδετών, όπως της γαλανίνης, ενεργοποιούν πολλαπλούς καθοδικούς καταρράκτες σηματοδότησης, όπως η αναστολή των cAMP/PKA, στην περίπτωση των GALR1 και GALR3 και διέγερση της φωσφολιπάσης C από την GALR2. (Gopalakrishnan et al., 2021). Η κατανομή των υποδοχέων διαφέρει από ιστό σε ιστό και η γαλανίνη και το GAL(1-15) πεπτίδιο έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους GALR1 και GALR2 (Kupcova et al., 2022; Webling et al., 2012).

Οι GALR1 έχουν ανασταλτική λειτουργία, επιδρώντας σε ανασταλτικές Gi/o πρωτεΐνες που μειώνουν τα επίπεδα των cAMP, κλείνουν οι τασεοελεγχόμενοι διάυλοι Ca^{2+} και ανοίγουν προσδετοεξαρτώμενα κανάλια επανορθωτικού ρεύματος K^+ (Kir6), προκαλώντας μια εκροή K^+ , και μειώνοντας τελικά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Branchek et al., 2000; Gopalakrishnan et al., 2021; Millón et al., 2017; Morais et al., 2016).

Οι GALR3 είναι πιο πολύπλοκοι υποδοχείς που δεν εντοπίζονται σε όλα τα θηλαστικά και τα χαρακτηριστικά τους και ο μηχανισμός λειτουργίας τους δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστά (Barde et al., 2016). Και αυτοί οι υποδοχείς έχουν ανασταλτική λειτουργία, όπως οι GALR1 και μεταγωγή σήματος γίνεται πιθανώς με τον ίδιο τρόπο, μέσω πρόσδεσης σε ανασταλτικές Gi/o πρωτεΐνες, μείωση των επιπέδων cAMP και παρεμπόδιση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών από τους νευρώνες στις μεμβράνες των οποίων εντοπίζονται (Karlsson & Holmes, 2006).

Όσον αφορά στους GALR2 υποδοχείς, η ενεργοποίησή τους είναι μάλλον διεγερτική. Ο GALR2 υποδοχέας ενεργοποιεί μια Gq πρωτεΐνη, προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , διέγερση της φωσφολιπάσης C και ενεργοποίηση είτε ανασταλτικών μονοπατιών (Webling et al., 2012; Kupcova et al., 2022), είτε αύξηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (Branchek et al., 2000; Gopalakrishnan et al., 2021; Millon et al., 2017).

1.5.2.3.1. Υποδοχείς της γαλανίνης και κατάθλιψη

Σε ζωικά μοντέλα όπου έχουν μελετηθεί, διέγερση των GALR1 επιφέρει συμπτώματα κατάθλιψης, όπως και η διέγερση των GALR3, με τις μελέτες σε τρωκτικά να αφορούν κυρίως στη λειτουργία των υποδοχέων αυτών στο ραχιαίο πυρήνα της ραφής που βρίσκεται στο στέλεχος του εγκεφάλου (Barr et al., 2006; Brunner et al., 2014; de Souza et al., 2018; Kuteeva

et al., 2008; Millon et al., 2017). Έκθεση σε χρόνιο στρες που οδηγεί σε κατάθλιψη, συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης των GALR1 στο εγκεφαλικό στέλεχος (Wang et al., 2016).

Διέγερση των GALR2 υποδοχέων από τη γαλανίνη έχει άλλοτε αντικαταθλιπτική και άλλοτε καταθλιπτική επίδραση. (Brunner et al., 2014; Kuteeva et al., 2008; Millon et al., 2017; Saar et al., 2013).

1.5.2.3.2 Υποδοχείς της γαλανίνης και άγχος

Οι GALR1 υποδοχείς έχουν μάλλον αγχογόνο δράση στο δικτυωτό σχηματισμό αρουραίων (de Souza et al., 2018; Morais et al., 2016). Οι GALR3, αντίθετα, φαίνεται να έχουν αγχολυτική επίδραση (Brunner et al., 2014; Locker et al., 2021).

Η επίδραση του GALR2 στο άγχος δεν είναι ξεκάθαρη. Στον ιππόκαμπο αρουραίων, έχει αγχογόνο επίδραση, κάτι που όμως δεν έχει επαληθευτεί σε όλες τις μελέτες (de Souza et al., 2018; Funck et al., 2018; Locker et al., 2021). Στο εγκεφαλικό στέλεχος, οι υποδοχείς GALR2 έχουν αγχολυτική δράση, πιθανώς μέσω αλληλεπίδρασης με το σεροτονινεργικό σύστημα (Morais et al., 2016).

Συνοψίζοντας, οι τρεις υποδοχείς φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση του άγχους και της κατάθλιψης. Το αποτέλεσμα που επιφέρει η πρόσδεση της γαλανίνης σε κάθε έναν από τους τρεις υποδοχείς, είναι διαφορετικό και η επίδραση της γαλανίνης επομένως γίνεται με ιστοειδικό τρόπο. Για παράδειγμα, ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση γαλανίνης επιφέρει μείωση του άγχους (Bing et al., 1993). Αντίθετα, στην αμυγδαλή και στον ιππόκαμπο προκαλεί αύξηση άγχους (Funck et al., 2018; Möller et al., 1999). Συνεπώς, λόγω αυτής τη ετερογένειας των δράσεων των υποδοχέων, τα αποτελέσματα της σηματοδότησης του πεπτιδίου GALANIN, εξαρτώνται τελικά από την κατανομή των διαφορετικών υποδοχέων σε κάθε περιοχή και σε συνάρτηση, από τον ιστό στον οποίο εκφράζονται και την ποικιλία των G-πρωτεϊνών που υπάρχουν στο σημείο αυτό, αλλά και από το είδος του υποδοχέα που ενεργοποιείται κατά προτίμηση στα διαφορετικά είδη οργανισμών, περιοχές του εγκεφάλου ή μοντέλο μελέτης (Karlsson & Holmes, 2006 ; Okdeh et al., 2023).

1.5.3 Το πεπτίδιο GAL(1-15)

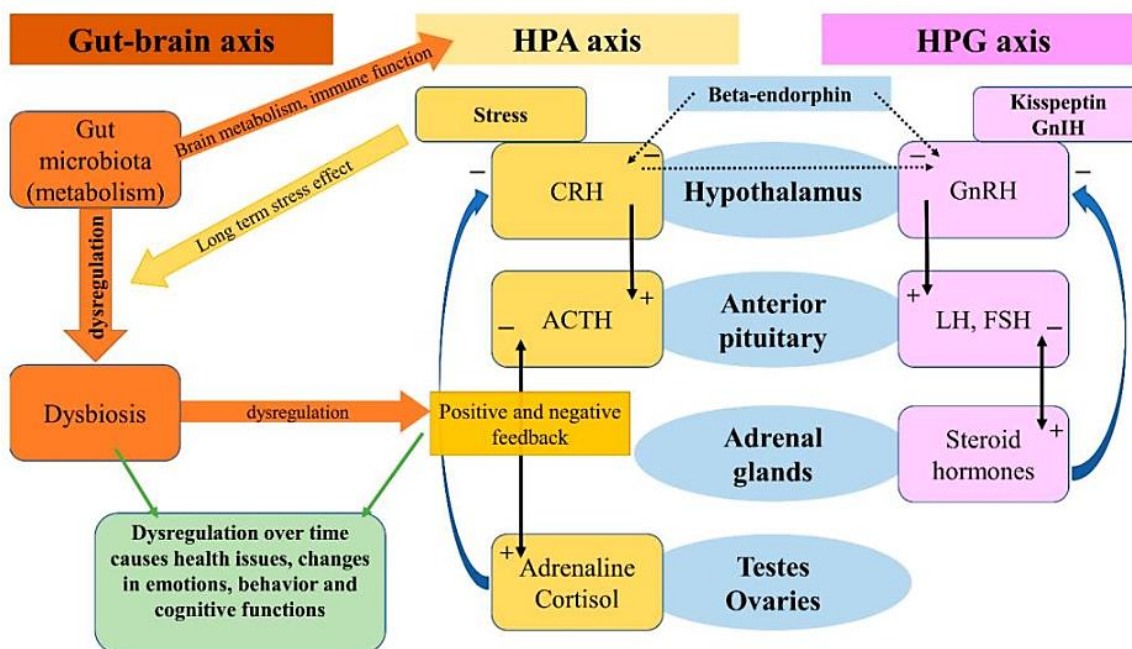
Το πεπτίδιο Galanin(1-15) (galanin fragment (1–15)) είναι το N-τελικό άκρο της προ-προ γαλανίνης. Είναι ενεργό στο ΚΝΣ (Millon et al., 2017) και δρα ως σηματοδοτικό μόριο. Εκτός από αυτό, υπάρχει και το πεπτίδιο GAL(1-29) που πιθανώς έχει παρόμοιο ρόλο (O Borroto-Escuela et al., 2014). Το αμινοτελικό άκρο της προ-προ γαλανίνης είναι πολύ συντηρημένο, υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου (Branchek et al. 2000). Το GAL(1-15), όπως και η γαλανίνη έχει μεγάλη συγγένεια για τους υποδοχείς GALR1 και GALR2 (Kupcova et al., 2022; Webling et al., 2012).

Το GAL(1-15) δρα μέσω της πρόσδεσής του σε ετεροδιμερή GALR1/GALR2 (Millón et al., 2017). Οι O Borroto-Escuela et al. (2014) παρατήρησαν ότι το πεπτίδιο GAL(1-15) είχε

καταθλιπτική και αγχογόνο επίδραση σε αρουραίους και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από τη γαλανίνη. Στην ίδια μελέτη, παρατηρώντας τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων της γαλανίνης *in situ*, υπέθεσαν ότι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο GALR1 και GALR2 στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου. Ο σχηματισμός των ετεροδιμερών GALR1–GALR2 οδηγεί σε αλλαγή της επιμέρους διαμόρφωσής τους και την αύξηση της προτίμησής τους για διαφορετικά από τη γαλανίνη πεπτίδια, όπως το GAL(1-15). Αυτή η σύνδεση αυξάνει τη σηματοδότηση μέσω των Gi/o G-πρωτεϊνών, το οποίο οδηγεί σε ενισχυμένη μείωση της ενεργότητας των αδενυλικών κυκλασών και των CREBs (cAMP-Response-Element-Binding proteins), προκαλώντας συμπτώματα κατάθλιψης (O Borroto-Escuela et al., 2014).

1.6 Βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κατάθλιψη και το άγχος

Σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κατάθλιψη και το άγχος είναι κυρίως ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, HPAA), ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (Hypothalamic-Pituitary-gonadal Axis, HPGA) και ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου (Gut-Brain Axis, GBA) (Lach et al., 2018) [Εικόνα 1.6].



Εικόνα 1.6: Ο άξονας εντέρου εγκεφάλου (Gut-Brain Axis, GBA), ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, HPAA) και ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (Hypothalamic-Pituitary-gonadal Axis, HPGA). Σχηματική απεικόνιση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεών τους. (Kucrova et al., 2022)

1.6.1 Ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου (Gut-Brain axis, GBA)

Ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου είναι το αμφίδρομο σηματοδοτικό μονοπάτι που συνδέει το γαστρεντερικό με το ΚΝΣ, με νευροπεπτίδια που παράγονται στο φλοιό και το μυελό των επινεφριδίων να συμμετέχουν σε αυτό. Νευροπεπτίδια όπως το Υ, η ουσία Ρ, η νευροτενσίνη και η γαλανίνη εκφράζονται σε όλα τα επίπεδα του άξονα εντέρου-εγκεφάλου (Gopalakrishnan et al 2021). Τα νευροπεπτίδια που παράγονται στο ΚΝΣ, μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και δρουν σε νευρικά και μη κύτταρα. Το ΚΝΣ σύστημα και το έντερο, συνδέονται μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Ενεργοποίηση του πνευμονογαστρικού νεύρου από το έντερο, προκαλεί άρση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και έκκριση νευροπεπτιδίων και μορίων ανοσολογικής σηματοδότησης, επιδρώντας στα συμπτώματα στρες και άγχους. Με σηματοδότηση από τον εγκέφαλο στο έντερο, επιτυγχάνονται η μικροβιακή ισορροπία, η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών, η γαστρεντερική κινητικότητα, η έκκριση βλεννίνης και η ρύθμιση του συστήματος απόκρισης στο στρες. Ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου, θεωρητικά, επηρεάζεται και από το μικροβίωμα, με αρκετούς μικροοργανισμούς να μπορούν να παράγουν νευροπεπτίδια και υποδοχείς για αυτά αλλά και για ορμόνες του εντέρου (Holzer & Farzi, 2014). Ορμόνες του εντέρου και του μικροβιώματός του, φαίνεται να αλληλεπιδρούν και να συμμετέχουν στην αιτιολογία της κατάθλιψης (Lach et al., 2018).

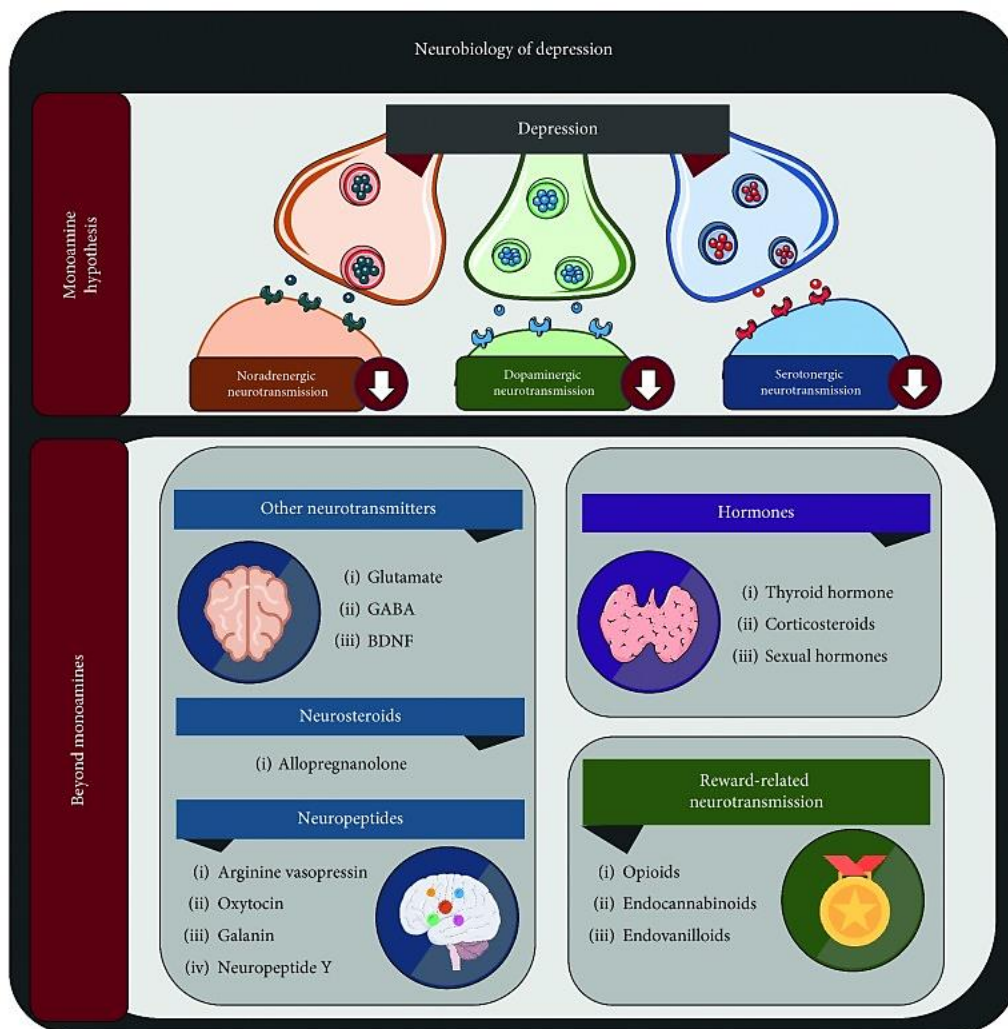
1.6.1.1 Γαλανίνη και Νευροπεπτίδιο Υ

Στη μελέτη των Narváez et al. (2015) παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση και σχηματισμός ετεροδιμερών συμπλεγμάτων GALR2-NPYY1R στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου αρουραίων. Ο NPYY1R, είναι Y1 υποδοχέας του νευροπεπτιδίου Υ και διαμεσολαβεί την αντικαταθλιπτική δράση του νευροπεπτιδίου Υ, στο σημείο αυτό. Το GALR2, σε σύμπλεγμα με τον NPYY1R ενίσχυσε την αντικαταθλιπτική δράση του Υ. Ενώ μεμονωμένη έγχυση γαλανίνης επέφερε κατάθλιψη, ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση γαλανίνης ταυτόχρονα με τον αγωνιστή των NPYY1R [1125]-[Leu31,Pro34]PYY, ο οποίος έχει αντικαταθλιπτική δράση, ενίσχυσε την πρόσδεση του. Αυτό ίσως οφείλεται στην παρουσία του GALR2 ανταγωνιστή M871 σε αυτή την περιοχή (Okdeh et al., 2023). Ο GALR1 επίσης σχηματίζει ετεροδιμερή με υποδοχείς Y1 του νευροπεπτιδίου Υ, επιδρώντας και με αυτό τον τρόπο στη ρύθμιση της κατάθλιψης (Fuxe et al. 2012 ; Narvaez et al. 2016; O Borroto-Escuela et al. 2010).

1.6.2 Μονοαμινεργικό μονοπάτι και γαλανίνη (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, HPA)

Υπάρχει η υπόθεση ότι δυσλειτουργία των σεροτονινεργικών και νοραδρενεργικών μονοπατιών σηματοδότησης οδηγεί στην κατάθλιψη και το άγχος. Αυτή η υπόθεση αν και είναι ακόμα αποδεκτή, έχει διευρυνθεί και πλέον η κατάθλιψη και το άγχος θεωρούνται πιο περίπλοκες νευροενδοκρινικές διαταραχές, που το τελικό σημείο της παθοφυσιολογία τους

περιλαμβάνει την απορρύθμιση των μονοαμινεργικών νευροδιαβιβαστών και των μονοπατιών μεταβολικών και ενδοκρινικών παραγόντων (Chávez -Castillo et al., 2019) [Εικόνα 1.6.2].



Εικόνα 1.6.2: Οι παράγοντες που συνθέτουν τη νευροβιολογία της κατάθλιψης. (GABA, γ-αμινοβουτυρικό οξύ και BDNF, Brain derived neurotropic factor) (Chávez-Castillo et al., 2019)

Στο ΚΝΣ η γαλανίνη συν-εκφράζεται με τη σεροτονίνη, τη ντοπαμίνη και τη νορεπινεφρίνη από τους νευρώνες του εγκεφαλικού στελέχους και έχει επίδραση στα ανοδικά μονοαμινεργικά μονοπάτια που συσχετίζονται με την κατάθλιψη (da Conceição Machado et al., 2018; Funck et al., 2018; Kuteeva et al., 2008). Μέσω των μονοαμινεργικών μονοπατιών φαίνεται να συνδέεται με τα συμπτώματα άγχους και κατάθλιψης, ρυθμίζοντας τη λειτουργία των νευρώνων του μεταχιακού συστήματος που ανταποκρίνονται στους νευροδιαβιβαστές που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά (Unschuld et al., 2008; Wrenn & Crawley, 2001).

Η σεροτονίνη (5-HT) ειδικά μέσω του 5-HT_{1A} υποδοχέα και οι υποδοχείς της γαλανίνης αλληλοεπιδρούν σε προσυναπτικό και μετασυναπτικό επίπεδο, σχηματίζοντας GAL1-GAL2-5-HT_{1A} ετερομερή συμπλέγματα υποδοχέων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με τους 5-HT νευρώνες του ιπποκάμπου, επιδρώντας και με αυτό τον τρόπο στην εμφάνιση της κατάθλιψης (Millon et al., 2017).

Η γαλανίνη στον υποθάλαμο συνεκφράζεται και με την Corticotropin Releasing Hormone (CRH) και τη Βασοπρεσίνη (Mazzocchi et al., 1992) και επηρεάζει τα επίπεδα της ACTH και της κορτιζόλης στο αίμα (Arvat et al., 1995). Η υπερέκφραση CRH έχει συνδεθεί με χρόνιο άγχος και κατάθλιψη ενώ η βασοπρεσίνη προάγει αγχώδεις και καταθλιπτικές συμπεριφορές. Η κορτιζόλη, που είναι το τελικό προϊόν του HPAΑ, είναι μια ορμόνη που ρυθμίζει όλα τα συστήματα οργάνων υπό την επίδραση χρόνιου και οξύ πόνου, αλλά έχει συσχετιστεί και με χρόνιες διαταραχές που οφείλονται σε στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το άγχος και η κατάθλιψη (Chávez-Castillo et al., 2019).

Η γαλανίνη επίσης εμποδίζει τη διέγερση και την απελευθέρωση νορεπινεφρίνης, σε βαθμό ανάλογο με τα επίπεδά της (Yoshitake et al., 2003). Υψηλή ενεργότητα των νοραδρενεργικών νευρώνων, λόγω στρες και μπλοκαρίσματος του βρόχου αρνητικής ανάδρασης για την απελευθέρωσή της νοραδρεναλίνης, ενεργοποιεί την απελευθέρωση γαλανίνης στην αμυγδαλή. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτή η αλληλεπίδραση δεν είναι ακόμα γνωστός. Κάτω από τις ειδικές αυτές συνθήκες, η γαλανίνη έχει κυρίως αγχολυτική δράση (Karlsson & Holmes, 2006). Μελέτες σε αρουραίους σε διάφορα μοντέλα άγχους έχουν δείξει ότι διάφορα είδη στρες, όπως το κοινωνικό στρες (λόγω εγκλεισμού σε μεγάλο πλήθος στους αρουραίους), η σωματική άσκηση, ο πόνος και το στρες λόγω ακινητοποίησης των ζώων, προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της προπρογαλανίνης στην περιοχή του εγκεφαλικού στελέχους όπου εκφράζεται και η νορεπινεφρίνη, στην αμυγδαλή και τον υποθάλαμο (Holmes et al., 2003; Holmes et al., 2006; O'Neal, 2001). Χρόνιο στρες, αντίθετα με τα παραπάνω, έδειξε μια αύξηση των συμπτωμάτων κατάθλιψης, με μείωση των επιπέδων των mRNAs της προ-προγαλανίνης στον ιππόκαμπο και τον υποθάλαμο (Sergeyev et al., 2005).

Παρ' όλα αυτά, η αλληλεπίδραση του HPAΑ με τη γαλανίνη δεν είναι ξεκάθαρη. Χορήγηση της μπορεί είτε να ενεργοποιήσει είτε να μειώσει την έκκριση νευροπεπτιδίων του HPAΑ που ενεργοποιούνται από το στρες, ανάλογα με το σημείο στο οποίο χορηγήθηκε (Karlsson & Holmes, 2006 ; Unschuld et al., 2010). Γι αυτό έχει προταθεί η θεωρία ότι, για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι της γαλανίνης που σχετίζεται με το άγχος, θα πρέπει η συναισθηματική πίεση ή η νευρολογική διαταραχή να ξεπεράσει έναν ελάχιστο ουδό/κατώφλι. Αυτό το φαινόμενο δεν είναι ειδικό για τη γαλανίνη, αλλά φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό για την ενεργοποίηση και την αλληλεπίδραση πολλών νευροπεπτιδίων με το ΚΝΣ (Consolo et al., 1994). Σε γενικές γραμμές, η ρύθμιση των μονοπατιών της γαλανίνης είναι περίπλοκη και σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, καθώς εξωγενές στρες δεν έχει πάντα την ίδια επίδραση στην έκκριση της γαλανίνης και δεν έχει πάντα τα ίδια αποτελέσματα. Τα μονοπάτια αυτά ενδέχεται επίσης να διαφέρουν μεταξύ ειδών, περιοχών του εγκεφάλου και μοντέλων συμπεριφοράς (Barrera et al., 2006; Karlsson & Holmes, 2006).

Το πεπτιδίο GAL(1-15) φαίνεται να αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ του γαλανινεργικού και του σεροτονινεργικού μονοπατιού αφού ενισχύει την αντικαταθλιπτική δράση των υποδοχέων της σεροτονίνης σε αρουραίους (Millón et al., 2017).

1.6.4 LHRH και φυλοεξαρτώμενη έκφραση

Οι ορμόνες του φύλου παρουσιάζουν χαρακτηριστικές αυξομειώσεις στην έκφραση τους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής και των δύο φύλων (Herman, 2009). Σε τέτοιες περιόδους ορμονικών αλλαγών, ειδικά όταν συμπίπτουν με σημαντικά γεγονότα ζωής, παρουσιάζονται διαταραχές της διάθεσης (Douma et al, 2005). Ειδικά για τις γυναίκες, οι ορμονικές μεταβολές είναι πολύ μεγάλες (Chávez-Castillo et al., 2019), πράγμα που δικαιολογεί την μεγαλύτερη συχνότητα των διαταραχών της διάθεσης στις γυναίκες, ειδικότερα μετά την εφηβεία σε σχέση με τους άνδρες (Chaplin et al. 2008).

Η γαλανίνη συνεντοπίζεται και συνεκκρίνεται με την luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) στην υπόφυση, πιθανώς ρυθμίζοντας τη λειτουργία των LHRH νευρώνων κατά την ωορρηξία. Η LHRH, που απελευθερώνεται από τους νευρώνες αυτούς, προκαλεί την έκκριση ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing hormone, LH) και ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) που με τη σειρά τους, στις γυναίκες προκαλούν παραγωγή οιστρογόνων στις ωοθήκες (Merchenthaler, 2005; Unschuld et al., 2010). Οι υποδοχείς των οιστρογόνων εκφράζονται σε όλον τον εγκέφαλο και συμμετέχουν στην οργάνωση των αναπτυσσόμενων νευρώνων και την ενεργοποίηση των ώριμων νευρώνων. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την ενεργότητα και τη νευροδιαβίβαση πολλών από τους νευροδιαβιβαστές του HPAΑ (Grigoriadis & Kennedy, 2002). Ειδικότερα, αυξάνουν την ενεργότητα της σεροτονίνης ρυθμίζοντας το μεταβολισμό της και την έκφραση των υποδοχέων της αλλά και την πυροδότηση των σεροτονινεργικών νευρώνων στους πυρήνες της ραφής του κέντρου της σεροτονίνης, δηλαδή στο εγκεφαλικό στέλεχος (Chávez-Castillo et al., 2019). Στα θηλυκά άτομα παρατηρείται επίσης μεγαλύτερος βαθμός συνεντοπισμού και υψηλότερα επίπεδα mRNA της προ-προγαλανίνης στους LHRH νευρώνες και συγκέντρωση του πεπτιδίου GALANIN, σε σχέση με τα αρσενικά. Η έκφραση της γαλανίνης σε ενήλικους LHRH νευρώνες αυξορρυθμίζεται και από τα οιστρογόνα και ρυθμίζεται από την προγεστερόνη (Merchenthaler et al., 2006). Επομένως η γαλανίνη, επιδρώντας στους LHRH, όπως και στους σεροτονινεργικούς νευρώνες, επηρεάζει πολλές λειτουργίες των οιστρογόνων, με τις επιδράσεις της να φτάνουν ακόμα και στον έλεγχο της προλακτίνης και της αυξητικής ορμόνης (Kupcova et al., 2022; Lang et al., 2007).

Τα ανωτέρω μονοπάτια πιθανώς είναι υπεύθυνα για την φυλοεξαρτώμενη εμφάνιση της κατάθλιψης και του άγχους, σε συνδυασμό με κοινωνικούς παράγοντες. Μάλιστα, στη διαχρονική μελέτη μαθητών 11-14 ετών, οι Chaplin et al. (2008) παρατήρησαν ότι, ενώ δεν υπήρχε διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης κατάθλιψης στα προεφηβικά άτομα, μετά την έναρξη της εφηβείας ο αριθμός των θηλυκών ατόμων που έπασχαν ήταν διπλάσιος σε σχέση με των αρσενικών. Στη μελέτη των Unschuld et al. (2008), παρατηρήθηκε συσχέτιση των

πολυμορφισμών του GALANIN με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της Αγχώδους διαταραχής (Panic Disorder, PD) μόνο στις γυναίκες, ενώ στη μελέτη των Wang et al., 2013, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση εμφάνισης Μείζονος διαταραχής μόνο στο γυναικείο πληθυσμό. Άλλωστε, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η Μείζων Κατάθλιψη είναι πιο συχνή στις γυναίκες και ίσως οι πολυμορφισμοί στο GALANIN να σχετίζονται με το κατά πόσο οι γυναίκες είναι επιρρεπείς στις διαταραχές αυτές (Wang et al., 2013).

1.6.5. Άλλα μονοπάτια και αλληλεπίδραση με αντικαταθλιπτικούς παράγοντες

Η γαλανίνη και τα πεπτίδια που προκύπτουν από αυτή, αλληλοεπιδρούν και με αντικαταθλιπτικούς παράγοντες. Οι García-Durán et al. (2021) στη μελέτη που πραγματοποίησαν, η οποία αφορούσε αρουραίους, από τους οποίους είχαν αφαιρεθεί οι οσφρητικοί βολβοί και εμφάνιζαν συμπτώματα κατάθλιψης, παρατήρησαν ότι ενδοεγκεφαλοκοιλιακή χορήγηση του πεπτιδίου GAL(1-15), βελτίωσε την αντικαταθλιπτική δράση του escitalopram, ενώ η χορήγηση του ανταγωνιστή του GALR2 M871 παρεμπόδιζε αυτή του τη δράση. Οι Lu et al. (2005) παρατήρησαν, ότι η fluoxetine, ένας ανασταλτικός παράγοντας της επαναπορρόφησης της σεροτονίνης με αντικαταθλιπτική δράση, δρούσε μέσω διέγερσης των νευρώνων του ραχιαίου πυρήνα ραφής, διαμεσολαβούμενης από τους GALR2 και υπέθεσαν ότι επιλεκτική αυξορρύθμιση των GALR2 στους νευρώνες αυτούς είχε ως αποτέλεσμα τη σχετική μετατόπιση από GALR1 και GALR3 σε GALR2 σηματοδότηση.

Ο HPAΑ είναι ένας από τους τρόπους με τους οποίους το ΚΝΣ ρυθμίζει και την φλεγμονή, ως αντίδραση σε περιβαλλοντικό στρες (Lang & Koffer, 2011). Το ανοσοποιητικό και το νευροενδοκρινικό σύστημα συνδέονται, καθώς πολλά νευροπεπτίδια, ορμόνες, κυτοκίνες και υποδοχείς συμμετέχουν σε βιοχημικά μονοπάτια και των δύο συστημάτων (Butts & Sternberg, 2008). Μια πιθανή συσχέτιση του άγχους με την κατάθλιψη ίσως είναι αποτέλεσμα επιρροής τους από τα μονοπάτια του πόνου και της φλεγμονής. Χρόνιος πόνος οδηγεί σε μεταβολή της συμπεριφοράς, κατάθλιψη και άγχος. Φλεγμονή και χρόνιος πόνος σε αρουραίους προκαλεί υπερέκφραση των GALR1 και GALR2 υποδοχέων στον επικλινή πυρήνα, τον κεντρικό διαμεσολαβητή μεταξύ κινήτρου και δράσης στον εγκέφαλο (Yang et al., 2015).

1.7 Το περιβάλλον στην εμφάνιση κατάθλιψης και άγχους

Το περιβάλλον είναι ένας από τους σοβαρότερους παράγοντες που επηρεάζουν το άγχος και την κατάθλιψη. Και οι δύο διαταραχές άλλωστε, προκύπτουν ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες. Περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες στην πρώιμη παιδική ηλικία, όπως ελλιπής διατροφή και στρεσογόνες εμπειρίες στην ενήλικη ζωή, είναι σημαντικοί κίνδυνοι για την ανάπτυξη κατάθλιψης (Domschke et al., 2012; Gonda et al., 2018).

Η ανθεκτικότητα σε αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες πιθανώς οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Οι Juhasz et al. (2014) παρατήρησαν ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου της γαλανίνης αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης κατάθλιψης ειδικά σε άτομα που έχουν

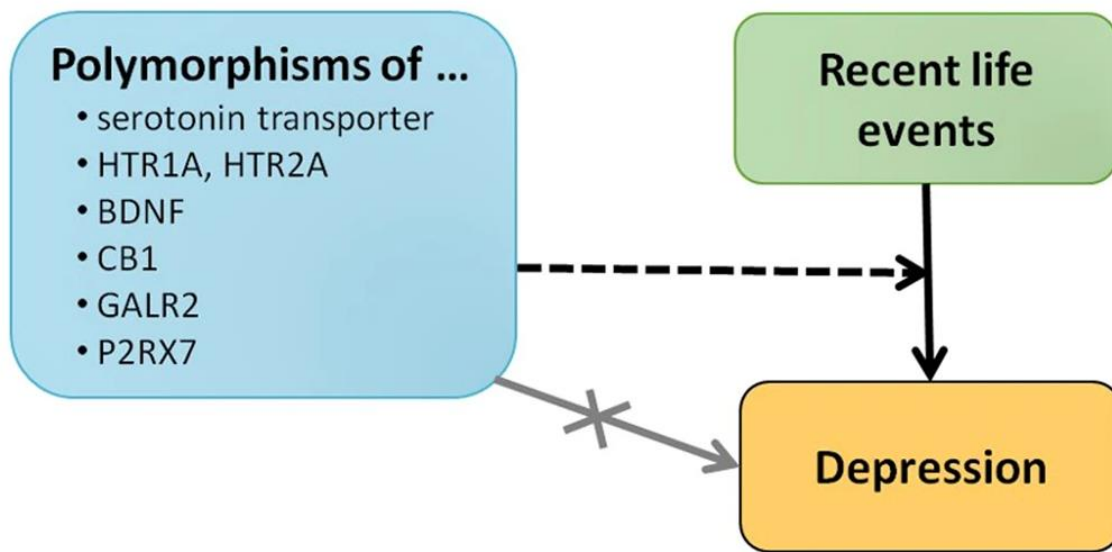
εκτεθεί σε περιβαλλοντικό στρες. Έτσι θα μπορούσε να υποτεθεί ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί θα μπορούσαν να καθορίσουν το αποτέλεσμα της έκθεσης στους παράγοντες αυτούς. Η κατάθλιψη φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από ορμονικούς και γενετικούς, όσο και από κοινωνικούς παράγοντες σε θηλυκά άτομα (da Conceição Machado et al., 2018).

1.7.1 Στρεσογόνες εμπειρίες ζωής

Τα ζωικά μοντέλα της κατάθλιψης και του άγχους στα τρωκτικά, περιλαμβάνουν πάντα περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως επαναλαμβανόμενα στρεσογόνα ερεθίσματα, τα οποία ακολουθούνται συνήθως από μεταβολή των συμπεριφορικών φαινοτύπων που συσχετίζονται με αυτές τις διαταραχές, όπως ανηδονία και ακινησία ή φόβος, αντίστοιχα. Από τα άτομα που εμφανίζουν διαταραγμένους φαινοτύπους, επιλέγονται τα υποψήφια γονίδια που φαίνεται να έχουν διαφορική έκφραση, σε σχέση με άτομα με φυσιολογικό φαινότυπο, για περεταίρω μελέτη τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους. Αυτή η προσέγγιση, έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες συσχέτισης σε ανθρώπους, όπου μελετώνται συνήθως άτομα χωρίς να είναι απαραίτητα γνωστές και όμοιες προηγούμενες στρεσογόνες εμπειρίες. Δεδομένου του γεγονότος ότι τα συμπτώματα κατάθλιψης που αναπτύσσονται ως απόκριση σε διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες, πιθανώς διαμεσολαβούνται από διαφορετικά βιολογικά μονοπάτια (Pacák & Palkovits, 2001), είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν οι γενετικοί παράγοντες που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους (Gonda et al., 2018). Ειδικότερα σε μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide association studies, GWAS), όπου μελετώνται χιλιάδες ασθενείς και υγιή άτομα-controls, συνήθως, SNPs και σε συνάρτηση γονίδια που έχουν συσχετιστεί προηγουμένως σε ζωικά μοντέλα, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Bosker et al., 2011), αν και η παρουσία φαινοτύπων άγχους και κατάθλιψης αμέσως μετά από συγκεκριμένες στρεσογόνες εμπειρίες σε ανθρώπους είναι αντίστοιχη με τα ζωικά μοντέλα (Hollis et al., 2013).

Οι Gonda et al. (2018) έκαναν μία Μπαυεσιανή ανάλυση για να μελετήσουν κατά πόσο πολυμορφισμοί διαφορετικών γονιδίων, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως γονίδια κινδύνου, επηρεάζουν την εμφάνιση της ασθένειας, αναμεσά τους και το γονίδιο GALR2. Παρατηρώντας μια μη στατιστικά σημαντική επίδραση των πολυμορφισμών αυτών σε ομάδες ατόμων που δεν είχαν κάποια προηγούμενη στρεσογόνο εμπειρία και ισχυρή συσχέτιση των πολυμορφισμών με συμπτώματα κατάθλιψης σε άτομα που είχαν, συμπεράναν ότι τα αποτελέσματα των γενετικών παραγόντων μπορούν να αποδομηθούν στη μη-σημαντική επίδραση των γενετικών πολυμορφισμών και στη σημαντική αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος [Εικόνα 1.7.1]. Δηλαδή υποστηρίζουν ότι η κύρια αιτία της κατάθλιψης είναι το περιβάλλον και η αντίδραση του οργανισμού μεταβάλλεται από γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι συλλογικά δρουν με τον ίδιο τρόπο που επιδρούν στα ζωικά μοντέλα.

\



Εικόνα 1.7.1: Συσχέτιση SNPs γονιδίων και περιβάλλοντος με την εμφάνιση φαινοτύπων. (Gonda et al., 2018)

Διαφορετικός βαθμός έκθεσης, ενεργοποιεί διαφορετικά τα γονίδια κινδύνου, και ίσως ενεργοποιεί και διαφορετικά μονοπάτια και μηχανισμούς (Gonda et al., 2018).

Η κατάθλιψη είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια με πολύ περίπλοκο γενετικό υπόβαθρο με πολλούς διαφορετικούς γενετικούς τρόπους να συμβάλλουν ο καθένας σε μικρό ποσοστό στον τελικό φαινότυπο (Dunn et al., 2015). Όπως υποστηρίζουν και οι Domschke & Reif (2012), αναφερόμενοι σε μελέτες διδύμων, κατά 37-42% η κατάθλιψη κληρονομείται και οι ιδιαίτερες περιβαλλοντικές επιδράσεις του ατόμου επηρεάζουν την εκδήλωση Μείζονας κατάθλιψης κατά 63%. Καθώς οι αγχώδεις διαταραχές έχουν επικαλυπτόμενο με της κατάθλιψης φαινότυπο, αιτιολογία, και κοινή γενετική προδιάθεση, με πολλούς πολυμορφισμούς να συμμετέχουν τόσο στην κατάθλιψη όσο και στο άγχος, πιθανώς έχουν παρόμοιο τρόπο κληρονομής. (Domschke & Reif, 2012). Συγκεκριμένα, η γενικευμένη αγχώδης διαταραχή (Generalized anxiety disorder) έχει κληρονομησιμότητα 32%, χωρίς αυτό το ποσοστό να είναι απόλυτο καθώς η διαταραχή αυτή συσχετίζεται και είναι συνδεδεμένη και με άλλες αγχώδεις διαταραχές και φοβίες που έχουν διαφορετικά ποσοστά κληρονομησιμότητας και οφείλονται σε συνδυασμό γονιδίων ανθεκτικότητας και γονιδίων προδιάθεσης, υποδεικνύοντας περίπλοκο τρόπο κληρονομής (Domschke & Reif, 2012 ; Hettema et al., 2001). Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες γονοτύπου-περιβάλλοντος (GxE) για το άγχος, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την κατάθλιψη, αντίξοες συνθήκες διαβίωσης και στρεσογόνα συμβάντα στην ενήλικη ζωή οδηγούν σε εκδήλωση αγχωδών διαταραχών (Laucht et al., 2009). Πολυμορφισμοί σε γονίδια που συσχετίζονται με το άγχος μπορούν να επηρεάζουν την ένταση των συμπτωμάτων, μετά από έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες (όπως καφεΐνη) (Childs et al., 2008). Συνεπώς, γονίδια που

σχετίζονται με το άγχος μπορεί να παρέχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε περιβαλλοντικά, στρεσογόνα ερεθίσματα.

Οι Domschke & Reif (2012) υποστηρίζουν ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί κινδύνου έχουν διαφορετική ενεργοποίηση ανάλογα με την περιβαλλοντική έκθεση. Συνεπώς η κατάθλιψη και το άγχος προκαλούνται από το περιβάλλον και διαμεσολαβούνται από τα γονίδια . Επίσης, πιθανώς διαφορετικά μονοπάτια και μηχανισμοί ενεργοποιούνται σε απόκριση στους στρεσογόνους παράγοντες αν προϋπάρχει περιβαλλοντική έκθεση και διαφορετικά είδη ή διαφορετικής σοβαρότητας συμβάντα ζωής. Για να γίνεται επομένως πιο σαφής εντοπισμός των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν προτείνεται, εκτός των άλλων, η μελέτη πληθυσμών που έχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης της διαταραχής, όπως ομάδες ατόμων που βρίσκονται σε κοινές στρεσογόνες συνθήκες διαβίωσης (Caspi et al.,2003).

1.8 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)

Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism,SNP) είναι μια σημειακή μετάλλαξη σε έναν γενετικό τόπο του γονιδιώματος, η οποία εντοπίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% στον πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι σταθερές και όχι απαραίτητα επιβλαβείς για τον οργανισμό. Αποτελούν τον πιο συνηθισμένο τύπο πολυμορφισμού του γονιδιώματος, με έναν πολυμορφισμό να συναντάται ανά 350 ζεύγη βάσεων, ενώ ευθύνονται για το 90-95% της ποικιλομορφίας που εμφανίζει το ανθρώπινο γονιδίωμα (Russell, 2009). SNPs δημιουργούνται μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως επίδραση εσωτερικών ή εξωτερικών παραγόντων, αυθόρμητες αλλοιώσεις των βάσεων, αλλά και σφάλματα κατά την αντιγραφή που δεν επιδιορθώνονται. Επειδή τα λάθη κατά την αντιγραφή είναι εξαιρετικά σπάνια, πολύ σπάνια δημιουργούνται και νέοι πολυμορφισμοί. (Wright . 2005)

Οι διαφορετικοί SNPs, χαρακτηρίζονται ανάλογα με την επίπτωση που έχουν στην πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο. Οι κωδικοί SNPs, εντοπίζονται στο εσωτερικό των κωδικών περιοχών των γονιδίων και μπορεί να είναι είτε παρανοηματικές μεταλλάξεις, πράγμα το οποίο οδηγεί συνήθως σε ασθένειες, είτε σιωπηλές μεταλλάξεις, όπου ένα κωδικόνιο αντικαθίσταται από κάποιο συνώνυμο. Οι μη κωδικοί SNPs δεν οδηγούν συνήθως σε ασθένειες, αλλά, αν βρίσκονται σε υποκινητές ή άλλες ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασής τους. Μπορούν να μεταβάλλουν την ενεργότητα του υποκινητή, την δυνατότητα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, τη σταθερότητα των mRNAs ή και την αποδοτικότητα της μετάφρασης. Τέλος, μπορούν να προδιαθέτουν για κάποιες ασθένειες και να επηρεάζουν την απόκριση του οργανισμού σε θεραπείες και το μεταβολισμό των φαρμάκων αλλά και να επιδρούν σε πολύπλοκους φαινοτύπους όπως είναι το ύψος και η προσωπικότητα (Shastry, 2009). Γενικότερα, οι SNPs μελετώνται για τυχόν ταυτοποίηση συσχέτισής τους με συμπτώματα και φαινοτύπους. Συγκρίνοντας τα αλληλόμορφα των ατόμων που εμφανίζουν τα συμπτώματα που μελετώνται, με άτομα χωρίς αυτόν το φαινότυπο, μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος της επιρροής του πολυμορφισμού αλλά και να κατανοηθούν καλύτερα τα υποκείμενα

μοριακά μονοπάτια, ώστε να αναπτυχθούν νέες θεραπείες για αυτά τα συμπτώματα (Yang et al., 2019).

Η κατανομή των SNPs δεν είναι ομοιογενής, με τη συχνότητα εμφάνισής τους να είναι μεγαλύτερη στις μη κωδικές περιοχές. Καθώς ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπολογίζεται στα 19.500 γονίδια (Amaral et al., 2023) και το πλήθος και η περιπλοκότητα των ρυθμιστικών παραγόντων είναι πολύ μεγάλη, προκύπτει η υπόθεση, ότι η περιπλοκότητα και η ποικιλία των ανθρωπίνων φαινοτύπων οφείλεται στις διαφορετικές παραλλαγές της έκφρασης των ίδιων γονιδίων και συνεπώς οι μη κωδικοί, ρυθμιστικοί πολυμορφισμοί είναι υπεύθυνοι για την ανθρώπινη ποικιλομορφία (Buckland, 2006). Ασθένειες όπως οι ψυχιατρικές διαταραχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για ένα μεγάλο ποσοστό της ανθρώπινης νοσηρότητας, είναι πολυπαραγοντικές, με το γενετικό παράγοντα να αποτελείται από πολλαπλά γονίδια και ρυθμιστικές περιοχές, κάθε ένα από τα οποία συμβάλει σε μικρό βαθμό στην προδιάθεση για την ασθένεια. (Nkruma et al., 2005).

Ο υποκινητής και οι γειτονικές του περιοχές, περιέχουν τα στοιχεία που ελέγχουν την έναρξη της μεταγραφής, συνεπώς SNPs στο εσωτερικό τους επηρεάζουν την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων και σε συνάρτηση, την ποσότητα των παραγόμενων mRNAs, δρώντας ως cis-επιδρώντα στοιχεία. Πιθανώς αυτές οι μεταβολές της έκφρασης λαμβάνουν χώρα, καθώς μικρές μεταβολές στην αλληλουχία επηρεάζουν και μεταβάλλουν την καμπυλότητα ή και την ελαστικότητα της αλυσίδας του DNA, πλησιάζοντας ή απομακρύνοντάς το από την βέλτιστη διαμόρφωσή του (Buckland, 2006).

Μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικοί παράγοντες καθιστούν ορισμένα άτομα πιο επιρρεπή σε ψυχολογικές και νευρολογικές δυσλειτουργίες. Γι αυτό το λόγο, η κατανόηση των γενετικών παραγόντων, όπως των SNPs μπορεί να δια φωτίσει για τις νευροψυχιατρικές διαταραχές (Yang et al., 2018).

Πολυμορφισμοί ανοδικά του γονιδίου GALANIN, έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της διάθεσης, αν και ο αριθμός των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί είναι περιορισμένος. Οι Unschuld et al. (2008) παρατήρησαν συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου και της σοβαρότητας διαταραχής πανικού σε γυναίκες ασθενείς. Στη μελέτη των Juhasz et al. (2014), αναφέρθηκε σημαντική συσχέτιση της παρουσίας SNPs στο γονίδιο της γαλανίνης και του υποδοχέα της, με συμπτώματα κατάθλιψης και άγχους, μόνο σε άτομα που είχαν εκτεθεί σε στρεσογόνες συνθήκες στην παιδική τους ηλικία ή στην πρόσφατη ζωή τους.

1.8.1 Ο πολυμορφισμός rs4432027

Ο πολυμορφισμός rs4432027, είναι ένας μη κωδικός, μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, που εντοπίζεται σε περιοχή ενισχυτή του γονιδίου GALANIN, 2kb ανοδικά του 5' άκρου της κωδικής του περιοχής. Τα αλληλόμορφα που συναντώνται στον πληθυσμό είναι τα C, A και T με το C να θεωρείται το αλληλόμορφο αναφοράς με συχνότητα C=0.33017 στον παγκόσμιο πληθυσμό. Το T, το οποίο εντοπίστηκε στην παρούσα μελέτη, έχει συχνότητα 0.66983. Η συχνότητα των αλληλομόρφων μεταβάλλεται από πληθυσμό σε πληθυσμό, με το T

αλληλόμορφο να συναντάται με συχνότητα 0,74 στην Ευρώπη, 0,81 στην Ανατολική Ασία, 0,596 στη Λατινική Αμερική για άτομα με Αφρο-Καραϊβική καταγωγή και 0,713 για άτομα με Ευρωπαϊκή και Αμερικανική καταγωγή.

Στη μελέτη των Keszler et al. (2019) το αλληλόμορφο **C** του rs4432027 εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με αυξημένα επίπεδα άγχους σε Ούγγρους νέους (18-35 ετών), αλλά δεν είχε από μόνο του κάποια σημαντική επίπτωση στα συμπτώματα της κατάθλιψης. Ομοίως, καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του SNP rs4432027 και της κατάθλιψης στη μελέτη των da Conceicao Machado et al. (2018), όπου αξιολογήθηκαν συμπτώματα κατάθλιψης σε 112 εφήβους στη Βραζιλία, οι οποίοι δεν είχαν κάποια υποκείμενη ψυχιατρική νόσο. Οι Unschuld et al. (2008) επίσης δεν παρατήρησαν κάποια συσχέτιση ειδικά για τον συγκεκριμένο SNP με συμπτώματα άγχους σε ασθενείς που έπασχαν από Διαταραχή πανικού, σε σχέση με υγιή άτομα-controls. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη συσχέτισης 700 ασθενών με Μείζονα Κατάθλιψη και 673 υγιή controls, Κινεζικής Χαν εθνότητας. Και εδώ, δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση του rs4432027 με την ευαισθησία για ανάπτυξη Μείζονος Κατάθλιψης, παρά μόνο στην περίπτωση του απλοτύπου G-G-A-A-A-**T** των **πολυμορφισμών** rs2510387-rs2513297-rs2187331-rs948854-rs2097042-rs**4432027** ($p= 0.005$) (Wang et al., 2013).

1.8.2 Ο απλότυπος rs948854_rs4432027

Ο πολυμορφισμός rs4432027 παρουσιάζει ανισορροπία σύνδεσης με το πολυμορφισμό rs948854 [$r^2>0.96$, $D'=1.00$ (Ensemble, release 109 - Feb 2023)], έναν επίσης μη κωδικό ρυθμιστικό SNP. Ο πολυμορφισμός rs948854 εντοπίζεται 1044 νουκλεοτίδια ανοδικά του rs4432027, με αλληλόμορφα C, G, T και A ($C>A$ / $C>G$ / $C>T$) (Unschuld et al., 2008). Οι Keszler et al. (2019) πραγματοποίησαν ανάλυση απλοτύπων για πολυμορφισμούς που είχαν συσχετισθεί στο παρελθόν με συμπτώματα άγχους και παρατήρησαν ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση του συνδυασμού αλληλομόρφων rs948854 C_rs4432027_C με άγχος, στους κατά τα άλλα υγιείς Ούγγρους νέους, ανεξαρτήτως φύλλου. Σε γυναίκες ασθενείς με διαταραχή πανικού παρουσιάστηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση απλοτύπων που περιέχουν τον rs4432027 σε συνδυασμό με τους rs948854 και rs3136537, με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, κάτι που όμως δεν παρατηρήθηκε για τους άνδρες (Unschuld et al., 2008). Η απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς των αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών και υγιών-control στην ίδια μελέτη, ίσως υποδεικνύει ότι τα SNPs αυτά δεν καθιστούν τα άτομα επιρρεπή για την εμφάνιση της Διαταραχής πανικού, αλλά επηρεάζουν την ένταση των συμπτωμάτων σε ήδη πάσχοντες. (Unschuld et al., 2008)

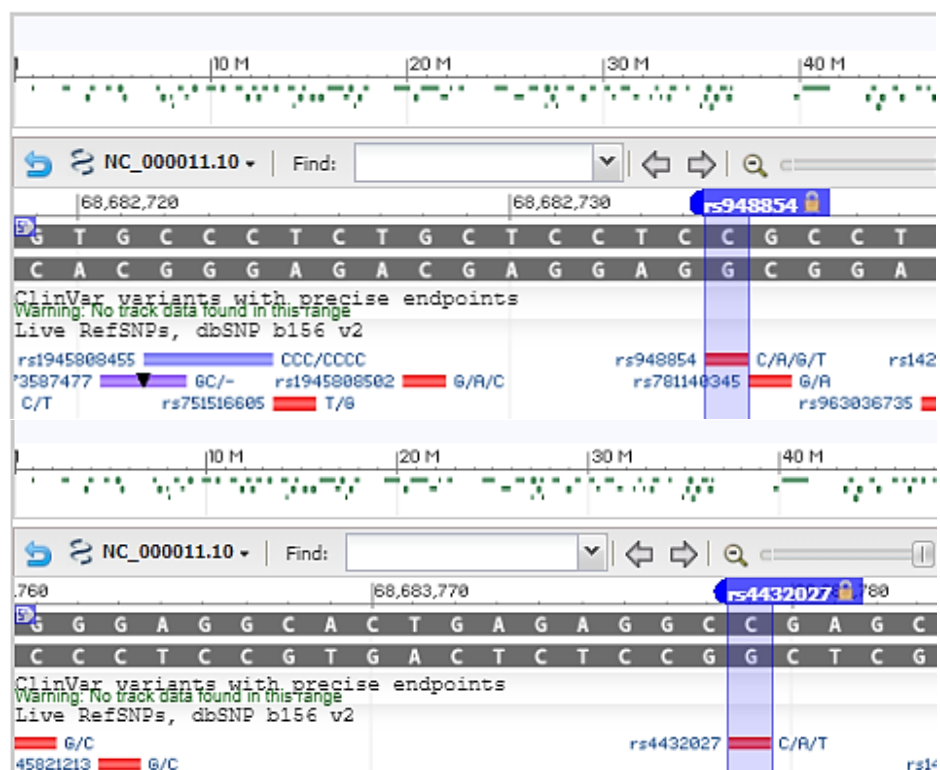
1.8.2.1 Λειτουργική σημασία του απλοτύπου και διαφορική έκφραση του γονιδίου GALANIN

Λόγω της σημασίας των επιπέδων έκφρασης της γαλανίνης ιδιαίτερα για την κατάθλιψη, αλλά και για το άγχος, πολύ πιθανόν πολυμορφισμοί SNPs των 5' και 3' ρυθμιστικών περιοχών

του γονιδίου να τα επηρεάζουν και έτσι να έχουν επίδραση στα συμπτώματα των διαταραχών αυτών, μεταβάλλοντας περιοχές πρόσδεσης microRNA ή μεταγραφικών παραγόντων. Οι δύο πολυμορφισμοί rs4432027 και rs948854 εντοπίζονται σε νησίδες CpG-δινουκλεοτιδίων στον υποκινητή του GALANIN και έτσι συμμετέχουν στην επιγενετική ρύθμιση του υποκινητή επηρεάζοντας πιθανώς την έκφραση του γονιδίου. Οι Keszler et al. (2019), παρατηρώντας ότι τα C αλληλόμορφα του συνδυασμού αλληλομόρφων rs948854 C_rs4432027_C, ακολουθούνται από G νουκλεοτίδια [Εικόνα 1.7.2.1.i], έβγαλαν το συμπέρασμα ότι αυτός ο απλότυπος συμμετέχει στην επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου, σχηματίζοντας δινουκλεοτίδια CpG που μπορούν να μεθυλοποιηθούν και πιθανώς έχουν προσθετική επίδραση στην ανάπτυξη άγχους και κατάθλιψης, μειώνοντας την έκφραση της γαλανίνης. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Unschuld et al. (2008), μελετώντας γυναίκες με διαταραχή πανικού, σημειώνοντας ότι αυτό εξηγεί γιατί οι πολυμορφισμοί αυτοί πιθανώς επηρεάζουν τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και όχι την εμφάνιση της διαταραχής.

Δεν είναι γνωστή η επιρροή της επιγενετικής ρύθμισης στις διαταραχές της διάθεσης. Είναι γεγονός ότι διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου έχουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης και έκφρασης του γονιδίου της γαλανίνης. Κατά την εξέταση ατόμων που έπασχαν από κατάθλιψη και είχαν αυτοκτονήσει, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα GALANIN και GALR3 mRNA και μειωμένη μεθυλίωση του DNA στο κέντρο της νοραδρεναλίνης στο εγκεφαλικό τους στέλεχος, σε σχέση με εγκεφάλους μη-ασθενών. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα των μεταγράφων του GALANIN και GALR3 ήταν χαμηλότερα και του GALR1 αυξημένα, με αυξημένη μεθυλίωση του DNA, στο μετωπιαίο φλοιό, μόνο των αρσενικών ατόμων που είχαν αυτοκτονήσει. Συνεπώς, τα γονίδια της γαλανίνης και του GALR3 μεθυλιώνονται και εκφράζονται διαφορετικά, στα άτομα με κατάθλιψη, σε σχέση με τα υγιή άτομα, εμποδίζοντας πιθανώς τη σωστή ρύθμιση των νοραδρενεργικών και των σεροτονινεργικών νευρώνων, που έχουν συσχετιστεί με την Μείζονα Καταθλιπτική Διαταραχή (Barde et al.,2016) [Εικόνα 1.8.2.1.ii]. Από όλα τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η έκφραση της γαλανίνης, αν και διαφορετική για κάθε τύπο του εγκεφάλου, εμφανίζει μια απορρύθμιση σε άτομα που πάσχουν από κατάθλιψη και μάλιστα με φυλοειδικό και ιστοειδικό τρόπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όσον αφορά στο γονίδιο της γαλανίνης, αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης στις περισσότερες περιπτώσεις συνεπάγεται μείωση των επιπέδων του mRNA του GAL. Συνεπώς, η μεθυλίωση στη ρυθμιστική περιοχή του GALANIN καταστέλλει τη μεταγραφή.

Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p14 Primary Assembly
 gi|568815587|ref|NC_000011.10|



Εικόνα 1.8.2.1.ι: Η θέση των SNPs rs948854 και rs4432027 και τα νουκλεοτίδια εκατέρωθέν τους (dbSNP, NCBI, Released Sep 21, 2022)(Keszler et al., 2019)

Ο πολυμορφισμός rs4432027 εντοπίζεται επάνω στην αλληλουχία του H3K27ac-H3K4me1 hESC ενισχυτή που εντοπίστηκε σε ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Barakat et al., 2018). Οι ενισχυτές είναι ρυθμιστικά cis-δρώντα στοιχεία που αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων με ιστοειδικό τρόπο. Η λειτουργία τους προϋποθέτει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και συσχετίζεται με τις τροποποιήσεις των ιστονών (Barakat et al., 2018). Ποιο γονίδιο ρυθμίζει αυτός ο ενισχυτής δεν είναι γνωστό. Δεν είναι απαραίτητο να ρυθμίζει το γονίδιο που είναι πλησίον του. Αν ο ενισχυτής αυτός ρυθμίζει το γονίδιο GAL, μεταβολή του αλληλομόρφου του SNP και του προτύπου μεθυλίωσης της περιοχής, μπορεί να μεταβάλλει τη ρύθμιση του GALANIN και συνεπώς και τα επίπεδα έκφρασης, διαταράσσοντας το γαλανινεργικό σύστημα.

GAL					
gDNA methylation					
Regions	Sex	mRNA	CpG1	CpG2	CpG3
DLPFC	M	↓↓	↑	↑↑	↑↑
	F	↑	↑	↓	—
ACC	M	—	—	—	—
	F	—	—	—	—
DRN	M	↑↑	—	↓	
	F	↑↑	—	—	—
LC	M	↑↑	↓↓	↓	—
	F	↑↑	↓	↓↓	—
MRN	M	↑	—	—	—
	F	↑	—	—	—

Εικόνα 1.8.2.1.ii: Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης και μεθυλίωσης του γονιδίου GALANIN σε εγκεφάλους ατόμων που έπασχαν από κατάθλιψη σε σχέση με αυτά που δεν έπασχαν. Τα ανοδικά βέλη υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική αύξηση της μεθυλίωσης ή των επιπέδων mRNA και τα καθοδικά το αντίθετο. Μονά βέλη υποδεικνύουν $p < 0.05$ και διπλά $p < 0.01$. ACC (anterior cingulate cortex): Πρόσθιος φλοιός του προσαγωγίου, μέρος του μεταιχμιακού συστήματος. DLPFC (dorsolateral prefrontal cortex): Ραχιοπλευρικός προμετωπιαίος φλοιός, κέντρο της ντοπαμίνης και της ρύθμισης της κίνησης και της βραχυπρόθεσμης μνήμης. DRN (dorsal raphe nucleus): Ραχιαίος πυρήνας της ραφής στο εγκεφαλικό στέλεχος, κέντρο της σεροτονίνης. LC (locus coeruleus): Υπομέλας τόπος του εγκεφαλικού στελέχους, κέντρο της νορεπινεφρίνης. MRN (medullary raphe nucleus): Μυελοειδής πυρήνας της ραφής (Barde et al., 2016).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Μέχρι σήμερα, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες τόσο για την επιρροή της γαλανίνης στη διαφοροποίηση των συμπτωμάτων των διαταραχών της διάθεσης, όσο και για την εμφάνιση αυτών των διαταραχών μετά από κάποια κοινή και ελεγχόμενη στρεσογόνο εμπειρία σε υγιή άτομα. Ελάχιστες είναι επίσης οι μελέτες που αφορούν ειδικά άτομα - άνδρες, καθώς η κατάθλιψη και το άγχος παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις για τα δύο φύλα. Τέλος, μόλις τέσσερις μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη συσχέτιση SNPs της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου GALANIN με συμπτώματα άγχους και κατάθλιψης. Ο ρόλος της γαλανίνης στη ρύθμιση της διάθεσης είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και η κατανόηση της γενετικής βάσης των διαταραχών της διάθεσης πολλά υποσχόμενη, για την ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισής τους.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη και η συσχέτιση των διαφορετικών αλληλομόρφων του SNP rs4432027 του γονιδίου GALANIN με πιθανές διαφορές στις μεταβολές των επιπέδων των συμπτωμάτων κατάθλιψης και άγχους και των αισθημάτων συνοχής και ζωτικής εξάντλησης υγείων νεοσύλλεκτων ανδρών, κατά τη διάρκεια της βασικής υποχρεωτικής στρατιωτικής εκπαίδευσης. Η περίοδος βασικής υποχρεωτικής εκπαίδευσης είναι ιδανική περίοδος για τη μελέτη της εμφάνισης των διαταραχών της διάθεσης, γιατί αποτελεί ένα κοινό και ομοιογενές στρεσογόνο περιβάλλον για τον πληθυσμό της μελέτης.

Η εργασία αυτή αποτελεί συνέχεια της εργασίας των Alexopoulos et al. (2020), οι οποίοι μελέτησαν την συσχέτιση μεταξύ SNPs των APOE-, COMT Val108/158Met- και BDNF VAL66Met με τα παραπάνω συμπτώματα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Νευροψυχιατρική αξιολόγηση και Δειγματοληψία

3.1.1 Πληθυσμός, Βιομετρικά και Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Στην παρούσα μελέτη, έγινε δειγματοληψία σιέλου και νευροψυχιατρική αξιολόγηση σε 179 νεοσυλλέκτους άνδρες του 2/39 Συντάγματος Πεζικού στη Δυτική Ελλάδα, κατά τη διάρκεια της 19μερούς στρατιωτικής τους εκπαίδευσης (29/8-16/9/2011). Οι άνδρες αυτοί, δεν είχαν ιστορικό ασθενειών που επηρεάζουν την νευρική λειτουργία ή προϋπάρχουσες ψυχιατρικές διαταραχές.

Καταγράφηκαν επίσης, ο Δείκτης Μάζας Σώματος και η περίμετρος της κεφαλής τους, ως δείκτης του μεγέθους της ενδοκρανιακής κοιλότητας και του μεγίστου μεγέθους του ενήλικου εγκεφάλου. Δημογραφικά χαρακτηριστικά που λήφθηκαν υπόψη είναι το μορφωτικό επίπεδο σε αριθμό ετών εκπαίδευσης και ο τόπος κατοικίας («Αστικός» αν πρόκειται για πόλη με πληθυσμό μεγαλύτερο των 2000, ή «Αγροτικός») (Alexopoulos et al., 2021). Τα δημογραφικά και βιομετρικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1.

Υγιείς νεαροί άνδρες N=179	
ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
Ηλικία (έτη) ^a	22 (21.54; 2.97)
Εκπαίδευση (έτη) ^a	(N=147) ^b , 16 (14.89;2.69)
Αστικός : Αγροτικός τόπος κατοικίας	(N=176) ^b , 134:42
ΒΙΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ^a	
ΔΜΣ	(N=175) ^b , 24 (24.63; 3.94
Περίμετρος Κεφαλής (cm)	58 (57.96 ; 1.75)
^a Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (μέσος όρος; τυπική απόκλιση)	
^b Σε κάποιες περιπτώσεις δεν αναφέρονταν οι συγκεκριμένες πληροφορίες	
ΔΜΣ Δείκτης Μάζας Σώματος = $\frac{\text{Μάζα σε Kg}}{\text{Υψος του ατόμου σε m}^2}$	

Πίνακας 3.1.1.: Σύνοψη των δημογραφικών και βιομετρικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού της μελέτης. (Alexopoulos et al., 2021)

3.1.2 Νευροψυχιατρική αξιολόγηση

Αξιολογήθηκαν τυχόν συμπτώματα κατάθλιψης, άγχους, ζωτικής εξάντλησης και το αίσθημα συνοχής των συμμετεχόντων, σε τρεις φάσεις της βασικής τους εκπαίδευσης: Την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3). Αυτές οι χρονικές στιγμές επιλέχθηκαν για να αξιολογηθεί η μεταβολή των παραπάνω συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια της βασικής εκπαίδευσης.

Τα συμπτώματα **κατάθλιψης** και η σοβαρότητά τους αξιολογήθηκαν με βάση το ερωτηματολόγιο του Beck (B.D.I.) (Beck et al. 1961). Το ερωτηματολόγιο αυτό, αφορά συνολικά σε 21 συμπτώματα κατάθλιψης, όπως θλίψη και απαισιοδοξία, αυτοκατάκριση, αίσθημα αποτυχίας και τύψεις, καθώς και σωματικές ενοχλήσεις, όπως αϋπνία. Σε κάθε

απάντηση αναλογεί σκορ 0-3, με την τελική βαθμολογία να προκύπτει από το συνολικό άθροισμα και να είναι ανάλογη με τη σοβαρότητα της κατάθλιψης του υποκειμένου.

Τα συμπτώματα **Άγχους** υπολογίστηκαν με το State-Trait Anxiety inventory X (STAI X). Η μελέτη αυτή, που είναι επίσης σε μορφή ερωτηματολογίου, διαχωρίζει και αξιολογεί το άγχος που οφείλεται σε στρεσογόνους παράγοντες και εκφράζεται με παροδικά και υποκειμενικά αισθήματα νευρικότητας και ανησυχίας σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (State, s-anxiety), από την έμφυτη τάση του υποκειμένου προς άγχος, λόγω του χαρακτήρα του (Trate, t-anxiety). Σε κάθε απάντηση αναλογεί σκορ 1-4 με το συνολικό άθροισμα να είναι ανάλογο με τη σοβαρότητα της διαταραχής.

Το **Αίσθημα συνοχής**, που εκφράζει την ικανότητα του ατόμου να αντιλαμβάνεται και να δίνει νόημα στην κατάσταση στην οποία βρίσκεται, περιλαμβάνει τις έννοιες της κατανόησης (ο βαθμός στον οποίο το άτομο βλέπει τον κόσμο σε τάξη), της ικανότητας διαχείρισης της στρεσογόνου κατάστασης, την εύρεση νοήματος και τη διάθεση του ατόμου να ανταπεξέλθει. Εκτιμήθηκε με την κλίμακα SOC (Sense Of Coherence) του Antonovsky που περιλαμβάνει 13 ερωτήσεις, με σκορ που κυμαίνεται στο διάστημα 0-7, μιας κλίμακας Likert. Το συνολικό σκορ κυμαίνεται μεταξύ 19 και 91 και είναι ανάλογο των επιπέδων του αισθήματος συνοχής.

Η **Ζωτική εξάντληση** (VE, Vital Exhaustion) περιλαμβάνει σωματικές και νοητικές ενοχλήσεις, όπως ασυνήθιστη κόπωση, απώλεια ενέργειας, αυξημένη ευερεθιστότητα, και αποθάρρυνση. Αξιολογήθηκε με το ερωτηματολόγιο Maastricht (MQ Maastricht VE Questionnaire), το οποίο περιλαμβάνει 21 ερωτήσεις, με σκορ ανά απάντηση 0 έως 2. Και σε αυτή την περίπτωση το άθροισμα των βαθμολογιών αντικατοπτρίζει τη σοβαρότητα της εξάντλησης.

3.2 Εργαστηριακές διεργασίες

3.2.1 Τράπεζες δεδομένων και Προγράμματα βιοπληροφορικής

Η βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και οι επιμέρους βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνει, αξιοποιήθηκαν για την εύρεση της βιβλιογραφίας και για το σχεδιασμό των εκκινήτων της PCR. Ειδικότερα, για την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου Galanin, χρησιμοποιήθηκε η βάση GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ενώ για την εύρεση και τη μελέτη του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs4432027, η dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), όπου εμφανίζεται η αλληλουχία 200 νουκλεοτιδίων, στο κέντρο της οποίας βρίσκεται ο πολυμορφισμός. Με το BLASTn[®] (Basic Local Alignment Search Tool) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch), ένα εργαλείο που επιτρέπει τη στοίχιση και τη σύγκριση αλληλουχιών, έγινε εντοπισμός της ευρύτερης ακολουθίας εκατέρωθεν του SNP και ταυτοποίηση του τμήματος, για την ενίσχυση του οποίου κατασκευάστηκαν εκκινήτες DNA. Οι εκκινήτες σχεδιάστηκαν με βάση το πρόγραμμα Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Η Βάση δεδομένων OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man) περιλαμβάνει καταλόγους με ανθρώπινα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με γενετικές ασθένειες και πώς τα ιδιαίτερα γονοτυπικά χαρακτηριστικά έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινους φαινοτύπους. Χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των φαινοτύπων που έχουν συσχετιστεί με το γονίδιο Galanin καθώς επίσης και με τον πολυμορφισμό rs4432027, τη χρωμοσωμική θέση και άλλα χαρακτηριστικά του γονιδίου.

Με το εργαλείο NEBcutter2.0 (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>) εντοπίστηκε η κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία κατατέμνει το DNA επάνω στον πολυμορφισμό που μελετάται, ώστε να επιτευχθεί η γονοτύπηση των δειγμάτων.

3.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Δείγματα σιέλου (επιθηλιακά κύτταρα παρειάς) είχαν ληφθεί από τους νεοσυλλέκτους κατά την πρώτη φάση της μελέτης και ήταν αποθηκευμένα σε μορφή διαλύματος στους -80°C . Από αυτά τα διαλύματα έγινε απομόνωση του ολικού DNA με το DNeasy® Blood and Tissue kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (QIAGEN, Γερμανία).

3.2.2.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, περιλαμβάνει την παροδική πρόσδεση των μορίων DNA σε μεμβράνη silica, παρουσία κατάλληλου pH και χαοτροπικών αλάτων, τα οποία αφαιρούν το νερό από τα ενυδατωμένα μόρια στο διάλυμα και διευκολύνουν την ειδική πρόσδεση του DNA. Οδηγεί σε απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας, απουσία ανασταλτικών παραγόντων της PCR.

Συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται λύση από την πρωτεΐνωση K και στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH και αιθανόλη. Τα διαλύματα αυτά έπειτα φυγοκεντρώνονται διαμέσου της μεμβράνης silica, όπου το DNA προσδένεται ειδικά, ενώ απομακρύνονται οι προσμείξεις και οι ενζυμικοί ανασταλτικοί παράγοντες. Ακολουθούν δύο πλύσεις της μεμβράνης με ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση όλων των ρυπαντών και τέλος, γίνεται έκλυση του DNA από τη μεμβράνη σε υδατικό διάλυμα και αποθήκευση στους 4°C .

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA έγινε με φωτομέτρηση των διαλυμάτων στα 260 nm (A_{260}), όπου το DNA απορροφά πιο ισχυρά το φως. Η καθαρότητα του διαλύματος υπολογίστηκε από τον λόγο A_{260}/A_{280} , ώστε να προσδιοριστούν προσμείξεις σε πρωτεΐνες και RNA. Καλής ποιότητας διαλύματα έχουν τιμές A_{260}/A_{280} 1.7–2.0, ενώ οι τιμές που αποκλίνουν υποδεικνύουν παρουσία προσμείξεων στο διάλυμα.

3.2.2.2 Υλικά

1. DNeasy® Blood and Tissue kit το οποίο περιλαμβάνει τα εξής διαλύματα:
2. Διάλυμα πρωτεΐνωσης K και διάλυμα λύσης AL

3. Αιθανόλη
4. Ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης AW1 και AW2
5. Ρυθμιστικό διάλυμα AE για την έκλουση και τη διαλυτοποίηση του DNA

3.2.2.3 Όργανα

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες των 2μL και στήλες με μεμβράνη silica DNeasy® που περιλαμβάνονταν στο kit
2. Επιτραπέζια θερμαινόμενη συσκευή της εταιρείας Cleaver
3. Φυγόκεντρος Hermie Labortechnik
4. Φασματοφωτόμετρο NanoDrop Microvolume Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

3.2.2.4 Πειραματική διαδικασία απομόνωσης του DNA

- Προσθήκη 200 μl διαλύματος σιέλου και 20 μL proteinase K σε σωληνάριο των 2 mL.
- Προσθήκη στο προηγούμενο διάλυμα 200 μL Buffer AL, καλή ανάδευση με vortex και επώαση στους 56 °C για 10 min.
- Προσθήκη 200 μL Αιθανόλης (96-100%) και καλή ανάδευση με vortex.
- Εισαγωγή του διαλύματος στη στήλη της μεμβράνης και της στήλης σε σωληνάριο των 2 mL, φυγοκέντρωση στα 6000 x g για 1 min, αφαίρεση και απόρριψη του σωληναρίου με το διήθημα.
- Εισαγωγή της στήλης σε νέο σωληνάριο των 2 mL, προσθήκη 500 μL Buffer AW1, φυγοκέντρωση στα 6000 x g για 1 min, αφαίρεση και απόρριψη του σωληναρίου με το διήθημα.
- Εισαγωγή της στήλης σε καθαρό σωληνάριο των 2 mL, προσθήκη 500 μL Buffer AW2, φυγοκέντρωση στα 20000 x g για 3 min, αφαίρεση και απόρριψη του σωληναρίου με το διήθημα
- Εισαγωγή της στήλης σε νέο σωληνάριο των 2 mL , προσθήκη 200 μL διαλύματος έκπλυσης Buffer AE στο κέντρο της μεμβράνης και αναμονή για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση στα 6000 x g για 1 min. Το διήθημα ήταν το διάλυμα που περιείχε το ολικό DNA των κυττάρων
- Για αύξηση της απόδοσης DNA ακολούθησε εισαγωγή εκ νέου της στήλης σε καθαρό σωληνάριο και επανάληψη των βημάτων 7 και 8

3.2.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA

Έγινε φωτομέτρηση των διαλυμάτων στα 260 nm και 280 nm και υπολογισμός του λόγου A(260)/A(280). Η διαδικασία αυτή έγινε αυτόματα από το φασματοφωτόμετρο. Επίσης, αυτόματα έγινε και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA των διαλυμάτων σε ng/μL. Οι τιμές της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του DNA στα διαλύματα ήταν απαραίτητες και για

τον προσδιορισμό του κατάλληλου όγκου που θα χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία της PCR που ακολούθησε.

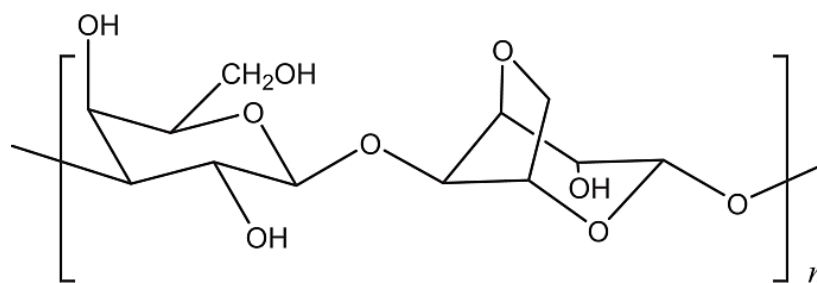
3.2.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης

Τα προϊόντα της απομόνωσης του DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης για να επιβεβαιωθεί η παρουσία και η ποιότητα του DNA.

3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μακρομορίων (DNA, RNA, πρωτεϊνών κλπ.), με βάση το μέγεθός τους και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια βιοχημείας, μοριακής βιολογίας και γενετικής, για το διαχωρισμό μειγμάτων μακρομορίων και θραυσμάτων τους, την εκτίμηση του μήκους τους με χρήση δεικτών μοριακών βαρών (Ladders) καθώς και ως προπαρασκευαστική μέθοδος για άλλες τεχνικές, όπως είναι η RFLP και οι Western και Southern blot.

Κατά την ηλεκτροφόρηση DNA, κατασκευάζεται ένα πορώδες πήκτωμα αгарόζης ή άλλου υλικού, το οποίο περιέχει ειδικές εγκοπές (πηγάδια, wells). Σε κάθε μια από αυτές τις θέσεις εισάγεται διάλυμα που περιέχει τα μόρια DNA προς μελέτη, σεσημασμένα με EtBr, μια φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων. Εφαρμόζεται στη συνέχεια ηλεκτρική τάση στα άκρα του πηκτώματος. Τα DNA είναι μόρια αρνητικά φορτισμένα, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο εξωτερικό τους. Με την εφαρμογή τάσης, αρχίζουν να μετακινούνται προς τον αντίθετο ως προς το φορτίο τους πόλο, δηλαδή τον θετικό πόλο της συσκευής της ηλεκτροφόρησης, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους τους και του φορτίου τους. Τα μόρια με όμοιο μέγεθος και φορτίο, συγκεντρώνονται σε ζώνες, οι οποίες οπτικοποιούνται καθώς το EtBr φθορίζει στην υπεριώδη ακτινοβολία. Με αυτή την τεχνική μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μήκους 100bp έως και 25kb.



Εικόνα 3.2.3.1: Η δομή της αгарόζης (Nobuyuki and Ura, 2020)

Η αгарόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από φύκη και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες αгарοβιόζης. Η αгарοβιόζη είναι δισακχαρίτης που προκύπτει από D-γαλακτόζη και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτοπυρανόζη [Εικόνα

3.2.3.1]. Η αгарόζη, η οποία διατίθεται σε μορφή σκόνης, υγροποιείται με θέρμανση στους 65-70 °C σε διάλυμα TBE (Tris/Borate/EDTA) ενώ σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζει πορώδες

και ανθεκτικό πήκτωμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση σε αгарόζη. Όσο πιο μεγάλη η συγκέντρωση της αгарόζης, τόσο μικρότεροι είναι οι πόροι του πηκτώματος. Συνεπώς, πιο μικρά μόρια προς διαχωρισμό, απαιτούν πηκτωμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης αгарόζης.

Για την ηλεκτροφόρηση του γονιδιωματικού DNA παρασκευάστηκε πηκτωμα $1\% \frac{W}{V}$ αгарόζης.

TBE (Tris/Borate/EDTA), είναι ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται τόσο ως συστατικό του πηκτώματος όσο και για την καταβύθισή του, για να διευκολύνεται η μετακίνηση των μορίων διαμέσου του. Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας, ο οποίος προσδένεται σε κατιόντα και ειδικά Mg^{2+} , που δρουν ως συμπαράγοντες των νουκλεασών. Έτσι, το EDTA παρέχει προστασία στο DNA του διαλύματος. Το tris [Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο], μια ασθενής βάση, σε διάλυμα με το βορικό οξύ (Borate) έχουν ελαφρώς βασικό pH (8,3) ώστε το DNA να είναι αποπρωτονιωμένο και διαλυτό στο νερό.

EtBr (Βρωμιούχο Αιθίδιο), είναι μια αρωματική ένωση που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA προκαλώντας ταυτόχρονα τη χαλάρωση των υπερελλικώσεων του και να φθορίζει στο υπεριώδες (UV). Χρησιμοποιείται κυρίως ως φθορίζων ανιχνευτής για τη σήμανση του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση και την οπτικοποίηση των ζωνών DNA.

Loading Buffer, προστίθεται στο διάλυμα του DNA πριν την εισαγωγή του στο πηκτωμα. Περιέχει μόρια όπως η γλυκερόλη που «βαραίνουν» το δείγμα εμποδίζοντας το DNA να απομακρυνθεί από τα πηγάδια, καθώς επίσης και κάποια χρωστική που μετακινείται μαζί με τα μόρια DNA και επιτρέπει την παρατήρηση του «μετώπου» της ηλεκτροφόρησης.

3.2.3.2 Υλικά

1. TBE 10X (Tris-Borate-EDTA) Buffer (1lt). Παρασκευάστηκε με προσθήκη ddH₂O, Tris Base, Boric Acid και EDTA σε κωνική φιάλη των 2L και ανάδευση [Πίνακας 3.2.3.2]. Ακολούθησε προσαρμογή του pH με HCL, σε τιμή κοντά στο 8,3. Τέλος προστέθηκε ddH₂O για τελικό όγκο του διαλύματος ίσο με 1L. Το TBE 10X στη συνέχεια αραιώθηκε με ddH₂O για να έχει τελική συγκέντρωση TBE 0,5X.

ΓΙΑ 1 L TBE 10X	
dd H ₂ O	800 mL
Trisbase (MW=121.1)	108 gr
Boric Acid	
EDTA (0,5 M)	55 gr

Πίνακας 3.2.3.2: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή 10X TBE

1. FastGene® Agarose (NIPPON Genetics EUROPE)
2. EtBr (ethidium bromide solution 10mg/ml) της εταιρείας SIGMA.
3. Loading buffer 10X.

3.2.3.3 Όργανα

1. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
3. Φυγόκεντρος Thermo (Electron Corporation)
4. Επιτραπέζιος λαμπτήρας υπεριώδους ακτινοβολίας (BIO View)

3.2.3.4 Πειραματική Διαδικασία

Παρασκευή πηκτώματος Αγαρόζης 1% w/v

- Σε κωνική φιάλη, ανάδευση 70 mL TBE 0.5X με 0,7 gr αγαρόζης και θέρμανση σε συσκευή μικροκυμάτων, με ανάδευση του διαλύματος ανά 10-15 sec, έως ότου το διάλυμα να είναι διαυγές.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθέτηση των τοιχωμάτων και μίας ή δύο σειρών «χτενιών» για τη δημιουργία των πηγαδιών, σχηματίζοντας έτσι το εκμαγείο του πηκτώματος
- Πριν έρθει σε σημείο πήξης το διάλυμα της αγαρόζης (~55°C), προσθήκη 3,75 μ L EtBr και μετά από σύντομη ανάδευση, τοποθέτηση με προσοχή στο εκμαγείο, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου 15-20 min, έως ότου στερεοποιηθεί.

Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

- Σε Eppendorf 1.5 mL προσθήκη 2,2 μ L Loading buffer 10X και 20 μ L διαλύματος DNA που προέκυψε από την απομόνωση. Κάθε Eppendorf περιέχει τελικό όγκο διαλύματος 22,2 μ L.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8 RPM για 30 sec.

Γ. Ηλεκτροφόρηση

- Αφαίρεση με προσοχή των τοιχωμάτων του εκμαγείου και των «χτενιών» από τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- Προσθήκη TBE 0.5X έως ότου το διάλυμα καλύπτει πλήρως το πήκτωμα.
- Με πιπέτα, τοποθέτηση των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση στα πηγάδια.
- Σύνδεση της συσκευής με τροφοδοτικό και ρύθμισή του σε ένταση 25 mA. Ανάλυση σε θερμοκρασία δωματίου για 45-60min, έως ότου το «μέτωπο» της ηλεκτροφόρησης να έχει προχωρήσει σε ικανοποιητικό μήκος

- Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης και απενεργοποίηση του τροφοδοτικού, αφαίρεση του πηκτώματος από τη συσκευή και τοποθέτησή του στην τράπεζα υπερψύξης ακτινοβολίας, όπου είναι πλέον ορατές οι ζώνες του DNA και μπορούν να φωτογραφηθούν. Επειδή το συνολικό γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελείται από τμήματα ποικίλων μεγεθών, αναμένεται εικόνα πολλών βαθμιαίων ζωνών με την ένταση του φθορισμού να μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση από τα πηγάδια.

3.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μήκους 458bp, που εμπεριείχε τον πολυμορφισμό rs4432027.

3.2.4.1 Αρχή της μεθόδου

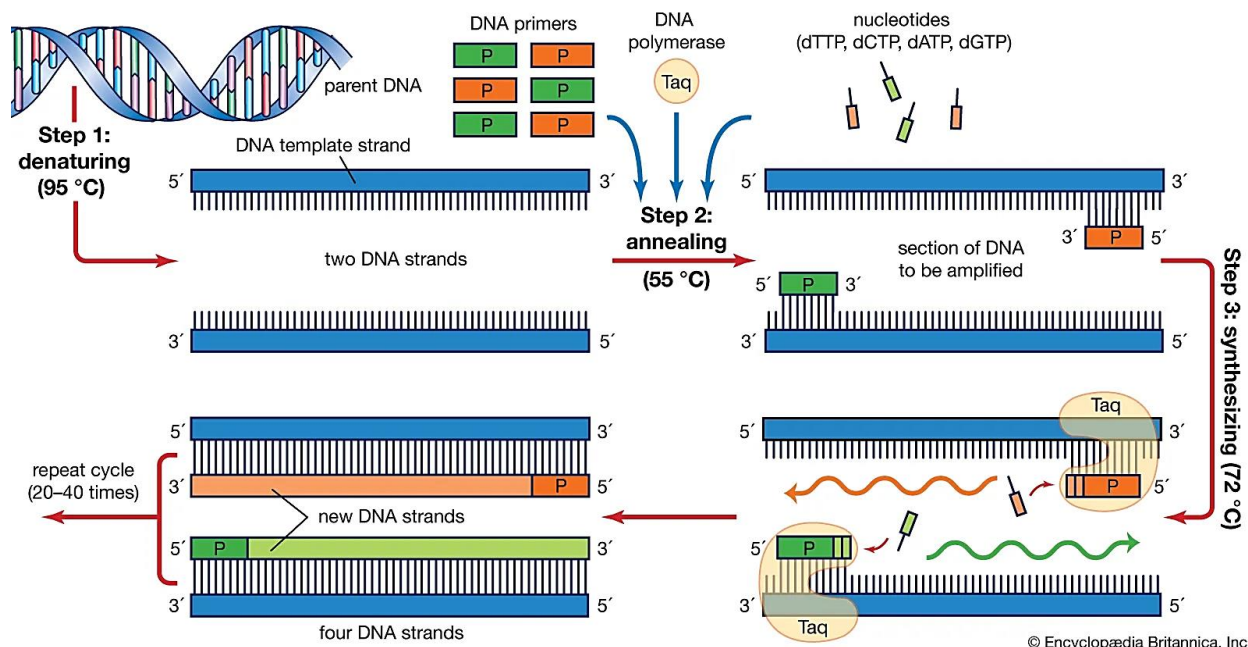
Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος επιλεκτικού πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA. Από το 1983 που επινοήθηκε από την ομάδα του Kary Mullis έχει αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο στην εργαστηριακή πράξη, με πολλές διαφορετικές εκδοχές της να έχουν αναπτυχθεί και με τη χρήση της σε πλήθος επιστημονικών κλάδων, από την βασική έρευνα, έως την κλινική πράξη.

Η PCR, βασίζεται στην ικανότητα μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης του DNA, να αντιγράφει το τμήμα DNA που παρεμβάλλεται μεταξύ δύο θέσεων, συμπληρωματικών σε ειδικά σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), απουσία κάποιου ζωντανού οργανισμού. Για να επιτευχθεί ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός των τμημάτων DNA, πραγματοποιούνται αλληπάλληλοι κύκλοι που αποτελούνται από τρία βασικά στάδια:

1. Αποδιάταξη (Denaturation) του DNA. Σε αυτό το στάδιο αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος του DNA στους 95 °C ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αζωτούχων βάσεων και έτσι οι δύο κλώνοι της δίκλωνης έλικας να διαχωριστούν.
2. Υβριδοποίηση-Πρόσδεση των εκκινητών. Με μείωση της θερμοκρασίας στην κατάλληλη τιμή, ένα συγκεκριμένο ζεύγος ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδίων (εκκινητές) που είναι συμπληρωματικό των αλληλουχιών 3' εκατέρωθεν της αλληλουχίας προς διπλασιασμό, προσδένεται στον κάθε κλώνο του DNA.
3. Σύνθεση - Επιμήκυνση του DNA. Με εκ νέου αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C, η θερμοανθεκτική πολυμεράση του DNA προσδένεται δίπλα στους εκκινητές και αντιγράφει το DNA με κατεύθυνση 5'→3'. Τα προϊόντα της αντιγραφής του DNA θα αποτελέσουν μήτρα για την εκ νέου πρόσδεση εκκινητών και αντιγραφή του DNA.

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 20-40 κύκλους με τον αριθμό των αντιγράφων του τμήματος DNA προς ενίσχυση να διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Η όλη διαδικασία γίνεται αυτοματοποιημένα από ένα ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler), ο οποίος αυξομειώνει ταχύτητα τη θερμοκρασία και ολοκληρώνει όλους τους κύκλους σε λιγότερο από 3 ώρες. Για την

πραγματοποίηση PCR απαιτείται πολύ μικρή αρχική ποσότητα DNA και ο αριθμός των αντιγράφων αυξάνεται εκθετικά [Εικόνα 3.2.4.1].



Εικόνα 3.2.4.1: Η διαδικασία της PCR και τα στάδιά της (Encyclopedia Britannica, 2023).

Η **Taq** Πολυμεράση του DNA που χρησιμοποιείται είναι μια θερμοανθεκτική DNA Πολυμεράση I, που πρώτη φορά απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Ως Πολυμεράση του DNA οδηγούμενη από DNA (EC 2.7.7.7) συνθέτει DNA, συνδέοντας νουκλεοτίδια μεταξύ τους με κατεύθυνση 5' → 3', με βάση μια αλληλουχία - εκμαγείο. Για τη σύνδεση της Taq στο DNA-εκμαγείο, απαραίτητη είναι η πρόσδεση ενός ολιγονουκλεοτιδίου, του λεγόμενου εκκινητή, στο 3' άκρο της αλληλουχίας προς αντιγραφή. Καθώς προέρχεται από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, είναι ενεργή σε υψηλές θερμοκρασίες (70-80 °C) όπου γίνεται το στάδιο της επιμήκυνσης της PCR, ενώ απενεργοποιείται παροδικά και δεν μετουσιώνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Απαραίτητη για τη λειτουργία της, είναι η παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης Mg^{2+} .

Οι **εκκινητές** είναι ζεύγος μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων μήκους συνήθως 20 nt, τα οποία είναι συμπληρωματικά στο 3' άκρο κάθε ενός από τους δύο κλώνους του DNA προς ενίσχυση. Για την ειδική ενίσχυση του επιλεγμένου τμήματος, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έχουν οι εκκινητές αλληλουχία μοναδική στο γονιδίωμα. Επίσης, σημαντική είναι και η σύνθεση των εκκινητών, καθώς υψηλότερη περιεκτικότητα σε G/C συνεπάγεται πιο σταθερή πρόσδεσή τους στο συμπληρωματικό DNA, αλλά και μεγαλύτερη θερμοκρασία αποδιάταξής τους από το DNA (T annealing). Ακόμα, οι δύο εκκινητές θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης, για να γίνεται ταυτόχρονα η πρόσδεση και η αποδιάταξή τους ενώ τέλος, θα πρέπει να μην είναι συμπληρωματικοί ο ένας προς τον άλλον, ώστε να μην υβριδοποιούνται μεταξύ τους, αλλά και οι ίδιοι να μη δημιουργούν βρόχους, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις δεν

είναι δυνατή η πρόσδεσή τους στο DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.4.1.

	Sequence (5'→3')	Templa te strand	Len gth (nt)	Start	Stop	Tm	GC%	Self 5' complem entarity	Self 3' compleme ntarity
Forward primer	TTTCAGCAGA TGACCCCGTG	(+)	20	114	133	60.3 2	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	GTCTGCTTGG CCATCCCATT	(-)	20	571	552	60.6 9	55.00	6.00	1.00
Product length	458								

Πίνακα 3.2.4.1: Ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για την PCR και τα χαρακτηριστικά τους.

Για τη σωστή λειτουργία της Taq και την πραγματοποίηση της PCR απαιτούνται ειδικές συνθήκες pH καθώς και η παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Αυτές οι συνθήκες εξασφαλίζονται από το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης με την προσθήκη $MgCl_2$. Τα κατιόντα Mg λειτουργούν ως συμπαράγοντες της πολυμεράσης του DNA βελτιώνοντας την απόδοση της αντίδρασης, αν και μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της εξειδίκευσης. Επίσης, λόγω του θετικού τους φορτίου, προσδένονται στα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA, μειώνοντας έτσι το φορτίο τους και συνεπώς την άπωση μεταξύ δύο μορίων DNA, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο σωστά η πρόσδεση των εκκινητών κατά την υβριδοποίηση.

Τα **Τριφωσφορικά Δεοξυριβονουκλεοτίδια** (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) αποτελούν τα δομικά συστατικά του νεοσυντιθέμενου DNA. Χρησιμοποιούνται σαν έτοιμο μείγμα που προκύπτει από ανάμειξη ίσων ποσοτήτων από τα τέσσερα επιμέρους νουκλεοτίδια · dATP, dTTP, dGTP, dCTP

3.2.4.2 Υλικά

1. Taq 10X buffer της εταιρείας enzyQUEST
2. $MgCl_2$ 25 mM της εταιρείας enzyQUEST
3. Μείγμα dNTPs 20 mM που παρασκευάστηκε με ανάμειξη 20 μ L από κάθε ένα από τα διαλύματα dATP, dTTP, dGTP και dCTP, αρχικής συγκέντρωσης 100 mM, της εταιρείας enzyQUEST

4. Διαλύματα primers Forward (F) και Reverse (R) 25 pmol/μL, τα οποία προέκυψαν με αραίωση των αρχικών διαλυμάτων 100 pmol/μL της εταιρείας Eurofins Genomics
5. Taq Πολυμεράση 5 u/μL της εταιρείας enzyQUEST

3.2.4.3 Όργανα

1. Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
2. Φυγόκεντρος Thermo (Electron Corporation)
3. Θερμικός ανακυκλωτής PTC-200 Peltier Thermal Cycler

3.2.4.4 Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε για 10-20 δείγματα την κάθε φορά.

Παρασκευή Master mix

Για καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας, αρχικά παρασκευάζεται Master mix σε δοκιμαστικό σωλήνα των 2 mL, που περιέχει τα αντιδραστήρια που προστίθενται σε ίδιες ποσότητες στους δοκιμαστικούς σωλήνες, ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης DNA κάθε δείγματος, με την εξής σειρά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (10X Buffer)
- Διάλυμα Mg^{2+} (MgCl)
- Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Forward και Reverse primers
- DNA Πολυμεράση Taq

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του master mix ανά δείγμα προς pcr παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.4.4.i. Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται πολλαπλασιάζονται επί $v+1$, όπου v ο αριθμός των δειγμάτων. Η ποσότητα Master mix που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα είναι 10,8 μL.

	μL διαλύματος Ανά δείγμα
Taq buffer 10X	5 μL
MgCl ₂	3 μL
dNTPs	0.5 μL
GAL(F) primer	1 μL
GAL(R) primer	1 μL
Taq DNA Polymerase	0.3 μL
V _{pcr} = 10.8 μL	

Πίνακας 3.2.4.4.i: Περιεχόμενο Master mix ανά δείγμα

- Ακολουθεί ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρωση του δοκιμαστικού σωλήνα με το Master mix.

Ετοιμασία δοκιμαστικών σωλήνων PCR

- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες της PCR προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ώστε ο τελικός όγκος κάθε δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των 10.8 μ L Master mix να είναι 50 μ L και η τελική ποσότητα του DNA να είναι 200 – 500 ng.
- Προσθήκη 10,8 μ L Master mix σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα PCR
- Στο τέλος προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας DNA από κάθε δείγμα, μετά από σύντομη ανάδευση του αρχικού διαλύματος. Η ποσότητα του DNA που προστίθεται πρέπει να είναι 200 – 500 ng.
- Ακολουθεί σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 8 RPM για 40 sec

Εισαγωγή των δειγμάτων στον Θερμικό ανακυκλωτή.

Το πρόγραμμα του Θερμικού ανακυκλωτή παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.4.4.ii

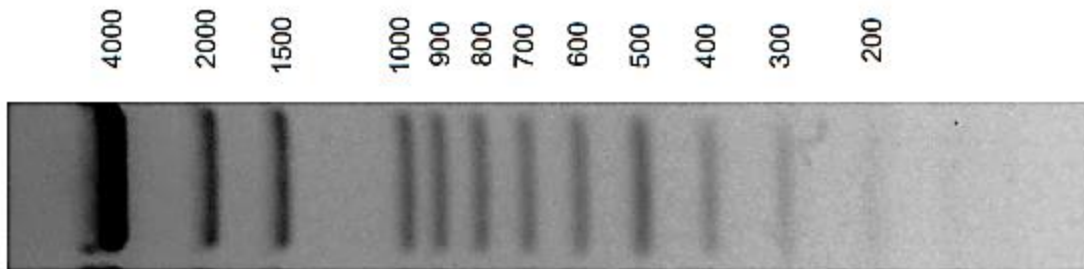
Θερμοκρασία (Στάδιο PCR)	Διάρκεια (min:sec)	Αριθμός επαναλήψεων
95 °C	5:00	1
95 °C (Αποδιάταξη)	1:00	35
54 °C (Υβριδοποίηση)	1:00	
72 °C (Σύνθεση)	1:00	
72 °C	10:00	1
12 °C (Συντήρηση των προϊόντων)	∞	

Πίνακας 3.2.4.4.ii: Πρόγραμμα του του Θερμικού ανακυκλωτή

- Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματός, τα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20 °C

3.2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Τα τμήματα DNA της PCR ηλεκτροφορούνται παρουσία δείκτη μοριακών βαρών (Ladder), ο οποίος αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση αυτή γίνεται για να επιβεβαιωθεί ότι ενισχύθηκε το σωστό τμήμα DNA. Η διαδικασία γίνεται όπως προηγουμένως, σε πήκτωμα αгарόζης 1.5% παρουσία 10 μ L ladder [Εικόνα 3.2.5].



Εικόνα 3.2.5: Ladder pPSU1 + pPSU2 + PstI . Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι τα μήκη των τμημάτων DNA που φαίνονται σε ζώνες, σε bp.

3.2.5.1 Υλικά

1. TBE 0,5 X Buffer
2. FastGene® Agarose (NIPPON Genetics EUROPE)
3. EtBr (ethidium bromide solution 10mg/ml) της εταιρείας SIGMA.
4. Loading buffer 10X.
5. Ladder pPSU1 + pPSU2 + PstI

3.2.5.2 Όργανα

1. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
3. Φυγόκεντρος Thermo (Electron Corporation)
4. Επιτραπέζιος λαμπτήρας υπεριώδους ακτινοβολίας (BIO View)

3.2.5.3 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης

Το πήκτωμα αгарόζης που παρασκευάστηκε, είχε συγκέντρωση αгарόζης 1,5 % W/V και παρασκευάστηκε όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, με 70 mL TBE 0.5X, 1.05g αгарόζης και 3.75 μ L EtBr.

Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

- Σε Eppendorf 1.5 mL προσθήκη 12.5 μ L ddH₂O, 2,5 μ L Loading Buffer 10X και 10 μ L προϊόν PCR, με αυτή τη σειρά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8.000 rpm για 30 sec.

Ηλεκτροφόρηση

Και εδώ η διαδικασία έγινε όπως προηγουμένως. Μαζί με τα δείγματα, στο κεντρικό πηγάδι κάθε σειράς φορτώθηκαν και 10 μ L Ladder. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 30 mA, σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45 min.

3.2.6 Ανίχνευση του SNP με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό του αλληλομόρφου T του SNP rs4432027 στα προϊόντα της PCR.

3.2.6.1 Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση BspI, μια ενδονουκλεάση περιορισμού, που είναι δραστική στους 37 °C, αναγνωρίζει την αλληλουχία $5'-\text{GCTNAGC}-3'$ και $3'-\text{CGACTCG}-5'$ και κόβει μεταξύ των C και T. Παρουσία του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού rs4432027 στην 388^η θέση του ενισχυμένου DNA, οδηγεί σε αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, το οποίο κατατέμνει σε αυτό το σημείο, με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο τμήματα DNA, μήκους 387 bp και 71bp. Απουσία του αλληλομόρφου, το ενισχυμένο DNA παραμένει ακέραιο. Συνεπώς, όταν το άτομο είναι ομοζυγώτης στο T αλληλόμορφο, όλα τα αντίγραφα που προκύπτουν από την PCR θα καταταμηθούν και στην ηλεκτροφόρηση θα εμφανίζονται δύο ζώνες μήκους 387 bp και 71 bp. Αν το άτομο δεν έχει το T αλληλόμορφο του rs4432027 στο γονιδίωμά του (εδώ θεωρείται ομοζυγώτης με το C αλληλόμορφο), όλο το DNA που ενισχύθηκε θα παραμένει ακέραιο και θα σχηματίζει μοναδική ζώνη DNA, μήκους 458 bp. Τέλος, όταν το άτομο είναι ετεροζυγώτης, τα προϊόντα PCR που περιέχουν το T θα τέμνονται και αυτά που δεν το έχουν θα μένουν ακέραια. Συνεπώς θα εμφανίζονται τρεις ζώνες μήκους 485 bp, 387 bp και 71 bp.

3.2.6.2 Υλικά

1. 10X Tango Buffer της εταιρείας Thermo Scientific
2. BspI (Bpu 1102I) 10 U/ μ L, της εταιρείας Thermo Scientific

3.2.6.3 Όργανα

1. Επιτραπέζια θερμαινόμενη συσκευή της εταιρείας Cleaver
2. Φυγόκεντρος Hermie Labortechnik

3.2.6.4 Πειραματική Διαδικασία

Παρασκευή Master mix ενζυμικής κατάτμησης

Για καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας, παρασκευάζεται Master mix, που περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (10X Tango Buffer)
- Την περιοριστική ενδονουκλεάση BspI

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του master mix ανά δείγμα προς κατάτμηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.6.4. Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται πολλαπλασιάζονται επί $n+1$, όπου n ο αριθμός των δειγμάτων. Η ποσότητα Master mix που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα είναι 3,25 μL . Η κατασκευή του διαλύματος πραγματοποιείται σε Eppendorf σε πάγο.

μL διαλύματος Ανά δείγμα	
10X Tango Buffer	3 μL
Bpu 1102I	0,25 μL
Vκατάτμησης = 3,25 μL	

Πίνακας 3.2.6.4: Περιεκτικότητα Master mix ανά δείγμα

- Ακολουθεί ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση του δοκιμαστικού σωλήνα με το Master mix και επανατοποθέτηση σε πάγο.

Ετοιμασία των δοκιμαστικών σωλήνων της ενζυμικής κατάτμησης

- Σε eppendorfs των 1,5 ml προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διπλά απεσταγμένου νερού (ddH_2O) ώστε ο τελικός όγκος κάθε δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των 10.8 μL Master mix και του προϊόντος PCR να είναι 30 μL .
- Προσθήκη 3.25 μL Master mix σε κάθε eppendorf
- Στο τέλος προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας προϊόντος PCR από κάθε δείγμα, αντιστρόφως ανάλογα με την ένταση της ζώνης των 10 μL που παρατηρήθηκε στην ηλεκτροφόρηση, μετά από ανάδευση του κάθε διαλύματος με το ρύγχος της πιπέτας.
- Σύντομη ανάδευση, φυγοκέντρηση και επανατοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο

Επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση

- Ακολουθεί τοποθέτηση των διαλυμάτων σε thermoblock που έχει προθερμαθεί στους 37°C και επώαση για μία ώρα.
- Μετά τη λήξη της επώασης τα δείγματα τοποθετούνται στους -20 °C, για να απενεργοποιηθεί η περιοριστική ενδονουκλεάση και να σταματήσει η αντίδραση.

3.2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενζυμικής κατάτμησης και γονοτύπηση

Τα προϊόντα της κατάτμησης ηλεκτροφορήθηκαν παρουσία Ladder, για να ταυτοποιηθεί η παρουσία ή όχι του αλληλομόρφου στα δείγματα.

Η διαδικασία γίνεται όπως προηγουμένως, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, καθώς τα τμήματα προς διαχωρισμό έχουν μικρό μήκος. Χρησιμοποιούνται 10 μ L ladder. Τα προϊόντα κατάτμησης ηλεκτροφορήθηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ώστε να επιτευχθεί καλό διαχωρισμός. Τα τμήματα μήκους 71 bp είναι αναμενόμενο να μη φαίνονται στην ηλεκτροφόρηση, καθώς δημιουργούν ζώνη πολύ μικρής έντασης.

3.2.7.1 Υλικά

1. TBE 0,5 X Buffer
2. FastGene® Agarose (NIPPON Genetics EUROPE)
3. EtBr (Ethidium Bromide solution 10mg/ml) της εταιρείας SIGMA.
4. Loading buffer 10X.
5. Ladder pPSU1 + pPSU2 + PstI

3.2.7.2 Όργανα

1. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
3. Φυγόκεντρος Thermo (Electron Corporation)
4. Επιτραπέζιος λαμπτήρας υπεριώδους ακτινοβολίας (BIO View)

3.2.7.3 Πειραματική Διαδικασία

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Το πήκτωμα αγαρόζης έχει συγκέντρωση αγαρόζης 2 % W/V και παρασκευάζεται όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, με 70 mL TBE 0.5X, 1.4g αγαρόζης και 3.75 μ L EtBr.

Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

- Στα Eppendorf της κατάτμησης προσθήκη 3 μ L Loading Buffer 10X. Ο τελικός όγκος κάθε διαλύματος είναι 3,3 μ L
- Φυγοκέντρηση στα 8 RPM για 30 sec.

Ηλεκτροφόρηση και Γονοτύπηση

Ηλεκτροφόρηση έγινε όπως προηγουμένως, σε ένταση 25 mA, σε θερμοκρασία δωματίου για 60-90 min, παρουσία Ladder.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, παρατηρήθηκαν οι ζώνες των προϊόντων της κατάτμησης και ανάλογα με τον αριθμό των ζωνών που εμφανίστηκαν, τα άτομα χαρακτηρίστηκαν ως:

- Ομοζυγώτες χωρίς το αλληλόμορφο T, όταν είχαν μοναδική ζώνη 458 nt
- Ετεροζυγώτες, όταν εμφάνιζαν 3 ζώνες 458 bp, 387 bp και bp
- Ομοζυγώτες με το αλληλόμορφο T, όταν είχαν 2 ζώνες 387 bp και bp

3.2.8 Αλληλούχηση DNA

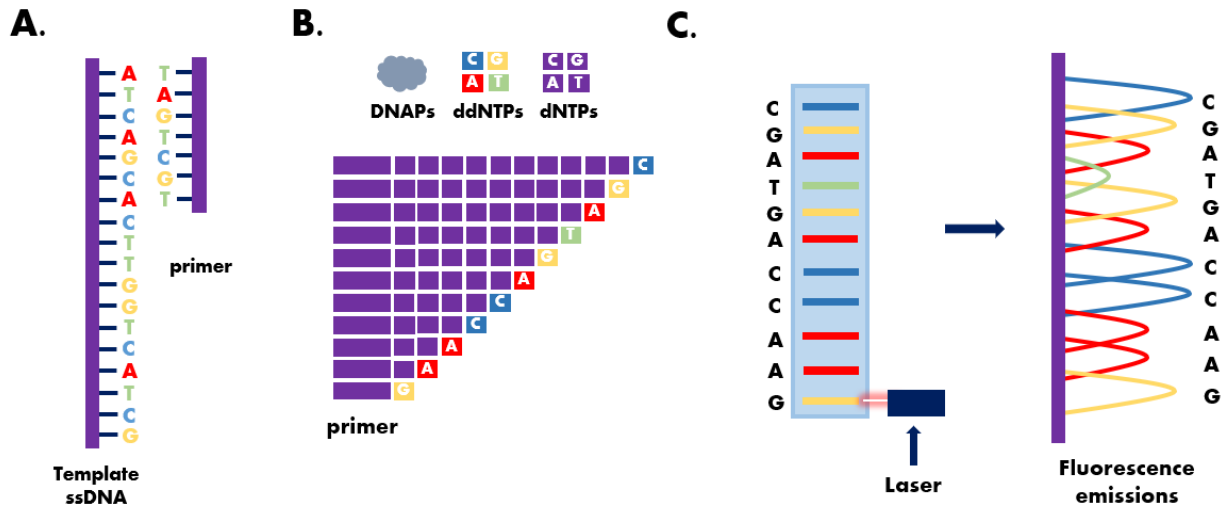
Δείγματα και των τριών γονοτύπων υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση από την εταιρεία Eurofins Genomics. Η αλληλούχηση έγινε με τη μέθοδο Sanger, μετά από καθαρισμό και προετοιμασία των διαλυμάτων των προϊόντων PCR και τη χρήση εκκινητών σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ο καθαρισμός των DNA της PCR έγινε με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, με τον ίδιο τρόπο που έγινε η απομόνωση DNA.

3.2.8.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Sanger [Εικόνα 3.2.8.1] αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους αλληλούχησης DNA, καθώς είναι σχετικά εύκολη και εξαιρετικά ακριβής. Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με χρήση τροποποιημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων, των διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) που ενσωματώνονται από την πολυμεράση του DNA κατά την αντιγραφή της αλυσίδας και αναστέλλουν την επιμήκυνσή της. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Chain Termination PCR: Πραγματοποιούνται τέσσερις PCR, παρουσία συμβατικών dNTPs και ενός είδους ddNTPs κάθε φορά, τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων δηλαδή, χωρίς -OH ομάδες στους 2' και 3' C της ριβόζης. Τα τροποποιημένα αυτά ddNTPs δεν επιτρέπουν στην DNA πολυμεράση να σχηματίσει 3',5'-φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ τους με επόμενα dNTPs, καθώς για αυτή τη διαδικασία απαιτεί παρουσία -OH στον 3' C της ριβόζης και έτσι διακόπτουν την επιμήκυνση. Τα ddNTPs ενσωματώνονται τυχαία κατά την επιμήκυνση, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται αντίγραφα που έχουν τερματιστεί σε όλα τα πιθανά μήκη. Κάθε είδος ddNTP είναι συνδεδεμένο και με μια διαφορετική φθορίζουσα ουσία.
2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR
3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Τα τμήματα DNA που έχουν προκύψει και έχουν διαχωριστεί με βάση το μέγεθός τους, αναγνωρίζονται από ειδικό υπολογιστή που

με λείζερ διεγείρει και ανιχνεύει τις φθοριζουσες ουσίες. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως χρωματογράφημα με διαφορετικές κορυφές φθορισμού για κάθε είδος ddNTP.



Εικόνα 3.2.8.1: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της αλληλούχησης κατά Sanger

3.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης, έγινε με το περιβάλλον προγραμματισμού και ανάλυσης δεδομένων R. Η R είναι μια εύχρηστη και ευρέως διαδεδομένη γλώσσα προγραμματισμού με την οποία μπορεί να γίνει στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, όπως η δημιουργία γραφημάτων, ενώ είναι συμβατή και με έτοιμα προγράμματα για στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μελετών συσχέτισης.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση:

- Υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η διάμεσος και η τυπική απόκλιση για τα βιομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά, για τη χρονική στιγμή follow-up-time-1 αλλά και για τις μεταβολές των μετρήσεων στα follow-up-time-3 και follow-up-time-3.
- Επιβεβαιώθηκε η απουσία συσχέτισης των δημογραφικών και των βιομετρικών χαρακτηριστικών, με την παρουσία διαφορετικών αλληλομόρφων του SNP.
- Σχηματίστηκαν θηκογράμματα που απεικονίζουν τα αποτελέσματα της νευροψυχιατρικής αξιολόγησης για κάθε γονότυπο ξεχωριστά, στις τρεις χρονικές στιγμές και για την παρουσία ή όχι ενός τουλάχιστον αλληλομόρφου T στις τρεις χρονικές στιγμές.
- Τέλος σχηματίστηκαν γραφικές παραστάσεις της μεταβολή του μέσου όρου των σκορ του BDI, των STAI X S και T, του SOC και του MQ τόσο για όλους τους νεοσυλλέκτους συνολικά, όσο και ειδικότερα για τους ομόζυγους με τον SNP, ομόζυγους χωρίς τον SNP και ετερόζυγους γονοτύπους αλλά και για τους φέροντες ή μη ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο T του SNP.

Για όλες τις παραπάνω αναλύσεις, υπολογίστηκε και η στατιστική σημαντικότητα (p-value) των αποτελεσμάτων

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Πληθυσμός

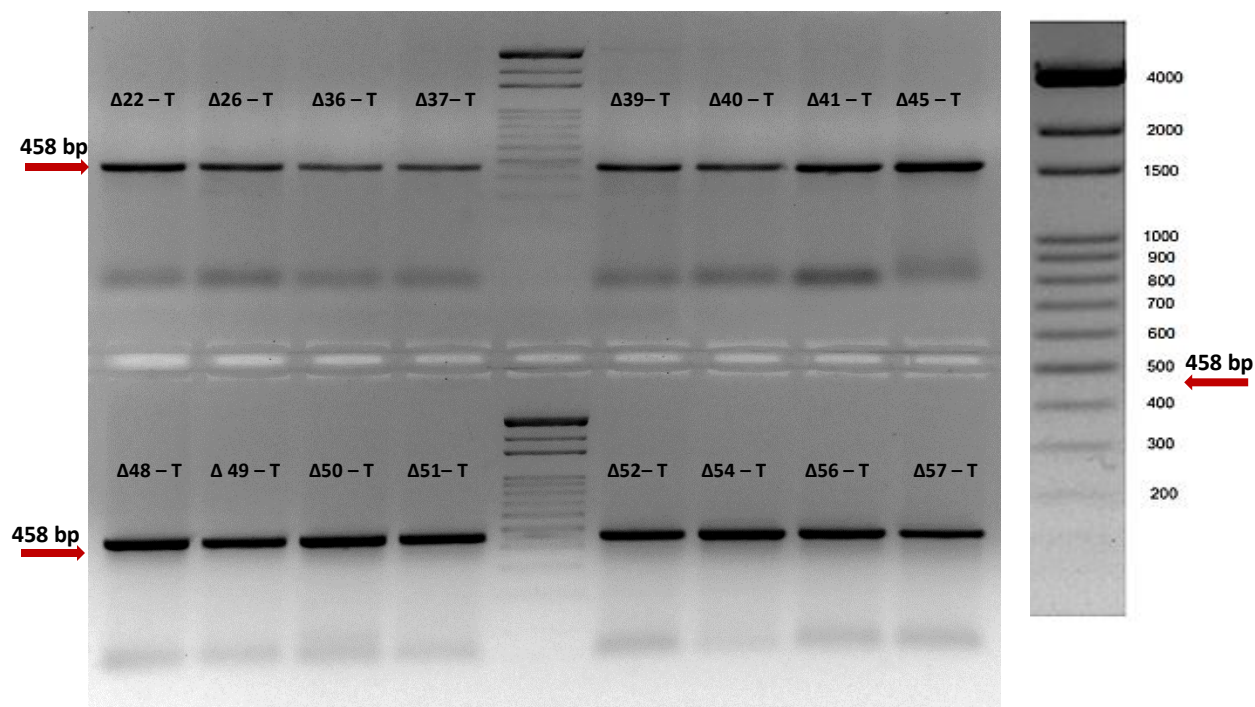
Μελετήθηκε ένα δείγμα 179 νεοσυλλέκτων ανδρών που δεν είχαν κάποια προϋπάρχουσα ψυχιατρική διαταραχή και ήταν ομοιογενείς ως προς τα δημογραφικά και τα βιομετρικά τους χαρακτηριστικά (Alexopoulos et al., 2020). Από αυτόν τον πληθυσμό έγινε επιτυχής απομόνωση DNA, PCR και γονοτύπηση με RFLP για 149 άτομα.

4.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου GALANIN με PCR

Τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου GALANIN, μήκους 458 bp, ενισχύθηκε με PCR. Ο συγκεκριμένος SNP εντοπίζεται στη θέση 388 [Εικόνα 4.2.i]. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1.5% w/v αгарόζης παρουσία του δείκτη μοριακών βαρών (Ladder) pPSU1 + pPSU2 + PstI [Εικόνα 4.2.ii].

```
5'- TTTCAGCAGATGACCCCGTGCTCTTCGGAAGCCCGGAGGTGCCACACTGTA  
CAAGTGTGATGCCTGGGATCCTGTGCTCCCCTGATGCCTGGGAATGGGGTGAAGG  
AACAGCCTAGGCTTGGGTTCCTCTCCTGGGTGTTCGGGACTTGGCCCCAGCTCA  
GGAAGGGTTTGTGGAGGAGCCAAGGAGGGCCTTGTTCCCTGTGGGATGTCTTTGCC  
TTGGGCACAAGGACAGCCTCTTGCTGCTGCTCTGCCCACCGCCCACCCCTTGGCG  
GCCTCTGGGAGTCTGGGCTGCTCTCCCTCTGGACCTAACCAGTTGCCCAATGGCTG  
GACCTGCTTAAAGCTCCCTCTTACAACCTGGACCAGGCAGCCAGGGGAGGCACTGA  
GAGGCC/TGAGCTTCTGAGCTGGTGCCTGTGGATGCTCGACGGTCCCGCAGCTC  
CCACAATGGGATGGCCAAGCAGAC - 3'
```

Εικόνα 4.2.i: Αλληλουχία του προϊόντος της PCR, με κατεύθυνση 5'→3'. Με κίτρινο φαίνονται οι αλληλουχίες του Forward primer και η αντίστροφη αλληλουχία του Reverse primer. Με κόκκινο φαίνεται η θέση του SNP, όπου μπορεί να εντοπίζεται είτε C, είτε T (dbSNP, Released Sep 21, 2022). Υπογραμμισμένα είναι η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BspI.



Εικόνα 4.2.ii: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% w/v. Στα δεξιά οι ζώνες του Ladder που χρησιμοποιήθηκε. Οι τιμές είναι το μήκος των ζωνών σε bp

4.3 Κατάτμηση των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση BspI

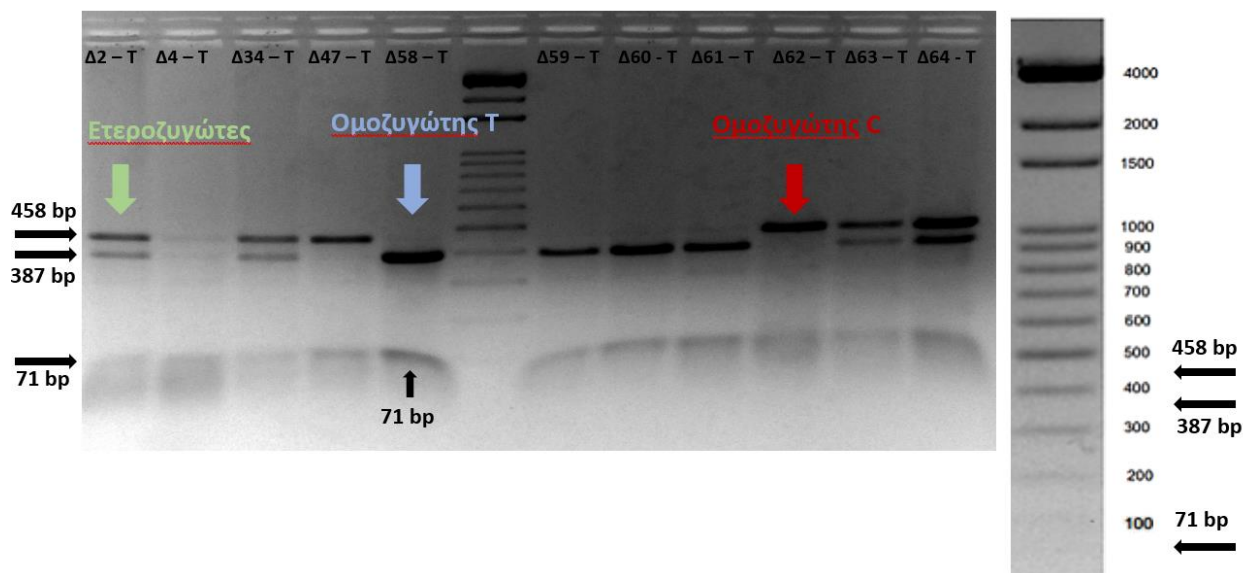
Τα προϊόντα της PCR μήκους 458 bp επώαστηκαν με την περιοριστική ενδονουκλεάση και τα μόρια που έφεραν T στη θέση 388 υπέστησαν κατάτμηση. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v. Για τους ομοζυγώτες με το T αλληλόμορφο σχηματίστηκαν δύο ζώνες μήκους 387 bp και 71 bp, αφού όλα τα προϊόντα PCR τους περιείχαν T αλληλόμορφο. Για τους ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο σχηματίστηκε μοναδική ζώνη 485 bp, αφού τα DNAs της PCR παρέμειναν ακέραια. Οι ετεροζυγώτες έχουν και τα δύο αλληλόμορφα, οπότε σχηματίστηκαν τρεις ζώνες 485 bp, 387 bp και 71bp.



Εικόνα 4.3.i: Η Θέση αναγνώρισης του Bpu1102I (BspI) (Thermo Fisher SCIENTIFIC). Το ένζυμο τέμνει μεταξύ των C και T. Στα αλληλόμορφα χωρίς τον SNP, το T αντικαθίσταται από C, μεταβάλλοντας την αλληλουχία, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζεται και να μην τέμνεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ BspI	ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗΣ
Ομόζυγος με το T αλληλόμορφο	NAI	➤ 387 bp ➤ 71 bp
Ομόζυγος με το C αλληλόμορφο	OXI	➤ 458 bp
Ετερόζυγος	NAI και OXI	➤ 458 bp ➤ 387 bp ➤ 71 bp

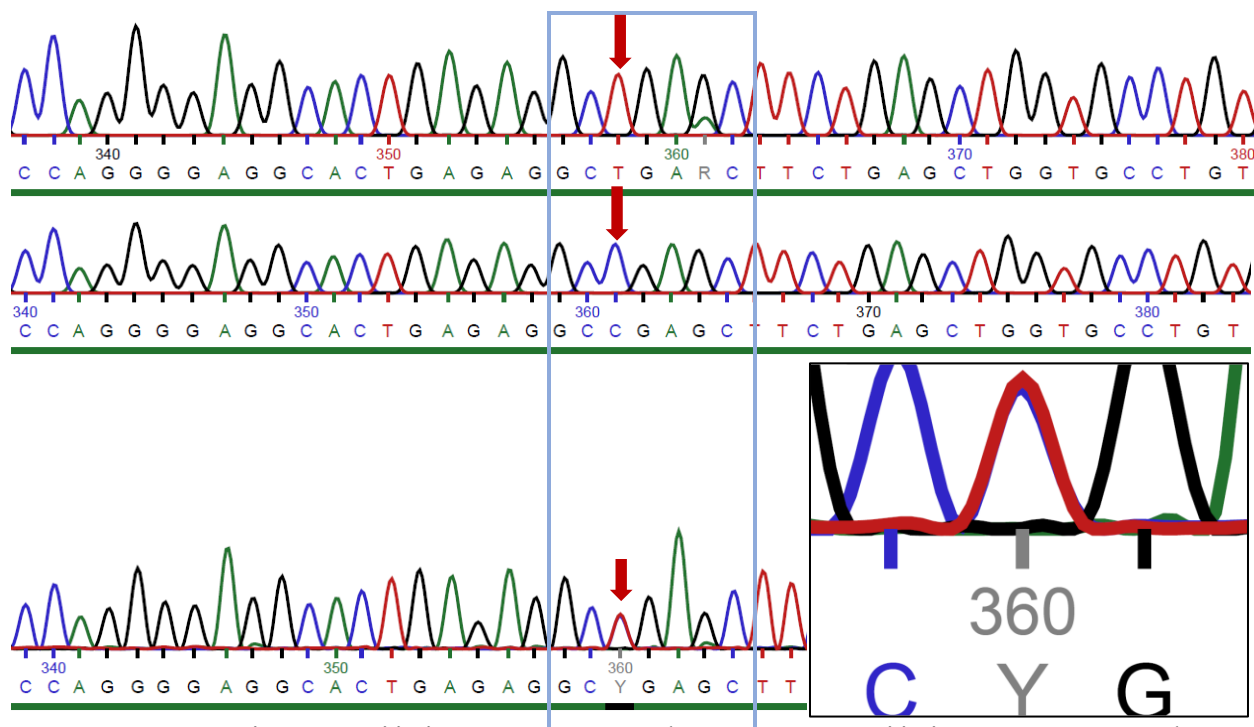
Πίνακας 4.3: Γονότυποι και αναμενόμενα προϊόντα κατάτμησης μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση BspI



Εικόνα 4.3.ii: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων κατάτμησης σε πήκτωμα αραρόζης 2% w/v. Στα δεξιά οι ζώνες του Ladder που χρησιμοποιήθηκε με το μήκος των ζωνών σε bp. Οι ζώνες μεγέθους 71 bp λόγω μικρού μεγέθους έχουν πολύ μικρή ένταση. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη ζώνη μεγέθους 458 bp ενός ατόμου ομοζυγώτη για το C αλληλόμορφο. Το μπλε βέλος δείχνει τη ζώνη μεγέθους 387 bp ενός ομοζυγώτη με το T αλληλόμορφο, ενώ στο κάτω μέρος φαίνεται και η ζώνη των 71 bp. Διακρίνονται τρεις ζώνες για τους ετεροζυγώτες (πράσινο βέλος).

4.4 Αλληλούχηση τριών γονοτύπων

Προϊόντα PCR από έναν ετεροζυγώτη, έναν ομοζυγώτη με το T αλληλόμορφο και έναν ομοζυγώτη με το C αλληλόμορφο υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της γονοτύπησης. Τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται παρακάτω, στις Εικόνες 4.4.i, 4.4.ii και 4.4.iii.



Εικόνα 4.4: Αποτελέσματα αλληλούχησης ενός ομοζυγώτη με το T αλληλόμορφο, ενός ομοζυγώτη με το C αλληλόμορφο και ενός ετεροζυγώτη. Η αλληλουχία αναγνώρισης του BlnI περικλείεται στο μπλε πλαίσιο και τα κόκκινα βέλη δείχνουν τον SNP. Το Y που εμφανίζεται στην αλληλουχία του ετεροζυγώτη είναι το σύμβολο της πυριμιδίνης κατά IUPAC, άρα στο σημείο εμφανίζονται τα αλληλόμορφα C και T.

4.5 Γενετικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού

Από τα 149 άτομα, στα οποία έγινε επιτυχής γονοτύπηση, οι 14 (9.4 %) ήταν ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο, οι 58 (38.9 %) ήταν ετεροζυγώτες και 77 (51.7%) ήταν ομοζυγώτες με το T αλληλόμορφο. Τα γενετικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	Πλήθος	Συχνότητα (N=149)
Ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο	14	9.4 %
Ετεροζυγώτες	58	38.9 %
Ομοζυγώτες με το T αλληλόμορφο	77	51.7 %
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ενός τουλάχιστον αλληλομόρφου Τα	Πλήθος	Συχνότητα carriers/non-carriers
T – allele – Carriers	135	90.6 %
Non-Carriers	14	9.4 %
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	Πλήθος	Συχνότητα Αλληλομόρφου* (N=298)
Τα	212	71.1 %
C	86	28.9 %
Συχνότητα αλληλομόρφων στον Ευρωπαϊκό Πληθυσμό: T = 75.35 % C=25.766 %		
Συχνότητα T αλληλομόρφου Παγκοσμίως: T = 67.9 % C=33.017 %		

Πίνακας 4.5: Γενετικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.

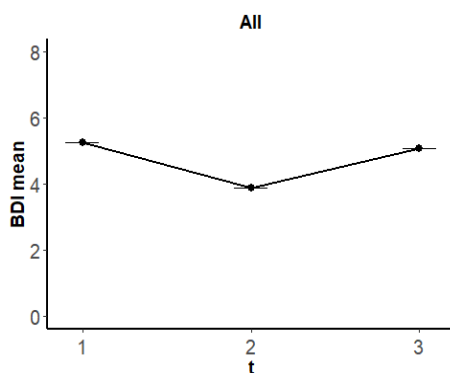
$$* \text{Συχνότητα αλληλομόρφου} = \frac{\text{Πλήθος ετεροζυγωτών} + (\text{πλήθος ομοζυγωτών} * 2)}{\text{Συνολικός πληθυσμός} * 2}$$

4.6 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τη μελέτη της παρουσίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς των σκορ των BDI, STAIX, SOC και MQ κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, υπολογίστηκαν οι p-values για όλον τον πληθυσμό και για τους επιμέρους γονοτύπους με τη μέθοδο Skillings-Mack. Το Skillings Mack test είναι η γενικευμένη μορφή του Friedman test και είναι μια μη παραμετρική στατιστική μέθοδος για τον εντοπισμό διαφορών στις τιμές όταν έχουν γίνει πολλαπλές μετρήσεις και χρησιμοποιείται όταν υπάρχουν ελλείψεις στην κατανομή των τιμών. Ο έλεγχος Kruskal-Wallis είναι μια στατιστική μέθοδος με την οποία ελέγχεται αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαμέσων περισσότερων από δύο μετρήσεων. Με το test αυτό για τις τρεις χρονικές στιγμές της περιόδου παρακολούθησης, μελετήθηκε αν οι τιμές των διαφορετικών γονοτύπων σε κάθε follow-up-time διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ως προς τη διάμεση τιμή τους. Οι υπολογισμοί αυτοί έγιναν με το περιβάλλον προγραμματισμού και ανάλυσης δεδομένων R.

4.6.1 Κατάθλιψη – BDI

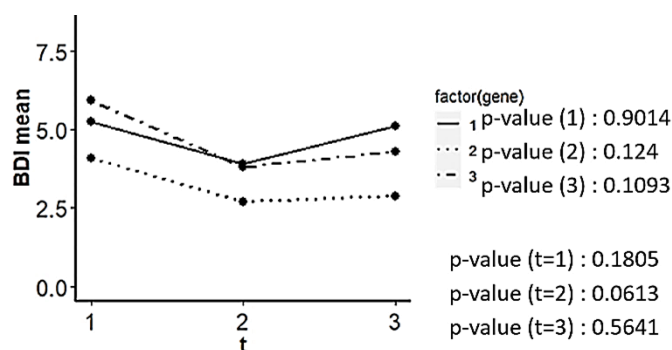
Για όλα τα άτομα-άνδρες, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα κατάθλιψης κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης [Γράφημα 4.6.1.i]



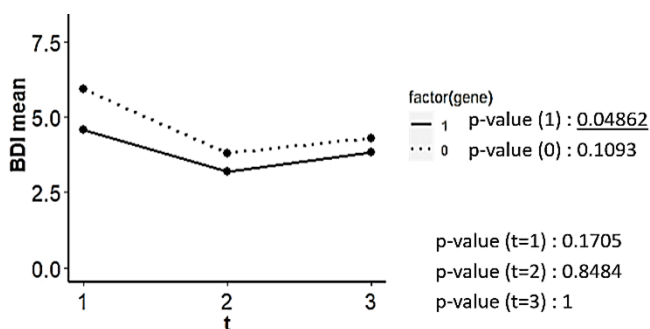
Γράφημα 4.6.1.i: Η μέση τιμή των BDI-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για όλον τον πληθυσμό. (Skillings-Mack p-value: 0.1109)

Δεν παρατηρήθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα κατάθλιψης για κανέναν από τους τρεις γονοτύπους κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης [Γράφημα 4.6.1.ii] Και στις τρεις χρονικές στιγμές τα επίπεδα κατάθλιψης δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά, καθώς τα p-values τόσο των γονοτύπων, όσο και των t, ήταν μεγαλύτερα από 0.05. Στα διχοτομημένα αποτελέσματα [Γράφημα 4.6.1.iii], οι φέροντες το T αλληλόμορφο εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων κατάθλιψης κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, κάτι που δεν παρατηρήθηκε για τους μη φέροντες το αλληλόμορφο

αυτό. Στις τρεις χρονικές στιγμές, τα BDI-scores δεν διαφέρουν για τους φέροντες και τους μη φέροντες το αλληλόμορφο T.



Γράφημα 4.6.1.ii: Οι μέσες τιμές των BDI-scores, την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time για τους ετεροζυγώτες (factor 1), τους ομοζυγώτες με T αλληλόμορφο (factor 2) και τους ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο (factor 3). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)

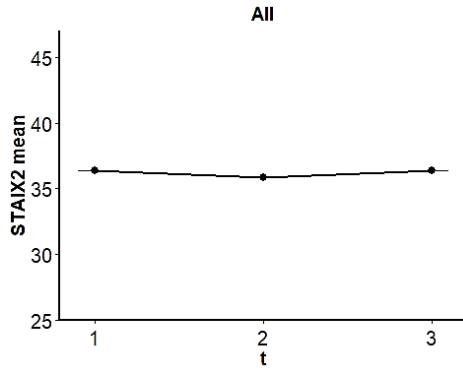


Γράφημα 4.6.1.iii: Οι μέσες τιμές των BDI-scores, την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time για τους φέροντες ένα τουλάχιστον T αλληλόμορφο (factor 1) και τους μη φέροντες T αλληλόμορφο (factor 0) (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)

4.6.2 Άγχος – STAI X

4.6.2.1 Αγχώδεις χαρακτήρες – Trait Anxiety, STAI X2

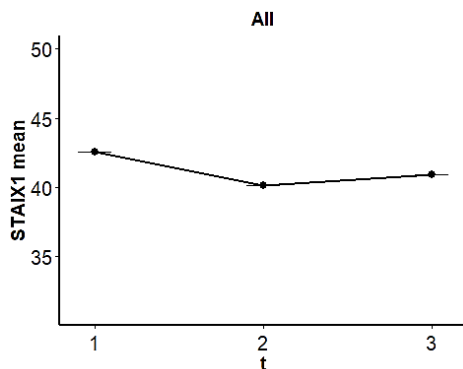
Η STAI X-T anxiety, αφορά στο άγχος ως μέρος του χαρακτήρα του ατόμου, λόγω χαρακτηριστικών όπως το φύλο και ο γονότυπός του, ανεξάρτητα από περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Δεν αναμένονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά του κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και πράγματι, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές για όλον τον πληθυσμό [Γράφημα 4.6.2.1]. Ακόμα, τα επίπεδα των επιμέρους γονοτύπων δεν εμφάνιζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους [p-value (t=1) : 0.997]



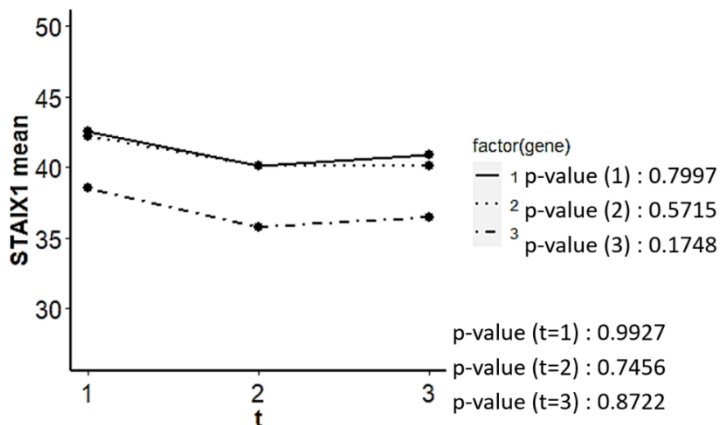
Γράφημα 4.6.2.1: Η μέση τιμή των STAIX-T scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για όλον τον πληθυσμό. (Skillings-Mack p-value: **0.9102**)

4.6.2.2 Άγχος ως αντίδραση στο περιβάλλον – State Anxiety, STAIX1

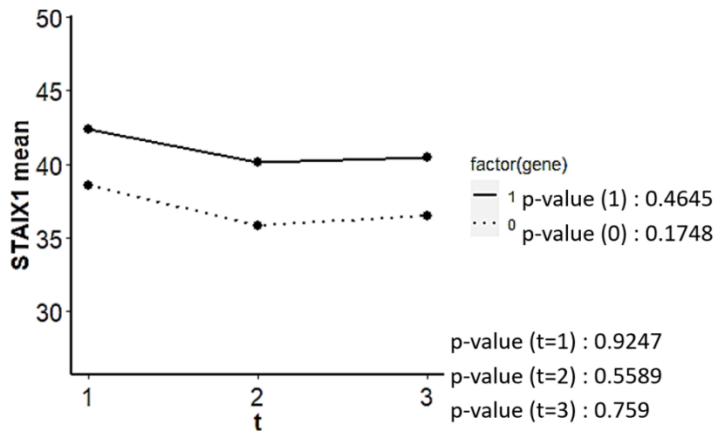
Μελετήθηκαν τα επίπεδα STAIX-S, του άγχους δηλαδή που αναπτύσσεται ως αντίδραση του οργανισμού σε περιβαλλοντικές στρεσογόνες καταστάσεις. Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν πρακτικά ίδια και στις τρεις χρονικές στιγμές, για όλον τον πληθυσμό [Γράφημα 4.6.2.2.i]. Το ίδιο ισχύει και για τους τρεις γονοτύπους ξεχωριστά αλλά και για τα διχοτομημένα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Και στις τρεις χρονικές στιγμές τα επίπεδα STAIX-S δεν διέφεραν μεταξύ carriers και non-carriers του T-αλληλομόρφου, αλλά και μεταξύ των τριών γονοτύπων [Γράφημα 4.6.2.2.ii και 4.6.2.2.iii]



Γράφημα 4.6.2.2.i: Η μέση τιμή των STAIX-s scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για όλον τον πληθυσμό. (Skillings-Mack p-value: **0.3482**)



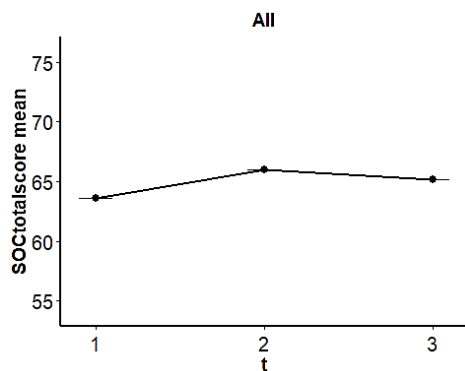
Γράφημα 4.6.2.2.ii: Η μέσες τιμές των STAIX-S scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους ετεροζυγώτες (factor 1), τους ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο (factor3). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)



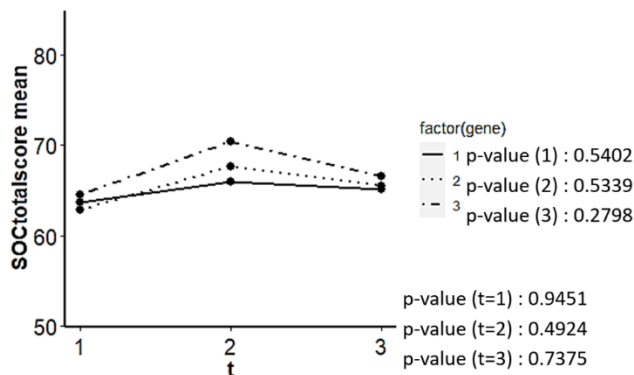
Γράφημα 4.6.2.2.iii: Η μέσες τιμές των STAIX-S scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους φέροντες ένα τουλάχιστον T αλληλόμορφο (factor 1) και τους μη φέροντες T αλληλόμορφο (factor 0). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)

4.6.3. Αίσθημα Συνοχής – SOC

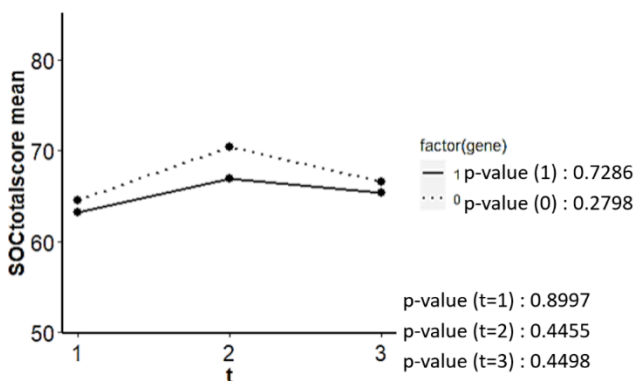
Όσον αφορά τα επίπεδα του αισθήματος συνοχής SOC και πάλι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή, τόσο για όλον τον πληθυσμό [Γράφημα 4.6.3.i], όσο και για τους επιμέρους γονοτύπους [Γράφημα 4.6.3.ii] και τα διχοτομημένα αποτελέσματα [Γράφημα 4.6.3.iii]. Οι διαφορές των SOC-scores ήταν όμοιες και στις τρεις μετρήσεις στα follow-up-time 1, follow-up-time 2 και follow-up-time 3.



Γράφημα 4.6.3.i: Η μέση τιμή των SOC-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για όλον τον πληθυσμό. (Skillings-Mack p-value:0.2285)



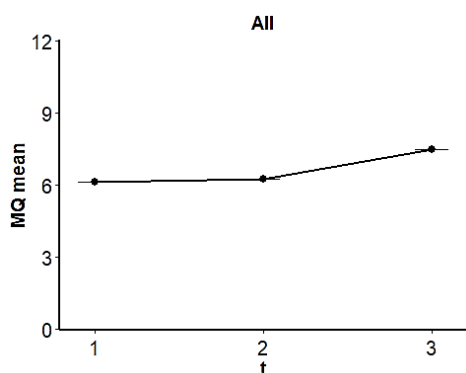
Γράφημα 4.6.3.ii: Η μέσες τιμές των SOC-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους ετεροζυγώτες (factor 1), τους ομοζυγώτες με T αλληλόμορφο (factor 2) και τους ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο (factor 3). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)



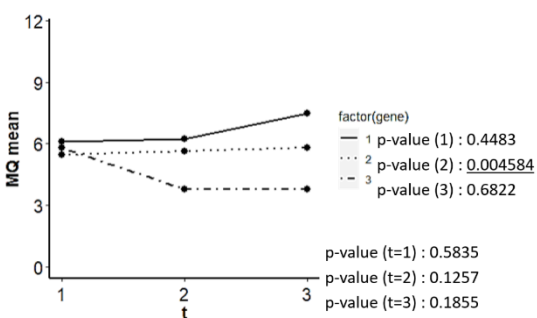
Γράφημα 4.6.3.iii: Η μέσες τιμές των SOC-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους φέροντες ένα τουλάχιστον T αλληλόμορφο (factor 1) και τους μη φέροντες T αλληλόμορφο (factor 0). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)

4.6.4 Ζωτική Εξάντληση – MQ

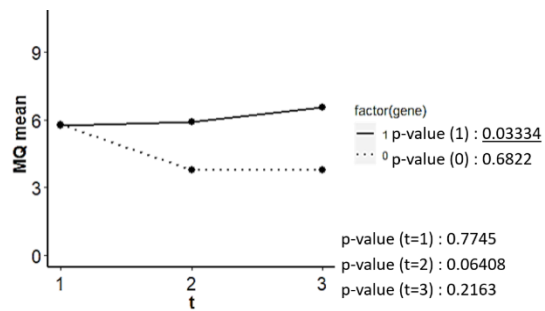
Τα επίπεδα ζωτικής εξάντλησης που μετρήθηκαν με το MQ δεν είχαν στατιστικά σημαντική μεταβολή κατά τη διάρκεια της μελέτης για όλον τον πληθυσμό [Γράφημα 4.6.4.i]. Οι ομοζυγώτες με το T παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων ζωτικής εξάντλησης, το ίδιο και οι έχοντες ένα τουλάχιστον T αλληλόμορφο [Γράφημα 4.6.4.ii και 4.6.4.iii]. Για τους υπόλοιπους γονοτύπους δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ για τις επιμέρους χρονικές στιγμές και πάλι δεν υπήρχε διαφορά στα σκορ της μέτρησης.



Γράφημα 4.6.4.i: Η μέση τιμή των MQ-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για όλον τον πληθυσμό. (Skillings-Mack p-value: 0.05801)



Γράφημα 4.6.4.ii: Η μέσες τιμές των MQ-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους ετεροζυγώτες (factor 1), τους ομοζυγώτες με T αλληλόμορφο (factor 2) και τους ομοζυγώτες με το C αλληλόμορφο (factor 3). (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)



Γράφημα 4.6.4.iii: Η μέσες τιμές των MQ-scores την πρώτη ημέρα (follow-up-time 1), την έκτη ημέρα (follow-up-time 2) και την δέκατη τρίτη ημέρα (follow-up-time 3) για τους φέροντες ένα τουλάχιστον T αλληλόμορφο (factor 1) και τους μη φέροντες T αλληλόμορφο (factor 0) (Οι p-values έχουν προκύψει από Skillings-Mack test για τους γονοτύπους και από Kruskal-Wallis test για τα t)

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κατάθλιψη και το άγχος, είναι σοβαρές ψυχιατρικές ασθένειες που πλήττουν ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες, αστικές κοινωνίες (Shahbazi et al., 2022). Είναι πολυπαραγοντικές νόσοι, καθώς περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν το φαινότυπό τους. Οι δύο διαταραχές έχουν κάποια κοινά συμπτώματα και μαζί με την κόπωση και άλλες νευρολογικές διαταραχές προκύπτουν ως απόκριση του οργανισμού στο περιβαλλοντικό στρες (Domschke et al., 2012). Μάλιστα, είναι πιθανόν, στρεσογόνα ερεθίσματα που ξεπερνούν έναν ελάχιστον ουδό έντασης να είναι το πραγματικό αίτιο της κατάθλιψης και του άγχους και ο φαινότυπος και η ένταση των συμπτωμάτων να διαφοροποιούνται από γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες (Consolo et al., 1994).

Η γενετική βάση της κατάθλιψης και του άγχους δεν είναι απόλυτα γνωστές. Η κληρονομησιμότητα της Μείζονος Κατάθλιψης είναι 37% και της Γενικευμένης αγχώδους Διαταραχής 31.6% στο γενικό πληθυσμό, χωρίς αυτές οι τιμές να είναι απόλυτες (Gottschalk et al., 2017; Sullivan et al., 2000). Και οι δύο διαταραχές έχουν συσχετιστεί με απορρύθμιση του Μονοαμινεργικού συστήματος ή γενικότερα του άξονα Υποθαλάμου–Υπόφυσης–Επινεφριδίων (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, HPA) αλλά και των μονοπατιών που αλληλοεπιδρούν με αυτό. Τα νευροπεπτίδια του άξονα εντέρου-εγκεφάλου (Gut-Brain Axis, GBA), ορμόνες και νευροδιαβιβαστές ρυθμίζουν το HPA αλλά και τα μονοπάτια του πόνου και της φλεγμονής. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν είναι ξεκάθαρες, γι αυτό και η αιτιοπαθολογία των διαταραχών της διάθεσης παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη (Chávez-Castillo et al., 2019).

Λόγω της αδυναμίας της αντιμετώπισης των συμπτωμάτων των διαταραχών της διάθεσης πολλών ασθενών μέσω φαρμακευτικής αγωγής (Kircova et al., 2022), τα τελευταία χρόνια η μελέτη έχει στραφεί στα νευροπεπτίδια, καθώς αυτά τα μικρά μόρια έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ρυθμίζουν μεγάλη ποικιλία νευρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της έκκρισης νευροδιαβιβαστών όπως της σεροτονίνης και της νοραδρεναλίνης (Gopalakrishnan et al 2021). Αν και έχει γίνει περιορισμένος αριθμός μελετών για το μόριο αυτό, είναι γνωστό ότι η γαλανίνη, καθώς επίσης και τα άλλα πεπτίδια που προκύπτουν από το γονίδιο GAL, εκφράζονται κυρίως στον εγκέφαλο αλλά και σε όλο το μήκος του άξονα εντέρου-εγκεφάλου και αυξομειώνουν την ένταση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και άγχους (Holmes and Picciotto, 2006). Η δράση τους εξαρτάται από το σημείο του ΚΝΣ στο οποίο θα εκφραστούν, από το είδος του υποδοχέα στον οποίο θα προσδεθούν καθώς επίσης και από την παρουσία διαφορετικών G-πρωτεϊνών στην περιοχή (Jiang et al., 2021). Μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον HPA επηρεάζουν τη διάθεση με ιστοειδικό τρόπο, αλλά και με φυλοειδικό τρόπο, μέσω του ελέγχου της απελευθέρωσης της luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) (Grigoriadis & Kennedy, 2002).

Η έκφραση του γονιδίου GALANIN ελέγχεται από ρυθμιστική περιοχή ανοδικά του, η οποία υπόκειται σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Αν και περιορισμένος αριθμός μελετών αφορούν ρυθμιστικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου, μη κωδικά SNPs έχουν συσχετιστεί με συμπτώματα άγχους και κατάθλιψης (Keszler et al., 2019, Wang et al., 2013).

Απόλυτη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4432027 με συμπτώματα κάποιας διαταραχής της διάθεσης, ως πολυμορφισμούς κινδύνου, θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση του

τρόπου με τον οποίο γίνεται διαφορική ρύθμιση του γαλανινεργικού συστήματος και των συστημάτων με τα οποία αλληλοεπιδρά, ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες και να γίνει έτσι ένα βήμα προς τη διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους το γονιδίωμα τελικά αλληλοεπιδρά και ρυθμίζεται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και με τη σειρά του επηρεάζει τη συμπεριφορά και την αντίδραση του οργανισμού σε αυτούς. Καλύτερη κατανόηση αυτών των μηχανισμών, θα μπορούσε να οδηγήσει και σε ανάπτυξη καλύτερων μεθόδων αντιμετώπισης των διαταραχών της διάθεσης και των συμπτωμάτων τους.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνέχεια της εργασίας των Alexopoulos et al. (2020), όπου είχαν μελετηθεί SNPs των γονιδίων απολιπρωτεΐνης E (Apolipoprotein E, APOE), του brain-derived neurotrophic factor (BDNF) και catechol-O-methyltransferase (COMT). Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες επηρεάζουν την αντίληψη του άγχους και την απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, ενώ συμμετέχουν και στην ανάπτυξη ασθενειών όπως το Alzheimer's και η Διαταραχή μετατραυματικού στρες (Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD), στη νευρογένεση και τη συναπτογένεση και στην απενεργοποίηση της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης αντίστοιχα. (Alexopoulos et al. (2020). Η μελέτη αυτή είχε την ιδιαιτερότητα, ότι αφορούσε ανθρώπους υγιείς, χωρίς προϋπάρχουσες ψυχιατρικές διαταραχές, οι οποίοι εκτέθηκαν σε ένα φαινομενικά ομοιογενές στρεσογόνο περιβάλλον, κάτι που δεν είναι πάντα εφικτό στις μελέτες σε ανθρώπους. Συνεπώς παρατηρείται πώς το ίδιο ερέθισμα, το οποίο μπορεί να προκαλέσει τις διαταραχές αυτές, μπορεί να επιφέρει φαινότυπο διαφορετικής έντασης, προφανώς εξαιτίας γενετικών ή επιγενετικών διαφορών μεταξύ των ατόμων που μελετώνται. Είναι επίσης από τις λίγες μελέτες για την κατάθλιψη και το άγχος, που αφορούν αποκλειστικά άνδρες, καταργώντας έτσι εν μέρει τη φυλοειδική διαφοροποίηση των συμπτωμάτων των διαταραχών. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε κατά πόσο ο SNP rs4432027 του γονιδίου GALANIN είναι πολυμορφισμός κινδύνου για την ανάπτυξη σοβαρότερων συμπτωμάτων άγχους, κατάθλιψης και ζωτικής εξάντλησης και για τη διαφοροποίηση του αισθήματος συνοχής, μετά από μια κοινή, σοβαρή στρεσογόνο εμπειρία, την στρατιωτική εκπαίδευση, σε υγιείς νεαρούς άνδρες.

Στη μελέτη των Alexopoulos et al. (2020) είχαν παρατηρηθεί στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της κατάθλιψης, του άγχους (STAIX-S) και του αισθήματος συνοχής και μάλιστα με συμπληρωματικό τρόπο, ενώ τα επίπεδα ζωτικής εξάντλησης παρέμειναν αμετάβλητα. Αυτές οι μεταβολές συμφωνούσαν με τις μεταβολές στο περιβάλλον των ανδρών. Η πρώτη περίοδος της εκπαίδευσης συνοδευόταν από υψηλά επίπεδα άγχους και κατάθλιψης καθώς οι νεοσύλλεκτοι ήρθαν αντιμέτωποι με ένα νέο, αυστηρό και αβέβαιο περιβάλλον. Αυτά τα συμπτώματα υποχώρησαν εν μέρει στο μέσον της περιόδου εκπαίδευσης, με μια ταυτόχρονη αύξηση του αισθήματος συνοχής, καθώς οι άνδρες είχαν συνηθίσει τις νέες συνθήκες και μπορούσαν να τις διαχειριστούν καλύτερα. Στο τέλος της εκπαίδευσης τα υψηλότερα επίπεδα άγχους και κατάθλιψης επανήλθαν, καθώς ξεκινούσε μια νέα αβέβαιη περίοδος.

Στην παρούσα μελέτη, για το σύνολο των ατόμων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές για κανέναν από τους φαινοτύπους που μελετήθηκαν, δηλαδή τα επίπεδα κατάθλιψης (BDI), του άγχους STAIX-T και STAIX-S και τα επίπεδα του αισθήματος συνοχής (SOC) και ζωτικής εξάντλησης (MQ). Το γεγονός ότι τα επίπεδα του άγχους STAIX-T

παρέμειναν σταθερά, είναι αναμενόμενο, καθώς το άγχος αυτό δεν επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά οφείλεται σε ειδικά χαρακτηριστικά του ατόμου, όπως το φύλλο και ο χαρακτήρας του. Στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων κατάθλιψης (BDI) παρατηρήθηκε μόνο στους φορείς του T αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs4432027. Η μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης στα άτομα αυτά, συνοδευόταν από στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της ζωτικής εξάντλησης των ομόζυγων ατόμων με το T αλληλόμορφο και συνολικά των φορέων ενός τουλάχιστον T αλληλομόρφου, τα οποία εμφάνισαν μια μικρή αύξηση σε όλη τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους γονοτύπους και αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις της μελέτης των Alexopoulos et al. Για καμία από τις μετρήσεις εν τω μεταξύ, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφορετικών γονοτύπων στην ίδια χρονική στιγμή follow-up-time. Τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδεικνύουν μια πιθανή συσχέτιση του T αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs4432027 με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα στρεσογόνα ερεθίσματα, αφού οι φορείς του T εμφάνισαν μείωση στα επίπεδα κατάθλιψης. Η ανθεκτικότητα αυτή φαίνεται να αντισταθμίζεται από μία αύξηση των συμπτωμάτων ζωτικής εξάντλησης, το οποίο είναι σύμπτωμα τόσο της κατάθλιψης, όσο και του άγχους, αφού περιλαμβάνει ενοχλήσεις τόσο σωματικές, όσο και γνωστικές. Η αντίθεση αυτή ίσως υποδεικνύει το ψυχικό κόστος της προσπάθειας βελτίωσης των καταθλιπτικών συμπτωμάτων στην ομάδα των φορέων T. Πάντως, η παρατήρηση αυτή χρήζει περαιτέρω μελέτης. Εφόσον η κατάθλιψη, το άγχος και η ζωτική εξάντληση έχουν αλληλεπικαλυπτόμενους φαινοτύπους, τα ανωτέρω αποτελέσματα συμφωνούν εν μέρει και με τα αποτελέσματα των Keszler et al. (2019), όπου το αλληλόμορφο C του rs4432027 συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα άγχους σε καυκάσιους (Ούγγρους) νέους (18-35 ετών), αν και δεν είχε από μόνο του κάποια σημαντική επίπτωση στα συμπτώματα της κατάθλιψης. Ακόμα και αυτές οι μικρές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν πάντως, επιβεβαιώνουν τη σημασία του γαλανινεργικού συστήματος στη ρύθμιση του φαινοτύπου της κατάθλιψης. Επιπλέον, στηρίζουν την υπόθεση των Uschuld et al. (2008), ότι εν τέλει, η ρύθμιση του γονιδίου της γαλανίνης και συνεπώς των επιδράσεών της στις διαταραχές της διάθεσης, ρυθμίζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις και όχι τόσο από το γονιδίωμα αυτό καθαυτό.

Αυτά τα αποτελέσματα βεβαία, έρχονται σε αντίθεση με τη μελέτη των Conceição Machado et al. (2018), οι οποίοι δεν παρατήρησαν κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4432027 με την κατάθλιψη, σε εφήβους από τη Βραζιλία. Ο SNP δεν συσχετίστηκε με άγχος και κατάθλιψη ούτε στις μελέτες των Uschuld et al. (2008) και Wang et al. (2013). Τα παραπάνω δεδομένα, ίσως επιβεβαιώνουν την υπόθεση των Uschuld et al. (2008) ότι ο πολυμορφισμός αυτός εν τέλει δεν επηρεάζει από μόνος του τα επίπεδα των νευροψυχιατρικών διαταραχών, αλλά έχει ανισορροπία σύνδεσης με τον SNP rs948854 που πράγματι επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου GALANIN, αφού έχει συσχετιστεί με άγχος τόσο μόνος του, όσο και στον απλότυπο rs948854 C_rs4432027_C. Ο rs948854 από την άλλη, έχει συσχετιστεί και με συμπτώματα κατάθλιψης σε εφήβους (Conceição Machado et al., 2018). Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από τα αποτελέσματα των Wang et al. (2013), οι οποίοι, μελετώντας ασθενείς Μείζονος κατάθλιψης και υγιή-controls, συσχέτισαν το T αλληλόμορφο σε απλότυπο G-G-A-A-

A-T των rs2510387-rs2513297-rs2187331-rs948854-rs2097042-rs4432027 ($p=0.005$) με παρουσία της διαταραχής. Άρα, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια ισχυρή συσχέτιση κάποιου από τα αλληλόμορφα του πολυμορφισμού rs4432027 με κάποια συγκεκριμένη διαταραχή της διάθεσης. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια, ότι και οι ίδιοι ο Wang et al. (2013) παρατήρησαν διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματά τους σε σχέση με αντίστοιχες, προηγούμενες μελέτες σε άτομα άλλης φυλής, συμπεραίνοντας ότι πιθανώς υπάρχουν και διαφορές της ρύθμισης του γαλανινεργικού συστήματος, όχι μόνο με ειδικό για κάθε είδος, ιστοειδικό και φυλοειδικό τρόπο, αλλά και με διαφοροποιήσεις για τις διαφορετικές φυλές (Wang et al., 2013).

Οι παραπάνω υποθέσεις απαιτούν περεταίρω μελέτη, καθώς και η δεδομένη μελέτη παρουσίαζε ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, το πλήθος των συμμετεχόντων (179) ήταν πολύ μικρό για να βγουν ασφαλή συμπεράσματα και ήταν ακόμη μικρότερο το πλήθος των δειγμάτων για τα οποία ήταν επιτυχείς η PCR και η γονοτύπηση (149). Ο αριθμός των με το C αλληλόμορφο που προέκυψαν, επίσης ήταν πάρα πολύ μικρός (14), με αποτέλεσμα οποιαδήποτε μεταβολή των μη φερόντων T αλληλόμορφο να μην είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης, ήταν σχετικά μικρή η περίοδος παρακολούθησης. Τα συμπτώματα κατάθλιψης πρέπει να ξεπερνούν τις δύο εβδομάδες σε διάρκεια για να χαρακτηριστούν ως καταθλιπτική διαταραχή (American Psychiatric organization, Torres, 2020). Το ίδιο ισχύει και για το άγχος, αφού οι διαταραχές πανικού δεν περιλαμβάνουν τα παροδικά συμπτώματα φόβου, αλλά μακροχρόνια, διαρκή και αυξανόμενα συμπτώματα (United States, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Mental Health). Τα συμπτώματα που μελετήθηκαν άλλωστε, ήταν εξαιρετικά ήπια (Alexopoulos et al., 2020) και μολονότι οι νευροψυχιατρικές αξιολογήσεις έγιναν με εγκεκριμένες μεθόδους, έγιναν με βάση τα υποκειμενικά κριτήρια των συμμετεχόντων, οι οποίοι μπορεί να εμφανίζουν μεροληψία ανάκλησης και αναφοράς πληροφοριών (recall and reporting bias), φαινόμενο σύνηθες σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων (Gonda et al., 2018). Δεν πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές μετρήσεις βιολογικών δεικτών του στρες όπως τα επίπεδα νοραδρεναλίνης ή αδρεναλίνης του πλάσματος για να γίνει μια πιο αντικειμενική ποσοτικοποίηση της έντασης των συμπτωμάτων κατάθλιψης και άγχους (Alexopoulos et al., 2020), ενώ δεν έγιναν και μετρήσεις της γαλανίνης στο πλάσμα, ώστε να γίνει κάποια συσχέτιση των συμπτωμάτων και του πολυμορφισμού με τα επίπεδα έκφρασης της γαλανίνης. Τέλος, το γεγονός ότι υπήρξε ένα κοινό στρεσογόνο ερέθισμα, δεν αναιρεί προηγούμενες στρεσογόνες εμπειρίες ζωής που μεταβάλλουν τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια και οι πολυμορφισμοί τους, που συσχετίζονται με το άγχος και την κατάθλιψη επηρεάζουν την ένταση των συμπτωμάτων σε μετέπειτα έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες και επιδρούν στη ρύθμιση των γενετικών παραγόντων του γαλανινεργικού συστήματος (da Conceição Machado et al., 2018; Laucht et al., 2009). Οι προηγούμενες εμπειρίες δεν αξιολογήθηκαν και δε λήφθηκαν υπόψη σε αυτή την μελέτη (Alexopoulos et al., 2020).

Συνοψίζοντας, στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, δεν προέκυψε ισχυρή συσχέτιση του T αλληλομόρφου με συμπτώματα κατάθλιψης και άγχους, ωστόσο τα άτομα που φέρουν το T αλληλόμορφο φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά σε στρεσογόνους παράγοντες που προκαλούν συμπτώματα κατάθλιψης, αλλά πιο επιρρεπή για εμφάνιση ζωτικής εξάντλησης. Σε μελλοντική

μελέτη θα μπορούσε να γίνει στατιστική ανάλυση για τους έχοντες και μη έχοντες ένα τουλάχιστον C αλληλόμορφο σε σχέση με τους φαινοτύπους των ατόμων, αλλά και μελέτη συσχέτισης του απλοτύπου rs948854 C_rs4432027_C και άλλων ρυθμιστικών SNPs του GALANIN, ώστε να μελετηθεί πιο ολοκληρωμένα η επίδραση των πολυμορφισμών της ρυθμιστικής περιοχής του GALANIN στην έκφραση του γονιδίου και στα συμπτώματα των διαταραχών της διάθεσης. Θα μπορούσε επίσης να γίνει μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού rs4432027 με την ένταση των συμπτωμάτων ατόμων που πάσχουν από κάποια διαταραχή, έτσι ώστε τα συμπτώματα να είναι πιο έντονα και προφανή.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexopoulos, P., Papanastasiou, A. D., Epsilonconomou, P., Beis, P., Niforas, M., Dassios, T. G., Kormpaki, A., Zarkadis, I. K., Reichel, M., Kornhuber, J., Perneczky, R., & Gourzis, P. (2021). Associations between APOE-, COMT Val108/158Met- and BDNF Val66Met polymorphisms and variations in depressive and anxiety symptoms, sense of coherence and vital exhaustion in the real-life setting of mandatory basic military training. *J Neural Transm (Vienna)*, 128(1), 105-114.
<https://doi.org/10.1007/s00702-020-02280-1>
- Amaral, P., Carbonell-Sala, S., Vega, F. M. D. L., Faial, T., Frankish, A., Gingeras, T., Guigo, R., Harrow, J. L., Hatzigeorgiou, A. G., Johnson, R., Murphy, T. D., Pertea, M., Pruitt, K. D., Pujar, S., Takahashi, H., Ulitsky, I., Varabyou, A., Wells, C. A., Yandell, M., Carninci, P., & Salzberg, S. L. (2023). The status of the human gene catalogue. *Preprint*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10055485/>
- Arias-de la Torre, J., Vilagut, G., Ronaldson, A., Serrano-Blanco, A., Martin, V., Peters, M., Valderas, J. M., Dregan, A., & Alonso, J. (2021). Prevalence and variability of current depressive disorder in 27 European countries: a population-based study. *Lancet Public Health*, 6(10), e729-e738.
[https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00047-5)
- Arvat, E., Gianotti, L., Ramunni, J., Grottoli, S., Brossa, P. C., Bertagna, A., Camanni, F., & Ghigo, E. (1995). Effect of galanin on basal and stimulated secretion of prolactin, gonadotropins, thyrotropin, adrenocorticotropin and cortisol in humans. *European journal of endocrinology*, 133(3), 300-304.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1530/eje.0.1330300>
- Barakat, T. S., Halbritter, F., Zhang, M., Rendeiro, A. F., Perenthaler, E., Bock, C., & Chambers, I. (2018). Functional Dissection of the Enhancer Repertoire in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 23(2), 276-288 e278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.014>
- Barde, S., Ruegg, J., Prud'homme, J., Ekstrom, T. J., Palkovits, M., Turecki, G., Bagdy, G., Ihnatko, R., Theodorsson, E., Juhasz, G., Diaz-Heijtz, R., Mechawar, N., & Hokfelt, T. G. (2016). Alterations in the neuropeptide galanin system in major depressive disorder involve levels of transcripts, methylation, and peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(52), E8472-E8481.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1617824113>
- Barr, A. M., Kinney, J. W., Hill, M. N., Lu, X., Biros, S., Rebek, J., Jr., & Bartfai, T. (2006). A novel, systemically active, selective galanin receptor type-3 ligand exhibits antidepressant-like activity in preclinical tests. *Neurosci Lett*, 405(1-2), 111-115.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.033>
- Barrera, G., Hernandez, A., Poulin, J. F., Laforest, S., Drolet, G., & Morilak, D. A. (2006). Galanin-mediated anxiolytic effect in rat central amygdala is not a result of corelease from noradrenergic terminals. *Synapse*, 59(1), 27-40. <https://doi.org/10.1002/syn.20208>
- Beesdo, K., Knappe, S., & Pine, D. S. (2009). Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *The Psychiatric clinics of North America*, 32(3), 483-524. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.06.002>
- Bing, O., Möller, C., Engel, J. A., Söderpalm, B., & Heilig, M. (1993). Anxiolytic-like action of centrally administered galanin. *Neuroscience letters*, 164(1-2), 17-20.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90846-d](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90846-d)
- Bosker, F. J., Hartman, C. A., Nolte, I. M., Prins, B. P., Terpstra, P., Posthuma, D., van Veen, T., Willemsen, G., DeRijk, R. H., de Geus, E. J., Hoogendijk, W. J., Sullivan, P. F., Penninx, B. W., Boomsma, D. I., Snieder, H., & Nolen, W. A. (2011). Poor replication of candidate genes for major depressive disorder using genome-wide association data. *Mol Psychiatry*, 16(5), 516-532.
<https://doi.org/10.1038/mp.2010.38>
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., & Walker, M. W. (2000). Galanin receptor subtypes. *Trends in pharmacological sciences*, 21(3). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01446-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01446-2)

- Brunner, S. M., Farzi, A., Locker, F., Holub, B. S., Drexel, M., Reichmann, F., Lang, A. A., Mayr, J. A., Vilches, J. J., Navarro, X., Lang, R., Sperk, G., Holzer, P., & Kofler, B. (2014). GAL3 receptor KO mice exhibit an anxiety-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(19), 7138-7143.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1318066111>
- Butts, C. L., & Sternberg, E. M. (2008). Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cellular immunology*, 252(1-2), 7-15.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.09.009>
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5631), 386-389.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- Chaplin, T. M., Hong, K., Bergquist, K., & Sinha, R. (2008). Gender differences in response to emotional stress: an assessment across subjective, behavioral, and physiological domains and relations to alcohol craving. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 32(7), 1242-1250.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00679.x>
- Chavez-Castillo, M., Nunez, V., Nava, M., Ortega, A., Rojas, M., Bermudez, V., & Rojas-Quintero, J. (2019). Depression as a Neuroendocrine Disorder: Emerging Neuropsychopharmacological Approaches beyond Monoamines. *Adv Pharmacol Sci*, 2019, 7943481.
<https://doi.org/10.1155/2019/7943481>
- Childs, E., Hohoff, C., Deckert, J., Xu, K., Badner, J., & de Wit, H. (2008). Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(12), 2791-2800.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/npp.2008.17>
- Cohen, B. E., Edmondson, D., & Kronish, I. M. (2015). State of the Art Review: Depression, Stress, Anxiety, and Cardiovascular Disease. *Am J Hypertens*, 28(11), 1295-1302.
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpv047>
- Collaborators, C.-M. D. (2021). Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet*, 398(10312), 1700-1712.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02143-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02143-7)
- Consolo, S., Baldi, G., Russi, G., Civenni, G., Bartfai, T., & Vezzani, A. (1994). Impulse flow dependency of galanin release in vivo in the rat ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), 8047-8051.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8047>
- da Conceicao Machado, F., de Souza, L. V., Rangel, M., Jara, Z. P., & do Carmo Franco, M. (2018). Implication of galanin gene rs948854 polymorphism in depressive symptoms in adolescents. *Horm Behav*, 97, 14-17. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.001>
- de Souza, M. M., Silote, G. P., Herbst, L. S., Funck, V. R., Joca, S. R. L., & Beijamini, V. (2018). The antidepressant-like effect of galanin in the dorsal raphe nucleus of rats involves GAL(2) receptors. *Neurosci Lett*, 681, 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.029>
- Domschke, K., & Reif, A. (2012). Behavioral genetics of affective and anxiety disorders. *Curr Top Behav Neurosci*, 12, 463-502. https://doi.org/10.1007/7854_2011_185
- Douma, S. L., Husband, C., O'Donnell, M. E., Barwin, B. N., & Woodend, A. K. (2005). Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors. *Advances in nursing science*, 28(4), 364-375.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00012272-200510000-00008>
- Dunn, E. C., Brown, R. C., Dai, Y., Rosand, J., Nugent, N. R., Amstadter, A. B., & Smoller, J. W. (2015). Genetic determinants of depression: recent findings and future directions. *Harv Rev Psychiatry*, 23(1), 1-18. <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000054>

- Dyrbye, L., Thomas, M., & Shanafelt, T. (2006). Systematic Review of Depression, Anxiety, and Other Indicators of Psychological Distress Among U.S. and Canadian Medical Students. *Academic Medicine*, 81(4), 354-373. https://journals.lww.com/academicmedicine/Fulltext/2006/04000/Systematic_Review_of_Depression,_Anxiety,_and.9.aspx
- Funck, V. R., Fracalossi, M. P., Vidigal, A. P. P., & Beijamini, V. (2018). Dorsal hippocampal galanin modulates anxiety-like behaviours in rats. *Brain Res*, 1687, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.036>
- Garcia-Duran, L., Flores-Burgess, A., Cantero-Garcia, N., Puigcerver, A., Narvaez, J. A., Fuxe, K., Santin, L., Millon, C., & Diaz-Cabiale, Z. (2021). Galanin(1-15) Potentiates the Antidepressant-like Effects Induced by Escitalopram in a Rat Model of Depression. *Int J Mol Sci*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910848>
- Gonda, X., Hullam, G., Antal, P., Eszlari, N., Petschner, P., Hokfelt, T. G., Anderson, I. M., Deakin, J. F. W., Juhasz, G., & Bagdy, G. (2018). Significance of risk polymorphisms for depression depends on stress exposure. *Sci Rep*, 8(1), 3946. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22221-z>
- Gopalakrishnan, L., Chatterjee, O., Raj, C., Pullimamidi, D., Advani, J., Mahadevan, A., & Keshava Prasad, T. S. (2021). An assembly of galanin-galanin receptor signaling network. *J Cell Commun Signal*, 15(2), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00590-3>
- Gottschalk, M. G., & Domschke, K. (2017). Genetics of generalized anxiety disorder and related traits. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 159–168. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/kdomschke>
- Grigoriadis, S., & Kennedy, S. H. (2002). Role of estrogen in the treatment of depression. *American journal of therapeutics*, 9(6), 503-509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00045391-200211000-00008>
- Gundlach, A. L. (2002). Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *European journal of pharmacology*, 440, 255-268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01433-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01433-4)
- Herman, S. (2007). Sex Hormones and Epilepsy: No Longer Just for Women. *Sage Journals*, 8(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2007.00216>
- Hettema, J. M., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2001). A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. *The American journal of psychiatry*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.10.1568>
- Hökfelt, T., Tatemoto, K. (2008). 25 years with a multitasking neuropeptide. *Cell. Mol. Life Sci*, 65, 1791-1795. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00018-008-8152-9>
- Hollis, F., Isgor, C., & Kabbaj, M. (2013). The consequences of adolescent chronic unpredictable stress exposure on brain and behavior. *Neuroscience*, 249, 232-241. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.018>
- Holmes, A., Kinney, J. W., Wrenn, C. C., Li, Q., Yang, R. J., Ma, L., Vishwanath, J., Saavedra, M. C., Innerfield, C. E., Jacoby, A. S., Shine, J., Iismaa, T. P., & Crawley, J. N. (2003). Galanin GAL-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. *Neuropsychopharmacology*, 28(6), 1031-1044. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300164>
- Holmes, P. V., Yoo, H. S., & Dishman, R. K. (2006). Voluntary exercise and clomipramine treatment elevate prepro-galanin mRNA levels in the locus coeruleus in rats. *Neurosci Lett*, 408(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.057>
- Holzer, P., & Farzi, A. (2014). Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol*, 817, 195-219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_9
- Howard, D. M., Adams, M. J., Clarke, T. K., Hafferty, J. D., Gibson, J., Shirali, M., Coleman, J. R. I., Hagenaaars, S. P., Ward, J., Wigmore, E. M., Alloza, C., Shen, X., Barbu, M. C., Xu, E. Y., Whalley, H. C., Marioni, R. E., Porteous, D. J., Davies, G., Deary, I. J., Hemani, G., Berger, K., Teismann, H.,

- Rawal, R., Arolt, V., Baune, B. T., Dannlowski, U., Domschke, K., Tian, C., Hinds, D. A., and Me Research, T., Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics, C., Trzaskowski, M., Byrne, E. M., Ripke, S., Smith, D. J., Sullivan, P. F., Wray, N. R., Breen, G., Lewis, C. M., & McIntosh, A. M. (2019). Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nat Neurosci*, 22(3), 343-352. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0326-7>
- Juhász, G., Hullam, G., Eszlari, N., Gonda, X., Antal, P., Anderson, I. M., Hokfelt, T. G., Deakin, J. F., & Bagdy, G. (2014). Brain galanin system genes interact with life stresses in depression-related phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(16), E1666-1673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403649111>
- Karatayev, O., Baylan, J., & Leibowitz, S. F. (2009). Increased intake of ethanol and dietary fat in galanin overexpressing mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 43(8), 571-580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.09.025>
- Karlsson, R. M., & Holmes, A. (2006). Galanin as a modulator of anxiety and depression and a therapeutic target for affective disease. *Amino Acids*, 31(3), 231-239. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0336-8>
- Keszler, G., Molnar, Z., Ronai, Z., Sasvari-Szekely, M., Szekely, A., & Kotyuk, E. (2019). Association between anxiety and non-coding genetic variants of the galanin neuropeptide. *PLoS One*, 14(12), e0226228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226228>
- Kinney, J. W., Starosta, G., & Crawley, J. N. (2003). Central galanin administration blocks consolidation of spatial learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(1), 42-54. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00023-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00023-6)
- Koffer, B., Liu, M. L., Jacoby, A. S., Shine, J., & Iismaa, T. P. (1996). Molecular cloning and characterisation of the mouse preprogalanin gene. *Gene*, 182(1-2), 71-75. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00477-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00477-5)
- Kupcova, I., Danisovic, L., Grgac, I., & Harsanyi, S. (2022). Anxiety and Depression: What Do We Know of Neuropeptides? *Behav Sci (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/bs12080262>
- Kuteeva, E., Hokfelt, T., & Ogren, S. O. (2005). Behavioural characterisation of transgenic mice overexpressing galanin under the PDGF-B promoter. *Neuropeptides*, 39(3), 299-304. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.01.004>
- Kuteeva, E., Hokfelt, T., Wardi, T., & Ogren, S. O. (2008). Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell Mol Life Sci*, 65(12), 1854-1863. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8160-9>
- Kuteeva, E., Wardi, T., Hokfelt, T., & Ogren, S. O. (2007). Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17(1), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.03.003>
- Lach, G., Schellekens, H., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. *Neurotherapeutics*, 15(1), 36-59. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0585-0>
- Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., Hokfelt, T., & Kofler, B. (2015). Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev*, 67(1), 118-175. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006536>
- Lang, R., Gundlach, A. L., & Kofler, B. (2007). The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol Ther*, 115(2), 177-207. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.05.009>
- Lang, R., & Kofler, B. (2011). The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides*, 45(1), 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.10.005>

- Laucht, M., Treutlein, J., Blomeyer, D., Buchmann, A. F., Schmid, B., Becker, K., Zimmermann, U. S., Schmidt, M. H., Esser, G., Rietschel, M., & Banaschewski, T. (2009). Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 12(6), 737-747. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1461145708009875>
- Leibowitz, S. F., Dourmashkin, J. T., Chang, G.-Q., Hill, J. O., Gayles, E. C., Fried, S. K., & Wang, J. (2004). Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle. *Brain Research*, 1008(2), 168-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.030>
- Lewis, M. J., Johnson, D. F., Waldman, D., Leibowitz, S. F., & Hoebel, B. G. (2004). Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 28(12), 1822-1828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/01.alc.0000148099.12344.c8>
- Lim, A. S., Ellison, B. A., Wang, J. L., Yu, L., Schneider, J. A., Buchman, A. S., Bennett, D. A., & Saper, C. B. (2014). Sleep is related to neuron numbers in the ventrolateral preoptic/intermediate nucleus in older adults with and without Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, 137, 2847-2861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/brain/awu222>
- Liu, H.-X., & Hökfelt, T. (2002). The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends in pharmacological sciences*, 23(10), 468-474. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)02074-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02074-6)
- Locker, F., Bieler, L., Nowack, L. M. F., Leitner, J., Brunner, S. M., Zaunmair, P., Kofler, B., & Couillard-Despres, S. (2021). Involvement of Neuropeptide Galanin Receptors 2 and 3 in Learning, Memory and Anxiety in Aging Mice. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071978>
- Lu, X., Barr, A. M., Kinney, J. W., Sanna, P., Conti, B., Behrens, M. M., & Bartfai, T. (2005). A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 874-879. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0408891102>
- Markkula, N., & Suvisaari, J. (2017). Prevalence, risk factors and prognosis of depressive disorders. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*, 133(3), 275-282. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29205026/>
- Mathew, S. J., Price, R. B., & Charney, D. S. (2008). Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 148C(2), 89-98. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30172>
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L. K., Rebuffat, P., & Nussdorfer, G. G. (1992). Effects of galanin on the secretory activity of the rat adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*, 192(6), 373-381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02576294>
- McGuffin, P., Katz, R., Watkins, S., & Rutherford, J. (1996). A hospital-based twin register of the heritability of DSM-IV unipolar depression. *Archives of general psychiatry*, 53(2), 129-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830020047006>
- Merchenthaler, I., Hoffman, G. E., & Lane, M. V. (2005). Estrogen and estrogen receptor- β (ER β)-selective ligands induce galanin expression within gonadotropin hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons in the female rat brain. *Endocrinology*, 146(6), 2760-2765. <https://doi.org/https://doi.org/10.1210/en.2004-1562>
- Millon, C., Flores-Burgess, A., Narvaez, M., Borroto-Escuela, D. O., Gago, B., Santin, L., Castilla-Ortega, E., Narvaez, J. A., Fuxe, K., & Diaz-Cabiale, Z. (2017). The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15)

- in depression-like behaviours. *Neuropeptides*, 64, 39-45.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.01.004>
- Möller, C., Sommer, W., Thorsell, A., & Heilig, M. (1999). Anxiogenic-like action of galanin after intra-amygdala administration in the rat. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 21(4), 507-512.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00102-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00102-X)
- Morais, J. S., Souza, M. M., Campanha, T. M., Muller, C. J., Bittencourt, A. S., Bortoli, V. C., Schenberg, L. C., & Beijamini, V. (2016). Galanin subtype 1 and subtype 2 receptors mediate opposite anxiety-like effects in the rat dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res*, 314, 125-133.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.007>
- Morilak, D. A., Cecchi, M., & Khoshbouei, H. (2003). Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress. *Life sciences*, 73(6), 715-726.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00392-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00392-8)
- Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D. H., & Moore, S. S. . (2005). Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of animal science*, 83(1), 20-28.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2527/2005.83120x>
- O'Neal, H. A., Van Hoomissen, J. D., Holmes, P. V., & Dishman, R. K. (2001). Prepro-galanin messenger RNA levels are increased in rat locus coeruleus after treadmill exercise training. *Neuroscience letters*, 299(1-2), 69-72. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01780-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01780-8)
- O Borroto-Escuela, D., Narvaez, M., Di Palma, M., Calvo, F., Rodriguez, D., Millon, C., Carlsson, J., Agnati, L. F., Garriga, P., Diaz-Cabiale, Z., & Fuxe, K. (2014). Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GalR1 protomer of a GalR1-GalR2 heteroreceptor complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 452(3), 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.061>
- Okdeh, N., Mahfouz, G., Harb, J., Sabatier, J. M., Roufayel, R., Gazo Hanna, E., Kovacic, H., & Fajloun, Z. (2023). Protective Role and Functional Engineering of Neuropeptides in Depression and Anxiety: An Overview. *Bioengineering (Basel)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020258>
- Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews*, 22(4), 502-548.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>
- R., B. P. (2006). The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*, 1762(1), 17-18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.10.004>
- Rauch, I., Lundström, L., Hell, M., Sperl, W., & Kofler, B. (2007). Galanin message-associated peptide suppresses growth and the budded-to-hyphal-form transition of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4167-4170.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AAC.00166-07>
- Russell, P. J. (2009). *iGenetics: A Molecular Approach*. Benjamin Cummings.
- S., S. B. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods in molecular biology*, 578, 3-22.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1
- Saar, I., Runesson, J., Jarv, J., Kurrikoff, K., & Langel, U. (2013). Novel galanin receptor subtype specific ligand in depression like behavior. *Neurochem Res*, 38(2), 398-404.
<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0933-8>
- Salari, N., Hosseini-Far, A., Jalali, R., Vaisi-Raygani, A., Rasoulpoor, S., Mohammadi, M., Rasoulpoor, S., & Khaledi-Paveh, B. (2020). Prevalence of stress, anxiety, depression among the general population during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Global Health*, 16(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12992-020-00589-w>

- Sergeyev, V., Fetissov, S., Mathe, A. A., Jimenez, P. A., Bartfai, T., Mortas, P., Gaudet, L., Moreau, J. L., & Hokfelt, T. (2005). Neuropeptide expression in rats exposed to chronic mild stresses. *Psychopharmacology (Berl)*, 178(2-3), 115-124. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2015-3>
- Shahbazi, F., Shahbazi, M., & Poorolajal, J. (2022). Association between socioeconomic inequality and the global prevalence of anxiety and depressive disorders: an ecological study. *General Psychiatry*, 35(3). <https://doi.org/doi:10.1136/gpsych-2021-100735>
- Sullivan, P. F., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *The American journal of psychiatry*, 157(10), 1552–1562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>
- Tang, J., & Zhang, T. (2022). Causes of the male-female ratio of depression based on the psychosocial factors. *Front Psychol*, 13, 1052702. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.1052702>
- Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jörnvall, H., McDonald, T. J., & Mutt, V. (1983). Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS letters*, 164(1), 124-128. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80033-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80033-7)
- Torres, F. (2020). What Is Depression? *AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION*. <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>
- Unschuld, P. G., Ising, M., Erhardt, A., Lucae, S., Kohli, M., Kloiber, S., Salyakina, D., Thoeringer, C. K., Kern, N., Lieb, R., Uhr, M., Binder, E. B., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., & Keck, M. E. (2008). Polymorphisms in the galanin gene are associated with symptom-severity in female patients suffering from panic disorder. *J Affect Disord*, 105(1-3), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.05.006>
- Unschuld, P. G., Ising, M., Roeske, D., Erhardt, A., Specht, M., Kloiber, S., Uhr, M., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., & Binder, E. B. (2010). Gender-specific association of galanin polymorphisms with HPA-axis dysregulation, symptom severity, and antidepressant treatment response. *Neuropsychopharmacology*, 35(7), 1583-1592. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.30>
- Wang, P., Li, H., Barde, S., Zhang, M.-D., Sun, J., Wang, T., Zhang, P., Luo, H., Wang, Y., Yang, Y., Wang, C., Svenningsson, P., Theodorsson, E., Hökfelt, T. G. M., & Xu, Z.-Q. D. (2016). Depression-like behavior in rat: Involvement of galanin receptor subtype 1 in the ventral periaqueductal gray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(32), 4726–4735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1609198113>
- Wang, Y. J., Li, H., Yang, Y. T., Tie, C. L., Li, F., Xu, Z. Q., & Wang, C. Y. (2013). Association of galanin and major depressive disorder in the Chinese Han population. *PLoS One*, 8(5), e64617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064617>
- Webling, K. E., Runesson, J., Bartfai, T., & Langel, U. (2012). Galanin receptors and ligands. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 146. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00146>
- Wittchen, H. U., Knäuper, B., & Kessler, R. C. (1994). Lifetime risk of depression. *The British journal of psychiatry, Supplement*(26), 16–22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7873133/>
- Wray, N. R., Pergadia, M. L., Blackwood, D. H., Penninx, B. W., Gordon, S. D., Nyholt, D. R., Ripke, S., MacIntyre, D. J., McGhee, K. A., Maclean, A. W., Smit, J. H., Hottenga, J. J., Willemsen, G., Middeldorp, C. M., de Geus, E. J., Lewis, C. M., McGuffin, P., Hickie, I. B., van den Oord, E. J., Liu, J. Z., Macgregor, S., McEvoy, B. P., Byrne, E. M., Medland, S. E., Statham, D. J., Henders, A. K., Heath, A. C., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Boomsma, D. I., Madden, P. A., & Sullivan, P. F. (2012). Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry*, 17(1), 36-48. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.109>
- Wrenn, C. C., & Crawley, J. N. (2001). Pharmacological evidence supporting a role for galanin in cognition and affect. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(1), 283-299. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(00\)00156-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00156-1)

- Wright, A. F. (2005). Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. In *eLS*.
<https://doi.org/10.1038/npg.els.0005005>
- Yang, J. A., He, J. M., Lu, J. M., & Jie, L. J. (2018). Jun, Gal, Cd74, and C1qb as potential indicator for neuropathic pain. *J Cell Biochem*, 119(6), 4792-4798. <https://doi.org/10.1002/jcb.26673>
- Yang, X., Fang, Y., Chen, H., Zhang, T., Yin, X., Man, J., Yang, L., & Lu, M. (2021). Global, regional and national burden of anxiety disorders from 1990 to 2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Epidemiol Psychiatr Sci*, 30, e36.
<https://doi.org/10.1017/S2045796021000275>
- Yang, Y., Zhang, Y., Li, X. H., Li, Y., Qian, R., Li, J., & Xu, S. L. (2015). Involvements of galanin and its receptors in antinociception in nucleus accumbens of rats with inflammatory pain. *Neurosci Res*, 97, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.03.006>
- Yoshitake, T., Reenila, I., Ogren, S. O., Hokfelt, T., & Kehr, J. (2003). Galanin attenuates basal and antidepressant drug-induced increase of extracellular serotonin and noradrenaline levels in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 339(3), 239-242. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(03\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00020-x)
- Zhu, S., Hu, X., Bennett, S., Charlesworth, O., Qin, S., Mai, Y., Dou, H., & Xu, J. (2022). Galanin family peptides: Molecular structure, expression and roles in the neuroendocrine axis and in the spinal cord. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 1019943. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1019943>
- [Record #212 is using a reference type undefined in this output style.]