

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Νικηφόρος Β. Αγγελόπουλος

**ΚΑΙ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Αναστάσιος Ε. Γερμενής

# **ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ**

# **ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ**

# **ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ Δ. ΖΗΣΗ**

Συγχρηματοδότηση: *ΕΠΕΑΕΚ II*

ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα - Έργο: 282

*ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ*



**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ**

**ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ**  
**ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ**  
**ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**



**Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ**  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Νικηφόρος Β. Αγγελόπουλος** (επιβλέπων)

Καθηγητής Ψυχιατρικής

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Γεώργιος Κουκούλης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Νικηφόρος Β. Αγγελόπουλος**

Καθηγητής Ψυχιατρικής

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Γεώργιος Κουκούλης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας

**Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς**

Καθηγητής Φυσιολογίας

**Ματθαίος Σπελέτας**

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

**Οδυσσέας Μουζάς**

Λέκτορας Ψυχιατρικής



*Στην συμπαράσταση των γονέων μου*

*Στον Αντώνη που είναι δίπλα μου*





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>17</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>43</b>
<b>ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗΣ .....</b>	<b>113</b>
<b>ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ HAMILTON ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ .....</b>	<b>114</b>
<b>ΙΣΤΟΡΙΚΟ – ΔΙΑΓΝΩΣΗ .....</b>	<b>114</b>
<b>ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>114</b>
<b>ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ .....</b>	<b>116</b>
<b>A. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ .....</b>	<b>118</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ .....</b>	<b>47</b>
1. Ψυχιατρική νοσηρότητα.....	47
2. Συλλογή δειγμάτων αίματος .....	47
3. Ανοσοφαινότυπος περιφερικού αίματος .....	48
3.1. Προετοιμασία δειγμάτων για κυτταρομετρική ανάλυση.....	48
3.2. Κυτταρομετρικοί προσδιορισμοί .....	49
4. Λειτουργία φαγοκυττάρων.....	61
4.1. Έλεγχος φαγοκυττάρωσης.....	61
4.2. Έλεγχος οξειδωτικής έκρηξης.....	61
5. Λειτουργικός έλεγχος μονοκυττάρων .....	64
5.1 Προσδιορισμός κυτταροκινών – Μεθοδολογία Elispot.....	64
5.1.1. Απομόνωση μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος .....	66
5.1.2. Προτύπωση συνθηκών μεθόδου Elispot.....	67
5.1.3. Εφαρμογή της μεθόδου - Στάδια.....	73
5.2 Προσδιορισμός κυτταροκινών με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία .....	74
5.2.1. Εφαρμογή της μεθόδου - Στάδια.....	74

6. Πρωτεΐνες οξείας φάσεως .....	76
7. Στατιστική ανάλυση .....	76
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	77
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	107
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>111</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>113</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....</b>	<b>119</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>139</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>141</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>143</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κατάθλιψη έχει εξελιχθεί σε νόσημα που αποτελεί συνώνυμο του σύγχρονου τρόπου ζωής. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που συνδέουν τις καταθλιπτικές διαταραχές με διάφορα νοσήματα με ειδική αναφορά στις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στον δυτικό κόσμο, συμπεριλαμβάνοντας τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα και τον καρκίνο.

Η ιδέα ότι η ψυχολογική κατάσταση ενός ατόμου μετέχει στην ανοσιακή τροποποίηση του οργανισμού και επηρεάζει με τον τρόπο αυτό την έκβαση διαφόρων παθήσεων μπορεί να αναζητηθεί στην αρχαιότητα. Το 200 μ.χ. ο Γαληνός έγραψε ότι *“οι μελαγχολικές γυναίκες ήταν ποιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού συγκριτικά με τις αισιόδοξες γυναίκες”*. Κάνοντας μία ιστορική αναδρομή, μελέτες που πραγματεύονται τις επιδράσεις της κατάθλιψης και των καταστάσεων ψυχοκαταπόνησης στο ανοσιακό σύστημα δημοσιεύτηκαν σε δύο διαδοχικά κύματα, το πρώτο την δεκαετία του ‘50 και ένα μεγαλύτερο είχε έναρξη την δεκαετία του ‘80.

Τις τελευταίες δεκαετίες η πρόοδος και η ανακάλυψη νέων μεθόδων αξιολόγησης βιολογικών, ψυχολογικών, ενδοκρινικών και ανοσιακών παραγόντων έκανε δυνατή την προσέγγιση της αμφίδρομης αλληλεπίδρασης μεταξύ κεντρικού νευρικού, ενδοκρινικού και ανοσιακού συστήματος η οποία επέρχεται μέσω ουσιών που εκκρίνονται και από τα τρία συστήματα. Οι επιδράσεις των συστημάτων αυτών είναι τόσο στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους που μπορεί να θεωρηθεί ότι λειτουργούν ως ενιαία μονάδα. Γνωρίζοντας την στενή αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών αυτών συστημάτων γεννάται το ερώτημα κατά πόσο μεταβολές του ανοσιακού συστήματος επηρεάζουν ή μετέχουν στην παθογένεια διαφόρων ασθενειών ή λοιμώξεων καθώς και το αν η κατάθλιψη μεταβάλλει τον χρόνο έναρξης και την εξέλιξη χρόνιων νοσημάτων. Εφόσον ψυχολογικοί παράγοντες έχουν άμεση επίδραση σε νοσήματα που σχετίζονται με ανοσιακές διαταραχές, τότε είναι σημαντικό να διερευνηθεί κατά πόσο παρεμβάσεις που βελτιώνουν την ψυχική υγεία έχουν επίπτωση στην πορεία και έκβαση αυτών των ασθενειών. Εξίσου σημαντικό είναι να μεταφερθούν τα αποτελέσματα της βασικής έρευνας που πραγματοποιείται σε αυτό το πεδίο ώστε να έχουν εφαρμογές σε κλινικό επίπεδο με σκοπό την διαφύλαξη της ψυχικής υγείας και αντιστρόφως.

Παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει πραγματοποιηθεί προς την κατεύθυνση της διερεύνησης των ανοσιακών μεταβολών που συνοδεύουν την κατάθλιψη, τα μέχρι στιγμής ερευνητικά δεδομένα δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα και δεν έχει τεκμηριωθεί η αναφερόμενη ευαισθησία των ασθενών με κατάθλιψη στις λοιμώξεις.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να διερευνηθούν οι ανοσιακές διαταραχές που εμφανίζονται στην κατάθλιψη, μελετώντας παράλληλα και δείκτες της φυσικής ανοσίας η οποία ελάχιστα έχει διερευνηθεί. Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να δώσει απαντήσεις κατά πόσο στους ασθενείς με κατάθλιψη υπάρχουν μεταβολές του ανοσιακού συστήματος που σηματοδοτούν καταστολή της φυσικής ανοσίας, καθιστώντας τους έτσι επιρρεπείς στις λοιμώξεις.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Εκφράζω θερμές ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής παρακολούθησης της διατριβής μου. Ειδικότερα, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Ψυχιατρικής και Διευθυντή της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας) κ. Νικηφόρο Αγγελόπουλο για την ανάθεση της διατριβής, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη την πορεία της μελέτης.

Θερμότερες ευχαριστίες εκφράζω στον Καθηγητή Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας κ. Αναστάσιο Γερμενή, καθώς η καθοδήγηση και οι συμβουλές του ήταν καθοριστικής σημασίας. Στάθηκε δίπλα μου δάσκαλος, μου μετέδωσε το πάθος του για την έρευνα και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω έναν νέο για μένα «κόσμο» αυτόν της Ανοσολογίας, τον οποίο αγάπησα τόσο, που θάθελα να μου δοθεί η ευκαιρία να συνεχίσω να υπηρετώ.

Ευχαριστώ το Λέκτορα Ψυχιατρικής κ. Οδυσσέα Μουζά, τη συνάδελφο ψυχίατρο κ. Αγγελική Θεοχάρη καθώς και το νοσηλευτικό προσωπικό της Ψυχιατρικής Κλινικής για τη βοήθεια και τη συνεργασία τους κατά την συλλογή του υλικού της μελέτης.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, στο οποίο πραγματοποίησα όλες τις απαραίτητες μετρήσεις, για τη συνεργασία τους όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Ο καθένας, στο βαθμό που του αναλογούσε, φρόντισε για τις καλύτερες δυνατές συνθήκες φιλοξενίας μου σ' αυτό το χώρο. Ιδιαίτερα, αναφέρω τη συνάδελφο και φίλη, διδακτορική φοιτήτρια κ. Φανή Καλαλά, η βοήθεια της οποίας ήταν πολύ σημαντική, αναφορικά κυρίως με την εκπαίδευση μου στην κυτταρομετρία ροής. Με υπομονή και ενδιαφέρον ήταν δίπλα μου σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, το συνεργάτη του Εργαστηρίου, EU Marie-Curie Fellow κ. Βάιο Καρανίκα, αναφορικά με την εκμάθηση της τεχνικής Elispot, της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρίας και των κυτταροκαλλιιεργειών. Τέλος, το βιοχημικό κ. Δημήτρη Νικούλη, για τη βοήθεια του στους νεφελομετρικούς προσδιορισμούς και το μοριακό βιολόγο κ. Γεδεών Λουλέ για τη συνεργασία τους.

Ευχαριστίες εκφράζω στη συνάδελφο κ. Ευαγγελία Ντζάνη για τη βοήθεια της στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και το σύζυγο μου συνάδελφο Αντώνη Βούζα που με αγάπη και υπομονή στάθηκαν δίπλα μου.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

- 5-HT** (5-υδροξυτρυπτοφάνη) = σεροτονίνη
- ACTH** (adrenocorticotropin) = αδρενοκορτικοτροπίνη
- APC** (antigen presenting cell) = αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
- APPs** (acute phase proteins) = πρωτεΐνες οξείας φάσεως
- BcR** (B-cell receptor) = B κυτταρικός υποδοχέας
- BDNF** (brain-derived neurotrophic factor) = νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο
- CAAs** (competing amino acids) = ανταγωνιστικά αμινοξέα
- Con-A** (concanavalin-A) = κονκαναβαλίνη
- CRF** (corticotropin releasing factor) = παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης
- CRH** (corticotropin releasing hormone) = κορτικοτροπίνη
- CRP** (C-reactive protein) = C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
- CTLs** (cytolytic T cells) = κυτταρολυτικό T-λεμφοκύτταρο (CD8<sup>+</sup>)
- DST** (dexamethasone suppression test) = δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη
- HIV** (human immunodeficiency virus) = ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
- IDO** (indoleamine-2,3-dioxygenase) = 2,3 διοξυγονάση της ινδολεαμίνης
- IFN-γ** (interferon-γ) = ιντερφερόνη-γ
- IL-1** (interleukin-1) = ιντερλευκίνη-1
- IL-1ra** = ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1
- IL-6** (interleukin-6) = ιντερλευκίνη-6
- LCA** (Leucocyte Common Antigen) = κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο
- LPS** (lipopolysaccharide) = λιποπολυσακχαρίτης
- mAb** (monoclonal antibodies) = μονοκλωνικά αντισώματα
- MHC** (major histocompatibility complex) = μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
- N-CAM** (neural cell adhesion molecule) = μόριο προσκόλλησης της οικογένειας ICAM που εντοπίζεται στα νευρικό ιστό
- NFκβ** (nuclear factor κβ) = πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κβ
- NK κύτταρα** (natural killer cells) = φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
- NO** (nitric oxide) = νιτρικό οξύ
- PBMC** (peripheral blood mononuclear cells) = μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος
- PHA** (phytohemagglutinin) = φυτοαιμοσυγκολλητίνη
- PNV** (paraventricular nucleus) = παρακοιλιακοί πυρήνες

**PWM** (pokeweed mitogen) = μιτογόνο από το φυτό *Phytolacca americana*

**RBC** (red blood cells) = ερυθρά αιμοσφαίρια

**SD** (standard deviation) = σταθερή απόκλιση

**sIL-2R** (soluble IL-2 receptor) = διαλυτός υποδοχέας της IL-2

**sIL-6R** (soluble IL-6 receptor) = διαλυτός υποδοχέας της IL-6

**TcR** (T-cell receptor) = T-κυτταρικός υποδοχέας

**TH** (T-helper) = βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο

**TLR** (Toll-like receptors) = Toll-like υποδοχείς

**TNF** (tumor necrosis factor) = παράγοντας νέκρωσης των όγκων

**TRP** (tryptophan) = τρυπτοφάνη

**VCAM-1** (vascular cell adhesion molecule-1) = μόριο προσκόλλησης της οικογένειας

ICAM που εντοπίζεται στο ενδοθήλιο

**VP** = (vasopressin) αγγειοτασίνη

**VZV** ( varicella zoster virus) = ιός ανεμευλογιάς

**WBC** (white blood cells) = λευκά αιμοσφαίρια

**ΑΝΣ** = αυτόνομο νευρικό σύστημα

**ΚΝΣ** = κεντρικό νευρικό σύστημα



## ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---



## 1. ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Η κατάθλιψη ανήκει στις συναισθηματικές διαταραχές και αποτελεί την πιο συχνή ψυχική διαταραχή [1]. Η σημασία της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας της καταθλιπτικής διαταραχής δεν έγκειται μόνο στο μεγάλο αριθμό των ανθρώπων που υποφέρουν, αλλά και στον μεγάλο κίνδυνο αυτοκαταστροφής που απορρέει από την νόσο. Οι βιωματικές επιπτώσεις της κατάθλιψης για το άτομο που υποφέρει, είναι αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη σημασία. Μέτρο της οδύνης του αρρώστου είναι ότι συχνά βλέπει το θάνατο ως λύτρωση. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η κατάθλιψη για πολλούς ασθενείς είναι μια χρόνια και υποτροπιάζουσα νόσος.

Σύμφωνα με εκτιμήσεις της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (1990) η κατάθλιψη αποτελεί τη τέταρτη κατά σειρά αιτία που οδηγεί σε λειτουργική ανικανότητα. Διατυπώνεται επίσης η εκτίμηση ότι το έτος 2020 η κατάθλιψη θα αποτελεί την δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου και αναπηρίας παγκοσμίως [2].

Το 4-6% του γενικού πληθυσμού στον δυτικό κόσμο υποφέρει από κάποια μορφή κατάθλιψης [3, 4]. Στον Ελληνικό χώρο το ποσοστό αυτό αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου [5]. Η πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει κάποιο είδος καταθλιπτικής διαταραχής κατά τη διάρκεια της ζωής του ανέρχεται σε 20% για τις γυναίκες και 10% για τους άντρες [6]. Σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις τα ποσοστά είναι αρκετά υψηλότερα, το 8% των ατόμων αυτών θα αναπτύξουν μείζονα κατάθλιψη ενώ ένα ποσοστό της τάξεως 15% - 36% θα εμφανίσουν άλλες καταθλιπτικές διαταραχές. Η μελέτη της επιδημιολογίας της κατάθλιψης έχει δυσκολίες που απορρέουν από την πολυμορφία και την ετερογένεια των καταθλιπτικών συμπτωμάτων που δυσκολεύουν την διάγνωση, καθώς και από το γεγονός ότι άλλες επιδημιολογικές έρευνες αφορούν την κατάθλιψη ως διαταραχή (νόσο) και άλλες ως σύμπτωμα [7, 8]. Όσον αφορά την κατανομή στα δύο φύλα η κατάθλιψη υπερτερεί στις γυναίκες σε αναλογία 2:1 σε όλες τις ηλικίες.

## 1.1 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η αιτιολογία των καταθλιπτικών διαταραχών είναι πολυπαραγοντική. Δεν έχει βρεθεί έως σήμερα ένα συγκεκριμένο αίτιο που να ενοχοποιείται για την ανάπτυξη και εκδήλωση της νόσου. Πολλοί παράγοντες έχουν ερευνηθεί χωρίς να υπάρχουν τεκμηριωμένα στοιχεία με αποτέλεσμα η αιτιοπαθογένεια της κατάθλιψης να παραμένει άγνωστη.

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η ενδογενής κατάθλιψη συνδέεται με διαταραχές των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων του εγκεφάλου. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση η κατάθλιψη οφείλεται σε υπολειτουργία των νοραδρενεργικών και των σεροτονινεργικών συνάψεων λόγω μείωσης της συγκέντρωσης νοραδρεναλίνης και σεροτονίνης στο μεσοσυναπτικό διάστημα. Στην υπόθεση αυτή στηρίχθηκε η φαρμακευτική αντιμετώπιση της κατάθλιψης. Επίσης ο υποθαλάμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακός άξονας έχει συσχετιστεί με την αιτιοπαθογένεια της κατάθλιψης. Έχει αναφερθεί ότι σε περίπου 50% των καταθλιπτικών ασθενών παρατηρείται αύξηση της κορτιζόλης λόγω ενεργοποίησης του άξονα. Η ενεργοποίηση του άξονα συνδέεται και με ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος με συνέπεια αύξηση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF-α) και ως εκ τούτου δυσλειτουργία των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων.

Γενετικοί παράγοντες επίσης φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην αιτιοπαθογένεια τόσο της κατάθλιψης όσο και της μανιοκαταθλιπτικής διαταραχής. Έχει παρατηρηθεί ότι η καταθλιπτική διαταραχή όπως και η μανιοκατάθλιψη εμφανίζονται συχνότερα σε οικογένειες πασχόντων. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οικογενειών, διδύμων και υιοθεσίας. Με τις μελέτες οικογενειών διερευνάται η πιθανότητα η κατάθλιψη να έχει οικογενή χαρακτήρα. Βάσει των μελετών αυτών βρέθηκε ότι ο κίνδυνος νόσησης για την κατάθλιψη είναι περίπου 14% στους συγγενείς πρώτου βαθμού, ενώ είναι μόλις 5% στον γενικό πληθυσμό. Από τις μελέτες διδύμων προκύπτει ότι οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι έχουν βαθμό συμφωνίας για καταθλιπτική διαταραχή 54%, ενώ οι διζυγωτικοί 24%. Οι μελέτες υιοθεσίας έδειξαν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης κατάθλιψης σε υιοθετημένους των οποίων οι βιολογικοί γονείς είχαν επίσης καταθλιπτική διαταραχή. Τα αποτελέσματα των μελετών είναι σημαντικά διότι επιβεβαιώνουν την ύπαρξη κάποιου βαθμού κληρονομικής επιβάρυνσης και πάνω σε αυτά βασίζεται η ψυχιατρική γενετική συμβουλευτική των συναισθηματικών διαταραχών.

Στοιχεία της προσωπικότητας έχουν επίσης συσχετισθεί με την εμφάνιση της κατάθλιψης. Δύο τύποι είναι κυρίως ευάλωτοι, η καταθλιπτική προσωπικότητα με χαμηλή

ανοχή στις ματαιώσεις και μεγάλη συναισθηματική ευαισθησία, καθώς και η ιδεοψυχαναγκαστική προσωπικότητα.

Ψυχολογικές θεωρίες έχουν αναπτυχθεί που συνδέουν αιτιοπαθογενετικά την κατάθλιψη με παλαιές ή πρόσφατες ψυχολογικές εμπειρίες. Τρεις είναι οι κύριες θεωρίες, η ψυχαναλυτική θεωρία, η θεωρία της μαθημένης αβοηθησίας και οι γνωσιακές θεωρίες. Κατά την ψυχαναλυτική θεωρία η κατάθλιψη είναι αποτέλεσμα μιας ενδοστρεφόμενης εχθρότητας. Η απώλεια του “αγαπημένου αντικειμένου” έχει ως αποτέλεσμα τα αισθήματα μίσους που έτρεφε το άτομο για αυτό να εσωτερικεύονται κατευθυνόμενα προς τον ίδιο του τον εαυτό. Η θεωρία της μαθημένης αβοηθησίας βασίζεται σε ένα μοντέλο που αφορά πειραματόζωα τα οποία υποβάλλονται σε ηλεκτρικά ερεθίσματα τα οποία δεν μπορούν να αποφύγουν. Τελικά τα πειραματόζωα σταματούν να αντιδρούν σε παρόμοια μελλοντικά ερεθίσματα δεχόμενα κατά κάποιο τρόπο το γεγονός ότι είναι αβοήθητα. Τα πειράματα αυτά οδήγησαν στην παρατήρηση ότι κάτι ανάλογο παρατηρείται και στους καταθλιπτικούς ασθενείς, όπου υπάρχει η πεποίθηση ότι η απόκτηση επιθυμητών στόχων είναι ανέφικτη και ότι το άτομο δεν μπορεί να κάνει τίποτα για να αλλάξει αυτή την πραγματικότητα. Κατά τη γνωσιακή θεωρία υποστηρίζεται ότι ο τρόπος που οι καταθλιπτικοί επεξεργάζονται την πληροφορία ή ερμηνεύουν τα γεγονότα είναι λανθασμένος και η βάση είναι απαισιόδοξη, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν καταθλιπτικογόνες απόψεις.

Τέλος καταστάσεις ψυχοκαταπόνησης έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση ενός καταθλιπτικού επεισοδίου, κυρίως του πρώτου. Επίσης εκλυτικό παράγοντα για την ανάπτυξη της καταθλιπτικής διαταραχής μπορεί να αποτελέσει ένα σωματικό νόσημα δρώντας ως μη ειδικό στρεσογόνο ερέθισμα. Υπάρχουν βέβαια παθήσεις που σχετίζονται άμεσα με την κατάθλιψη, όπως ο καρκίνος της κεφαλής του παγκρέατος, η νόσος Cushing, ορισμένες ιογενείς λοιμώξεις. Στον καρκίνο του παγκρέατος η κατάθλιψη εμφανίζεται ως το πρώτο σύμπτωμα της νόσου.

## **1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ**

Η κλινική εικόνα της κατάθλιψης δεν είναι πάντα ίδια σε όλους τους πάσχοντες. Άλλοι εμφανίζουν λύπη, απελπισία και τάσεις αυτοκαταστροφής, άλλοι σωματικά ενοχλήματα και άλλοι εκφράζουν παράλληλα με το καταθλιπτικό συναίσθημα παραληρητικές ιδέες. Η ταξινόμηση και διάγνωση των συναισθηματικών διαταραχών γίνεται, είτε με βάση τα διαγνωστικά κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας

(WHO) ICD-10 (πίν. 1), είτε βάσει των διαγνωστικών κριτηρίων DSM-IV της Αμερικάνικης Ψυχιατρικής Εταιρείας.

### **Πίνακας 1.** Ταξινόμηση καταθλιπτικού επεισοδίου κατά ICD-10

---

#### **F32.0** Ήπιο καταθλιπτικό επεισόδιο

#### **F32.1** Μέτριας βαρύτητας καταθλιπτικό επεισόδιο

##### **F32.10** Χωρίς σωματικό σύνδρομο

##### **F32.11** Με σωματικό σύνδρομο

#### **F32.2** Βαρύ καταθλιπτικό επεισόδιο χωρίς ψυχωσικά στοιχεία

#### **F32.3** Βαρύ καταθλιπτικό επεισόδιο με ψυχωσικά στοιχεία

---

Για να τεθεί διάγνωση για το βαρύ καταθλιπτικό επεισόδιο χωρίς ψυχωσικά στοιχεία (F32.2) είναι απαραίτητο να υπάρχουν τα τρία τυπικά συμπτώματα (1-3) και, επιπλέον, τουλάχιστον τέσσερα από τα άλλα συμπτώματα (4-10) μερικά από τα οποία θα πρέπει να είναι πολύ έντονα (πίν. 2). Το καταθλιπτικό επεισόδιο πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον δύο εβδομάδες για να τεθεί διάγνωση.

Στο βαρύ καταθλιπτικό επεισόδιο με ψυχωσικά στοιχεία (F32.3) ισχύουν τα κριτήρια τα οποία έχουν περιγραφεί στο F32.2, παράλληλα διαπιστώνονται παραληρητικές ιδέες, ψευδαισθήσεις ή καταθλιπτική εμβροντησία.

### **Πίνακας 2.** Κριτήρια ICD-10 για τη διάγνωση του βαρέος καταθλιπτικού επεισοδίου

- 
1. Καταθλιπτικό συναίσθημα στη μεγαλύτερη διάρκεια της ημέρας, σχεδόν κάθε μέρα.
  2. Απώλεια ενδιαφέροντος και ευχαρίστησης.
  3. Μειωμένη ενεργητικότητα που συνοδεύεται από αυξημένη κόπωση και περιορισμένη δραστηριότητα.
  4. Μειωμένη συγκέντρωση και προσοχή.
  5. Μειωμένη αυτοεκτίμηση και εμπιστοσύνη στον εαυτό.
  6. Ιδέες ενοχής και αναξιότητας (ακόμη και στον ήπιο τύπο του επεισοδίου).
  7. Ζοφερές και απαισιόδοξες προοπτικές για το μέλλον.
  8. Ιδέες ή πράξεις αυτοκαταστροφής ή αυτοκτονίας.
  9. Διαταραχή του ύπνου (αϋπνία ή υπερυπνία) σχεδόν κάθε μέρα
  10. Μείωση της όρεξης με απώλεια βάρους.
-

## 2. ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ - ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Η ψυχονευροανοσολογία αποτελεί σχετικά νέο πεδίο έρευνας και πραγματεύεται τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κεντρικού νευρικού και ανοσιακού συστήματος, προσπαθώντας να διερευνήσει την οδό μέσω της οποίας ο ψυχισμός επηρεάζει την υγεία και επιδρά στην εμφάνιση ασθενειών. Είναι σημαντικό να διερευνηθεί αν και με ποιόν τρόπο τα άτομα που πάσχουν από καταθλιπτική διαταραχή ή αυτά σε συνθήκες ψυχοκαταπόνησης μπορούν να τροποποιήσουν τους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μίας ασθένειας ή να επηρεάσουν την σοβαρότητα και την εξέλιξη μίας νόσου. Ο Irwin [9] με την μελέτη του έδωσε φως στο δύσκολο αυτό κομμάτι που αφορά τις κλινικές επιπτώσεις της κατάθλιψης.

Είναι πλέον γνωστό βάσει νεότερων ερευνητικών δεδομένων ότι η κατάθλιψη αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη και την πορεία της νόσου όσον αφορά τις καρδιαγγειακές παθήσεις [10, 11]. Σε αντίθεση με τα όσα αφορούν τις καρδιαγγειακές παθήσεις, λιγότερα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση των ανοσιακών μεταβολών που παρατηρούνται στην κατάθλιψη στην παθογένεια λοιμώξεων και άλλων λοιμωδών νοσημάτων. Ο αριθμός των μελετών που πραγματεύονται την αλληλεπίδραση ανοσιακών και ψυχολογικών παραγόντων όσον αφορά την ανάπτυξη και την εξέλιξη των λοιμώξεων είναι μικρός. Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι άτομα σε συνθήκες ψυχοκαταπόνησης έχουν αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη λοιμώξεων [12, 13, 14], σε αυτές όμως τις πρώτες έρευνες δεν προσδιορίστηκε επακριβώς ο ρόλος του ανοσιακού συστήματος στην αιτιοπαθογένεια των λοιμώξεων.

Οι Cohen et al στην μελέτη τους το 1991 [14] ήταν από τους πρώτους που προσπάθησαν να τεκμηριώσουν πειραματικά την άποψη που ευρέως υπήρχε, ότι οι καταστάσεις ψυχοκαταπόνησης καταστέλλουν την ανοχή στις λοιμώξεις. Είναι γνωστό ότι όπως και στην κατάθλιψη και οι καταστάσεις ψυχοκαταπόνησης συνοδεύονται από ανοσιακές και νευροενδοκρινικές μεταβολές. Στην έρευνα αυτή σε δείγμα 394 ατόμων έγινε ρινική έγχυση ιών που προκαλούν αναπνευστική λοίμωξη. Αξιολογήθηκε η ανάπτυξη λοίμωξης από τα κλινικά συμπτώματα που εμφανιστήκαν καθώς και από τον τίτλο αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν έναντι του ιού. Παράλληλα εκτιμήθηκε με ερωτηματολόγια η ψυχολογική κατάσταση των εθελοντών. Τα αποτελέσματα της έρευνας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η βαρύτητα του ψυχολογικού στρες σχετίζεται άμεσα με αυξημένα ποσοστά ανάπτυξης αναπνευστικής λοίμωξης.

Προς την ίδια κατεύθυνση, σημαντική είναι και η επόμενη έρευνα των Cohen et al (1999) οι οποίοι μελέτησαν την πιθανότητα η τοπική παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών να σχετίζεται με ευπάθεια λοίμωξης από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα σε συνθήκες ψυχοκαταπόνησης [15]. Στη μελέτη αυτή 55 άτομα μολύνθηκαν με τον ιό της απλής γρίπης (influenza A), ενώ παράλληλα αξιολογήθηκαν, η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και τα ρινικά επίπεδα της IL-6. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της βαρύτητας του ψυχολογικού στρες και της ανάπτυξης λοίμωξης από τον ιό της απλής γρίπης. Επίσης τα άτομα που βίωναν μεγαλύτερο ψυχολογικό στρες πριν τον εμβολιασμό με τον ιό της απλής γρίπης εμφάνισαν μεγαλύτερη συγκέντρωση ρινικών επιπέδων IL-6.

Άλλη μία λοίμωξη που έχει μελετηθεί σε σχέση με καταθλιπτικές διαταραχές είναι η λοίμωξη από έρπητα ζωστήρα. Ο έρπητας ζωστήρας εμφανίζεται μετά από ενεργοποίηση του ιού της ανεμευλογιάς (Varicella Zoster Virus / VZV) εφόσον υπάρχει σε λανθάνουσα κατάσταση στον οργανισμό. Η συχνότητα και η βαρύτητα της λοίμωξης από τον έρπητα ζωστήρα αυξάνει σημαντικά με την ηλικία των ασθενών και η πλειονότητα των επεισοδίων λοίμωξης εμφανίζεται σε άτομα άνω των 60 ετών. Εν τούτοις τα αίτια της αυξημένης συχνότητας του ιού στους ηλικιωμένους και ο μηχανισμός ενεργοποίησης του από την λανθάνουσα κατάσταση δεν είναι γνωστά. Υπάρχουν στοιχεία ότι η κυτταρική ανοσία παίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση και τις επιπλοκές του έρπητα ζωστήρα [16]. Για το λόγο αυτό στην μελέτη των Irwin et al [17] ερευνήθηκε η επίδραση της κατάθλιψης ως παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη έρπητα ζωστήρα. Η επίδραση αυτή εκτιμήθηκε υπολογίζοντας το ποσοστό των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος που είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται σε απάντηση στο αντιγόνο του ιού της ανεμευλογιάς (VZV-RCF), σε άτομα με κατάθλιψη, μάρτυρες ανάλογου φύλου και ηλικίας καθώς και σε άτομα άνω των 60 ετών. Στους καταθλιπτικούς ασθενείς βρέθηκε μειωμένη κυτταρική απόκριση στο αντιγόνο του ιού της ανεμευλογιάς, συγκριτικά με τους μάρτυρες, εύρημα που αφορά και τα άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών.

Ακολούθησε προς την ίδια κατεύθυνση η μελέτη των Zorrilla et al [18] η οποία είχε σκοπό να προσδιορίσει εάν οι καταθλιπτικές διαταραχές και οι καταστάσεις ψυχοκαταπόνησης διευκολύνουν την επανεμφάνιση του ιού της ανεμευλογιάς και επηρεάζουν την πορεία της HIV λοίμωξης. Χρησιμοποιήθηκαν μετά-αναλυτικές τεχνικές για την ανασκόπηση των αποτελεσμάτων 16 δημοσιευμένων ερευνών που αφορούσαν την σχέση καταθλιπτικών διαταραχών και στρεσογόνων καταστάσεων με την πορεία την



λοίμωξης από τον ιό της ανεμευλογιάς, και 19 μελέτες που αφορούσαν την HIV λοίμωξη. Συμπερασματικά βρέθηκε και σε αυτή τη έρευνα ότι οι καταθλιπτικές διαταραχές αυξάνουν τον κίνδυνο για επανεμφάνιση του ιού της ανεμευλογιάς, ενώ δεν παρατηρήθηκε να επισπεύδουν την πορεία της HIV λοίμωξης.

Στην πρόσφατη μελέτη των Cruess et al [19] βρέθηκε ότι σε γυναίκες με HIV λοίμωξη η συνύπαρξη μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής σχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα των NK κυττάρων, όπως επίσης και με αύξηση των ενεργοποιημένων CD8<sup>+</sup> κυτταρολυτικών λεμφοκυττάρων και του ιϊκού φορτίου. Τα ευρήματα υποδηλώνουν εξασθένηση του ανοσιακού συστήματος και μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο νόσησης από HIV λοίμωξη.

### 3. ΑΝΟΣΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Είναι διάχυτη η αντίληψη ότι η κατάθλιψη και οι καταστάσεις ψυχοκαταπόνησης συνοδεύονται από αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης νοσημάτων ανοσιακής αιτιολογίας όπως αυτοάνοσων νοσημάτων, καρκίνου και λοιμώξεων.

Εξίσου παλαιά είναι και η προσπάθεια πειραματικής επιβεβαίωσης των σχέσεων και των αλληλεπιδράσεων του ανοσιακού συστήματος με το νευροενδοκρινικό. Από το 1919 ο Ishigami είχε μελετήσει την οψωνινοποίηση των μυκοβακτηρίων, κατά τη διάρκεια της ενεργού και της ανενεργού φάσης της φυματίωσης και είχε παρατηρήσει ότι η φαγοκυτταρική δραστηριότητα ελαττώνεται, όταν συνυπάρχει ισχυρό συναισθηματικό στρες, οδηγούμενος έτσι στο συμπέρασμα ότι το στρες προκαλεί ανοσοκαταστολή και ευαισθησία στη νόσο. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από σωρεία πειραμάτων, ώστε να εκφράζεται πλέον η υπόθεση ότι το ανοσιακό σύστημα αποτελεί ένα εσωτερικό αισθητήριο όργανο, το οποίο αναγνωρίζει μη αντιληπτά ερεθίσματα όπως βακτήρια, ιούς και άλλα αντιγόνα, και μεταδίδει πληροφορίες στο νευροενδοκρινικό σύστημα, μέσω ορμονών που εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αθροιστεί τεράστιος όγκος πληροφοριών που πείθουν ότι το νευροενδοκρινικό και το ανοσιακό σύστημα επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν προς διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού [20]. Απόδειξη αυτού αποτελεί η επιβεβαίωση της παραγωγής ορμονών και νευροπεπτιδίων από τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και διαφόρων κυτταροκινών, αντιστοίχως, από τους ενδοκρινείς αδένες, τα νευρικά κύτταρα και τη μικρογλοία. Η πολυπλοκότητα αυτών των φαινομένων είναι τέτοια που χρειάζεται διερεύνηση για την ένταξη όλων αυτών των πληροφοριών σε ενιαίο πλαίσιο.

Έχουν περάσει περισσότερα από 20 χρόνια από τότε που δημοσιεύθηκε η πρώτη μελέτη που αφορούσε τις ανοσιακές μεταβολές στην κατάθλιψη. Εντούτοις υπάρχουν πολλά κενά σχετικά με την κατανόηση των ανοσιακών διαταραχών της κατάθλιψης και των επιπτώσεών τους. Η κατάθλιψη έχει συσχετιστεί με μεταβολές διαφόρων παραμέτρων της ανοσιακής απάντησης, επάγοντας ταυτόχρονα τόσο την ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος όσο και την καταστολή ορισμένων λειτουργιών του [21, 22].

### 3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Η οδός διερεύνησης των ανοσιακών διαταραχών που συνοδεύουν την κατάθλιψη δεν ήταν κοινή μεταξύ των μελετητών. Οι ανοσιακές διαταραχές που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με καταθλιπτική διαταραχή μπορούν αδρά να διακριθούν σε διαταραχές που αφορούν τους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, σε διαταραχές της λειτουργικής ικανότητας των λευκοκυττάρων και τέλος σε δείκτες που υποδηλώνουν ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος [23]. Τα ευρήματα των κυριότερων μελετών έχουν συμπεριληφθεί στις δύο σημαντικές μετα-αναλύσεις που δημοσιεύθηκαν, η πρώτη από τους Herbert & Cohen [24] το 1993 και η δεύτερη από τους Zorrilla et al [25] το 2001.

Σε κυτταρικό επίπεδο έχει διερευνηθεί ο σχετικός και απόλυτος αριθμός των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους. Από τις πρώτες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση ήταν των Kronfol et al το 1984 [26] όπου παρατηρήθηκε αύξηση του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων (λευκοκυττάρωση), παράλληλα με αύξηση των ουδετεροφίλων, μείωση των λεμφοκυττάρων και μείωση των μονοκυττάρων [27, 28]. Τα ευρήματα αυτά αναπαράγονται σε μεταγενέστερες μελέτες [29, 30, 31] σε καταθλιπτικούς ασθενείς χωρίς αγωγή [32], αλλά και μετά την έναρξη αυτής [33]. Στην μετα-ανάλυση των Zorrilla et al [25] (πίν.3) επιβεβαιώνονται, εμφανίζοντας στατιστική σημαντικότητα, η απόλυτη λευκοκυττάρωση, η αύξηση του ποσοστού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και η απόλυτη λεμφοπενία. Επίσης, ενώ στις περισσότερες μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει μείωση του ποσοστού των μονοκυττάρων, σε άλλες εμφανίζεται μικρή αλλά σημαντική απόλυτη μονοκυττάρωση [33, 34], η οποία προφανώς επισκιάζεται από την μεγαλύτερη αύξηση των ουδετεροφίλων.

Ακολούθησαν μελέτες που διερεύνησαν με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής τον ανοσοφαινότυπο των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων και κυρίως των λεμφοκυττάρων. Με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι μεμβρανικών υποδοχέων των λεμφοκυττάρων μελετήθηκαν τα Β-λεμφοκύτταρα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και οι υποπληθυσμοί τους, καθώς και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK κύτταρα). Τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα συμβατά μεταξύ τους.

Όσον αφορά τα Β-λεμφοκύτταρα ( $CD19^+/CD20^+$ ) έχει αναφερθεί αύξηση τους [35, 36], ενώ άλλοι δεν παρατήρησαν διαφορά του απόλυτου αριθμού τους [37, 38, 39]. Στη μελέτη των Robertson et al [40] αναφέρεται επίσης αύξηση του διακεκριμένου

υποπληθυσμού των B-λεμφοκυττάρων ( $CD5^+$ ). Τα  $CD5$  B-κύτταρα ή B-1a κύτταρα αποτελούν τον επικρατούντα λεμφοκυτταρικό πληθυσμό στην περιτοναϊκή κοιλότητα και σχετίζονται με την παραγωγή IgM ανοσοσφαιρινών.

Ο απόλυτος αριθμός των T-λεμφοκυττάρων ( $CD3^+$ ) εμφανίζεται μειωμένος στην πλειονότητα των ερευνών. Αναλυτικότερα εμφανίζονται μειωμένα τα κυτταρολυτικά T-λεμφοκύτταρα ( $CD3^+/CD8^+$ ), ενώ έχει παρατηρηθεί αύξηση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ( $CD3^+/CD4^+$ ) κυρίως σε καταθλιπτικούς ασθενείς που ανθίστανται στη θεραπεία. Με βάση τα αποτελέσματα των δύο μετα-αναλύσεων στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίζεται μόνο όσον αφορά την αύξηση του λόγου βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων / κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων ( $CD4^+/CD8^+$ ) [21, 33, 34, 36, 37, 41]. Σημαντική είναι επίσης η αύξηση του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης  $CD25$  και  $HLA-DR$  [27, 29, 42]. Επιπροσθέτως έχει βρεθεί αύξηση του ποσοστού των μνημονικών, βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ( $CD3^+/CD4^+/CD45RO^+$ ) [21] χωρίς αυτή η παρατήρηση να επιβεβαιώνεται σε όλες τις μελέτες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσέγγιση της μελέτης του ανοσιακού συστήματος με βάση τον έλεγχο της λειτουργικής ικανότητας των λευκοκυττάρων. Η έρευνα έχει επικεντρωθεί σε μελέτες διέγερσης λεμφοκυττάρων με μιτογόνα, στην διερεύνηση της δραστηριότητας των NK κυττάρων και στην ικανότητα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων για φαγοκυττάρωση οψωνινοποιημένων βακτηρίων.

Επηρεασμένη είναι η ικανότητα των λεμφοκυττάρων για πολλαπλασιασμό μετά από ενεργοποίηση με τα κατάλληλα μιτογόνα όπως Con-A, PHA (T-λεμφοκύτταρα) και PWM (B-λεμφοκύτταρα), που στην πλειονότητα των μελετών εμφανίζεται μειωμένη [21, 22, 43, 44, 45]. Τα ευρήματα αυτά, τα οποία συνηγορούν υπέρ ανοσιακής καταστολής, δεν αναπαράγονται σε όλες τις μελέτες καθώς σε ορισμένες δεν βρέθηκαν αλλαγές όσον αφορά την ικανότητα για πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων με μιτογόνα [46, 47]. Οι μεταβολές αυτές έχουν συσχετιστεί με τη βαρύτητα της καταθλιπτικής διαταραχής ή και τη συνύπαρξη άλλων ψυχιατρικών διαταραχών [48].

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί από πολλούς ερευνητές στην διερεύνηση της δραστηριότητας και του απόλυτου αριθμού των NK κυττάρων ( $CD3/CD16^+$ ,  $CD56^+$ ). Τα NK κύτταρα ενεργοποιούνται από την έκκριση κυτταροκινών όπως η IL-2 και η INF- $\gamma$ . Με τον τρόπο αυτό μετέχουν στην άμυνα του οργανισμού εναντίον των λοιμώξεων καθώς άτομα με απουσία ή μειωμένο αριθμό NK κυττάρων είναι περισσότερο επιρρεπή σε

λοιμώξεις. Ο απόλυτος αριθμός των NK κυττάρων σε καταθλιπτικούς ασθενείς βρέθηκε ότι είναι στην πλειονότητα των ερευνών μειωμένος [49, 50, 51], αντιθέτως αυξημένος βρέθηκε ο αριθμός των NK T-λεμφοκυττάρων ( $CD3^+/CD16^+$ ,  $CD56^+$ ) [52]. Οι Seidel et al [51] μίλησαν για μεγαλύτερη αύξηση των  $CD56^+$  NK κυττάρων κατά το οξύ στάδιο της καταθλιπτικής διαταραχής και σταδιακή μείωση τους με την ύφεση των συμπτωμάτων.

Η δραστικότητα των NK κυττάρων μελετήθηκε κυρίως με πρωτόκολλα που είχαν σκοπό να διερευνήσουν την ικανότητα των NK κυττάρων να προκαλούν λύση καρκινικών κύτταρων τα οποία ήταν σημασμένα με  $^{51}\text{Cr}$ . Η δραστικότητα των NK κυττάρων εμφανίζεται μειωμένη [21, 22, 49, 50, 53, 54], το οποίο επίσης συνηγορεί υπέρ ανοσιακής καταστολής. Υπάρχουν όμως και έρευνες όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε αυτές τις παραμέτρους [55]. Μεταβολές της δραστικότητας των NK κυττάρων σχετίζονται και με την ηλικία των καταθλιπτικών ασθενών [56], καθώς και με την χρήση ή όχι αντικαταθλιπτικής αγωγής [57].

Όσον αφορά την ικανότητα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων για φαγοκυττάρωση οψωνινοποιημένων βακτηρίων τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Στη μελέτη των McAdams et al [58] η φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων εμφανίζεται μειωμένη σε αντίθεση με τα μονοκύτταρα. Υπάρχουν βέβαια και έρευνες που τόσο η ικανότητα για φαγοκυττάρωση όσο και για οξειδωτική έκρηξη παρουσιάζεται μειωμένη στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα [59]. Στην μετα-ανάλυση των Zorrilla et al [25] επιβεβαιώνεται μόνο η μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας για τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα.

**Πίνακας 3:** Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των Zorrilla et al (2001) αναφορικά με τις ανοσιακές διαταραχές στην κατάθλιψη (πίνακας 1 του άρθρου [25], τροποποιημένος).

Ανοσιακοί δείκτες	Μέγεθος Ανάλυσης		Τυχαία Επίδραση (Random effect)				
	Δείγμα ΜΕΛΕΤΩΝ	Μέγεθος	Σταθερά Επίδραση (Fixed effect)				
	(k)	(N)	$p$	$p$	CI (95%)		$p (x^2)$
Λευκοκύτταρα	24	1510	<b>1.0E-6</b>	<b>0.001</b>	0.118	- 0.399	1.4E-21
Αρ. Λεμφοκυττάρων	22	1527	<b>&lt;1.0E35</b>	0.89	-0.124	- 0.141	1.1E-31
Αρ. Μονοκυττάρων	14	1126	<b>0.01</b>	0.11	-0.050	- 0.390	1.4E-23
Αρ. Ουδετερόφιλων	11	1002	<b>&lt;1.0E35</b>	0.06	-0.010	- 0.449	1.1E-13
% Λεμφοκυττάρων	11	826	<b>&lt;1.0E35</b>	<b>0.03</b>	-0.378	- -0.039	3.1E-12
% Μονοκυττάρων	9	744	<b>1.4E-5</b>	0.33	-0.323	- 0.128	0.04
% Ουδετερόφιλων	8	777	<b>&lt;1.0E35</b>	<b>0.01</b>	0.119	- 0.487	1.9E-12
Αρ. Β-κυττάρων	12	661	0.06	0.74	-0.154	- 0.208	0.0004
Αρ. CD3	16	879	0.07	0.80	-0.099	- 0.126	0.01
Αρ. CD4	16	928	0.15	0.62	-0.057	- 0.092	0.28
Αρ. CD8	15	885	0.55	0.36	-0.150	- 0.059	0.04
Αρ. NK	10	432	<b>0.01</b>	0.97	-0.211	- 0.216	1.4E-5
Αρ. CD25	2	63	<b>0.0008</b>	0.13	-0.625	- 0.927	0.49
Αρ. HLA-DR	2	99	<b>2.6E-5</b>	0.08	-0.275	- 0.848	0.61
% Β-κυττάρων	10	527	<b>3.7E-5</b>	0.60	-0.197	- 0.315	1.9E-6
% CD3	12	549	<b>0.05</b>	0.20	-0.331	- 0.062	0.0002
% CD4	15	617	<b>9.6E-5</b>	0.22	-0.068	- 0.269	9.6E-5
% CD8	14	559	0.12	0.10	-0.367	- 0.033	8.2E-8
% NK	6	225	0.24	0.26	-0.384	- 0.138	0.01
% CD25	2	63	<b>0.04</b>	0.27	-0.850	- 0.944	0.38
% HLA-DR	4	146	<b>0.002</b>	0.85	-0.775	- 0.720	8.3E-7
CD4/ CD8 ratio	16	834	<b>0.001</b>	<b>0.02</b>	0.029	- 0.300	0.02

**Πίνακας 3** (συνέχεια): Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των Zorrilla et al (2001) αναφορικά με τις ανοσιακές διαταραχές στην κατάθλιψη (πίνακας 1 του άρθρου [25], τροποποιημένος).

Ανοσιακοί δείκτες	Μέγεθος Ανάλυσης		Τυχαία Επίδραση (Random effect)				
	Δείγμα ΜΕΛΕΤΩΝ	Μέγεθος	Σταθερά Επίδραση (Fixed effect)				
	(k)	(N)	<i>p</i>	<i>p</i>	CI (95%)		<i>p</i> ( $\chi^2$ )
Ολική πρωτεΐνη ορού	4	129	<b>&lt;1.0E-35</b>	0.06	-0.913	- 0.010	0.0002
α1-Acid glycoprotein	6	289	<b>8.0E-8</b>	0.11	-0.071	- 0.497	0.004
α1-Αντιθρυψίνη	5	164	<b>0.02</b>	0.11	-0.117	- 0.614	0.03
Απτογλοβίνη	7	290	<b>1.2E-13</b>	<b>0.0002</b>	0.362	- 0.611	0.26
Αλβουμίνη	4	164	<b>&lt;1.0E-35</b>	0.09	-20.908	- 0.158	4.4E-5
IgM	7	483	<b>&lt;1.6E-10</b>	0.07	-20.025	- 0.388	2.3E-9
IgG	4	377	0.91	0.11	-20.188	- 0.032	0.92
IgA	6	442	0.73	0.21	-20.055	- 0.189	0.59
PGE <sub>2</sub>	4	117	<b>3.7E-8</b>	<b>0.01</b>	0.328	- 0.705	0.63
IL-6	4	217	<b>3.3E-8</b>	<b>0.05</b>	0.001	- 0.523	0.11
sIL-2R	5	275	<b>2.4E-15</b>	0.10	-20.191	- 0.930	9.8E-21
Φαγοκυττάρωση Ουδετερόφιλων	3	112	<b>0.004</b>	0.28	-20.932	- 0.681	0.01
NK κυτταροτοξικότητα	16	896	<b>3.3E-9</b>	<b>0.0002</b>	-20.462	- -20.221	4.5E-22
PHA	25	1144	<b>7.0E-10</b>	<b>0.0005</b>	-20.417	- -20.147	7.4E-19
Con-A	19	941	<b>9.4E-10</b>	<b>0.0002</b>	-20.527	- -20.148	3.1E-9
PWM	14	756	<b>4.2E-6</b>	<b>0.0008</b>	-20.438	- -20.153	1.7E-5
Παραγωγή IL-2 μετά ενεργοποίηση	4	102	0.23	0.28	-20.615	- 0.291	0.06

### 3.2 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Είναι γνωστό ότι η κατάθλιψη συνδέεται με καταστολή κύριων παραμέτρων της κυτταρικής ανοσίας όπως μείωση της δραστηριότητας των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων [60, 61] και μείωση της ικανότητας ενεργοποίησης των μονοκυττάρων μετά κατάλληλη διέγερση με μιτογόνα [62]. Υπάρχουν όμως και μελέτες που επιβεβαιώνουν παράλληλα ότι η μείζονα καταθλιπτική διαταραχή συνοδεύεται από ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος.

Οι ενδείξεις για την ύπαρξη ανοσιακής ενεργοποίησης έρχονται από διάφορες πηγές. Σημεία αποτελούν η αύξηση του απόλυτου αριθμού των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, η αύξηση των T-λεμφοκυττάρων και δει των ενεργοποιημένων (CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>), η αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και η αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυτών υποδοχέων της IL-6 (sIL-6R) και της IL-2 (sIL-2R).

Δείκτης ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος στην κατάθλιψη αποτελεί επίσης η αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσης. Αντίδραση οξείας φάσης παρατηρείται σε οξείες και χρόνιες αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις παθήσεις και χαρακτηρίζεται από αύξηση των θετικών και μείωση των αρνητικών πρωτεϊνών οξείας φάσης. Κύριο ρόλο για την εμφάνιση των φαινομένων της οξείας φάσης παίζουν οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, IL-6 και TNF που εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα. Υπό την άμεση επίδραση της IL-1, του TNF, και της IL-6 αυξάνεται η θερμοκρασία του σώματος, διεγείρονται τα ηπατοκύτταρα και μετέχουν στην σύνθεση και έκκριση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει αύξηση των μονοκυττάρων σε αυτούς που πάσχουν από κατάθλιψη [34], χωρίς αυτά τα ευρήματα να είναι συμβατά στην πλειονότητα των ερευνών [25]. Οι Rothermundt M et al σε έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2001 δεν μπόρεσε να στηρίξει την υπόθεση για ενεργοποίησης της αντίδρασης φλεγμονής στους καταθλιπτικούς [63].

Εύρημα που αναπαράγεται στις περισσότερες μελέτες που αφορούν την κατάθλιψη είναι η αύξηση των θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσεως όπως η CRP, η απτοσφαιρίνη [25, 64, 65], η α<sub>1</sub>-όξινη γλυκοπρωτεΐνη, και η α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνη [63, 66] και η μείωση των αρνητικών πρωτεϊνών οξείας φάσης όπως η αλβουμίνη και η τρανσφερίνη [66, 67, 68]. Αυτά επιβεβαιώνονται και στην μετα-ανάλυση του 2001 των Zorrilla et al (πίν. 3).

Η CRP είναι μια από τις πιο συχνά μετρήσιμες πρωτεΐνες οξείας φάσεως καθώς αποτελεί και έναν ισχυρό αιτιολογικό παράγοντα για ανάπτυξη καρδιαγγειακών



νοσημάτων. Η IL-6 η οποία βρίσκεται αυξημένη στους καταθλιπτικούς ασθενείς επάγει την παραγωγή από τα ηπατοκύτταρα της CRP [69]. Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει αύξηση της CRP στον ορό ασθενών με μείζονα καταθλιπτική διαταραχή και μείωση της σε περίοδο ύφεσης του καταθλιπτικού επεισοδίου [70] ή μετά από κατάλληλη αντικαταθλιπτική αγωγή [71]. Άλλες έρευνες δεν ανέδειξαν διαφορές των επιπέδων της CRP στον ορό συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [72].

Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση που δημοσιεύθηκε το 2005 [73] συμπεριλήφθηκαν 6 πληθυσμιακές μελέτες οι οποίες εξέτασαν την συσχέτιση μεταξύ CRP και ιστορικό μείζονος κατάθλιψης ή άλλων καταθλιπτικών συμπτωμάτων. Βρέθηκε ότι το ιστορικό μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση CRP μεταξύ ανδρών και όχι μεταξύ γυναικών. Τα επίπεδα CRP ήταν πιο αυξημένα όταν οι μετρήσεις έγιναν σε διάστημα μικρότερο των έξι μηνών από την έναρξη του καταθλιπτικού επεισοδίου συγκριτικά με ασθενείς σε ύφεση της νόσου και με υγιείς μάρτυρες [74, 75]. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε μελέτη στο ελληνικό πληθυσμό που συμπεριέλαβε 853 άτομα χωρίς καρδιαγγειακά νοσήματα και βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ κατάθλιψης και αύξησης της CRP και στα δύο φύλλα [76]. Παρόλα αυτά τα ευρήματα δεν υποδηλώνουν αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ τους.

Στα πλαίσια της ανοσιακής ενεργοποίησης που παρατηρείται στη μείζονα κατάθλιψη, παράλληλα με την αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσης συνυπάρχει και αύξηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος C3 και C4 που μετρήθηκαν σε ορό ασθενών [23, 66]. Επίσης σε κάποιες μελέτες έχει αξιολογηθεί η συγκέντρωση των κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών (IgA, IgG, IgM) χωρίς να υπάρχουν σαφή αποτελέσματα με εξαίρεση την συγκέντρωση της IgM που εμφανίζει αύξηση [25, 47].

### 3.3 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Τα αποτελέσματα πολυάριθμων μελετών και ανασκοπήσεων που πραγματοποιούνται τις ανοσολογικές διαταραχές στη κατάθλιψη οδήγησαν σε αλλαγή της αρχικής άποψης ότι η κατάθλιψη συνοδεύεται από καταστολή ορισμένων δεικτών της ανοσιακής λειτουργίας. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι οι καταθλιπτικές διαταραχές χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος. Ειδικότερα στους καταθλιπτικούς ασθενείς έχει επανειλημμένα παρατηρηθεί ότι ενεργοποιούνται μονοπάτια που εμπλέκονται στην φλεγμονή [24, 25, 77, 78]. Η αναφερομένη ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης εκφράζεται με αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και φαγοκυττάρων, με υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα των θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσεως και με παραγωγή και απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Παραδοσιακά η κατάθλιψη θεωρείτο ως μία πάθηση η οποία επέρχεται λόγω διαταραχών των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων του εγκεφάλου (υπολειτουργία των νοραδρενεργικών (NA) και των σεροτονινεργικών (5-HT) συνάψεων λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης νοραδρεναλίνης και σεροτονίνης στο μετασυναπτικό διάστημα). Συνέπεια των μεταβολών αυτών είναι και οι αναφερόμενες ενδοκρινικές και ανοσιακές διαταραχές που συνοδεύουν την κατάθλιψη. Παρόλα αυτά, σε ποιο πρόσφατες έρευνες εμφανίζεται η άποψη ότι οι μεταβολές των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων του εγκεφάλου και η ενεργοποίηση του υποθαλάμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακού άξονα αποτελούν επακόλουθο των ανοσιακών διαταραχών που προϋπάρχουν στους καταθλιπτικούς ασθενείς. Με αρωγό την άποψη αυτή, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην μελέτη των κυτταροκινών και στο κατά πόσο η παραγωγή και η έκκριση τους από τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος παίζει ρόλο στην παθογένεια της κατάθλιψης.

Το 1991, ο Smith [79] δημοσίευσε τη θεωρία της ενεργοποίησης των μακροφάγων και της έκκρισης από αυτά μονοκινών όπως IL-1, IFN- $\alpha$  και TNF, που προκαλούν ορμονικές και ανοσιακές διαταραχές σχετιζόμενες με κατάθλιψη. Από την έρευνα του Smith προκύπτουν σημαντικές παρατηρήσεις που συνηγορούν υπέρ αυτής της άποψης. (α) Είναι γνωστό ότι η κατάθλιψη συνοδεύεται από ορμονικές διαταραχές όπως, αυξημένη έκκριση αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH), αύξηση του παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRF), αύξηση της έκκρισης κορτιζόλης. Τι όμως προκαλεί αυτές τις διαταραχές; Το πιο πιθανό αίτιο είναι η επίδραση της IL-1. Η IL-1 έχει ειδική και άμεση επίδραση στο υποθάλαμο με αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του CRF, επίσης διεγείρει

άμεσα την έκκριση ACTH και αυξητικής ορμόνης (GH) και αναστέλλει την απελευθέρωση προλακτίνης (PRL). Το γεγονός ότι η IL-1 που απελευθερώνεται από τα μακροφάγα μπορεί να επιφέρει τις ορμονικές διαταραχές που παρατηρούνται στην κατάθλιψη επιβεβαιώνει την άποψη αυτή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του Niiraenan et al [80], ο οποίος ήταν από τους πρώτους μελετητές που δίνοντας σε 9 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα θεραπεία με IFN-α παρατήρησε ότι οι ασθενείς αυτοί που αρχικά ήταν ψυχικά υγιείς ανέπτυξαν συμπτώματα σε βαθμό που να μπορεί να τεθεί η διάγνωση μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής με βάση τα κριτήρια DSM-III-R. (β) Σε παθήσεις που είναι γνωστό ότι υπάρχει ενεργοποίηση μακροφάγων και γενικώς του ανοσιακού συστήματος συνυπάρχουν αυξημένα ποσοστά κατάθλιψης. Πράγματι αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα όπου παρατηρείται αυξημένη έκκριση μονοκινών (IL-1, TNF-α, IL-6) έχει βρεθεί διπλάσια επίπτωση κατάθλιψης από τον γενικό πληθυσμό [81]. (γ) Η μικρογλοία, δηλαδή τα μακροφάγα που υπάρχουν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, εκκρίνει κυτταροκίνες. Έχουμε δηλαδή έκκριση κυτταροκινών όχι μόνο στην κυκλοφορία αλλά και μέσα στο όργανο που κατά κύριο λόγο έχει συνδεθεί με τη κατάθλιψη. (δ) Η πιθανότητα εμφάνισης κατάθλιψης είναι δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες, επίσης είναι μεγαλύτερο το ποσοστό κατάθλιψης σε γυναίκες ηλικίας 18-44. Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες και κυρίως οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα έχει βρεθεί ότι αυξάνουν τον αριθμό των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων καθώς και την ικανότητα των μακροφάγων να εκκρίνουν κυτταροκίνες (IL-1). Η θεωρία αυτή εξηγεί και την αναλογία περίπου 3/1 της πιθανότητας να αναπτύξουν κατάθλιψη οι γυναίκες συγκριτικά με τους άντρες. Εάν όντως η θεωρία του Smith ισχύει μπορεί να εξηγηθεί γιατί στις γυναίκες και δει στις προεμμηνοπαυσιακές έχουμε μεγαλύτερα ποσοστά κατάθλιψης. (ε) Τέλος αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι στην Ιαπωνία τα ποσοστά κατάθλιψης είναι μειωμένα συγκριτικά με άλλες χώρες. Αυτό πιθανά οφείλεται στη μεγάλη κατανάλωση ψαρικών, πλούσια σε ω3-λιπαρά-οξέα. Έχει βρεθεί ότι το ιχθυέλαιο καταστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων και ως εκ τούτου υπάρχει μειωμένη παραγωγή μονοκινών. Αυτό επιβεβαιώνεται και στη μελέτη του Endres [82], όπου σε υγιείς εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε για έξι εβδομάδες ιχθυέλαιο παρατηρήθηκε μειωμένη έκκριση κατά 60% της IL-1 και κατά 40% του TNF.

Το 1995 από τους Maes et al ακολούθησε η υπόθεση της ενεργοποίησης παράλληλα με τα μονοκύτταρα και των T-Λεμφοκυττάρων στην κατάθλιψη [21], ενώ ακολούθησαν

προς την ίδια κατεύθυνση και άλλες μελέτες όπως αυτές των Yirmiya et al και του Maes το 1999 [83]. Σύμφωνα με αυτές τις υποθέσεις, η κατάθλιψη συνοδεύεται από ανοσιακή ενεργοποίηση βάσει της οποίας διεγείρονται τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, πιο συγκεκριμένα τα μονοκύτταρα-μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία παράγουν και απελευθερώνουν στην κυκλοφορία φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, IFN-γ, TNF-α). Αυτές οι κυτταροκίνες είναι υπεύθυνες για μία ποικιλία νευροενδοκρινικών και νευροχημικών διαταραχών που σχετίζονται με την κατάθλιψη.

Πράγματι τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες οδηγήθηκαν προς αυτή την κατεύθυνση μελετώντας διάφορες παραμέτρους ως δείκτες ανοσιακής ενεργοποίησης όπως την συγκέντρωση κυτταροκινών και των διαλυτών υποδοχέων τους καθώς και των πρωτεϊνών οξείας φάσεως στον ορό ασθενών με κατάθλιψη ή στο υπερκείμενο καλλιέργειών λευκοκυττάρων μετά από διέγερση με μιτογόνα.

Οι κυτταροκίνες αποτελούν ομάδα μικρομοριακών πρωτεϊνών (MB 8-80 kDa), οι οποίες δρουν με αυτοκρινή, παρακρινή ή ενδοκρινή τρόπο. Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφθεί στον άνθρωπο περισσότερες από εκατό δομικά διαφορετικές κυτταροκίνες, ενώ ο ρυθμός ανακάλυψής τους δεν φαίνεται να μειώνεται.

Η εκδήλωση της βιολογικής δράσης των κυτταροκινών επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης τους με ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων. Οι υποδοχείς των κυτταροκινών είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες το εξωκυττάριο τμήμα των οποίων είναι υπεύθυνο για την σύνδεση τους με τις κυτταροκίνες, ενώ το διαμεμβρανικό και κυρίως το ενδοκυττάριο μετέχει στη μεταβίβαση του μηνύματος.

Η κατάθλιψη βρέθηκε ότι σχετίζεται με αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, IL-6, IFN-γ, TNF-α [84, 85, 86], παράλληλα με αύξηση των διαλυτών υποδοχέων τους [87, 88, 89]. Παρατηρήθηκε δηλαδή αύξηση του διαλυτού υποδοχέα της IL-6 (sIL-6R) [90], του διαλυτού υποδοχέα της IL-2 (sIL-2R) [90, 91] και αύξηση του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra) [92]. Ειδικά η IL-6 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται άμεσα με ανοσιακή ενεργοποίηση στην κατάθλιψη, καθώς είναι μία κυτταροκίνη που επηρεάζει την έκκριση πρωτεϊνών οξείας φάσεως στους καταθλιπτικούς προκαλώντας αύξηση των θετικών και μείωση των αρνητικών πρωτεϊνών αντίστοιχα [72]. Συγχρόνως με την αύξηση που παρατηρήθηκε της IL-6 υπάρχει αύξηση και των συγκεντρώσεων του sIL-6R η οποία προάγει την δράση της IL-6 [73]. Έχει επίσης βρεθεί αύξηση της IL-2, ενώ σε άλλες μελέτες αντί για αύξηση των φλεγμονωδών

κυτταροκινών, βρήκαν είτε μείωση της IL-1, της IL-2 και της IL-3, είτε καμία μεταβολή [93, 94].

Βάσει της μετά-ανάλυσης των Zorrilla et al [25], φαίνεται ότι στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μόνο όσον αφορά την αύξηση της IL-6 και του διαλυτού υποδοχέα της IL-2 (sIL-2R), ευρήματα συχνά επαναλαμβανόμενα στις περισσότερες μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση (πίν. 3).

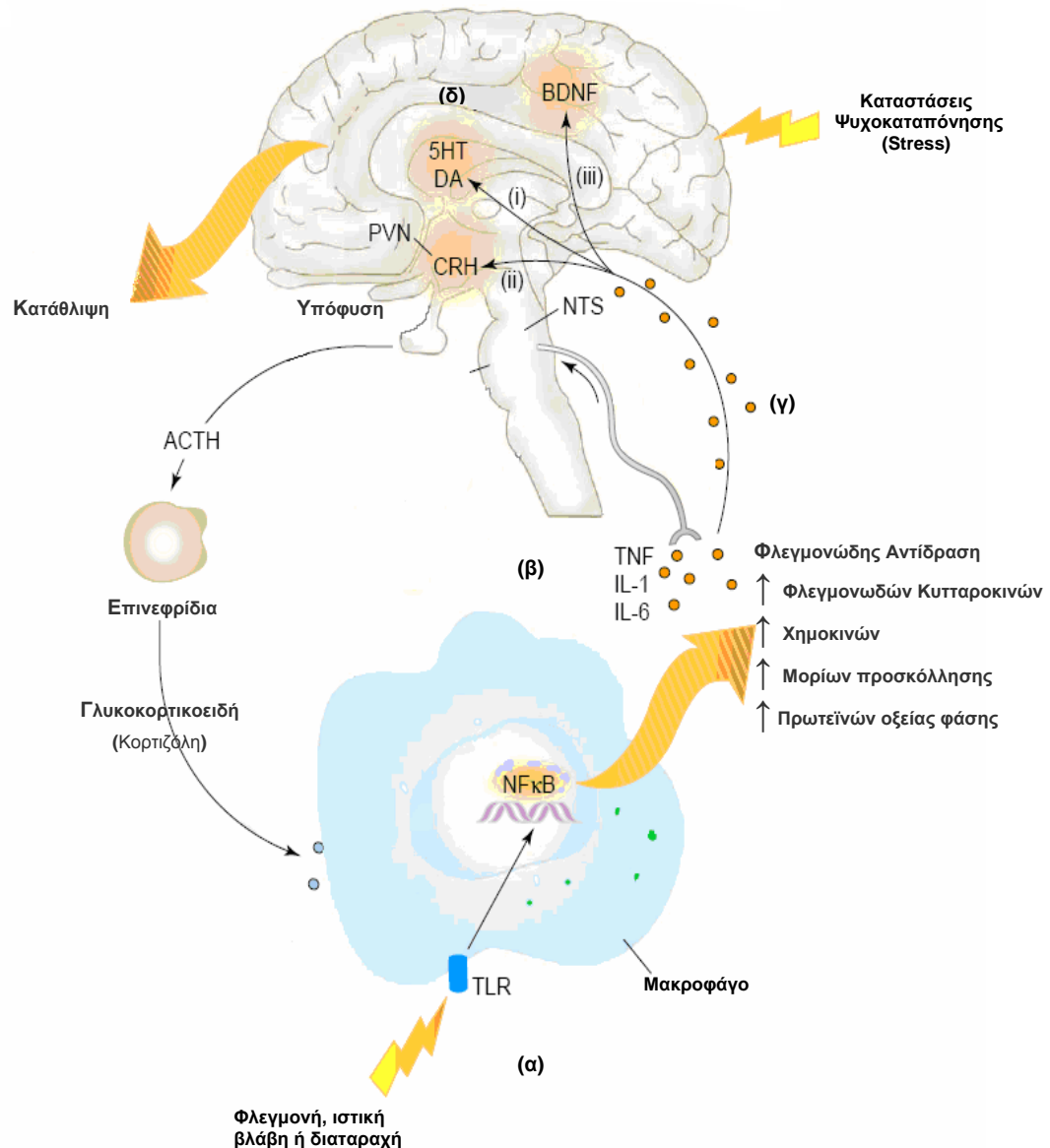
Παρότι υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά τις κυτταροκίνες και ένα μεγάλος αριθμός ερευνών και ανασκοπήσεων έχουν δημοσιευθεί, τα ευρήματα είναι αντιφατικά. Ενώ στη πλειονότητα των ερευνών έχουμε αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών υπάρχουν και μελέτες που δεν μπόρεσαν να βρουν διαφορές ή που παρατήρησαν μειωμένη έκκριση τους [23, 95]. Αυτό πιθανά να οφείλεται στον τρόπο μέτρησης και προσέγγισης των κυτταροκινών καθώς στις περισσότερες μελέτες η μέτρηση τους γίνεται στον ορό αίματος ασθενών με κατάθλιψη. Πιο αξιόπιστη μέθοδος αποτελεί η μέτρηση της παραγωγής κυτταροκινών σε καλλιέργειες μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων μετά από διέγερση με LPS ή με τα κατάλληλα μιτογόνα (PHA, Con-A). Εξίσου σημαντικό ρόλο κατέχει η καταλληλότητα του δείγματος μιας μελέτης καθώς και ο αποκλεισμός όλων των παραγόντων που θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα, όπως η ηλικία και η φαρμακευτική αγωγή που τυχόν λαμβάνουν τα άτομα της μελέτης.

### 3.3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΚΝΣ

Η δράση των κυτταροκινών στα κύτταρα του νευροενδοκρινικού συστήματος ασκείται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων που εκφράζονται, ανομοιόμορφα κατανομημένοι, στην επιφάνεια των κυττάρων των διάφορων περιοχών του εγκεφάλου (υποθάλαμος, ιππόκαμπος) και των ενδοκρινών αδένων. Ιστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την έκφραση μικρών ποσοτήτων φλεγμονωδών κυτταροκινών στα αστροκύτταρα, στην μικρογλοία και στους νευρώνες του ιπποκάμπου, του υποθαλάμου και του πρόσθιου εγκεφάλου σε καταστάσεις μη ανοσιακής ενεργοποίησης του οργανισμού. Οι κυτταροκίνες είναι υδρόφιλα μόρια και δεν μπορούν να διέλθουν δια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Υπάρχουν όμως περιοχές όπου ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι απών π.χ. περικοιλιακοί σχηματισμοί. Επιπλέον πολλές φορές οι ίδιες οι κυτταροκίνες συμβάλουν στην εξασθένηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η IL-1 για παράδειγμα διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό προκειμένου να ασκήσει τη δράση της συνδεδεμένη με τους υποδοχείς της εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος προκαλώντας δευτερογενή έκκριση μορίων, όπως νιτρικό οξείδιο (NO) ή προσταγλανδίνες τα οποία δρουν τοπικά και ερεθίζουν τους νευρώνες [96].

Όπως προαναφέρθηκε στους καταθλιπτικούς έχουμε ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης γεγονός που το χαρακτηρίζει η αύξηση φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IFN-γ, TNF-α). Δεν είναι γνωστό όμως πια είναι η επίδραση της αύξησης αυτών των κυτταροκινών στην λειτουργία του ΚΝΣ (εικ. 1). Οι περισσότερες έρευνες έχουν επίκεντρο την δράση της IL-1. Η IL-1 έχει βρεθεί ότι διεγείρει την παραγωγή των υπόλοιπων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-α και η IL-6 από τα αστροκύτταρα και την μικρογλοία ενεργοποιώντας την φλεγμονώδη διεργασία στο ΚΝΣ.

Παράλληλα έχει βρεθεί ότι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες σχετίζονται με μεταβολές των νευροδιαβιβαστών του ΚΝΣ δηλαδή της σεροτονίνης, και των κατεχολαμινών, της νοραδρεναλίνης και της ντοπαμίνης (DA) σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την κατάθλιψη συμπεριλαμβανομένου του υποθαλάμου, του ιπποκάμπου, του αμυγδαλοειδούς πυρήνα και του προμετωπιαίου φλοιού. Παρατηρήθηκε στις περιοχές αυτές του εγκεφάλου ως συνέπεια της αυξημένης συγκέντρωσης φλεγμονωδών κυτταροκινών, μειωμένη δραστηριότητα των προσυναπτικών νευρώνων της 5-HT, με συνέπεια την ελάττωση της σύνθεσης 5-HT, διαταραχή στην επαναπρόσληψη 5-HT στη μεσοσυναπτική σχισμή καθώς και μεταβολές στο επίπεδο των μετασυναπτικών υποδοχέων της 5-HT [95, 97].



**Εικόνα 1:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΚΝΣ και ανοσιακού συστήματος που αφορούν την κατάθλιψη [77]. **(α)** Ενεργοποίηση του NF-κB, μέσω των Toll-like υποδοχέων (TLR) κατά τη διάρκεια ανοσιακής ενεργοποίησης, οδηγεί σε φλεγμονώδη απάντηση και συμπεριλαμβάνει, **(β)** απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IL-6 και IL-1, **(γ)** οι κυτταροκίνες αυτές εισέρχονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μέσω κενών του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. **(δ)** Στον εγκέφαλο οι κυτταροκίνες μετέχουν σε μονοπάτια που σχετίζονται με την ανάπτυξη της καταθλιπτικής διαταραχής δηλ. **(i)** μεταβολή των νευροδιαβιβαστών όπως σεροτονίνη (5HT) και ντοπαμίνη (DA) **(ii)** ενεργοποίηση του CRH στους παρακωιλιακούς πυρήνες (PVN) με συνακόλουθη παραγωγή και απελευθέρωση ACTH από την υπόφυση και γλυκορτικοειδών

(κορτιζόλη) από τα επινεφρίδια και (iii) διαταραχή της πλαστικότητας της σύναψης μέσω μεταβολών σε συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες (π.χ. BDNF).

Η σύνθεση της 5-HT σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από την επάρκεια του αμινοξέος TRP στον εγκέφαλο καθώς η TRP ανταγωνίζεται άλλα αμινοξέα όπως η βαλίνη, η λευκίνη και η φαινυλαλανίνη (CAAs) για τους ίδιους μηχανισμούς πρόσληψης στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6 και IFNs έχει βρεθεί ότι μειώνουν την συγκέντρωση της TRP ενεργοποιώντας το ένζυμο 2,3 δυοξυγονάση της ινδολεαμίνης (IDO) που προάγει τον μεταβολισμό της TRP. Γίνεται έτσι φανερό ότι η υπερενεργοποίηση του ενζύμου IDO από τις κυτταροκίνες οδηγεί σε ελάττωση της συγκέντρωσης TRP γεγονός που συνοδεύεται από σημαντική μείωση της σύνθεσης 5-HT. Πράγματι η ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος φαίνεται ότι σχετίζεται με την ελάττωση των επιπέδων TRP, καθώς έχει βρεθεί μείωση της συγκέντρωσης της TRP στον ορό παράλληλα με αύξηση της συγκέντρωσης στον ορό της IL-6 και των θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσεως (νεοπτερίνη) και μείωση των αρνητικών πρωτεϊνών οξείας φάσεως. Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1 και η IFN-γ προκαλούν μείωση της αναλογίας TRP/CAAs επάγοντας την δράση του ενζύμου IDO όπως επίσης και ενεργοποιώντας την αξιοποίηση της TRP και των άλλων αμινοξέων για την σύνθεση θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσεως [93, 97, 98].

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιτείνουν την ανακύκλωση (turnover) της 5-HT γεγονός που οδηγεί σε ραγδαία ελάττωση της 5-HT καθώς η προσυναπτική διαθεσιμότητα της 5-HT είναι χαμηλή λόγω της μειωμένης σύνθεσης της, η οποία απορρέει από την ελάττωση της TRP. Τέλος έχει αναφερθεί σε έρευνες ότι η ανοσιακή ενεργοποίηση που παρατηρείται στην κατάθλιψη σχετίζεται και με τροποποίηση της δραστηριότητας και της ευαισθησίας των μετασυναπτικών υποδοχέων της 5-HT.

Η χαμηλή διαθεσιμότητα TRP στον εγκέφαλο αποτέλεσμα της οποίας είναι η ελάττωση της σύνθεσης της 5-HT αντιπροσωπεύουν την κύρια διαταραχή των νευροδιαβιβαστών του ΚΝΣ στα άτομα με κατάθλιψη. Σημαντικό είναι να ειπωθεί ότι η ανάπτυξη και η βαρύτητα της καταθλιπτικής διαταραχής σε ασθενείς που κάνουν ανοσοθεραπεία με IL-2 ή IFNs είναι στενά συνδεδεμένη με τα ελαττωμένα επίπεδα TRP που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της θεραπείας.

Σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση πως υψηλό ποσοστό ασθενών που ελάμβαναν θεραπεία, για λοιμώδη νοσήματα ή καρκίνο με IFN-α ανέπτυξαν συμπτώματα που



μπορούν να θέσουν την διάγνωση καταθλιπτικού επεισοδίου [77]. Η IFN-α προάγει την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IL-6, IL-1 και TNF-α. Στοιχεία που επιβεβαιώνουν την άποψη αυτή είναι το γεγονός ότι το καταθλιπτικό επεισόδιο που αναπτύσσεται ανταποκρίνεται στη θεραπεία με αντικαταθλιπτικά, σχετίζεται με ενεργοποίηση του ένζυμου IDO και ως εκ τούτου με μειωμένα επίπεδα TRP στον ορό των ασθενών που υποβάλλονται σε ανοσοθεραπεία και τέλος παρατηρούνται νευροενδοκρινικές διαταραχές παρόμοιες με αυτές που αναπτύσσονται στην κατάθλιψη όπως υπερκορτιζολαιμία.

### 3.3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Πολύ νωρίς, μόλις από την δεκαετία του '60 [99], περιγράφηκαν για πρώτη φορά αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στα άτομα με καταθλιπτικές διαταραχές. Η ενεργοποίηση του υποθάλαμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακού άξονα, και ως εκ τούτου η παρατηρούμενη υπερκορτιζολαιμία είναι ένα εύρημα που παρουσιάστηκε συχνά σε πολλές μεταγενέστερες μελέτες [100].

Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες αποτελούν ισχυρό διεγέρτη του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και για τον λόγο αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του και στην παθογένεια της κατάθλιψης. Η IL-1 και η IL-6 αντιπροσωπεύουν τους κύριους διεγέρτες του υποθάλαμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακού άξονα γεγονός που εκφράζεται με αύξηση της συγκέντρωσης στον ορό της κορτικοτροπίνης [101], της αγγειτενσίνης, της αδρενοκορτικοτροπίνης και της κορτιζόλης. Η IL-1 προάγει την παραγωγή CRF (παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης), επάγοντας έτσι την έκκριση ACTH. Ο CRF επιπρόσθετα ευαισθητοποιεί την υπόφυση στην δράση της IL-1. Η IL-2 είναι ο ισχυρότερος εκκριταγωγός παράγοντας της ACTH που έχει αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, πολύ πιο ισχυρός ακόμη και από τον CRF.

Για να εκτιμηθεί αν σε έναν καταθλιπτικό ασθενή υπάρχει διαταραχή του υποθαλάμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακού άξονα, διενεργείται η δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη (DST test) [102]. Η δοκιμασία αυτή συνίσταται στη χορήγηση 1mg δεξαμεθαζόνης. Η αναμενόμενη απάντηση είναι η καταστολή των επιπέδων κορτιζόλης μέσω αναστολής της απελευθέρωσης ACTH από την υπόφυση. Σε ένα ποσοστό της τάξεως του 50% η δοκιμασία αυτή είναι παθολογική, δηλαδή δεν καταστέλλεται η έκκριση της κορτιζόλης. Παράλληλα φαίνεται ότι στην κατάθλιψη συνυπάρχει αύξηση της έκκρισης της CRH του υποθαλάμου, με αποτέλεσμα αύξηση της ACTH και της κορτιζόλης.

Οι Smith et al [79] στη μελέτη τους όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα, κατέγραψαν σαν ένα πιθανό αίτιο της κατάθλιψης την έκκριση από τα μακροφάγα κυτταροκινών (μονοκίνες). Υπέθεταν ότι οι ενδοκρινικές διαταραχές που παρατηρούνται στην κατάθλιψη οφείλονται στην έκκριση από τα μακροφάγα κυτταροκινών όπως η IL-1, TNF και INF-α. Η IL-1 διεγείρει τον υποθάλαμο για την έκκριση του παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRF), καθώς επίσης διεγείρει την έκκριση της ACTH και της αυξητικής ορμόνης.

## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---



# ΥΛΙΚΟ

## 1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 47 ασθενείς με ενδογενή κατάθλιψη, οι οποίοι παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Μετά από συνέντευξη και λήψη του ιατρικού ιστορικού των ασθενών (παράρτημα Ι ), γινόταν εκτίμηση της καταθλιπτικής διαταραχής, με βάση τα κριτήρια ICD-10 της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας [103] καθώς και εκτίμηση της βαρύτητας της καταθλιπτικής διαταραχής με τη βαθμολογική κλίμακα Hamilton Depression Rating Scale-24 (HDRS-24). Στον πίνακα 5 φαίνεται η κατανομή των ασθενών ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την βαθμολογική κλίμακα HDRS.

**Πίνακας 5.** Κατανομή ασθενών και μαρτύρων της μελέτης

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ</b>	47	26
<b>ΦΥΛΟ (άνδρες / γυναίκες)</b>	9 / 38	5 / 21
<b>ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ ( <math>\pm</math> SD)</b>	47,23 $\pm$ 10,24	41,23 $\pm$ 13,89
<b>ICD-10 ( F32.2/F32. 3)</b>	45 / 2	-
<b>HDRS ( <math>\pm</math> SD)</b>	26 $\pm$ 4	-

Συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια ICD-10 για βαρύ καταθλιπτικό επεισόδιο με και χωρίς ψυχωσικά συμπτώματα (F32.2, F32.3). Η βαρύτητα της διαταραχής αξιολογήθηκε με την κλίμακα HDRS και πήραν μέρος στη μελέτη όσοι είχαν συνολική βαθμολογία πάνω από είκοσι. Οι ασθενείς που συμμετείχαν ήταν ηλικίας άνω των 18 και κάτω των 65 ετών, ελεύθεροι από οξεία ή χρόνια λοίμωξη, ελεύθεροι από χρόνια πάθηση που να επηρεάζει την ανοσιακή ή ενδοκρινική λειτουργία (π.χ. καρκίνος, ανοσοανεπάρκειες, υπερ- ή υποθυρεοειδισμός, αυτοάνοσα νοσήματα), ελεύθεροι από χρήση φαρμάκων που ενδέχεται να επηρεάζουν το ανοσιακό σύστημα (π.χ. κορτικοειδή, άλατα λιθίου κ.λπ.). Επιπλέον προϋπόθεση για να συμπεριληφθούν στη μελέτη ήταν η έλλειψη συνοδών ψυχιατρικών διαταραχών (π.χ. διπολική συναισθηματική διαταραχή, ψυχώσεις κ.λπ.) και η μη κατανάλωση αλκοόλ. Τέλος αποκλείστηκαν οι γυναίκες σε κύηση και γαλουχία.

Από τους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, 33 άτομα ελάμβαναν αγωγή με αντικαταθλιπτικά, 6 ελάμβαναν αγωγή μόνο με βενζοδιαζεπίνες και 8 ασθενείς δεν ελάμβαναν καθόλου αγωγή (πίν. 6).

**Πίνακας 6.** Φαρμακευτική αγωγή των ασθενών (N) με καταθλιπτική διαταραχή που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

ΦΑΡΜΑΚΑ	N
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ (SSRI)	
Παροξετίνη	4
Φλουοξετίνη	5
Φλουβοξαμίνη	3
Σιταλοπράμη	5
Σερταλίνη	4
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΟΡΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ (SNRI)	
Υδροχλωρική Βενλαφαξίνη	8
ΤΡΙΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ	
Υδροχλωρική Χλωριμιπραμίνη	4
BENZODIAZEPINES	6
ΧΩΡΙΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	8

## 2. ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Συμμετείχαν στη μελέτη 26 μάρτυρες ανάλογης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς. Ακολουθούσε λεπτομερής λήψη ιατρικού ιστορικού και έλεγχος του απόλυτου αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων για να αποκλειστεί η πιθανότητα πρόσφατης λοίμωξης. Στον πίνακα 5 φαίνεται η κατανομή των μαρτύρων ανάλογα με φύλο και ηλικία.

Απαραίτητη προϋπόθεση για συμμετοχή στη μελέτη ήταν η φυσιολογική γενική αίματος. Οι μάρτυρες που συμπεριλήφθηκαν ήταν ηλικίας άνω των 18 και κάτω των 65 ετών, ελεύθεροι από οξεία λοίμωξη τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν την αιμοληψία, ελεύθεροι από χρόνια πάθηση που να επηρεάζει την ανοσοποιητική ή ενδοκρινική λειτουργία, ελεύθεροι από χρήση φαρμάκων που ενδέχεται να επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα (π.χ. κορτικοειδή). Επιπλέον προϋπόθεση για να συμπεριληφθούν ήταν η απουσία ψυχικής διαταραχής και η απουσία συγγενών 1<sup>ου</sup> βαθμού με καταθλιπτική διαταραχή. Αποκλείστηκαν οι γυναίκες σε κύηση και γαλουχία και όσοι έκαναν κατανάλωση αλκοόλ.

# ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

## 1. ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ

Η διάγνωση της καταθλιπτικής διαταραχής γινόταν με βάση τα κριτήρια ICD-10 της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας. Η βαρύτητας της καταθλιπτικής διαταραχής αξιολογήθηκε με την βαθμολογική κλίμακα HDRS-24. Συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με συνολική βαθμολογία πάνω από είκοσι. Στους μάρτυρες δεν χρειάστηκε να γίνει η κλίμακα HDRS-24, διότι η κλίμακα αυτή αξιολογεί την βαρύτητα του καταθλιπτικού επεισοδίου εφόσον έχει διαγνωσθεί. Στους μάρτυρες αποκλείστηκε η ύπαρξη καταθλιπτικής ή άλλης ψυχικής διαταραχής από την συνέντευξη. Στο παράρτημα II παρατίθεται η κλίμακα HDRS-24.

## 2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στα άτομα της μελέτης γινόταν αιμοληψία συνολικά 40mL φλεβικού αίματος από παρακέντηση περιφερικής φλέβας, μετά από γραπτή συγκατάθεση τους. Αρχικά γινόταν αιμοληψία 20mL αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα (2-5U heparin/mL αίματος) από τα οποία γινόταν σε δεύτερο χρόνο η απομόνωση των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος (PBMC) για τη χρήση τους σε καλλιέργειες κυττάρων με σκοπό τον προσδιορισμό φλεγμονωδών κυτταροκινών (Μεθοδολογία Elispot και Μικροσφαιριδιακή Κυτταρομετρία). Ακολουθούσε αιμοληψία, χωρίς δεύτερη φλεβοκέντηση αλλά με αλλαγή σύριγγας, άλλων 20 mL αίματος. Από τα 20mL αίματος, 4 mL τοποθετούνταν σε 2 σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA για κυτταρομετρική ανάλυση, 2 mL τοποθετούνταν σε ηπαρινισμένο σωληνάριο για να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της φαγοκυττάρωσης και της οξειδωτικής έκκρισης και τα εναπομένοντα 14 mL χρησιμοποιούνταν για τη συλλογή ορού. Τα δείγματα του ορού διαχωρίζονταν σε μικρές ποσότητες (aliquots) και συντηρούνταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τα δείγματα που θα χρησιμοποιούνταν για κυτταρομετρική ανάλυση συντηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου ( $21^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι την ανάλυση τους, εντός 4-6 ωρών, ενώ τα δείγματα για τον έλεγχο φαγοκυττάρωσης και οξειδωτικής έκκρισης συντηρούνταν στους  $4^{\circ}\text{C}$  έως την επεξεργασία τους, εντός 4-6 ωρών.

### 3. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων έγινε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μεθοδολογία μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται, καθώς μια μονήρης σωματιδιακή διάταξη διέρχεται μπροστά από μια φωτεινή δέσμη. Στην κλινική πράξη αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο μέτρησης κυττάρων, με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την υδροδυναμική διάταξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε ρεύμα μονήρων κυττάρων, που διασταυρώνεται κάθετα με τη δέσμη LASER. Η πρόπτωση της δέσμης LASER πάνω στα κύτταρα προκαλεί σκεδασμό του φωτός. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός, που εκπέμπεται κατά τη φορά της φωτεινής δέσμης (πρόσθιος σκεδασμός), είναι ανάλογη του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός, που εκπέμπεται κατά ορθή γωνία προς τη φορά της δέσμης (πλάγιος σκεδασμός), σχετίζεται με το σχήμα και την ομοιογένεια (κοκκίωση) των κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα φθοριοχρώματα για την ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Ο προσδιορισμός των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων έγινε με άμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) σημασμένα, κατά περίπτωση (πίν.14), με φλουοροσκεΐνη (FITC), φυκοερυθρίνη (PE), φυκοερυθρίνη-Texas Red-x (ECD) και φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5 (PECY5) [104, 105, 106].

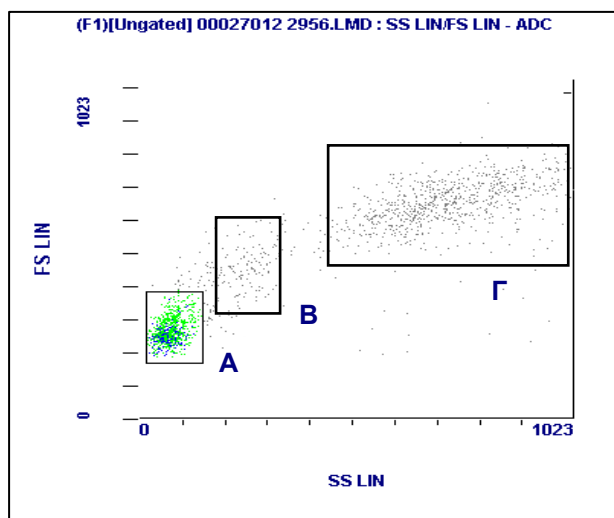
#### 3.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πάντα πριν από την επεξεργασία του αίματος γινόταν γενική αίματος στον αυτόματο αιματολογικό αναλυτή MicroDiff 18 (Coulter), ώστε να είναι γνωστός ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων. Εφόσον τα λευκά αιμοσφαίρια ήταν έως  $10^4/\mu\text{L}$  άρχιζε η επεξεργασία του δείγματος για ανάλυση χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω αραιώση. Ποσότητα 100  $\mu\text{L}$  ολικού αίματος επωαζόταν με 10  $\mu\text{L}$  από το κάθε mAb για 15 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο και σε θερμοκρασία δωματίου ( $21^\circ\text{C}$ ). Στη συνέχεια γινόταν λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο Multi-Q-PREP (Coulter) και ακολουθούσε η κυτταρομετρική ανάλυση εντός 2 ωρών. Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο ροής Epics XL-MCL (4 colour analysis, Beckman-Coulter).



### 3.2. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Με την έναρξη της ανάλυσης στο κυτταρόμετρο, γινόταν αρχικά ο εντοπισμός και η απεικόνιση των λευκών αιμοσφαιρίων. Μέσω του πρόσθιου (FS) και του πλάγιου σκεδασμού (SS), δηλαδή με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση διακρίνονταν στους τρεις βασικούς υποπληθυσμούς τους, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (εικ. 2). Ακολούθως, η ανάλυση περιοριζόταν σε έναν από τους τρεις λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, κατά περίπτωση, όπου προσδιορίζονταν η έκφραση συγκεκριμένων μεμβρανικών δεικτών με την χρήση των κατάλληλων mAb.



**Εικόνα 2.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) **A** αφορά τα λεμφοκύτταρα, το **B** αφορά τα μονοκύτταρα και το **Γ** τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα.

Μελετήθηκαν αναλυτικά τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, και οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων (T-λεμφοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, NK-like λεμφοκύτταρα). Οι μεμβρανικοί δείκτες υποδήλωναν την ωριμότητα του κάθε κυττάρου, την κατάσταση ενεργοποίησης τους, είτε αποτελούσαν μόρια προσκόλλησης, υποδοχείς του συμπληρώματος και υποδοχείς των ανοσοσφαιρινών.

Στους πίνακες 7–12 περιγράφονται αναλυτικά οι συνδυασμοί των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών, καθώς και το είδος του φθοριοχρώματος με το οποίο ήταν σημασμένο το κάθε mAb.

Στο παράρτημα III παρατίθενται εικόνες που περιλαμβάνουν τα στικτογράμματα και τα ιστογράμματα που αφορούν την έκφραση των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του κάθε λευκοκυτταρικού υποπληθυσμού χωριστά, τα οποία προέκυψαν από την κυτταρομετρική ανάλυση ενός δείγματος της μελέτης.

### 3.2.1. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των μονοκυττάρων (πίν. 7), γινόνταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα III, εικ. 1). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα μονοκύτταρα που ήταν σημασμένα με αντι-CD45 (PC5) και αντι-CD14 (ECD) (παράρτημα III, εικ. 2). Ακολούθως γινόνταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα III, εικ. 3-5):

**α.** την κατάσταση ενεργοποίησης τους: HLA-DR, CD25, CD69 [121, 122, 131, 133]

**β.** την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD11b, CD11c, CD18, CD62L, CD29, CD49d, CD15 [112, 115, 130]

**γ.** υποδοχείς ανοσοσφαιρινών: CD16, CD32, CD64 [116, 117]

**δ.** υποδοχείς του LPS: CD14, TLR-4 [113, 114, 134, 135]

**ε.** υποδοχείς του συμπληρώματος: CD35 [125]

**στ.** μόρια συνδιέγερσης: CD80, CD86 [123, 124]

**Πίνακας 7.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των μονοκυττάρων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD15	CD62L	CD14	CD45
2	CD64	CD11c	CD14	CD45
3	CD25	CD69	CD14	CD45
4	CD18	CD11b	CD14	CD45
5	CD80	CD86	CD14	CD45
6	CD16	CD32	CD14	CD45
7	CD29	HLA-DR	CD14	CD45
8	CD49d	CD180	CD14	CD45
9	CD35	TLR-4	CD14	CD45
10	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD14	CD45

### 3.2.2. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ

Για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων (πίν. 8), γινόταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα III, εικ. 6). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια που ήταν σημασμένα με αντι-CD16/56 (PC5) και αντι-CD45 (ECD) (παράρτημα III, εικ. 7-8). Ακολούθως γινόταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα III, εικ. 9-10):

α. την κατάσταση ενεργοποίησης τους: CD69 [131]

β. την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD11b, CD11c, CD18, CD62L, CD11a, CD15 [112, 115, 130]

γ. υποδοχείς ανοσοσφαιρινών: CD64 [116, 117]

**Πίνακας 8.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD18	CD11b	CD45	CD16/56
2	CD15	CD11c	CD45	CD16/56
3	CD64	CD69	CD45	CD16/56
4	CD11a	CD62L	CD45	CD16/56
5	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD45	CD16/56

### 3.2.3. ΦΥΣΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (NK κύτταρα)

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των NK κυττάρων (πίν. 9), γινόταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα III, εικ. 11). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα NK κύτταρα που ήταν σημασμένα με αντι-CD16/56 (PC5) και αντι-CD3 (ECD) (παράρτημα III, εικ. 12). Ακολούθως γινόταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα III, εικ. 13):

α. την κατάσταση ενεργοποίησης τους: CD69 [131]

β. την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD11b, CD18, CD62L [112, 130]

**Πίνακας 9.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD18	CD69	CD3	CD16/56
2	CD11b	CD62L	CD3	CD16/56
3	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD16/56

### 3.2.4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων (πίν. 10), γινόταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα ΙΙΙ, εικ. 14). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα που ήταν σημασμένα με αντι-CD4 (PC5) και αντι-CD3 (ECD) (παράρτημα ΙΙΙ, εικ. 15). Ακολούθως γινόταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα ΙΙΙ, εικ. 16-17):

- α. την κατάσταση ενεργοποίησης τους: HLA-DR, CD25, CD69 [121, 122, 131, 133]
- β. την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD18, CD62L [112, 130]
- γ. την ωριμότητα των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων: CD45RA, CD45RO [126, 127]
- δ. την TCR ειδικότητα: TCRγδ, TCRαβ [107, 136, 137]
- ε. την έκφραση του μορίου συνδιέγερσης: CD28 [123, 124]

**Πίνακας 10.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD45RA	CD45RO	CD3	CD4
2	HLA-DR	CD69	CD3	CD4
3	CD25	CD28	CD3	CD4
4	TCRγδ	TCRαβ	CD3	CD4
5	CD18	CD62L	CD3	CD4
6	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD4

### 3.2.5. ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυτταρολυτικών Τ-λεμφοκυττάρων (πίν. 11), γινόταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα III, εικ. 18). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα κυτταρολυτικά Τ-λεμφοκύτταρα που ήταν σημασμένα με αντι-CD8 (PC5) και αντι-CD3 (ECD) (παράρτημα III, εικ. 19). Ακολούθως γινόταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα III, εικ. 20-21):

- α. την κατάσταση ενεργοποίησης τους: HLA-DR, CD25, CD69 [121, 122, 131, 133]
- β. την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD18, CD62L, CD56 [112, 130, 128, 129]
- γ. την έκφραση του υποδοχέα ανοσοσφαιρινών: CD16 [116, 117]
- δ. την έκφραση του μορίου συνδιέγερσης: CD28 [123, 124]

**Πίνακας 11.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των κυτταρολυτικών Τ-λεμφοκυττάρων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	HLA-DR	CD69	CD3	CD8
2	CD25	CD28	CD3	CD8
3	CD16	CD56	CD3	CD8
4	CD18	CD62L	CD3	CD8
6	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD3	CD8

### 3.2.6. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των Β-λεμφοκυττάρων (πίν. 12), γινόταν αρχικά αναγνώριση τους με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο (SS) σκεδασμό (παράρτημα III, εικ. 22). Στον πληθυσμό αυτό αναγνωρίζονταν τα Β-λεμφοκύτταρα που ήταν σημασμένα με αντι-CD20 (PC5) και αντι-CD19 (ECD) (παράρτημα III, εικ. 23). Ακολούθως γινόταν ο προσδιορισμός των μεμβρανικών δεικτών (FITC και PE) που αφορούσαν (παράρτημα III, εικ. 24-25):

- α. την κατάσταση ενεργοποίησης τους: HLA-DR, CD25, CD69 [121, 122, 131, 133]
- β. την έκφραση μορίων προσκόλλησης: CD62L [130]
- γ. την ωριμότητα των Β-λεμφοκυττάρων: CD45RA, CD45RO [126, 127]

δ. ειδικούς υποπληθυσμούς (B-1a): CD5 [110]

ε. την έκφραση του μορίου συνδιέγερσης: CD28 [123, 124]

**Πίνακας 12.** Οι συνδυασμοί των mAb για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των Β-λεμφοκυττάρων σε δείγμα ολικού αίματος, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ mAb				
	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD45RA	CD45RO	CD19	CD20
2	HLA-DR	CD69	CD19	CD20
3	CD25	CD28	CD19	CD20
4	CD5	CD62L	CD19	CD20
6	Ισοτυπικό control	Ισοτυπικό control	CD19	CD20

**Πίνακας 13.** Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των λευκοκυτταρικών αντιγόνων που διερευνήθηκαν.

ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<b>CD3</b>	Αποτελεί τμήμα του συμπλέγματος του TcR	Θυμοκύτταρα, ώριμα T κύτταρα	107
<b>CD4</b>	Συνυποδοχέας των τάξης II MHC μορίων. Υποδοχέας της gp120 του HIV-1	T – βοηθητικά, μονοκύτταρα - μακροφάγα	108, 109
<b>CD5</b>	Συνδέτης του CD72	Ωριμα T κύτταρα, θυμοκύτταρα, B-1a υποπληθυσμό των B κυττάρων	110
<b>CD8</b>	Συνυποδοχέας των τάξης I MHC μορίων	T κυτταρολυτικά, υποπληθυσμό των NK κυττάρων, θυμοκύτταρα	108, 111
<b>CD11a</b>	Υπομονάδα αL της ιντεγκρίνης LFA-1, συνδέεται με τα μόρια προσκόλλησης CD54 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3	Λεμφοκύτταρα (T και B), ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα - μακροφάγα	112
<b>CD11b</b>	Υπομονάδα αM της ιντεγκρίνης CR3, συνδέεται με τα μόρια προσκόλλησης CD54, iC3b και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας.	NK κύτταρα, μυελοειδή κύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα - μακροφάγα	112
<b>CD11c</b>	Υπομονάδα αX της ιντεγκρίνης CR4	Μονοκύτταρα – μακροφάγα, NK κύτταρα, ουδετερόφιλα	112
<b>CD14</b>	Υποδοχέας του συμπλέγματος LPS – LBP (LPS- Binding Protein)	Μονοκύτταρα – μακροφάγα	113, 114

**Πίνακας 13** (συνέχεια). Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των λευκοκυτταρικών αντιγόνων που διερευνήθηκαν.

ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<b>CD15</b> (Lewis x)	Πεντασακχαρίτης που εκφράζεται στα γλυκοπεπτιδία και στις γλυκοπρωτεΐνες πολλών κυτταρικών μεμβρανών	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα - μακροφάγα, ηωσινόφιλα	115
<b>CD16</b>	Χαμηλής συγγένειας υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG (FcγRIII), μεσολαβητής της φαγοκυττάρωσης	Ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, NK κύτταρα	116, 117
<b>CD18</b>	Υπομονάδα της ιντεγκρίνης b2, συνδέεται με τις ιντεργκρίνες της ομάδας α (CD11a, CD11a, CD11a)	Λευκοκύτταρα	112
<b>CD19</b>	Συνυποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων (μετέχει στην ανάπτυξη, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση τους)	Β-λεμφοκύτταρα	118, 119
<b>CD20</b>	Μετέχει στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων	Β-λεμφοκύτταρα	120
<b>CD25</b>	Χαμηλής συγγένειας υποδοχέας της IL-2 (IL-2Ra)	Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα, μονοκύτταρα	121, 122
<b>CD28</b>	Ενεργοποίηση παρθένων Τ-λεμφοκυττάρων, συνδέεται με τα CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2)	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> ), Ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	123, 124
<b>CD29</b>	Ιντεγκρίνη, συνδέεται με το CD49d και σχηματίζει το VLA-4,	Μονοκύτταρα, Β-κύτταρα	112



**Πίνακας 13** (συνέχεια). Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των λευκοκυτταρικών αντιγόνων που διερευνήθηκαν.

ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<b>CD32</b>	Χαμηλής συγγένειας υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG (FcγRII)	Μονοκύτταρα, Β-κύτταρα, ηωσινόφιλα	116, 117
<b>CD35</b>	Υποδοχέας του συμπληρώματος τύπου I (CRI), μεσολαβητής της φαγοκυττάρωσης	Β-κύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, ερυθροκύτταρα	125
<b>CD45 (LCA)</b>	Ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	Λευκοκύτταρα	126, 127
<b>CD45RA</b>	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (μνημονικά) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα - μακροφάγα	126, 127
<b>CD45RO</b>	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (παρθένα) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα	126, 127
<b>CD49d</b>	Ιντεγκρίνη α4, συνδέεται με το CD29 και σχηματίζει το VLA-4, συνδέεται με τη φμπρονεκτίνη και το VCAM-1.	Μονοκύτταρα, Β-κύτταρα, θυμοκύτταρα	112
<b>CD56</b>	Ισότυπος του N-CAM (μόριο προσκόλλησης)	NK κύτταρα	128, 129
<b>CD62L</b>	Μόριο προσκόλλησης, συνδέεται με τα CD34 και GlyCAM, μεσολαβεί στην κύλιση των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων επί του ενδοθηλίου	Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα, μονοκύτταρα, NK κύτταρα	130

**Πίνακας 13** (συνέχεια). Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των λευκοκυτταρικών αντιγόνων που διερευνήθηκαν.

ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<b>CD64</b>	Υψηλής συγγένειας υποδοχέας του Fc τμήματος της IgG (FcγRI)	Μονοκύτταρα - μακροφάγα	116, 117
<b>CD69</b>	Πρώιμος δείκτης ενεργοποίησης	Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα, ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	131
<b>CD80</b>	Μόριο συνδιέγερσης, συνδέτης των CD28 και CTLA-4	Υποπληθυσμοί Β-κυττάρων	123, 124
<b>CD86</b>	Μόριο συνδιέγερσης, συνδέτης των CD28 και CD152 (CTLA-4)	Μονοκύτταρα, ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	123, 124
<b>CD180 (RP105)</b>	Ενεργοποίηση Β-κυττάρων, πρωτεΐνη ομόλογη του TLR,	Β-κύτταρα	132
<b>HLA-DR</b>	Μόριο MHC τάξης II, συμμετέχει στην αντιγονοπαρουσίαση και συνδέεται με το CD4	Μονοκύτταρα - μακροφάγα, δενδριτικά, Β-κυττάρων, ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα	133
<b>TLR4</b>	Υποδοχέας φυσικής ανοσίας, τμήμα του υποδοχέα του LPS	Μονοκύτταρα	134, 135
<b>TCR-αβ</b>	Τ κυτταρικός υποδοχέας με αλυσίδες α,β	Τ-λεμφοκύτταρα	107, 136
<b>TCR- γδ</b>	Τ κυτταρικός υποδοχέας με αλυσίδες γ,δ	Υποπληθυσμός Τ-λεμφοκύτταρα (σε κοιλότητες)	107, 137



**Πίνακας 14.** Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Μονοκλωνικά Αντισώματα	Παρασκευάστρια Εταιρεία	Κλώνος	Αριθμός Καταλόγου	Lot.
αντι - <b>CD3</b> (ECD)	Beckman-Coulter	UCHT1	AO7748	10
αντι - <b>CD4</b> (PC5)	Beckman-Coulter	13B8.2	AO7752	04
αντι - <b>CD5</b> (FITC)	Beckman-Coulter	BL1a	AO8932	01
αντι - <b>CD8</b> (FITC)	Beckman-Coulter	B9.11	AO7758	01
αντι - <b>CD11a</b> (FITC)	Beckman-Coulter	Bear1	IM0530	33
αντι - <b>CD11b</b> (PE)	Beckman-Coulter	Bear1	IM2581	11
αντι - <b>CD11c</b> (PE)	Beckman-Coulter	BU15	IM1760	24
αντι - <b>CD14</b> (ECD)	Beckman-Coulter	RM052	IM2707	30
αντι - <b>CD15</b> (FITC)	Beckman-Coulter	8045	IM1423	50
αντι - <b>CD16</b> (FITC)	Beckman-Coulter	3G8	IM0814	32
αντι - <b>CD18</b> (FITC)	Beckman-Coulter	7E4	IM1568	15
αντι - <b>CD19</b> (ECD)	Beckman-Coulter	J4.119	AO7770	12
αντι - <b>CD20</b> (PC5)	Beckman-Coulter	B9E9 (HRC20)	IM2644	17
αντι - <b>CD25</b> (FITC)	Beckman-Coulter	B1.49.9	IM0478	03
αντι - <b>CD28</b> (PE)	Beckman-Coulter	CD28.2	IM2071	13
αντι - <b>CD29</b> (FITC)	Beckman-Coulter	K20	IM0791	26
αντι - <b>CD32</b> (PE)	Beckman-Coulter	2E1	IM1935	20
αντι - <b>CD35</b> (FITC)	Beckman-Coulter	J3D3	IM1836	12
αντι - <b>CD45</b> (ECD)	Beckman-Coulter	J.33	AO7784	16
αντι - <b>CD45</b> (PC5)	Beckman-Coulter	J.33	AO7785	17
αντι - <b>CD45RA</b> (FITC)	Beckman-Coulter	ALD11	AO7786	02
αντι - <b>CD45RO</b> (PE)	Beckman-Coulter	UCHL1	AO7787	03
αντι - <b>CD49d</b> (FITC)	Beckman-Coulter	HP2/1	IM1404	21
αντι - <b>CD56</b> (PE)	Beckman-Coulter	N901 (NKH-1)	IM2073	16
αντι - <b>CD64</b> (FITC)	Beckman-Coulter	22	IM1604	50

αντι - <b>CD62L</b> (PE)	Beckman-Coulter	DREG56	IM2214	12
αντι - <b>CD69</b> (PE)	Beckman-Coulter	TP1.55.3	IM0463	37
αντι - <b>CD80</b> (FITC)	Beckman-Coulter	MAB104	IM1853	20
αντι - <b>CD86</b> (PE)	Beckman-Coulter	HA5.2B7	IM2729	14
αντι - <b>CD180</b> (PE)	eBioscience	MHR73-11	12-1809-73	EO11540
αντι - <b>HLA-DR</b> (FITC)	Beckman-Coulter	B8.12.2	IM0463	37
αντι - <b>HLA-DR</b> (PE)	Beckman-Coulter	B8.12.2	IM0464	42
αντι - <b>TLR4</b> (PE)	eBioscience	HTA125	12-9917-73	EO12055
αντι - <b>TCR-<math>\alpha\beta</math></b> (PE)	Beckman-Coulter	BMAO31	IM1467	22
αντι - <b>TCR- <math>\gamma\delta</math></b> (FITC)	Beckman-Coulter	IMMU510	IM1571	19

---

## 4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων όπως επίσης η ικανότητα τους για οξειδωτική έκρηξη (respiratory burst) ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τα kit της εταιρείας ORPEGEN<sup>®</sup> Pharma PHAGOTEST (Cat. No 341060) και BURST TEST (Cat. No 341058) τα οποία περιέχουν οψωνινοποιημένα βακτήρια (*E. coli*) σημασμένα με φλουορεσκεΐνη (FITC).

### 4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ

Γινόταν έλεγχος της ικανότητας των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων να φαγοκυτταρώνουν βακτήρια (εικ. 3). Χρειάζονταν συνολικά 200  $\mu$ L ηπαρινισμένου αίματος. Αρχικά το δείγμα χωρίζονταν σε 2 σωληνάρια, από τα οποία το ένα αποτελούσε τον μάρτυρα (control) και το δεύτερο το υπό μέτρηση δείγμα (test). Και τα δύο σωληνάρια επώαζονταν με οψωνινοποιημένα βακτήρια (*E. coli*), τα οποία ήταν σημασμένα με φλουορεσκεΐνη (FITC), για 10 λεπτά. Η διαφορά ήταν στην θερμοκρασία επώασης. Η επώαση του control γινόταν στους 0 °C, ώστε να σταματήσει η φαγοκυττάρωση των βακτηρίων, ενώ του test γινόταν σε θερμοκρασία 37 °C, ώστε να αναπαραχθούν οι συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό. Εν συνεχεία γινόταν επώαση με το QUENCHING SOLUTION, ένα διάλυμα που χρησιμοποιούνταν για να εξουδετερωθεί ο φθορισμός των βακτηρίων τα οποία δεν είχαν φαγοκυτταρωθεί. Ακολουθούσαν πλύσεις, λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τέλος επώαση στους 0 °C με το DNA STAINING SOLUTION, με το οποίο γινόταν η σταθεροποίηση του DNA των λευκοκυττάρων για να μπορούν να διακριθούν από τα βακτήρια.

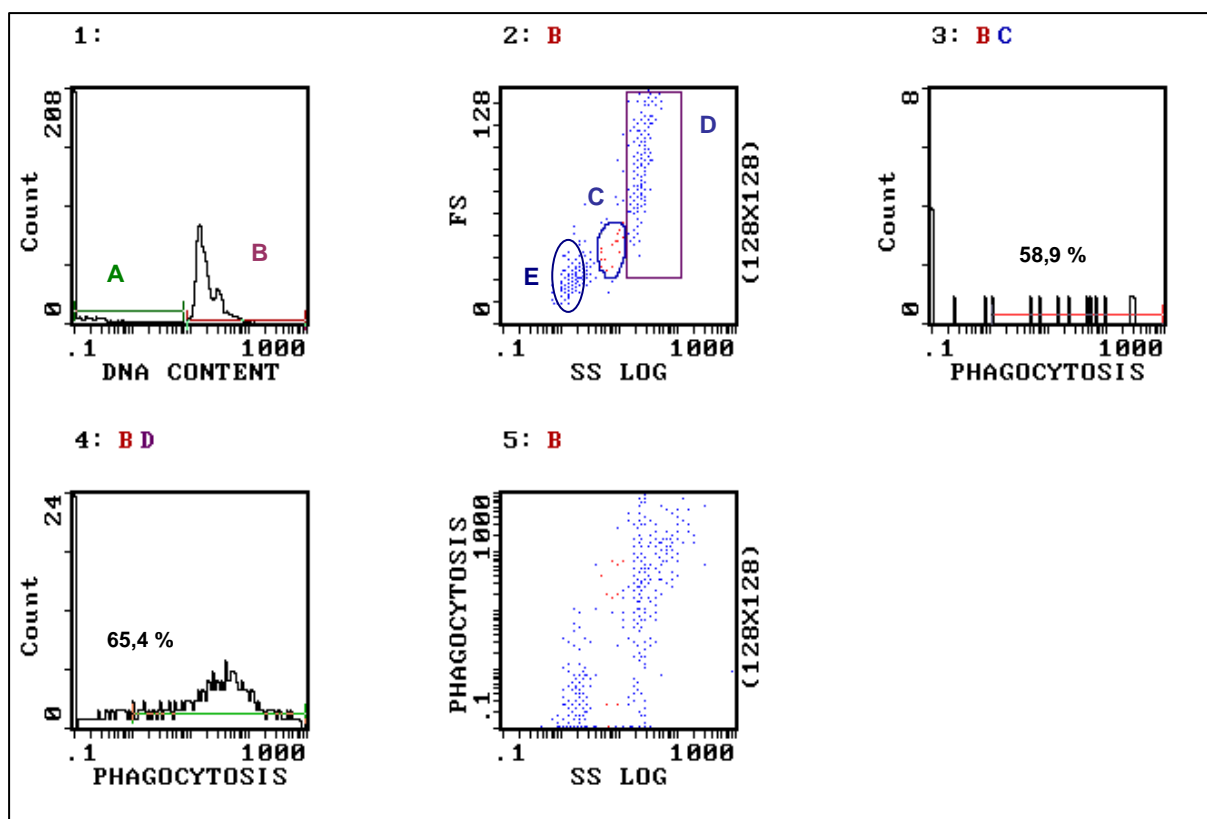
Οι μετρήσεις γίνονταν στο κυτταρόμετρο ροής Epics XL-MCL (4 colour analysis, Beckman-Coulter) εντός 60 λεπτών.

### 4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΚΡΗΞΗΣ

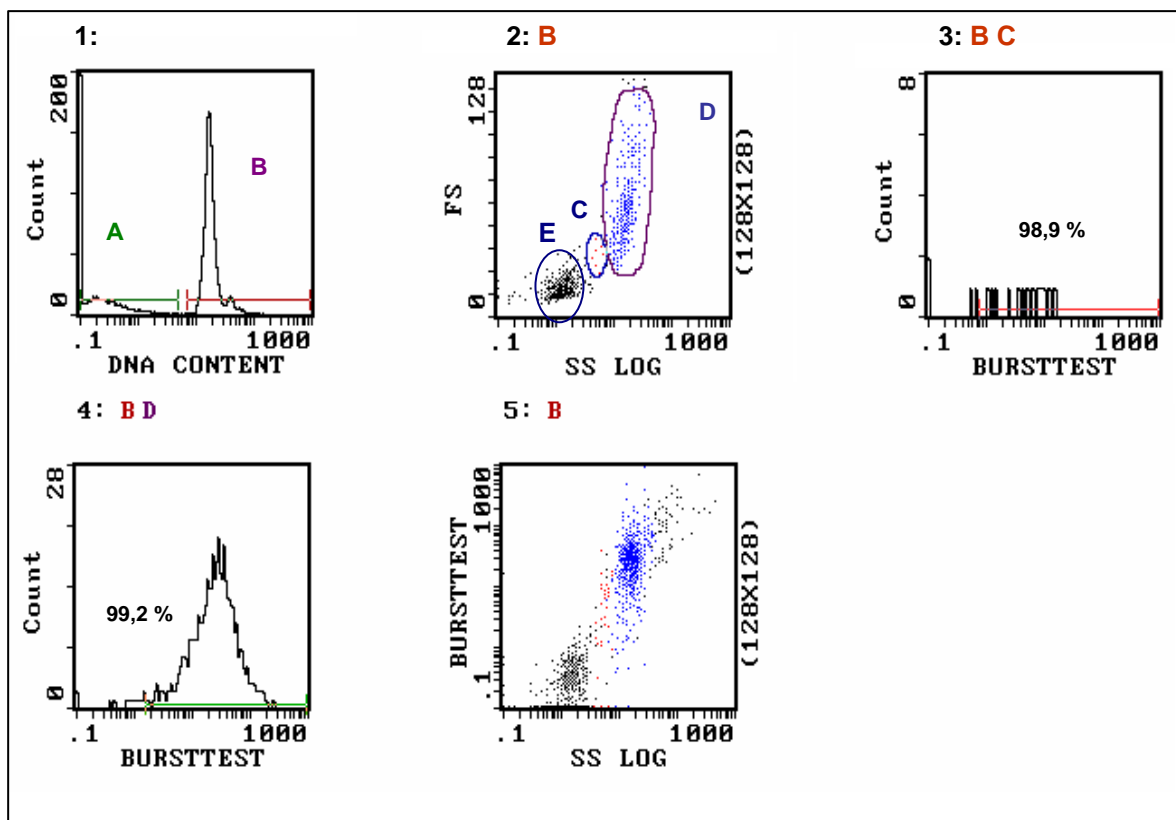
Με την μέθοδο αυτή γινόταν έλεγχος της ικανότητας των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων όχι μόνο να φαγοκυτταρώνουν τα βακτήρια, αλλά και να εκκρίνουν τα κατάλληλα οξειδωτικά ένζυμα μέσα στο φαγολυσόσωμα για την πέψη των βακτηρίων (εικ. 4). Χρειάζονταν συνολικά 400  $\mu$ L ηπαρινισμένου αίματος. Το δείγμα χωρίζονταν σε 4 σωληνάρια από τα οποία: το 1<sup>ο</sup> αποτελούσε τον μάρτυρα (control), στο οποίο δεν γινόταν προσθήκη βακτηριδίων, το 2<sup>ο</sup> το υπό μέτρηση δείγμα (test), το οποίο επώαζονταν

με τα βακτηρίδια (*E. coli*) τα οποία ήταν σημασμένα με FITC, το 3<sup>ο</sup> τον αρνητικό μάρτυρα (f-MLP) και το 4<sup>ο</sup> το θετικό μάρτυρα (PMA). Τα τέσσερα σωληνάρια επωάζονταν για 20 λεπτά στους 37 °C και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη του SUBSTRATE SOLUTION, ουσία η οποία όταν εκκρίνονται τα ένζυμα οξειδώνονταν και φθόριζε. Ακολουθούσαν πλύσεις και λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τέλος επώαση στους 0 °C με το DNA STAINING SOLUTION, με το οποίο γινόταν η σταθεροποίηση του DNA των λευκοκυττάρων για να μπορούν να διακριθούν από τα βακτήρια.

Οι μετρήσεις γίνονταν στο κυτταρόμετρο ροής Epics XL-MCL (4 colour analysis, Beckman-Coulter) εντός 30 λεπτών.



**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Η εικόνα προέρχεται από το κυτταρόμετρο. **1:** ανάλογα με την ποσότητα του DNA διακρίνονται τα βακτήρια τα οποία δεν έχουν φαγοκυτταρωθεί (A), από τα λευκά αιμοσφαίρια (B). **2:** εστιάζοντας στο παράθυρο των λευκοκυττάρων (B) και βάσει του πρόσθιου (FS) και του πλάγιου σκεδασμού (SS) διαχωρίζονται σε λεμφοκύτταρα (E), μονοκύτταρα (C) και πολυμορφοπύρηνα (D). **3:** εστιάζοντας στα μονοκύτταρα (C) φαίνεται το ποσοστό των μονοκυττάρων που έχουν φαγοκυτταρώσει τα βακτήρια. **4:** εστιάζοντας στα πολυμορφοπύρηνα (D) φαίνεται το ποσοστό των πολυμορφοπύρηνων που έχουν φαγοκυτταρώσει τα βακτήρια. **5:** παρουσιάζονται επίσης τα λευκοκύτταρα που έχουν φαγοκυτταρώσει τα βακτήρια.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Η εικόνα προέρχεται από το κυτταρόμετρο. **1:** ανάλογα με την ποσότητα του DNA διακρίνονται τα βακτήρια τα οποία δεν έχουν φαγοκυτταρωθεί (A), από τα λευκά αιμοσφαίρια (B). **2:** εστιάζοντας στο παράθυρο των λευκοκυττάρων (B) και βάσει του πρόσθιου (FS) και του πλάγιου σκεδασμού (SS) διαχωρίζονται σε λεμφοκύτταρα (E), μονοκύτταρα (C) και πολυμορφοπύρηνα (D). **3:** εστιάζοντας στα μονοκύτταρα (C) φαίνεται το ποσοστό των μονοκυττάρων τα οποία έχουν εκκρίνει τα ένζυμα για την πέψη των βακτηρίων. **4:** εστιάζοντας στα πολυμορφοπύρηνα (D) φαίνεται το ποσοστό των πολυμορφοπύρηνων που έχουν εκκρίνει τα ένζυμα για την πέψη των βακτηρίων. **5:** φαίνονται τα πολυμορφοπύρηνα και τα μονοκύτταρα τα οποία επίσης έχουν εκκρίνει οξειδωτικά ένζυμα.



## 5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ

Έγινε έλεγχος της ικανότητας των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος (PBMC) και ειδικότερα των μονοκυττάρων να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες μετά από διέγερσή τους. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών, η μεθοδολογία Elispot και η μέθοδος της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρίας. Στον πίνακα 15 φαίνεται η κατανομή των ατόμων στα οποία έγινε προσδιορισμός κυτταροκινών με τις παραπάνω μεθόδους .

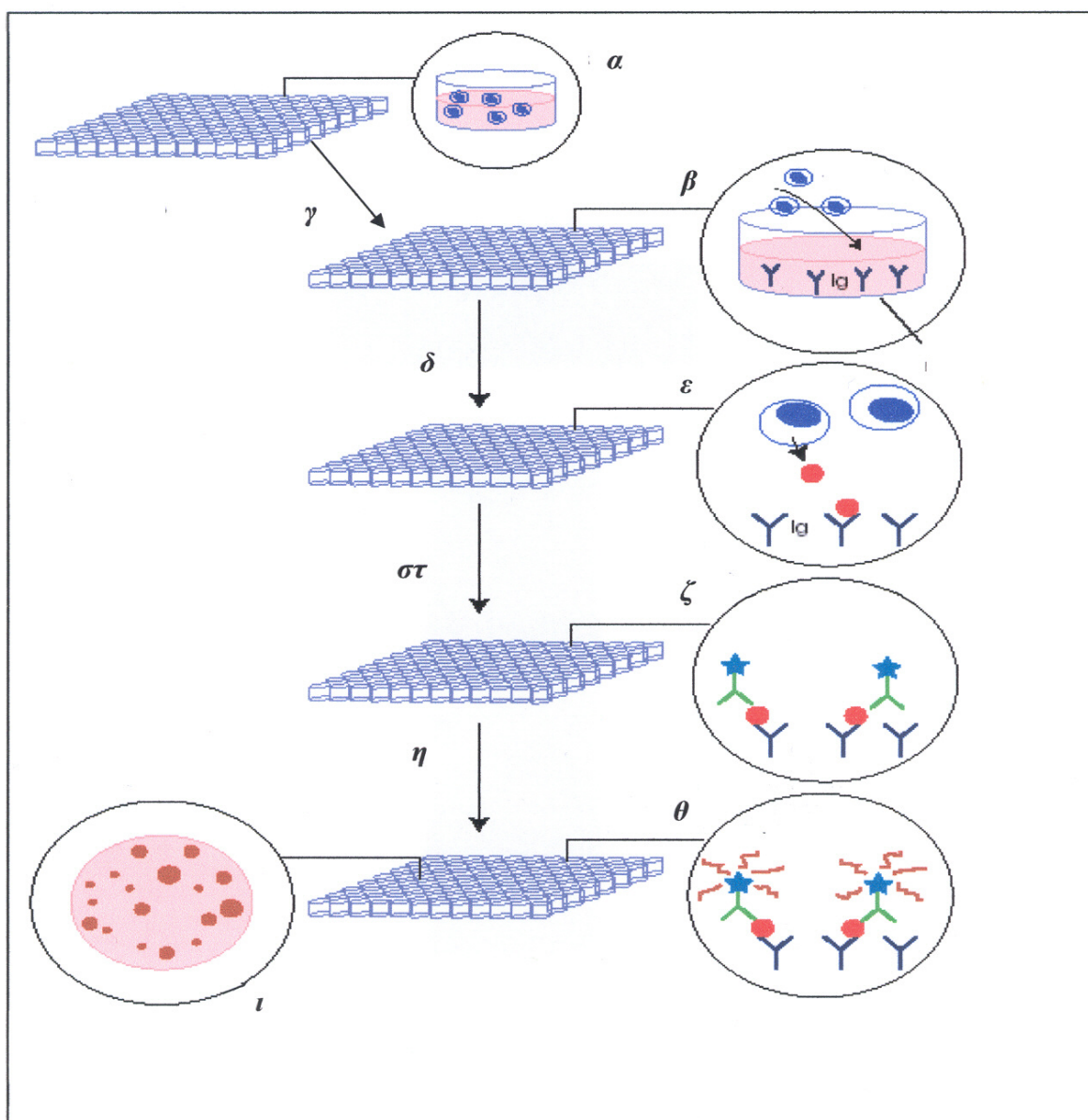
### 5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ELISPOT

Με τη μέθοδο Elispot (εικ. 5) επιτυγχάνεται η μέτρηση κυτταροκινών που παράγονται και εκκρίνονται ανά κύτταρο μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση. Τα υπό μέτρηση κύτταρα επιστρώνονται σε μικροπλάκες που αποτελούνται από 96 φρεάτια και γίνεται ενεργοποίηση τους με διάφορα μιτογόνα (PHA, LPS) [138, 139, 140].

Στη παρούσα μελέτη γινόταν καλλιέργεια PBMC στις μικροπλάκες Elispot και ενεργοποίηση τους με LPS στην προσπάθεια να διεγερθούν τα μονοκύτταρα και να επαχθεί από αυτά η έκκριση κυτταροκινών. Πιο συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η ικανότητα των PBMC (πριν τη διέγερση με LPS) αλλά και των μονοκυττάρων να παράγουν και να εκκρίνουν τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6 και TNF- $\alpha$ .

**Πίνακας 15.** Κατανομή ασθενών και μαρτύρων για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	MARTYPEΣ
ΑΡΙΘΜΟΣ (N)	40	20
ΦΥΛΟ (άνδρες / γυναίκες)	7 / 33	4 / 16
ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ ( $\pm$ SD)	47,70 $\pm$ 10,28	41,45 $\pm$ 15,33
ICD-10 ( F32.2/F32. 3)	38 / 2	-
HDRS ( $\pm$ SD)	27 $\pm$ 4	-

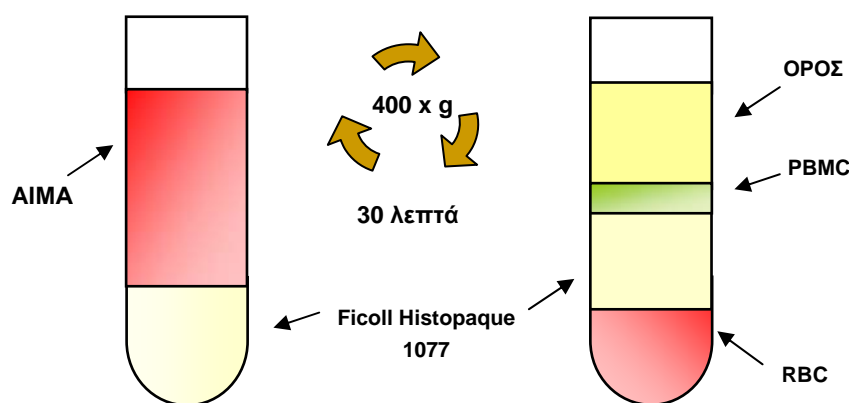


**Εικόνα 5.** Σχηματική παράσταση των βημάτων της τεχνικής Elispot

- α.** Καλλιέργεια PBMC ( $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ) παρουσία LPS ( $100 \text{ pg/mL}$ ) για να διεγερθούν τα μονοκύτταρα
- β.** Οι μικροπλάκες είναι επωασμένες με αντίσωμα έναντι της υπό μέτρησης κυτταροκίνης
- γ.** Τα PBMC επωάζονται στην πλάκα για 24 ώρες
- δ.** Εκκρίνουν κυτταροκίνες
- ε.** Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται δεσμεύονται από το αντίσωμα
- στ.** Απομακρύνονται τα κύτταρα με πλύσεις
- ζ.** Προστίθεται δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο κατάλληλο να μετατρέψει το υπόστρωμα σε έγχρωμη ουσία.
- η.** Προστίθεται το υπόστρωμα
- θ-ι.** Οι κυτταροκίνες που έχουν εκκριθεί από τα κύτταρα και συνδεθεί με το αντίσωμα με το οποίο ήταν προεπιστρωμένες οι πλάκες δημιουργούν εγχρωμές κηλίδες (spots).

### 5.1.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στα άτομα που πήραν μέρος στη μελέτη πραγματοποιούνταν αιμοληψία 20 mL φλεβικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα (2-5 U heparin/mL αίματος). Αρχικά γινόταν απομόνωση των PBMC, δηλαδή των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας. Σε σωληνάριο 50 mL γινόταν αρχικά προσθήκη 15 mL φικόλης (Ficoll Histopaque-1077) και εν συνεχεία με αργή έγχυση προσθήκη του ολικού αίματος (20 mL). Αρχίζε η πρώτη φυγοκέντρηση (400 g) του δείγματος για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου (εικ. 6). Εν συνεχεία γινόταν η συλλογή της στιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων και η τοποθέτηση της σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάριο 50 mL. Ακολουθούσαν 3 πλύσεις με ισοτονικό διάλυμα PBS-EDTA και γινόταν ξανά φυγοκέντρηση (250 g) του δείγματος για 8 λεπτά, στους 4°C.



**Εικόνα 6.** Φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας.

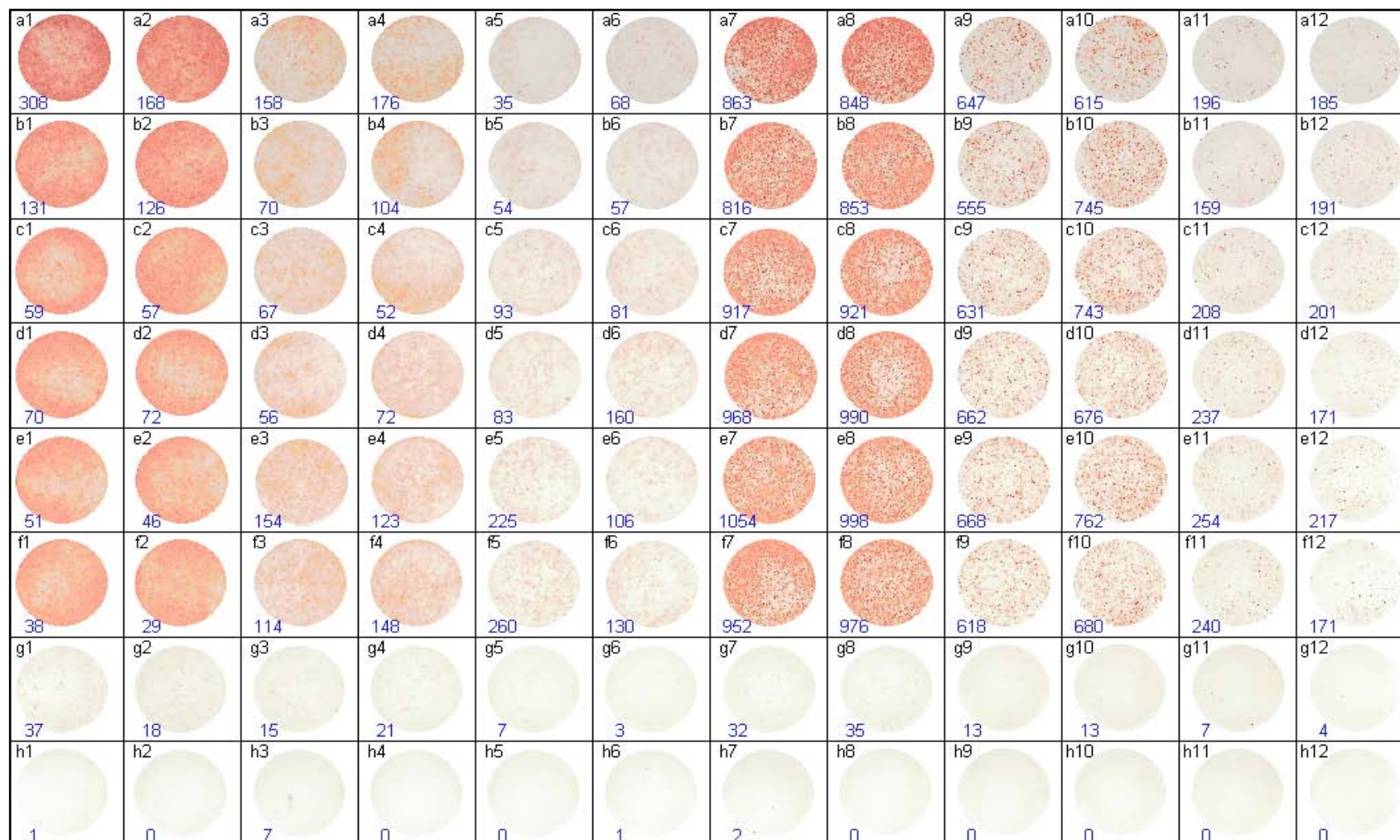
Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των μονοπύρηνων που απομονώνονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer και ακολουθούσε μία τελευταία φυγοκέντρηση (200 g) για 8 λεπτά, στους 4°C. Προκειμένου να διατηρηθούν τα κύτταρα ζωντανά έως την ημέρα επεξεργασίας τους γινόταν εναιώρηση τους σε ψυκτικό διάλυμα. Το ψυκτικό διάλυμα περιείχε 50% FBS (Fetal Bovine Serum), 40% SF-RPMIc (500 mL RPMI-1640, 10 mL PSG, 2,5 mL 2ME) και 10% DMSO. Η εναιώρηση των κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα γινόταν με βάση την συγκέντρωσή τους, περίπου  $10 \times 10^6$  PBMC/mL. Αρχικά τα κύτταρα τοποθετούνταν για 24 ώρες σε ισοπροπανόλη στους -80°C και την επόμενη μέρα τοποθετούνταν σε βαθιά κατάψυξη στο υγρό άζωτο μέχρι τη στιγμή που συγκεντρώθηκε όλο το υλικό της μελέτης.

### 5.1.2. ΠΡΟΤΥΠΩΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISPOT

Πριν την έναρξη της επεξεργασίας των δειγμάτων της μελέτης προηγήθηκε τυποποίηση της μεθόδου Elispot [141, 142]. Οι μικροπλάκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδική παραγγελία στην κατασκευάστρια εταιρεία (Immunospot Assay plate TNF- $\alpha$ , IL-6/AID, Art No ELSP) και ήταν προεπιστρωμένες με Ab έναντι των κυτταροκινών TNF- $\alpha$  και IL-6. Αρχικά έγιναν πειράματα που αφορούσαν τόσο τη συγκέντρωση των κυττάρων που θα καλλιεργούνταν στις μικροπλάκες, όσο και την συγκέντρωση του LPS που θα χρησιμοποιούνταν για την διέγερση των μονοκυττάρων, ώστε τα αποτελέσματα (αριθμός έγχρωμων κηλίδων) να μπορούν να αξιολογηθούν σωστά από το λογισμικό. Για να είναι ακριβής η μέτρηση έπρεπε οι έγχρωμες κηλίδες να είναι διακριτές μεταξύ τους [143]. Οι έγχρωμες κηλίδες αντιπροσωπεύουν την κυτταροκίνη που έχει παραχθεί και εκκριθεί ανά κύτταρο.

Στο πρώτο πείραμα έγινε επώαση των πλακών με διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων (PBMC)  $10^5/100 \mu\text{L}$ ,  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  και  $10^4/100 \mu\text{L}$ . Ταυτόχρονα γινόταν ενεργοποίηση των PBMC με διαδοχικές αραιώσεις LPS από αρχική συγκέντρωση 8  $\mu\text{g/mL}$  έως μηδενική συγκέντρωση LPS. Με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος (εικ. 7) φάνηκε ότι πιο διακριτές έγχρωμες κηλίδες, είχαμε σε συγκέντρωση PBMC  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ . Παράλληλα φάνηκε ότι σε συγκέντρωση PBMC  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ , ενώ γινόταν διέγερση τους με τις συγκεκριμένες αραιώσεις του LPS δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τον αριθμό των spots που αξιολογούνταν από το λογισμικό και έπρεπε να χρησιμοποιηθούν μικρότερες αραιώσεις LPS. Για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης των PBMC ακολούθησε και δεύτερο πείραμα (εικ. 8). Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν PBMC σε σταθερή συγκέντρωση  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  για κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας Elispot.

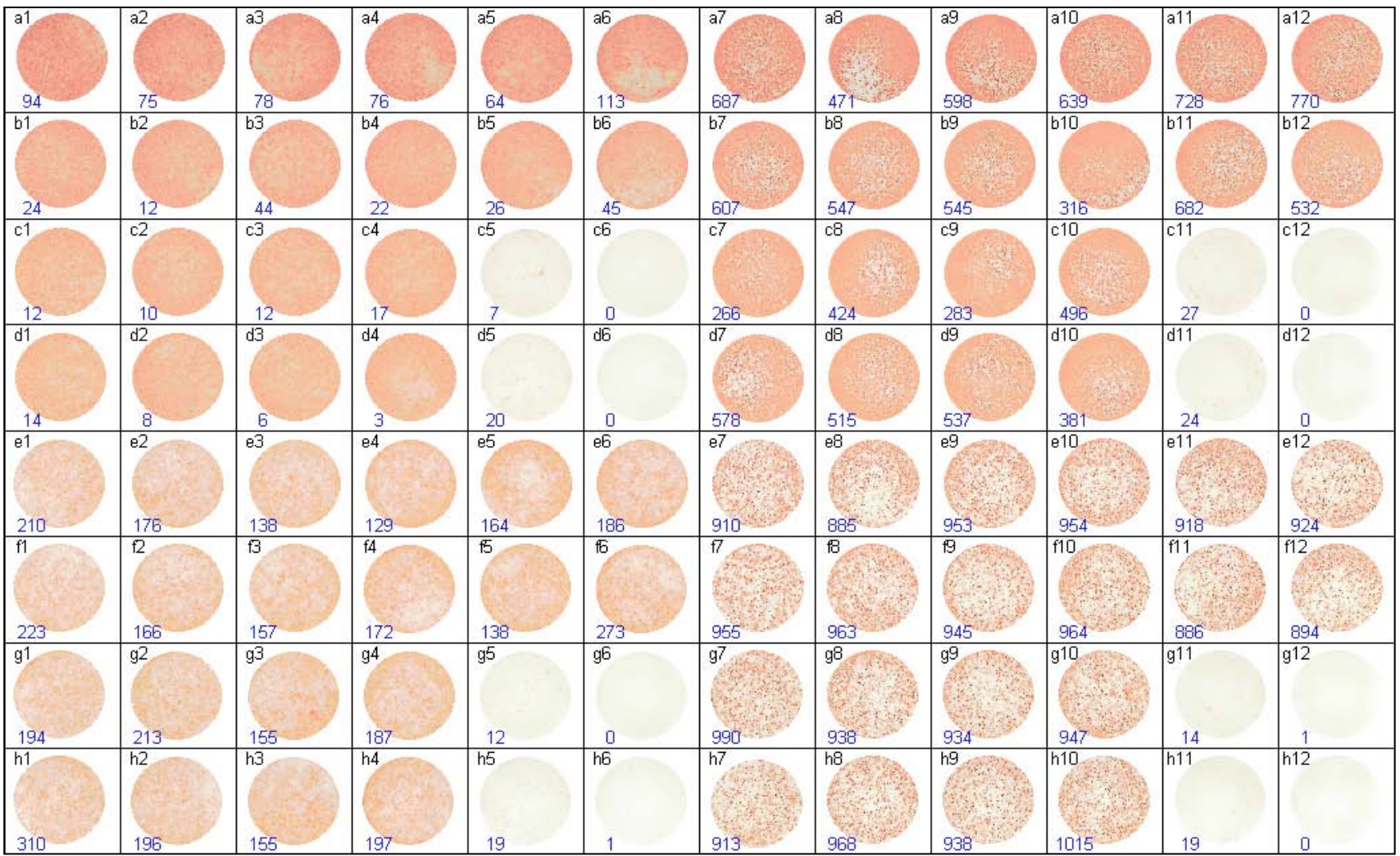
Ακολούθησαν πειράματα (εικ. 9-10) ώστε να γίνει τιτλοποίηση της συγκέντρωσης του LPS. Στα πειράματα αυτά η συγκέντρωση των PBMC ήταν σταθερή  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  και γίνονταν διαδοχικές αραιώσεις του LPS από συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/mL}$  έως 0,5  $\text{pg/mL}$ . Στην εικόνα 11 φαίνεται η γραφική παράσταση για κάθε κυτταροκίνη χωριστά (IL-6 και TNF- $\alpha$ ) βάσει της οποίας επιλέχθηκε η συγκέντρωση του LPS. Χρησιμοποιήθηκε LPS σε συγκέντρωση 100  $\text{pg/mL}$  για την ενεργοποίηση  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  PBMC. Στην συγκεκριμένη συγκέντρωση γινόταν διέγερση των μονοκυττάρων και οι έγχρωμες κηλίδες που εμφανίζονταν ήταν διακριτές μεταξύ τους ώστε να αξιολογούνται από το λογισμικό.



**ΕΙΚΟΝΑ 7.** Οι στήλες 1→6 έχουν επωαστεί με TNF-α και οι στήλες 7→12 με την IL-6. Στις στήλες 1-2 και 7-8 η συγκέντρωση των PBMC είναι  $10^5/100 \mu\text{L}$ , στις στήλες 3-4 και 9-10 είναι  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ , ενώ στις στήλες 5-6 και 11-12 είναι  $10^4/100 \mu\text{L}$ . Διαδοχικές αραιώσεις έγιναν ανά γραμμή (a-f) για το LPS. Γινόταν υποδιπλασιασμός της συγκέντρωσης του LPS, από αρχική συγκέντρωση 8  $\mu\text{g}$  έως 0,25  $\mu\text{g}$ . Στη γραμμή g δεν υπήρχε καθόλου LPS, ενώ στη γραμμή h δεν υπήρχαν PBMC. Η τελευταία γραμμή λειτουργούσε ως αρνητικός μάρτυρας. Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος γίνεται εμφανές ότι οι πιο διακριτές κηλίδες παρατηρούνται στις στήλες 3-4 για τον TNF-α και 9-10 για την IL-6 (δηλ. σε συγκέντρωση PBMC  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ), ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του LPS.

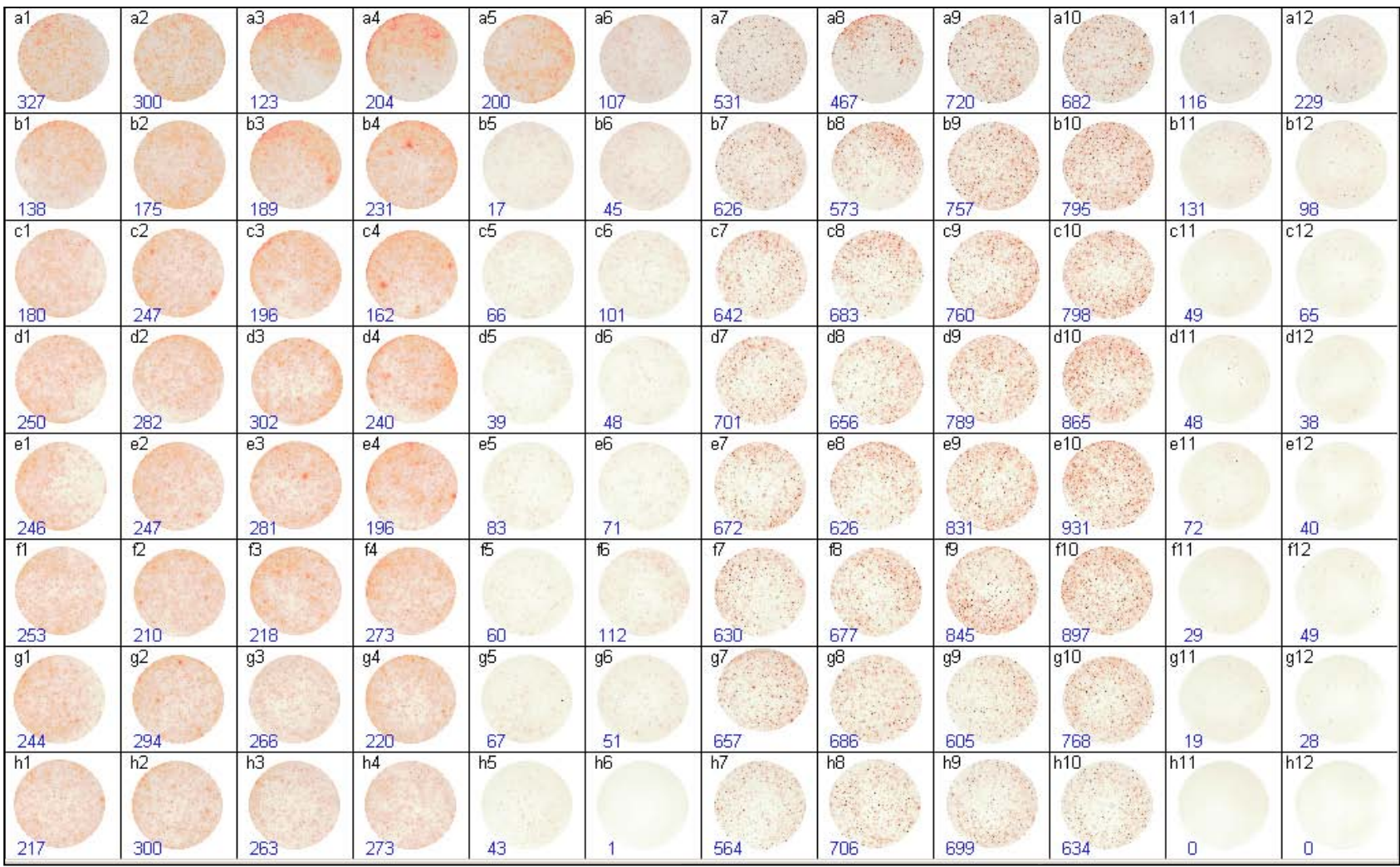
\* Ο αριθμός που αναγράφεται κάτω αριστερά σε κάθε φρεάτιο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυτταροκινών που έχουν παραχθεί και εκκριθεί από τα κύτταρα.





**ΕΙΚΟΝΑ 8.** Οι στήλες 1→6 έχουν επωαστεί με TNF-α και οι στήλες 7→12 με την IL-6. Στις γραμμές a→d η συγκέντρωση των PBMC είναι  $10^5/100 \mu\text{L}$ , ενώ στις γραμμές e→h είναι  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ . Οριζόντια ανά δυνάδες γίνονταν διαδοχικές αραιώσεις (υποδιπλασιασμός) της συγκέντρωσης του LPS, από αρχική συγκέντρωση  $8 \mu\text{g/mL}$  (a1-b1, e1-f1, a7-b7, e7-f7) έως συγκέντρωση  $0,015 \mu\text{g/mL}$  (c4-d4, g4-h4, c10-d10, g10-h10). Στα φρεάτια c5-d5, g5-h5, c11-d11 και g11-h11 δεν υπήρχε LPS, ενώ στα φρεάτια c6-d6, g6-h6, c12-d12 και g12-h12 δεν υπήρχαν PBMC (αρνητικοί μάρτυρες). Επιβεβαιώνεται και με αυτό το πείραμα ότι πιο διακριτές κηλίδες σχηματίζονταν σε συγκέντρωση PBMC  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ . Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στο σχηματισμό των κηλίδων στα φρεάτια με τις διαδοχικές αραιώσεις LPS.

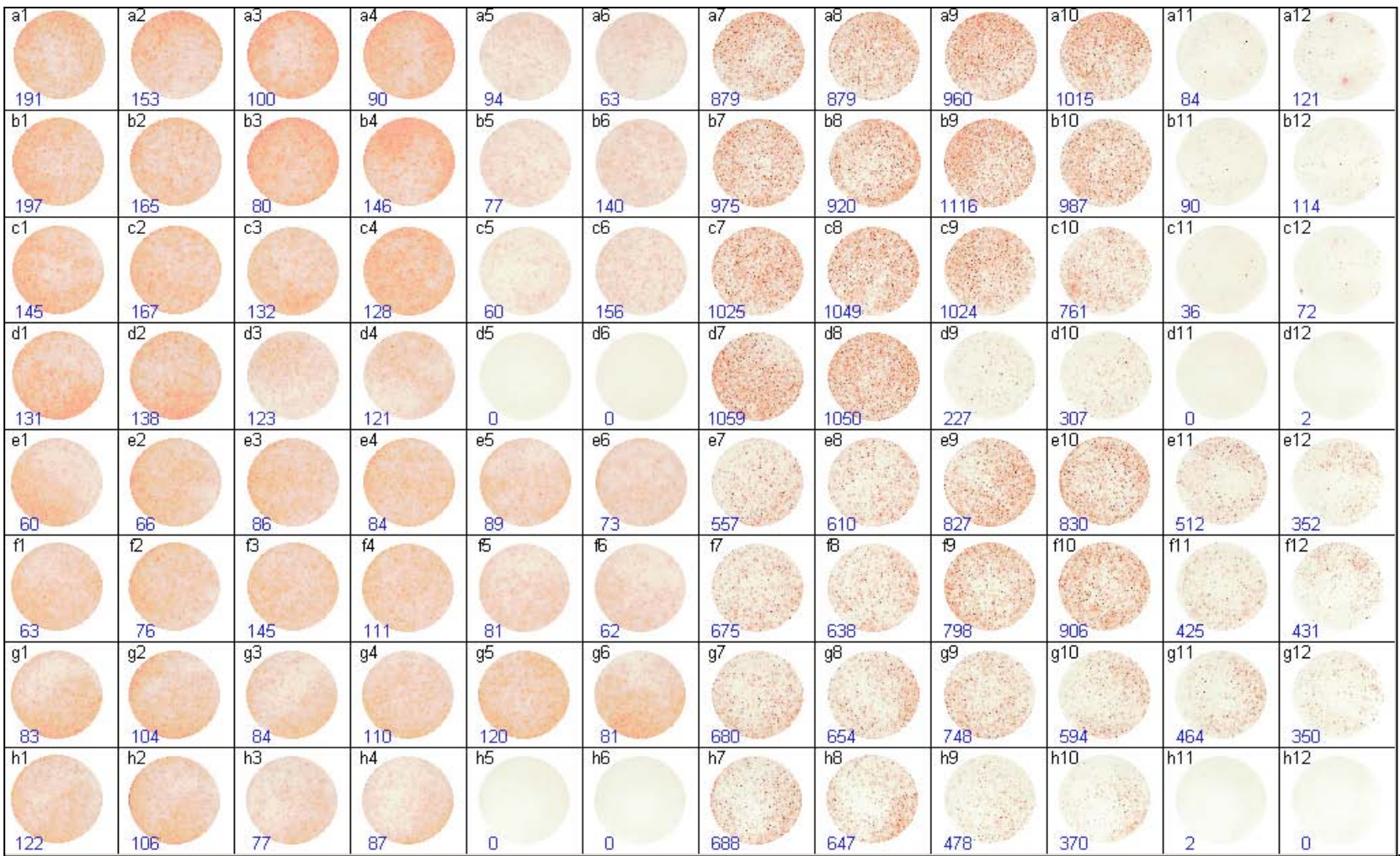
\* Ο αριθμός που αναγράφεται κάτω αριστερά σε κάθε φρεάτιο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυτταροκινών που έχουν παραχθεί και εκκριθεί από τα κύτταρα.



**ΕΙΚΟΝΑ 9.** Οι στήλες 1→6 έχουν επωαστεί με TNF-α και οι στήλες 7→12 με την IL-6. Η συγκέντρωση των PBMC είναι  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  σε όλα τα φρεάτια της μικροπλάκας. Κάθετα ανά δυάδες γίνονταν διαδοχικές αραιώσεις (υποδιπλασιασμός) της συγκέντρωσης του LPS, από αρχική συγκέντρωση  $1 \mu\text{g/mL}$  έως συγκέντρωση  $0,5 \text{ pg/mL}$ . Στα φρεάτια g5-g6, g11-g12 δεν υπήρχε LPS, ενώ στα φρεάτια h5-h6, h11-h12 δεν υπήρχαν PBMC (αρνητικοί μάρτυρες). Επιβεβαιώνεται και με αυτό το πείραμα ότι πιο διακριτές κηλίδες (spots) σχηματίζονταν σε συγκέντρωση PBMC  $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ . Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρούνται πιο διακριτές έγχρωμες κηλίδες σε συγκέντρωση LPS  $100 \text{ pg/mL}$  (f3-f4, f9-f10). Σε πιο μικρή συγκέντρωση LPS μειώνεται ο αριθμός των κηλίδων και δεν είναι ακριβής η μέτρηση .

\* Ο αριθμός που αναγράφεται κάτω αριστερά σε κάθε φρεάτιο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυτταροκινών που έχουν παραχθεί και εκκριθεί από τα κύτταρα.

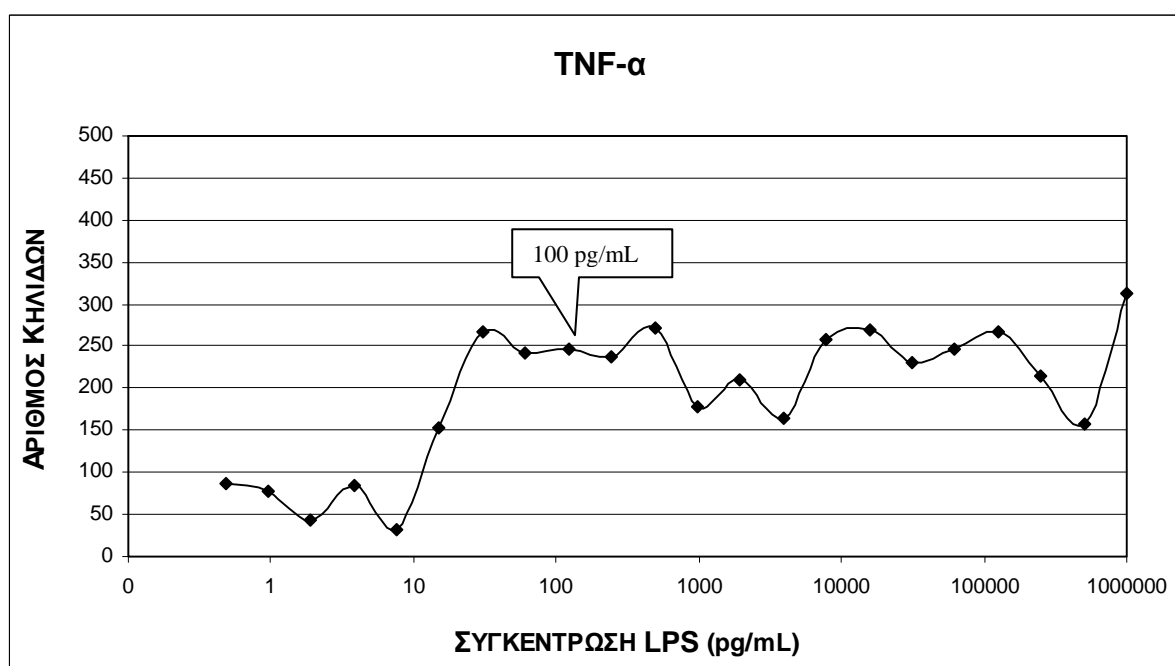
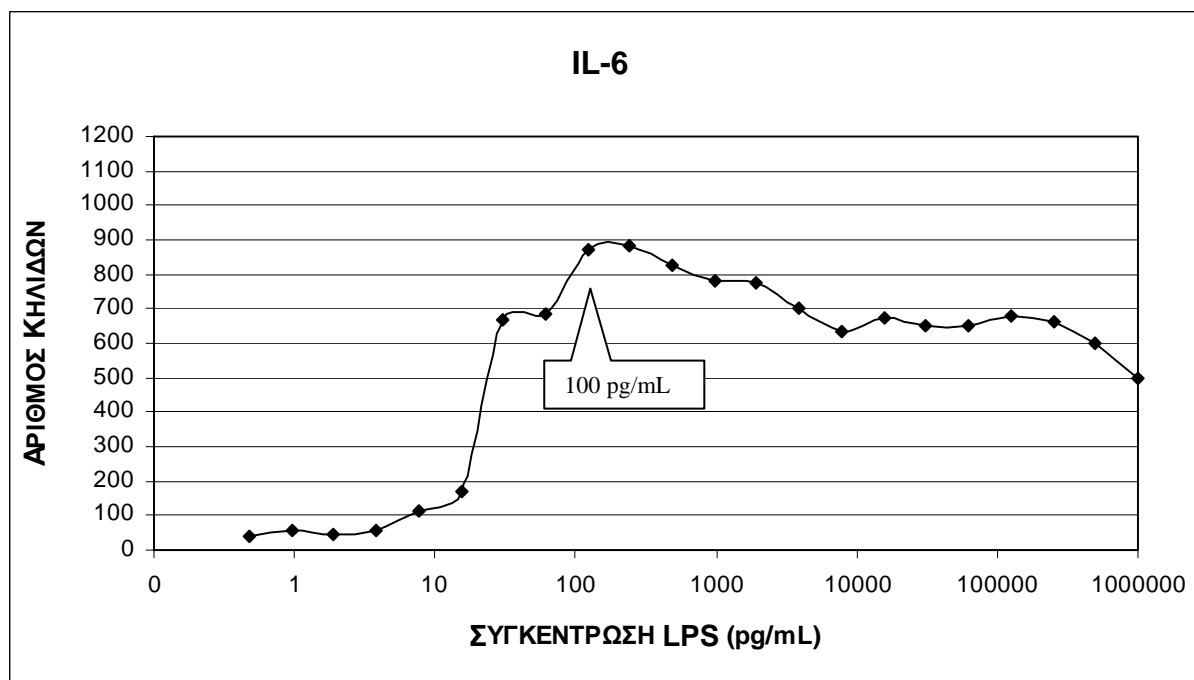




**ΕΙΚΟΝΑ 10.** Οι στήλες 1→6 έχουν επωαστεί με TNF-α και οι στήλες 7→12 με την IL-6. Η συγκέντρωση των PBMC είναι  $3 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$  σε όλα τα φρεάτια της μικροπλάκας. Στις γραμμές a→d και e→h υπάρχουν δύο διαφορετικά δείγματα. Κάθετα ανά δυάδες γίνονται διαδοχικές αραιώσεις (υποδιπλασιασμός) της συγκέντρωσης του LPS, από αρχική συγκέντρωση 25 ng/mL έως συγκέντρωση 1 pg/mL. Στα φρεάτια c5-c6, c11-c12 και g5-g6, g11-g12 δεν υπήρχε LPS, ενώ στα φρεάτια d5-d6, d11-d12 και h5-h6, h11-h12 δεν υπήρχαν PBMC (αρνητικοί μάρτυρες). Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρούνται πιο διακριτές έγχρωμες κηλίδες σε συγκέντρωση LPS 102,9 pg/mL (b3-b4, f3-f4, b9-b10, f9-f10). Σε πιο μικρή συγκέντρωση LPS μειώνεται ο αριθμός των κηλίδων και δεν είναι ακριβής η μέτρηση.

<sup>72</sup>Ο αριθμός που αναγράφεται κάτω αριστερά σε κάθε φρεάτιο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυτταροκινών που έχουν παραχθεί και εκκριθεί από τα κύτταρα.





**ΕΙΚΟΝΑ 11.** Τιτλοποίηση συγκέντρωσης LPS για την IL-6 (πάνω) και τον TNF-α (κάτω). Η συγκέντρωση των κυττάρων παραμένει σταθερή  $3 \times 10^4$ /100  $\mu$ L. Έγιναν 21 διαδοχικές αραιώσεις της συγκέντρωσης του LPS από αρχική συγκέντρωση 1  $\mu$ g/mL έως 0,5 pg/mL. Τα πιο διακριτά αποτελέσματα ήταν στην συγκέντρωση 100 pg/mL. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις μειώνονταν σημαντικά ο αριθμός των έγχρωμων κηλίδων.

### 5.1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΣΤΑΔΙΑ

Την πρώτη μέρα γινόταν απόψυξη των PBMC τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο. Ακολουθούσε εναιώρηση των PBMC σε διάλυμα 1% FBS-RPMI (RPMI 1640 medium, FBS heat inactivated), φυγοκέντρηση (400 g, 30 λεπτά, 21 °C ) και μέτρηση του αριθμού τους στην πλάκα Neubauer, με τον τρόπο αυτό γινόταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των ζώντων και των νεκρών μονοπύρηνων. Ακολουθούσαν φυγοκεντρήσεις (300g, 6 λεπτά, 21 °C) και γινόταν εναιώρηση των PBMC σε διάλυμα 1% FBS-RPMI, ώστε να υπάρχει τελική συγκέντρωση κυττάρων στο εναιώρημα  $1 \times 10^6/\text{mL}$  PBMC ( $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ).

Γινόταν στην συνέχεια αραίωση του λιποπολυσακχαρίτη - LPS (*E. coli* 0127:B8, 100  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma, L-4516) σε 1% FBS-RPMI για τελική συγκέντρωση LPS 100  $\text{pg/mL}$ . Σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας Elispot γινόταν προσθήκη αρχικά 100  $\mu\text{L}$  LPS-1% FBS-RPMI (100  $\text{pg/mL}$ ) και 100  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος PBMC - 1% FBS-RPMI ( $3 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ). Ακολουθούσε επώαση της μικροπλάκας Elispot για 24 ώρες στο θάλαμο επώασης ( $\text{CO}_2$ -incubator, Manual No. 7000370, Thermo 370/371 and 380/381) στους 37 °C σε συνθήκες 5%  $\text{CO}_2$ . Όλες οι εργασίες της πρώτης μέρας γίνονταν σε άσηπτες συνθήκες.

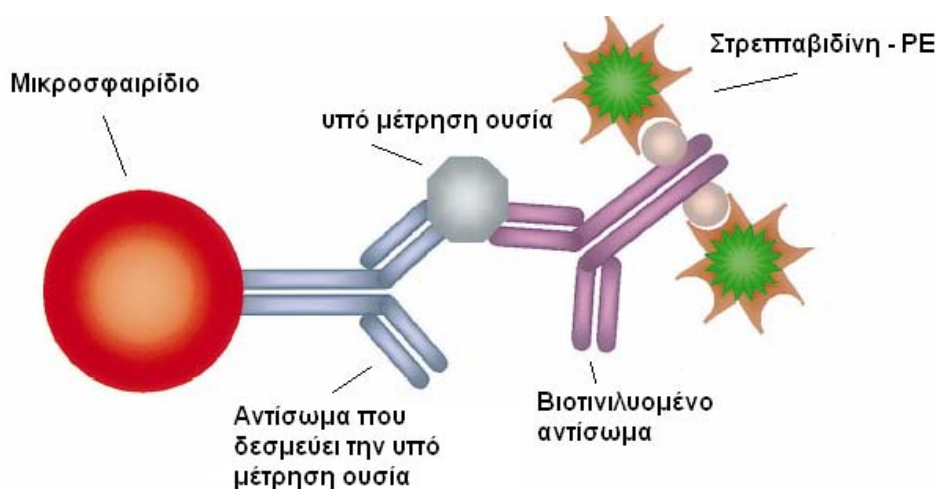
Την δεύτερη μέρα ακολουθούσαν τα κύρια στάδια της μεθόδου. Οι μικροπλάκες Elispot ήταν επιστρωμένες με αντίσωμα έναντι της υπό μέτρησης κυτταροκίνης (TNF- $\alpha$ , IL-6). Τα PBMC επωάζονταν στη μικροπλάκα για 24 ώρες και γινόταν έκκριση από αυτά κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονταν, δεσμεύονταν από το αντίσωμα με το οποίο ήταν προεπιστρωμένες οι πλάκες. Ακολουθούσε συλλογή του υπερκείμενου της καλλιέργειας, το οποίο αποθηκεύονταν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων με επίπεδη βάση και συντηρούνταν στους -20 °C, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό κυτταροκινών με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία. Στη συνέχεια γίνονταν πλύσεις για την απομάκρυνση των κυττάρων και γινόταν προσθήκη δεύτερου αντισώματος το οποίο ήταν σημασμένο με ένζυμο κατάλληλο να μετατρέψει το υπόστρωμα σε έγχρωμη ουσία. Γινόταν προσθήκη του υποστρώματος το οποίο μετατρέπονταν σε έγχρωμη ουσία. Οι έγχρωμες κηλίδες που εμφανίζονταν αντιπροσώπευαν την κυτταροκίνη που έχει παραχθεί και εκκριθεί ανά κύτταρο. Οι μικροπλάκες αφήνονταν σε σκοτεινό θάλαμο να στεγνώσουν για χρονικό διάστημα 12 – 24 ώρες και ακολουθούσε η αξιολόγηση τους από το λογισμικό (AID EliSpot Reader System).

## 5.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ - ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ

Με τη βοήθεια της τεχνολογίας xMAP καθίσταται δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλαπλών διαλυτών ουσιών σε κάθε δείγμα προς ανάλυση. Η τεχνολογία xMAP έχει δύο συνιστώσες (εικ. 13) [144, 145, 146]:

α) τη χρήση ειδικών ομάδων μικροσφαιριδίων πολυστερινίου συγκεκριμένης διαμέτρου (5,6  $\mu$ ) τα οποία περιέχουν ένα μείγμα 2 χρωστικών (κόκκινης και ιώδης) διαφορετικής ποσόστωσης, βάσει της οποίας γίνεται ο διαχωρισμός τους από τον κυτταρομετρητή.

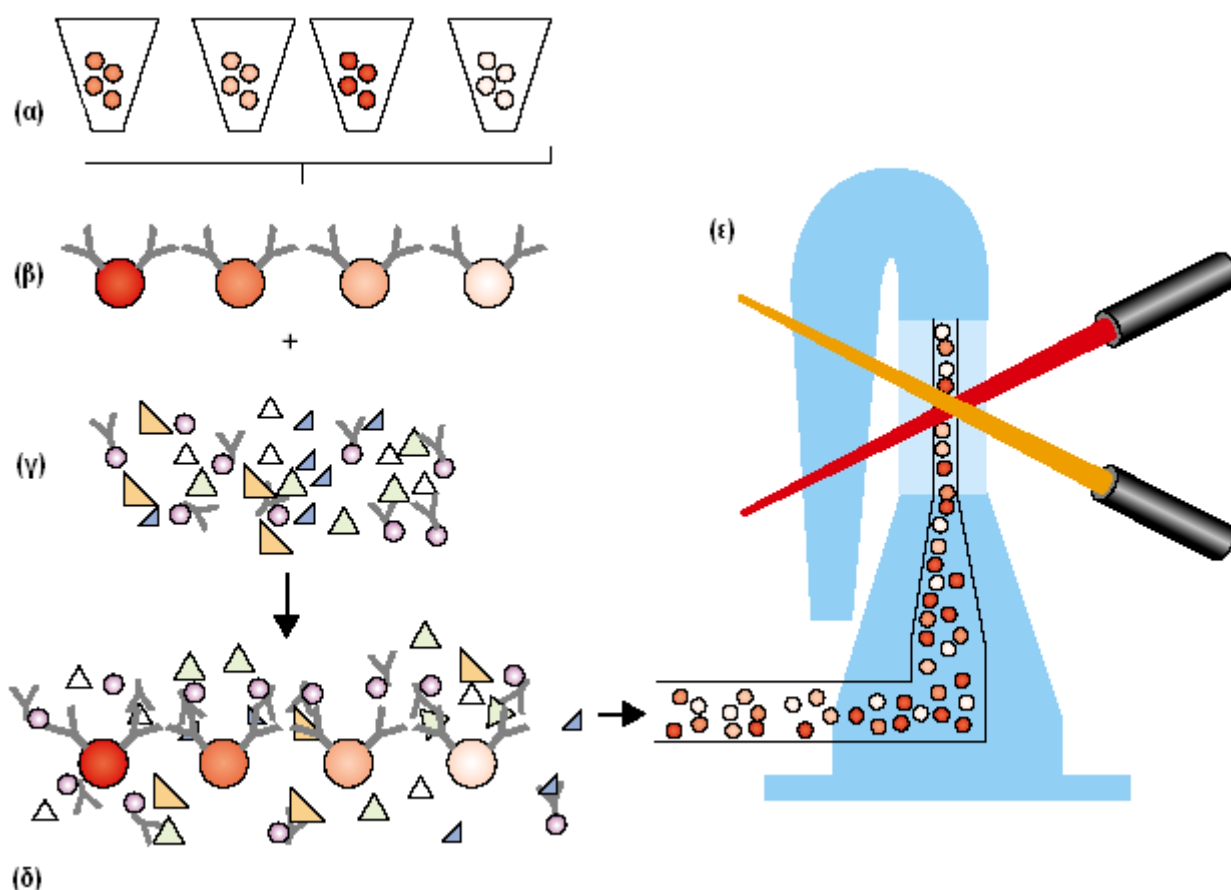
β) την ικανότητα σήμανσης των μικροσφαιριδίων με τα κατάλληλα μόρια (αντισώματα, υποδοχείς, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια) με σκοπό την σύνδεση τους με την υπό μέτρηση ουσία, ώστε με την προσθήκη συστήματος βιοτινιλυομένου αντισώματος και στρεπταβιδίνης σημασμένης με φθοριόχρωμα (PE) να αναδειχθεί η παραπάνω σύνδεση (εικ. 12).



**Εικόνα 12:** Βασική αρχή τεχνολογίας xMAP

### 5.2.1. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΣΤΑΔΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη kit της εταιρείας BMD (FIDIS<sup>TM</sup> Cytokine Human Extracellular Protein Buffer Reagent Kit, Cat. No MXHB0001) για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-8. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής της εταιρείας Luminex.



**Εικόνα 13:** Σχηματική παράσταση των βημάτων της τεχνολογίας XMAP [146]

**α.** Τα μικροσφαιρίδια (beads) χωρίζονται σε ομάδες με βάση το αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο στην επιφάνεια τους και το μείγμα των χρωστικών που περιέχουν.

**β.** Οι διαφορετικές ομάδες μικροσφαιριδίων αναμιγνύονται και επωάζονται με το ίδιο δείγμα για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών διαλυτών ουσιών του δείγματος.

**γ.** Προσθήκη βιοτινιλυμένου αντισώματος καθώς και στρεπταβιδίνης σημασμένης με φθοριόχρωμα (PE).

**δ.** Σχηματισμός διάφορων ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ των μικροσφαιριδίων και του δείγματος.

**ε.** Το κάθε μικροσφαιρίδιο περνά από την κυψέλη ροής του κυτταρομέτρου. Το κόκκινο LASER διεγείρει το μείγμα των χρωστικών που βρίσκονται στο εσωτερικό του, ούτως ώστε ο εκπεμπόμενος φθορισμός να επιτρέψει την διάκριση της ομάδας των μικροσφαιριδίων. Παράλληλα το πράσινο LASER διεγείρει την πορτοκαλί χρωστική (PE) εφόσον έχει συνδεθεί με το μικροσφαιρίδιο. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός σχετίζεται με την υπό μέτρηση ουσία. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανίχνευση πολλαπλών διαλυτών ουσιών και με τη χρήση διαλυμάτων πρότυπης συγκέντρωσης είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

Με τη μέθοδο της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρίας γινόταν προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προαναφερθέντων κυτταροκινών, που εκκρίνονταν από PBMC, πριν και μετά την διέγερση με LPS [147, 148]. Το υπό μέτρηση υλικό ήταν το υπερκείμενο καλλιέργειας PBMC, το οποίο συλλέγονταν από τις μικροπλάκες Elispot, οι οποίες ήταν προεπιστρωμένες με αντίσωμα έναντι των κυτταροκινών TNF-α και IL-6 (βλ. μεθοδολογία Elispot). Το υπερκείμενο (περίπου 150  $\mu$ L από κάθε φρεάτιο) συλλέγονταν 24 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας, αποθηκεύονταν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων με επίπεδη βάση και συντηρούνταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την επεξεργασία του.

Γινόταν απόψυξη των δειγμάτων ώστε να βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου ( $21^{\circ}\text{C}$ ). Αρχικά γινόταν προσθήκη 25  $\mu$ L εναιωρήματος μικροσφαιριδίων συνδεδεμένα με αντίσωμα στην μικροπλάκα 96 φρεατίων (FIDIS). Ακολουθούσε πλύση και εν συνεχεία προσθήκη 100  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος μαζί με 50  $\mu$ L του δείγματος και επώαση του διαλύματος για 2 ώρες σε ανακινητή ( $21^{\circ}\text{C}$ , σκοτεινό θάλαμο). Ακολουθούσαν πλύσεις, προσθήκη 100  $\mu$ L βοτινιλυομένου αντισώματος και γινόταν επώαση για 1 ώρα σε ανακινητή ( $21^{\circ}\text{C}$ , σκοτεινό θάλαμο). Τέλος, γινόταν προσθήκη 100  $\mu$ L στρεπταβιδίνης σημασμένης με PE και επώαση του διαλύματος για 30 λεπτά σε ανακινητή ( $21^{\circ}\text{C}$ , σκοτεινό θάλαμο). Με το πέρας της επώασης τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση.

## 6. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ

Προσδιορίστηκαν με ανοσονεφελομετρία (Nefelometer, BN<sup>®</sup> II System, Dade Behring) σε δείγματα ορού οι ακόλουθες πρωτεΐνες οξείας φάσεως: CRP, αμυλοειδές Α του ορού (SAA),  $\alpha_1$ -αντιθρυψίνη (AAT). Τα δείγματα ορού συντηρούνταν σε aliquots στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και πριν την επεξεργασία τους γινόταν απόψυξη ώστε να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου ( $21^{\circ}\text{C}$ ).

## 7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι περιγραφικές παράμετροι των αναλυθέντων δεδομένων δίνονται ξεχωριστά για την ομάδα των ασθενών με ενδογενή κατάθλιψη και την ομάδα των μαρτύρων αντίστοιχα. Οι συγκρίσεις έγιναν με την παραμετρική δοκιμασία Student's t test. Οι στατιστικές αναλύσεις εφαρμόστηκαν στα στατιστικά πακέτα SPSS (έκδοση 14.0; SPSS, Chicago, USA). Για όλους τους υπολογισμούς ποσοστών, τα 95% όρια εμπιστοσύνης αναφέρονται στην διωνυμική κατανομή. Τα αναφερόμενα επίπεδα σημαντικότητας είναι

αμφοτερόπλευρα. Οι τιμές των παραμέτρων παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στον πίνακα 16 φαίνεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD) του απόλυτου αριθμού και του εκατοστιαίου ποσοστού των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων, που προσδιορίστηκαν στους ασθενείς και τους μάρτυρες της μελέτης.

Η ανάλυση των παραμέτρων αυτών έδειξε ότι στους ασθενείς με κατάθλιψη υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων ( $p = 0,006$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 14) καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση του απόλυτου αριθμού των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων ( $p = 0,003$ ) και των μονοκυττάρων ( $p = 0,001$ ) (εικ. 14). Στους υπόλοιπους κυτταρικούς υποπληθυσμούς που ελέγχθηκαν η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές.

Στους πίνακες 17–23 φαίνονται οι τιμές των παραμέτρων (μεμβρανικοί δείκτες) που προσδιορίστηκαν σε κάθε έναν από τους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια, NK κύτταρα, βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, κυτταρολυτικά T-λεμφοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα). Η τιμή για κάθε παράμετρο που διερευνήθηκε αφορά το εκατοστιαίο ποσοστό (μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση) και τη μέση έντασης φθορισμού (pi).

Στα μονοκύτταρα (πίν. 17–18) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση όσον αφορά τη μέση ποσοστιαία έκφραση του CD25 ( $p = 0,020$ ) στους καταθλιπτικούς ασθενείς, ενώ βρέθηκε μείωση της έντασης φθορισμού του μορίου προσκόλλησης CD62L ( $p = 0,031$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 15).

Στους καταθλιπτικούς ασθενείς στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια (πίν. 19) βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης ποσοστιαίας έκφρασης ( $p = 0,013$ ) και της μέσης έντασης φθορισμού ( $p = 0,027$ ) του CD69, καθώς και αύξηση στη μέση ποσοστιαία έκφραση του CD11a ( $p = 0,05$ ) (εικ. 16).

Στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (πίν. 21) βρέθηκε στους ασθενείς στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσοστιαίας έκφρασης του CD45RO ( $p = 0,007$ ), μείωση της ποσοστιαίας έκφρασης του CD45RA ( $p = 0,048$ ), μείωση της μέσης έντασης φθορισμού

των HLA-DR βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ( $p = 0,023$ ) και στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού του CD69 ( $p = 0,024$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 17).

Η διερεύνηση των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων (πίν. 22) έδειξε στους ασθενείς στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης ποσοστιαίας έκφρασης του δείκτη ενεργοποίησης HLA-DR ( $p = 0,032$ ) και του μορίου προσκόλλησης CD16 ( $p = 0,032$ ) καθώς και αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού του CD18 ( $p = 0,053$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 18).

Όσον αφορά τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (πίν. 20) και τα B-λεμφοκύτταρα (πίν. 23) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των καταθλιπτικών ασθενών.

**Πίνακας 16.** Μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD) του απόλυτου αριθμού και των εκατοστιαίων ποσοστών των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους.

	<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</b>	<b>MARTYPEΣ</b>	<b>t - test</b>	<b>p - value</b>	<b>CI (95%)</b>
<b>Λευκά Αιμοσφαίρια (WBC) / <math>\mu</math>L</b>	7310,6 $\pm$ 1996,4	5938,4 $\pm$ 1975,2	2,823	<b>0,006</b>	402,8 - 2341,5
<b>Ουδετερόφιλα Πολυμορφοπύρρηνα / <math>\mu</math>L</b>	4732,6 $\pm$ 1697,4 63,4 $\pm$ 7,6 (%)	3551,0 $\pm$ 1242,9 59,6 $\pm$ 6,9 (%)	3,114	<b>0,003</b>	424,8 - 1938,2
<b>Μονοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	353,4 $\pm$ 113,4 4,9 $\pm$ 1,4 (%)	255,7 $\pm$ 112,9 4,1 $\pm$ 1,3 (%)	3,527	<b>0,001</b>	42,4 - 152,8
<b>Λεμφοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	2226,1 $\pm$ 532,7 31,6 $\pm$ 7,2 (%)	2148,4 $\pm$ 837,5 36,2 $\pm$ 6,8 (%)	0,483	0,63	-242,3 - -397,4
<b>NK κύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	223,5 $\pm$ 111,4 10,3 $\pm$ 5,1 (%)	211,9 $\pm$ 129,3 9,6 $\pm$ 4,4 (%)	0,401	0,689	-45,9 - 69,1
<b>B – Λεμφοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	268,8 $\pm$ 115,9 12,0 $\pm$ 4,2 (%)	243,5 $\pm$ 125,7 11,6 $\pm$ 3,7 (%)	0,865	0,390	-32,9 - 83,5
<b>T – Λεμφοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	1663,5 $\pm$ 460,1 74,4 $\pm$ 6,6 (%)	1626,7 $\pm$ 648,1 75,6 $\pm$ 4,3 (%)	0,281	0,779	-223,4 - 296,9
<b>NK-like/ <math>\mu</math>L</b>	18,7 $\pm$ 14,6 1,1 $\pm$ 0,7 (%)	13,1 $\pm$ 9,3 0,8 $\pm$ 0,5 (%)	1,805	0,075	- 0,5 - 12,1



**Πίνακας 16** (συνέχεια). Μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD) του απόλυτου αριθμού και των εκατοστιαίων ποσοστών των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	MARTYPEΣ	t - test	p - value	CI (95%)
<b>Βοηθητικά T – Λεμφοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	792,98 $\pm$ 285,542 47,85 $\pm$ 7,485 (%)	750,08 $\pm$ 317,385 46,5 $\pm$ 6,308 (%)	0,591	0,557	-101,9 - 187,7
<b>Κατασταλτικά T – Λεμφοκύτταρα / <math>\mu</math>L</b>	384,27 $\pm$ 190,226 22,56 $\pm$ 7,492 (%)	415, 90 $\pm$ 239,231 24,68 $\pm$ 6,396 (%)	- 0,620	0,537	-133,3 - 70,1

**Πίνακας 17.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) των μεμβρανικών δεικτών των μονοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των μονοκυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 2).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%		
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)							
CD15	49,54 ± 19,57	49,34 ± 13,61	0,051	0,959	-0,076	-	0,080
CD64	99,13 ± 1,05	99,23 ± 0,98	-0,419	0,676	-0,006	-	0,004
CD25	10,98 ± 21,41	3,34 ± 2,80	2,410	<b>0,020</b>	0,013	-	0,140
CD18	99,99 ± 0,04	100,00	-1,639	0,108	0,000	-	0,000
CD80	83,27 ± 17,38	81,89 ± 16,28	-0,389	0,699	-0,046	-	0,031
CD16	10,97 + 4,68	11,18 + 7,59	-0,113	0,911	-0,040	-	0,036
CD29	97,44 + 14,19	99,87 + 0,20	-0,763	0,449	-0,088	-	0,039
CD49d	63,41 + 17,23	69,05 + 19,03	-1,154	0,253	-0,154	-	0,041
CD35	86,39 + 8,02	88,36 + 6,83	-0,939	0,352	-0,062	-	0,022
CD62L	83,27 + 17,38	81,89 + 16,28	0,331	0,742	-0,069	-	0,097
CD11c	99,93 ± 0,17	99,89 ± 0,30	0,742	0,461	-0,001	-	0,002
CD69	3,37 ± 2,40	2,59 ± 1,40	1,749	0,085	-0,001	-	0,017
CD11b	99,87 ± 0,25	99,85 ± 0,25	0,370	0,712	-0,001	-	0,001
CD86	91,41 + 11,29	92,34 + 9,87	-0,310	0,757	-0,069	-	0,050
CD32	99,69 + 0,98	99,88 + 0,26	-0,851	0,398	-0,006	-	0,003
HLA-DR	78,04 + 22,56	75,42 + 24,58	0,412	0,682	-0,101	-	0,154
CD180	77,53 + 12,67	78,29 + 14,05	-0,211	0,833	-0,80	-	0,064
TLR-4	82,25 + 14,83	81,91 + 14,70	0,085	0,933	-0,078	-	0,084

**Πίνακας 18.** Ένταση φθορισμού (pi) (μέση τιμή  $\pm$  SD) των μεμβρανικών δεικτών των μονοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των μονοκυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 2).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%	
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)						
CD15	3,25 ± 1,09	3,17 ± 0,93	0,337	0,737	-0,420	- 0,591
CD64	2,90 ± 0,59	2,96 ± 0,77	-0,369	0,713	-0,381	- 0,262
CD25	1,10 ± 0,31	1,17 ± 0,64	-0,555	0,583	-0,344	- 0,197
CD18	8,59 ± 2,69	8,66 ± 2,56	-0,114	0,909	-1,365	- 1,217
CD80	6,98 ± 5,23	10,10 ± 6,75	-0,071	0,943	-0,087	- 0,081
CD16	4,61 ± 1,69	4,57 ± 2,96	0,064	0,949	-1,423	- 1,515
CD29	4,36 ± 2,34	4,80 ± 2,43	-0,673	0,503	-1,736	- 0,862
CD49d	1,38 ± 0,23	1,50 ± 0,38	-1,376	0,181	-0,317	- 0,063
CD35	2,46 ± 0,78	2,92 ± 1,44	-1,333	0,195	-1,172	- 0,251
CD62L	6,98 ± 5,23	10,10 ± 6,75	-2,194	<b>0,031</b>	-5,947	- -0,285
CD11c	10,49 ± 3,32	10,79 ± 2,76	-0,392	0,697	-1,825	- 1,226
CD69	1,31 ± 0,56	1,31 ± 0,63	-0,020	0,984	-0,286	- 0,281
CD11b	34,27 ± 13,60	34,82 ± 12,20	-0,173	0,863	-6,950	- 5,843
CD86	2,06 ± 0,56	2,28 ± 0,67	-1,315	0,194	-0,541	- 0,112
CD32	8,18 ± 2,83	8,83 ± 3,16	-0,810	0,421	-2,268	- 0,961
HLA-DR	2,50 ± 1,35	2,63 ± 2,08	-0,294	0,770	-1,023	- 0,761
CD180	2,16 ± 0,92	2,83 ± 2,36	-1,226	0,233	-1,804	- 0,464
TLR-4	2,04 ± 0,78	2,08 ± 0,49	-0,184	0,855	-0,419	- 0,349

**Πίνακας 19.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) και ένταση φθορισμού (pi) των μεμβρανικών δεικτών των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 7).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)						
CD64	5,9 ± 3,1	7,2 ± 8,02	-0,756	0,456	-0,046	- 0,021
CD69	2,8 ± 1,4	2,08 ± 0,9	2,542	<b>0,013</b>	0,002	- 0,014
CD18	99,4 ± 1,5	98,9 ± 3,9	0,639	0.528	-0,011	- 0,021
CD62L	98,8 ± 1,6	99,1 ± 0,9	-0,796	0,429	-0,010	- 0,004
CD11a	96,4 ± 3,2	94,07 ± 5,6	1,967	<b>0,057</b>	-0,001	- 0,048
CD11b	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0,03	-1,483	0,143	0,000	- 0,000
CD11c	97,2 ± 3,1	96,7 ± 3,9	0,608	0,545	-0,011	- 0,021
CD15	99,9 ± 0,02	99,9 ± 0,01	-0,066	0,948	0,000	- 0,000
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)						
CD64	1,15 ± 1,05	1,13 ± 0,49	0,101	0,920	-0,413	- 0,457
CD69	1,17 ± 0,34	1,80 ± 1,34	-2,336	<b>0,027</b>	-1,176	- -0,076
CD18	3,20 ± 1,48	2,91 ± 1,23	0,855	0,396	-0,389	- 0,974
CD62L	9,85 ± 6,21	8,10 ± 3,83	1,309	0,195	-0,919	- 4,430
CD11a	1,36 ± 0,42	1,24 ± 0,39	1,214	0,229	-0,079	- 0,323
CD11b	27,60 ± 9,67	25,09 ± 11,38	0,997	0,322	-2,512	- 7,531
CD11c	3,88 ± 1,24	3,58 ± 1,05	1,021	0,311	-0,281	- 0,870
CD15	50,06 ± 19,77	47,57 ± 18,30	0,528	0,599	-6,902	- 11,872

**Πίνακας 20.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) και ένταση φθορισμού (pi) των μεμβρανικών δεικτών των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 12).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)						
CD69	16,60 ± 9,89	18,31 ± 13,12	-0,629	0,531	-0,071	- 0,037
CD18	99,55 ± 1,28	99,84 ± 0,27	-1,517	0,135	-0,007	- 0,001
CD62L	39,94 ± 13,67	39,57 ± 16,17	0,106	0,916	-0,067	- 0,075
CD11b	77,26 ± 11,31	78,08 ± 13,73	-0,274	0,785	-0,068	- 0,051
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)						
CD69	2,43 ± 2,38	2,31 ± 1,44	0,238	0,813	-0,899	- 1,143
CD18	6,14 ± 2,21	6,66 ± 2,06	-0,991	0,325	-1,577	- 0,530
CD62L	12,83 ± 5,56	11,27 ± 5,94	1,122	0,266	-1,215	- 4,340
CD11b	2,14 ± 0,44	2,29 ± 0,66	-1,175	0,244	-0,412	- 0,107

**Πίνακας 21.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) και ένταση φθορισμού (pi) των μεμβρανικών δεικτών των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 15).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%		
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)							
CD45RA	33,93 ± 16,76	40,73 ± 11,82	-2,019	<b>0,048</b>	-0,135	-	-0,001
HLA-DR	2,16 ± 1,30	1,94 ± 0,99	0,747	0,458	-0,004	-	0,008
CD25	8,02 ± 2,84	8,74 ± 3,16	-0,997	0,322	-0,022	-	0,007
TCRγδ	4,55 ± 3,33	4,58 ± 2,51	-0,037	0,971	-0,015	-	0,015
CD18	87,12 ± 8,90	87,73 ± 6,30	-0,338	0,737	-0,042	-	0,030
CD45RO	66,65 ± 14,95	58,89 ± 8,92	2,774	<b>0,007</b>	0,022	-	0,133
CD69	3,87 ± 1,51	3,33 ± 0,61	1,744	0,085	-0,001	-	0,012
CD28	90,22 ± 8,43	92,50 ± 9,34	-1,069	0,289	-0,066	-	0,020
TCRαβ	84,66 ± 13,03	81,29 ± 16,43	0,964	0,338	-0,036	-	0,104
CD62L	78,40 ± 9,02	81,06 ± 6,07	-1,344	0,183	-0,066	-	0,013
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)							
CD45RA	2,39 ± 1,29	2,64 ± 1,12	-0,830	0,409	-0,850	-	0,350
HLA-DR	6,18 ± 4,53	8,88 ± 5,12	-2,323	<b>0,023</b>	-5,007	-	-0,382
CD25	1,18 ± 0,18	1,25 ± 0,13	-1,888	0,063	-0,153	-	0,004
TCRγδ	1,35 ± 0,46	1,51 ± 0,54	-1,354	0,180	-0,400	-	0,076
CD18	2,15 ± 0,56	2,09 ± 0,26	0,676	0,501	-0,127	-	0,257
CD45RO	12,57 ± 4,18	12,39 ± 2,04	0,248	0,805	-1,274	-	1,636
CD69	1,46 ± 0,32	1,33 ± 0,18	2,306	<b>0,024</b>	0,018	-	0,251
CD28	3,42 ± 1,15	3,28 ± 0,87	0,539	0,592	-0,376	-	0,654
TCRαβ	2,40 ± 0,90	2,27 ± 0,90	0,551	0,584	-0,318	-	0,560
CD62L	12,13 ± 2,98	11,92 ± 2,74	0,296	0,768	-1,204	-	1,623

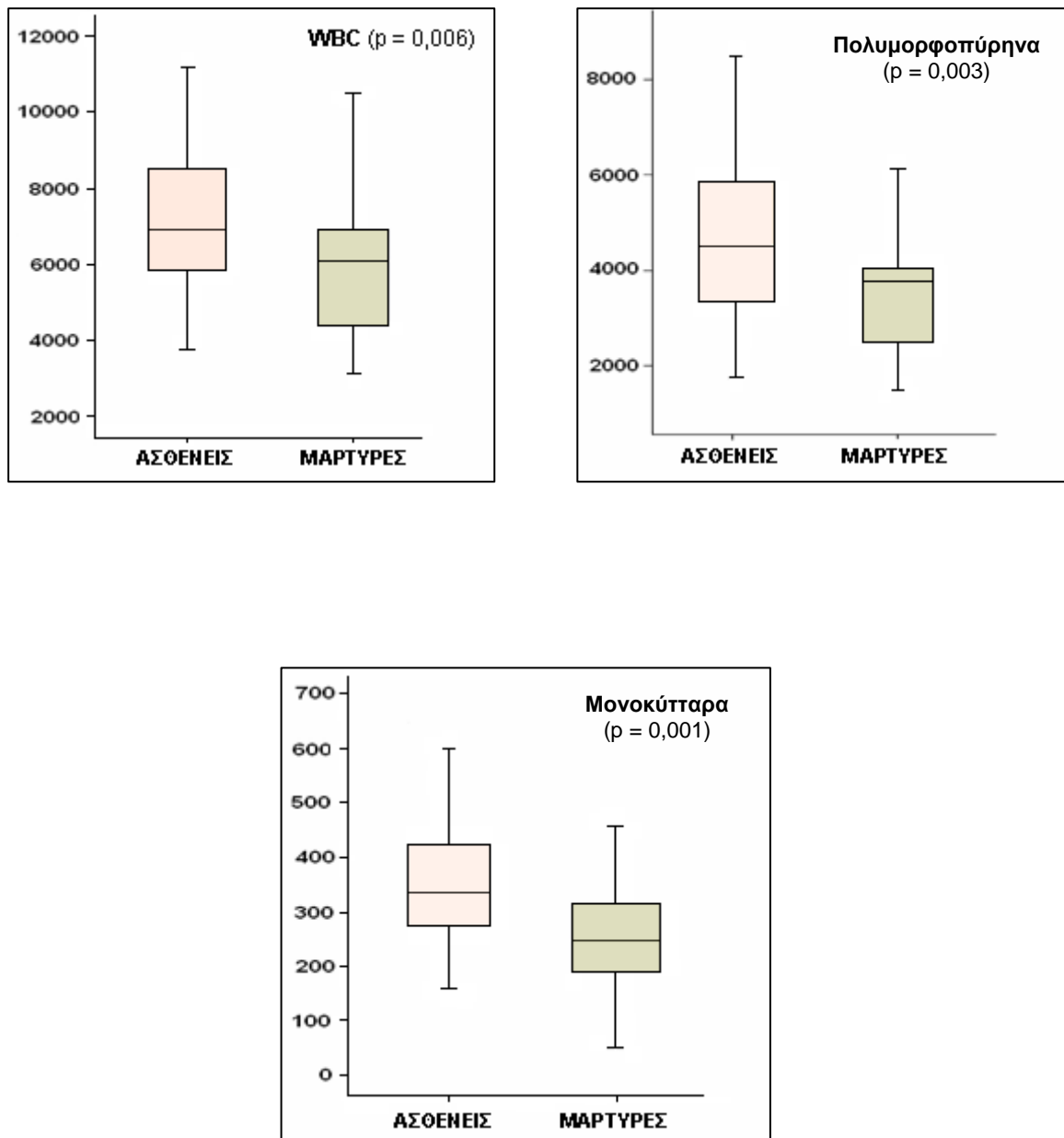
**Πίνακας 22.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) και ένταση φθορισμού (pi) των μεμβρανικών δεικτών των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 19).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)						
HLA-DR	4,01 ± 3,13	2,53 ± 1,92	2,188	<b>0,032</b>	0,001	- 0,028
CD25	2,41 ± 1,52	2,61 ± 2,54	-0,418	0,678	-0,011	- 0,007
CD16	3,36 ± 3,52	2,04 ± 1,61	2,185	<b>0,032</b>	0,001	- 0,025
CD18	94,57 ± 4,98	92,36 ± 6,28	1,654	0,103	-0,005	- 0,049
CD69	5,64 ± 3,24	7,16 ± 5,16	-1,360	0,182	-0,038	- 0,007
CD28	50,90 ± 17,95	52,78 ± 15,67	-0,489	0,457	-0,011	- 0,023
CD56	13,53 ± 10,32	12,09 ± 7,00	0,636	0,527	-0,031	- 0,060
CD62L	54,62 ± 14,63	53,80 ± 12,25	-1,090	0,280	-0,104	- 0,031
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)						
HLA-DR	2,90 ± 1,26	2,90 ± 1,73	-0,010	0,992	-0,707	- 0,700
CD25	1,05 ± 0,15	1,01 ± 0,11	1,025	0,309	-0,033	- 0,104
CD16	1,77 ± 0,76	2,46 ± 1,81	-1,853	0,074	-1,448	- 0,070
CD18	3,31 ± 0,94	2,95 ± 0,63	1,969	<b>0,053</b>	-0,005	- 0,732
CD69	2,03 ± 0,81	2,05 ± 0,48	-0,160	0,874	-0,326	- 0,278
CD28	2,26 ± 0,73	2,25 ± 0,57	0,051	0,960	-0,323	- 0,340
CD56	2,44 ± 0,83	2,43 ± 0,85	0,031	0,975	-0,400	- 0,413
CD62L	11,04 ± 3,95	12,01 ± 3,94	-1,004	0,319	-2,890	- 0,954

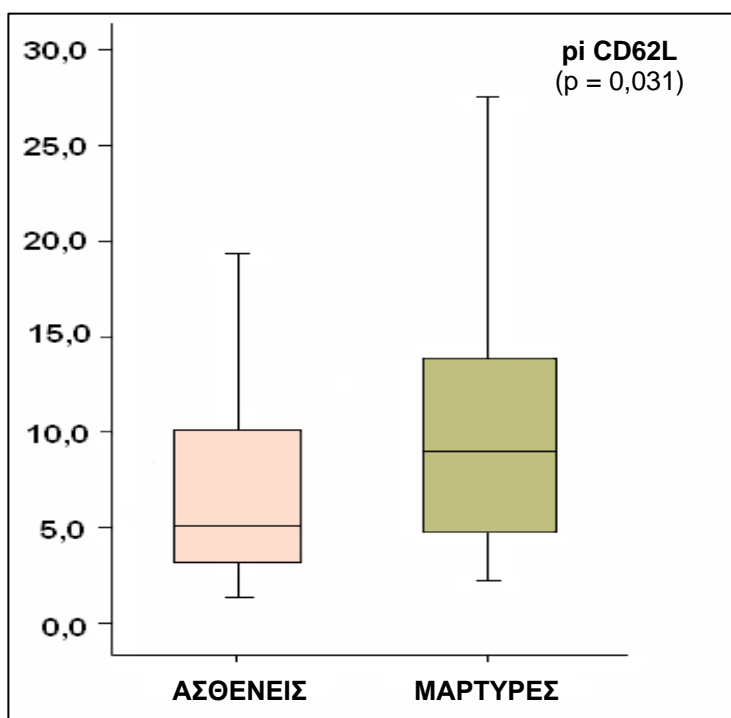
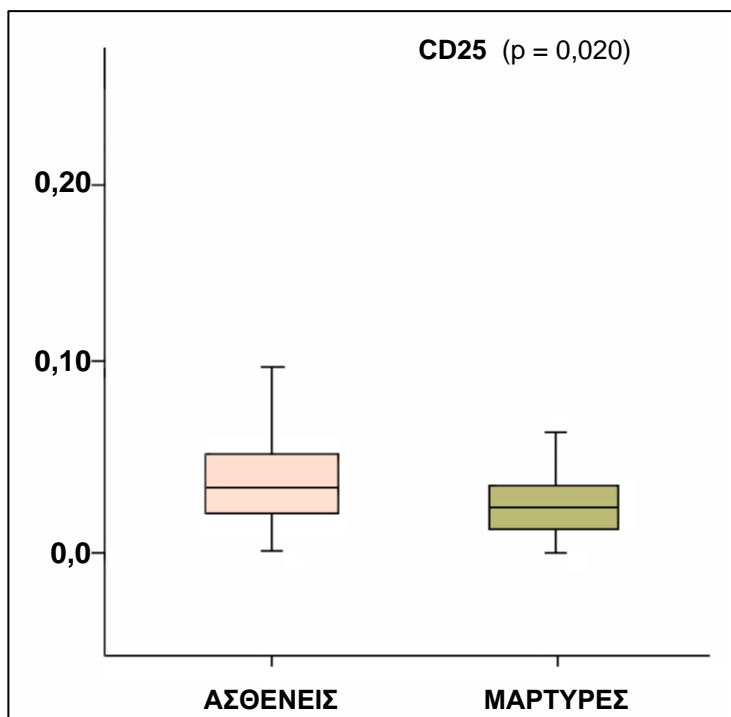
**Πίνακας 23.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) και ένταση φθορισμού (pi) των μεμβρανικών δεικτών των Β-λεμφοκυττάρων στους ασθενείς και στους μάρτυρες της μελέτης. Τα ποσοστά αναφέρονται στο συνολικό πληθυσμό των Β-λεμφοκυττάρων, όπως αυτό προσδιορίστηκε από το σκεδαστικό διάγραμμα (βλ. παράρτημα. ΙΙΙ, εικ. 23).

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t-test	p-value	CI 95%		
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (%)							
CD45RA	98,37 ± 2,32	97,78 ± 3,59	0,753	0,457	-0,010	-	0,022
HLA-DR	97,15 ± 4,99	96,73 ± 4,34	0,659	0,347	-0,012	-	0,021
CD25	4,01 ± 2,10	3,96 ± 2,70	0,072	0,943	-0,011	-	0,012
CD5	16,57 ± 7,87	16,46 ± 5,76	0,065	0,949	-0,034	-	0,036
CD45RO	1,22 ± 0,93	1,56 ± 1,16	-1,376	0,173	-0,008	-	0,002
CD69	5,08 ± 3,84	5,69 ± 4,48	-0,611	0,543	-0,026	-	0,014
CD28	2,50 ± 1,56	2,93 ± 2,09	-1,002	0,320	-0,013	-	0,004
CD62L	88,88 ± 1,59	88,36 ± 10,87	0,187	0,852	-0,050	-	0,060
ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (pi)							
CD45RA	4,70 ± 3,21	5,33 ± 3,18	-0,801	0,426	-2,184	-	0,932
HLA-DR	10,55 ± 5,18	9,60 ± 5,49	0,440	0,661	-3,350	-	5,246
CD25	1,13 ± 0,33	1,01 ± 0,26	1,549	0,126	-0,033	-	0,262
CD5	1,32 ± 0,49	1,20 ± 0,23	1,232	0,222	-0,077	-	0,327
CD45RO	1,97 ± 2,93	2,67 ± 3,91	-0,859	0,393	-2,308	-	0,919
CD69	1,20 ± 0,34	1,32 ± 0,36	-1,447	0,152	-0,299	-	0,047
CD28	1,10 ± 0,29	1,27 ± 0,52	-1,490	0,145	-0,391	-	0,060
CD62L	12,92 ± 4,95	12,35 ± 4,98	0,468	0,641	-1,851	-	2,988

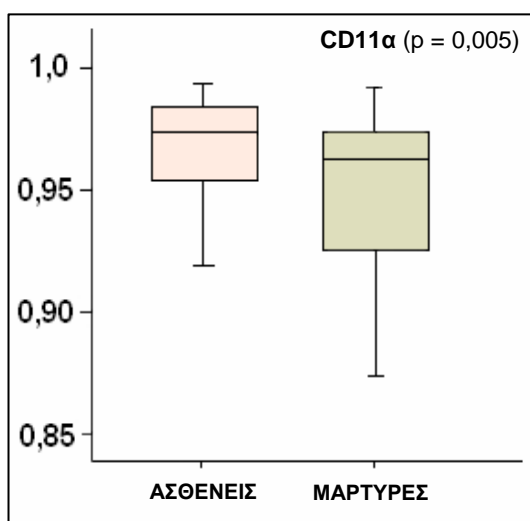
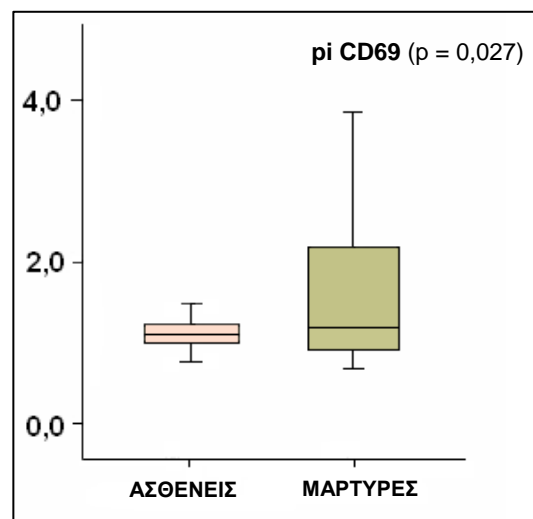
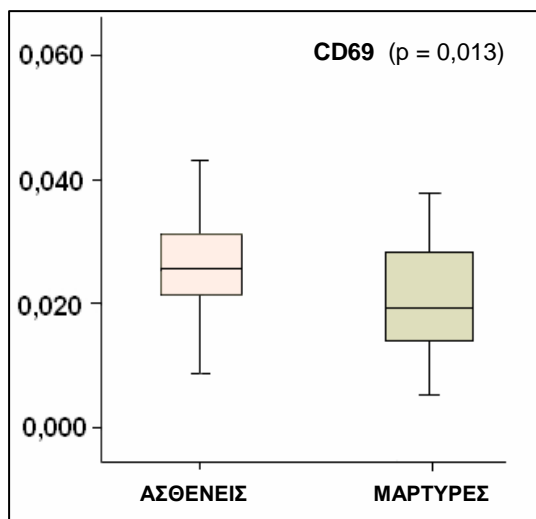




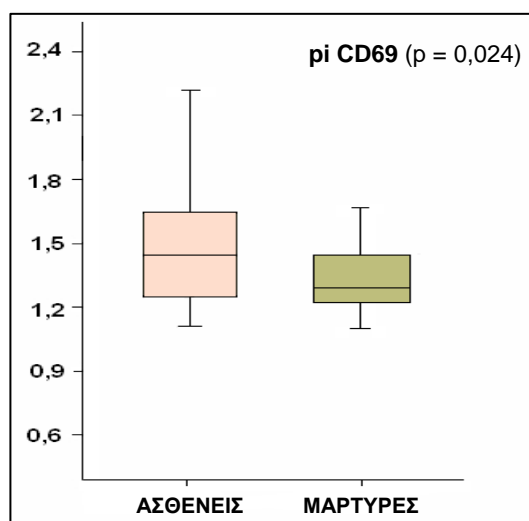
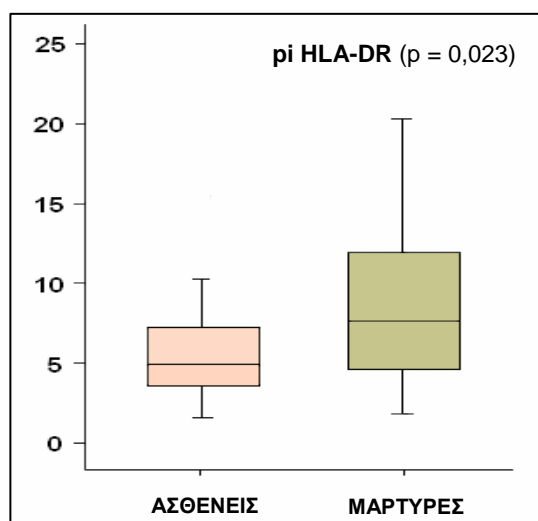
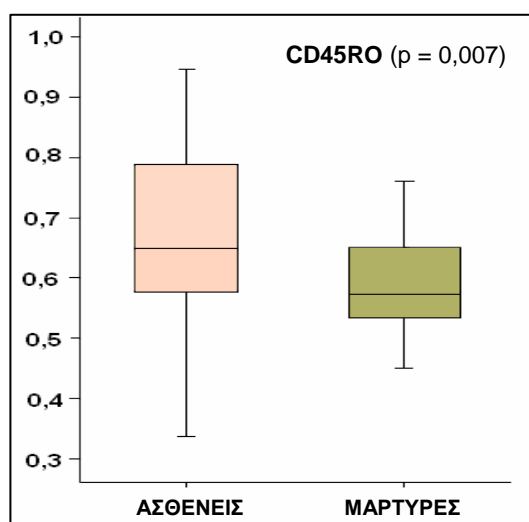
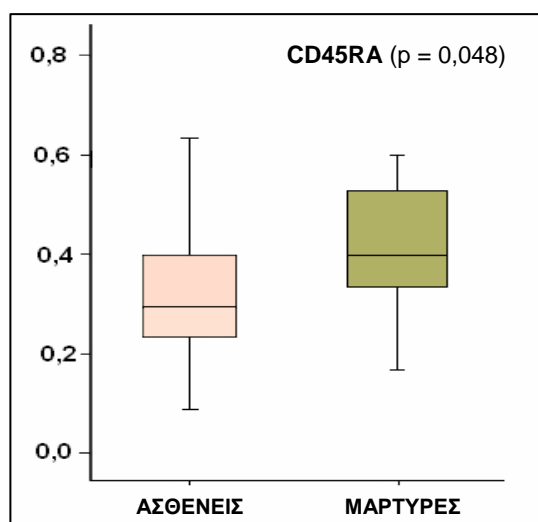
**Εικόνα 14:** Κατανομή του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων (WBC), των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των WBC ( $p = 0,006$ ), των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων ( $p = 0,003$ ) και των μονοκυττάρων ( $p = 0,001$ ) στους ασθενείς με κατάθλιψη.



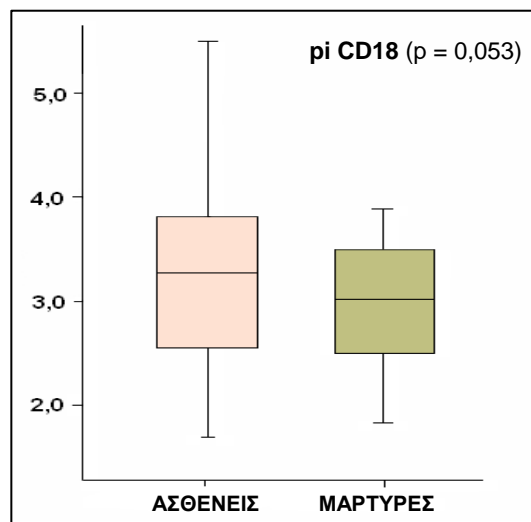
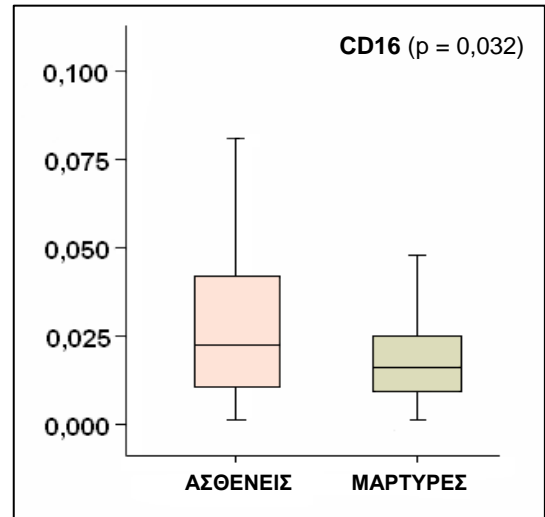
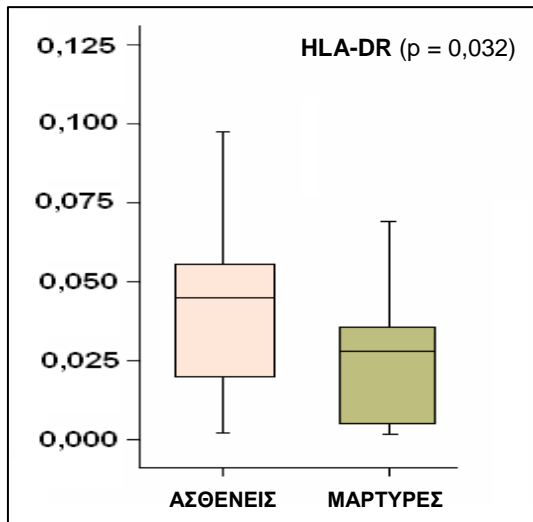
**Εικόνα 15:** Κατανομή στα μονοκύτταρα του εκατοστιαίου ποσοστού του μεμβρανικού δείκτη CD25 καθώς και της έντασης φθορισμού (pi) του CD62L μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους ασθενείς με κατάθλιψη παρατηρείται αυξημένη έκφραση του δείκτη CD25 ( $p = 0,020$ ) και μείωση της έντασης φθορισμού (pi) του CD62L ( $p = 0,031$ ).



**Εικόνα 16:** Κατανομή στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα του ποσοστού έκφρασης των μεμβρανικών δεικτών CD69 και CD11α καθώς και της έντασης φθορισμού (pi) του CD69 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους ασθενείς παρατηρείται αυξημένη έκφραση των δεικτών CD69 ( $p = 0,013$ ) και CD11α ( $p = 0,005$ ) αλλά μειωμένη ένταση φθορισμού του CD69 ( $p = 0,027$ ).



**Εικόνα 17:** Κατανομή στα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα του εκατοστιαίου ποσοστού των δεικτών CD45RA, CD45RO καθώς και της έντασης φθορισμού (pi) του HLA-DR και του CD69 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους ασθενείς παρατηρείται μειωμένη έκφραση του δείκτη CD45RA ( $p = 0,048$ ) και αυξημένη έκφραση του CD45RO ( $p = 0,007$ ). Επίσης παρατηρείται μειωμένη ένταση φθορισμού του δείκτη ενεργοποίησης HLA-DR ( $p = 0,023$ ) και αυξημένη ένταση φθορισμού του CD69 ( $p = 0,024$ ).



**Εικόνα 18:** Κατανομή στα κυτταρολυτικά Τ-λεμφοκύτταρα του εκατοστιαίου ποσοστού των δεικτών HLA-DR, CD16 καθώς και της έντασης φθορισμού (pi) του CD18 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους ασθενείς παρατηρείται αυξημένη έκφραση των δεικτών HLA-DR ( $p = 0,032$ ) και CD16 ( $p = 0,032$ ) καθώς και αύξηση της έντασης φθορισμού του CD18 ( $p = 0,053$ ).

## 2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ – ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΚΡΗΞΗΣ

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων (πίν. 24) είναι στατιστικά πολύ σημαντικά μειωμένα ( $p = 0,0001$ ) στους ασθενείς με κατάθλιψη, σε σχέση με τους μάρτυρες (εικ. 19).

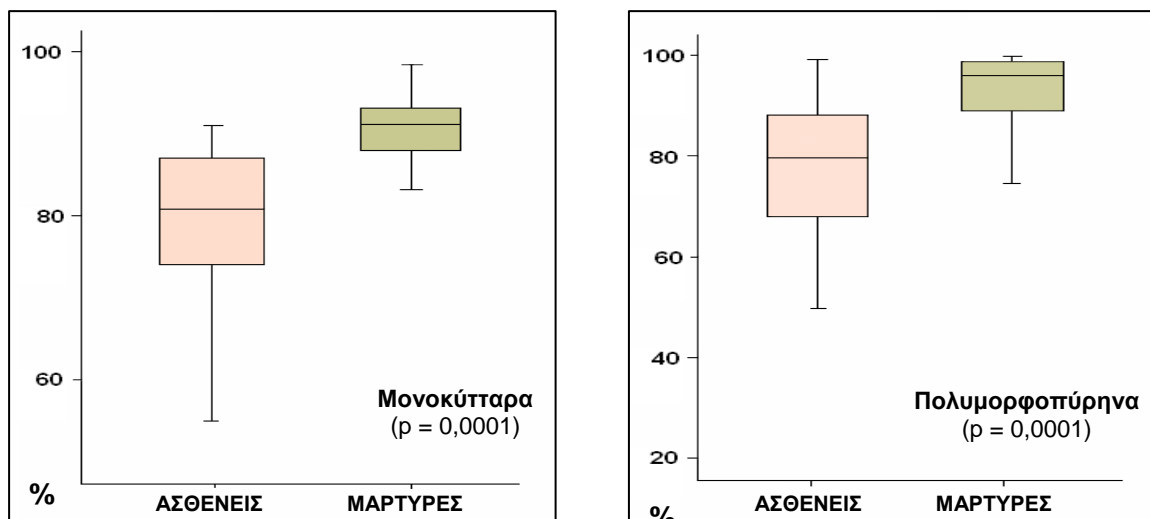
Όσον αφορά την οξειδωτική έκρηξη (πίν. 25) παρατηρήθηκε στους ασθενείς σημαντική μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού των μονοκυττάρων που εκκρίνουν οξειδωτικά ένζυμα ( $p = 0,032$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων όσον αφορά ουδετερόφιλα (εικ. 20).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 24.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που φαγοκυτταρώνουν.

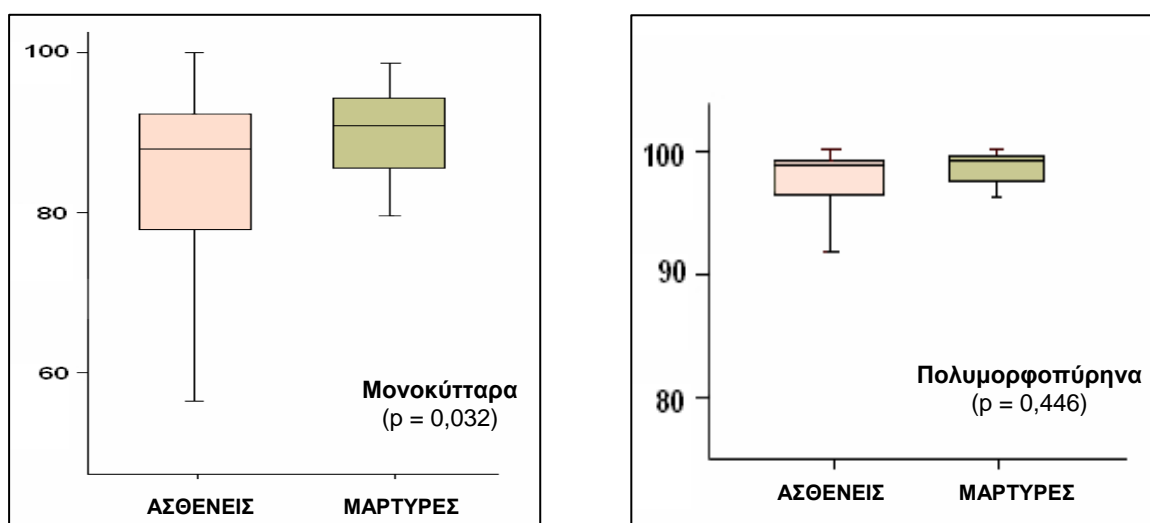
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
Μονοκύτταρα	78,16 $\pm$ 11,67	90,62 $\pm$ 3,89	- 5,269	<b>0,0001</b>	- 0,172 - - 0,077
Ουδετερόφιλα Πολυμορφοπύρηνια	75,80 $\pm$ 16,92	92,78 $\pm$ 7,99	- 4,816	<b>0,0001</b>	- 0,24 - - 0,995

**ΠΙΝΑΚΑΣ 25.** Ποσοστά έκφρασης (μέση τιμή  $\pm$  SD) των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που εκκρίνουν ένζυμα για οξειδωτική έκρηξη.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
Μονοκύτταρα	84,63 $\pm$ 10,70	89,73 $\pm$ 6,96	- 2,184	<b>0,032</b>	- 0,976 - - 0,044
Ουδετερόφιλα Πολυμορφοπύρηνια	95,65 $\pm$ 10,84	97,35 $\pm$ 4,04	- 0,766	0,446	- 0,611 - 0,027



**Εικόνα 19:** Κατανομή του εκατοστιαίου ποσοστού των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που φαγοκυτταρώνουν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους καταθλιπτικούς ασθενείς παρατηρείται μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα στα μονοκύτταρα ( $p = 0,0001$ ) και στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα ( $p = 0,0001$ ).



**Εικόνα 20:** Κατανομή του εκατοστιαίου ποσοστού των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που εκκρίνουν ένζυμα για οξειδωτική έκρηξη μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Στους ασθενείς παρατηρείται μειωμένη ικανότητα παραγωγής οξειδωτικών ενζύμων στα μονοκύτταρα ( $p = 0,032$ ) ενώ στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα ( $p = 0,446$ ) δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

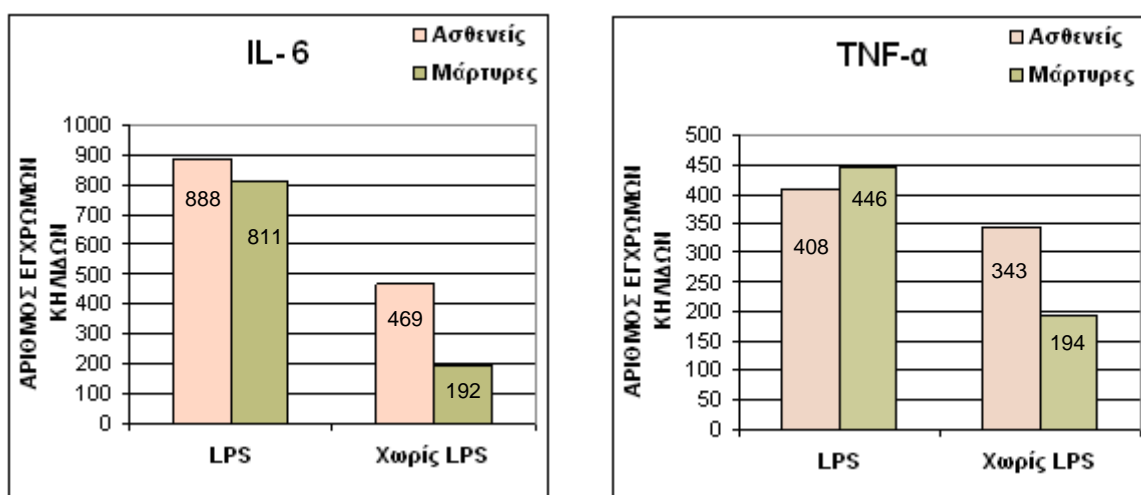
### 3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

#### A. ΜΕΘΟΔΟΣ ELISPOΤ

Μελετήθηκε η έκκριση κυτταροκινών και από τα μονοπύρηνα του περιφερικού αίματος (PBMC) καθώς και από τα μονοκύτταρα (αφού είχε προηγηθεί διέγερση των PBMC με LPS). Οι έγχρωμες κηλίδες που εμφανίζονταν στις μικροπλάκες μετά την προσθήκη του υποστρώματος αποτελούσαν τις κυτταροκίνες που είχαν παραχθεί και εκκριθεί ανά κύτταρο (εικ. 21).

Παρατηρήθηκε ότι χωρίς διέγερση με LPS στους ασθενείς η παραγωγή και έκκριση από τα PBMC της IL-6 είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη ( $p = 0,0001$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 22). Όταν έγινε διέγερση με LPS παρατηρήθηκε αύξηση στην έκκριση της IL-6 από τα μονοκύτταρα στους ασθενείς (εικ. 22), χωρίς όμως η διαφορά αυτή ανάμεσα στις δύο ομάδες μελέτης να είναι στατιστικά σημαντική (πίν. 26).

Όσον αφορά την παραγωγή και έκκριση του TNF-α παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0,0001$ ) στα άτομα με κατάθλιψη πριν τη διέγερση των PBMC με LPS (εικ. 23). Μετά τη διέγερση με LPS υπήρχε μείωση στη παραγωγή και έκκριση του TNF-α από τα μονοκύτταρα στους ασθενείς (εικ. 23), δεν βρέθηκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες μελέτης (πίν. 27).

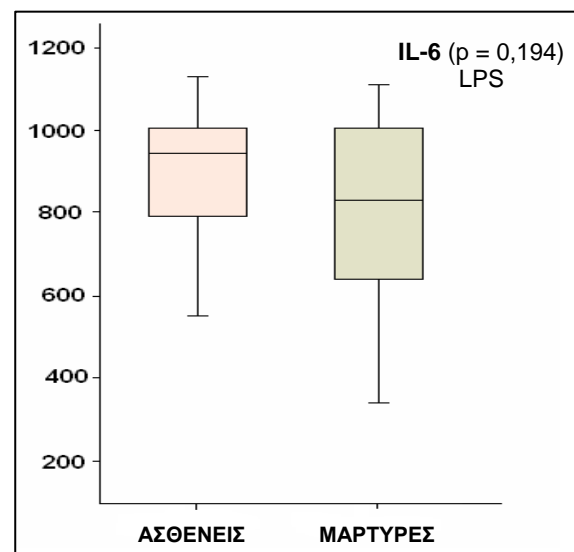
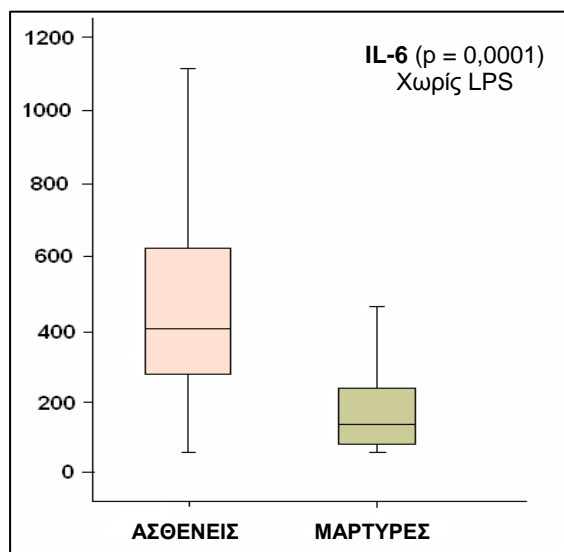


**Εικόνα 21.** Κατανομή των κυττάρων που παράγουν IL-6 (αριστερά) και TNF-α (δεξιά) πριν και μετά την διέγερση με LPS μεταξύ των ασθενών με κατάθλιψη και των μαρτύρων.



**Πίνακας 26.** Μέση τιμή  $\pm$  SD των κυττάρων που παράγουν και εκκρίνουν IL-6 πριν και μετά τη διέγερση με LPS – Μέθοδος Elispot.

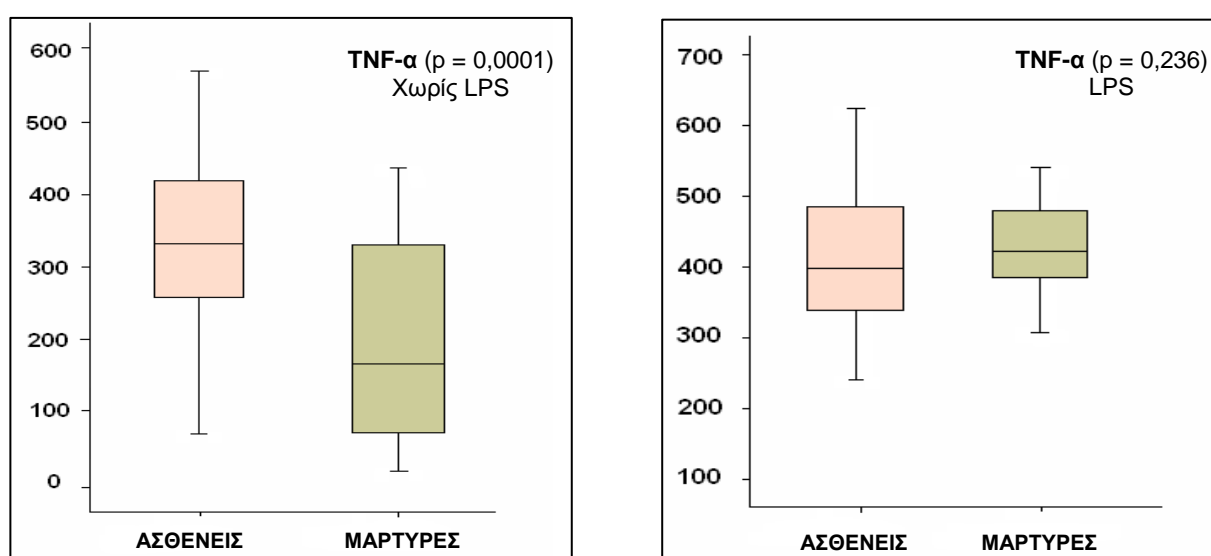
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%	
<b>Χωρίς Διέγερση με LPS</b>	469 $\pm$ 249	192 $\pm$ 130	4,647	<b>0,0001</b>	157,64	- 396,26
<b>Διέγερση με LPS</b>	888 $\pm$ 201	811 $\pm$ 232	1,314	0,194	- 39,94	- 192,44



**Εικόνα 22.** Κατανομή των κυττάρων που παράγουν IL-6 μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Χωρίς διέγερση με LPS (αριστερά), μετά την διέγερση των PBMC με LPS (δεξιά). Στους ασθενείς παρατηρείται αυξημένη παραγωγή και έκκριση IL-6 πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,0001$ ) και μετά τη διέγερση με LPS ( $p = 0,194$ ).

**Πίνακας 27.** Μέση τιμή  $\pm$  SD των κυττάρων που παράγουν και εκκρίνουν TNF- $\alpha$  πριν και μετά τη διέγερση με LPS – Μέθοδος Elispot.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
Χωρίς Διέγερση με LPS	343 $\pm$ 114	194 $\pm$ 136	4,46	<b>0,0001</b>	81,84 - 215,11
Διέγερση με LPS	408 $\pm$ 117	445 $\pm$ 98	-1,197	0,236	- 97,41 - 24,51



**Εικόνα 23.** Κατανομή των κυττάρων που παράγουν TNF- $\alpha$  μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Χωρίς διέγερση με LPS (αριστερά), μετά την διέγερση των PBMC με LPS (δεξιά). Παρατηρείται στους ασθενείς αυξημένη παραγωγή και έκκριση TNF- $\alpha$  πριν τη διέγερση με LPS (p = 0,0001), ενώ παρατηρείται μειωμένη παραγωγή και έκκριση TNF- $\alpha$  μετά τη διέγερση με LPS (p = 0,236).

## **B. ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ**

Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης (pg/mL) των κυτταροκινών IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-8.

Παρατηρήθηκε όσον αφορά την συγκέντρωση της IL-6 (πίν. 28) στατιστικά σημαντική αύξηση της στους ασθενείς πριν τη διέγερση των PBMC με LPS ( $p = 0,0001$ ) αλλά και μετά την διέγερση τους ( $p = 0,0001$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες (εικ. 24, 25).

Όσον αφορά την συγκέντρωση του TNF- $\alpha$  βρέθηκε αύξηση στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες, πριν και μετά τη διέγερση με LPS, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (πίν. 29, εικ. 24, 26).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της IL-1 $\alpha$  και της IL-1 $\beta$  έγινε στο υπερκείμενο των φρεατίων της μικροπλάκας Elispot που ήταν επιστρωμένα με IL-6 καθώς και σε αυτά που ήταν επιστρωμένα με TNF- $\alpha$ .

Στους ασθενείς βρέθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της IL-1 $\alpha$  (πίν. 30 / εικ. 27) στα φρεάτια που ήταν επιστρωμένα με IL-6 (εικ. 28) πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,019$ ) αλλά και μετά τη διέγερση με LPS ( $p = 0,007$ ). Επίσης αυξημένη βρέθηκε η συγκέντρωση της IL-1 $\alpha$  στα φρεάτια που ήταν επιστρωμένα με TNF- $\alpha$  (εικ. 29) πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,0001$ ) αλλά και μετά τη διέγερση με LPS ( $p = 0,005$ ).

Όσον αφορά την συγκέντρωση της IL-1 $\beta$  (πίν. 31 / εικ. 30) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της στα φρεάτια που ήταν επιστρωμένα με IL-6 (εικ. 31) πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,002$ ) αλλά και μετά τη διέγερση με LPS ( $p = 0,013$ ). Επίσης αυξημένη βρέθηκε η συγκέντρωση της IL-1 $\alpha$  στα φρεάτια που ήταν επιστρωμένα με TNF- $\alpha$  (εικ. 32) πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,001$ ) αλλά και μετά τη διέγερση με LPS ( $p = 0,026$ ).

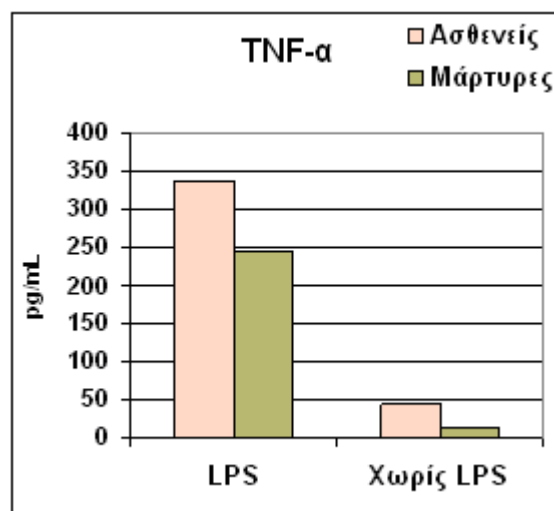
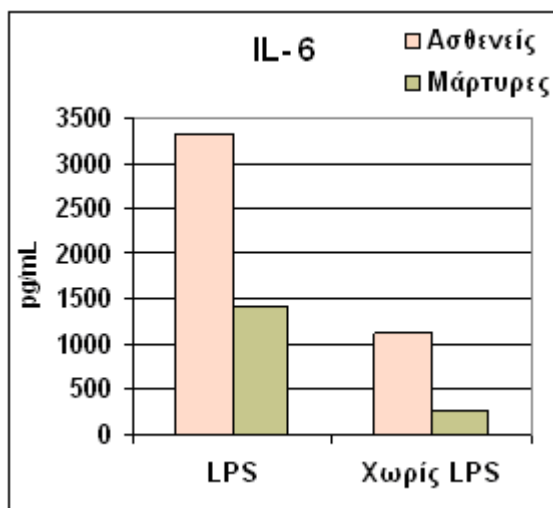
Η συγκέντρωση της IL-8 δεν αξιολογήθηκε διότι ήταν εκτός ορίων ευαισθησίας της μεθόδου και χρειάζονταν περαιτέρω αραίωση του δείγματος.

**Πίνακας 28.** Μέση τιμή  $\pm$  SD της συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-6 πριν και μετά τη διέγερση με LPS

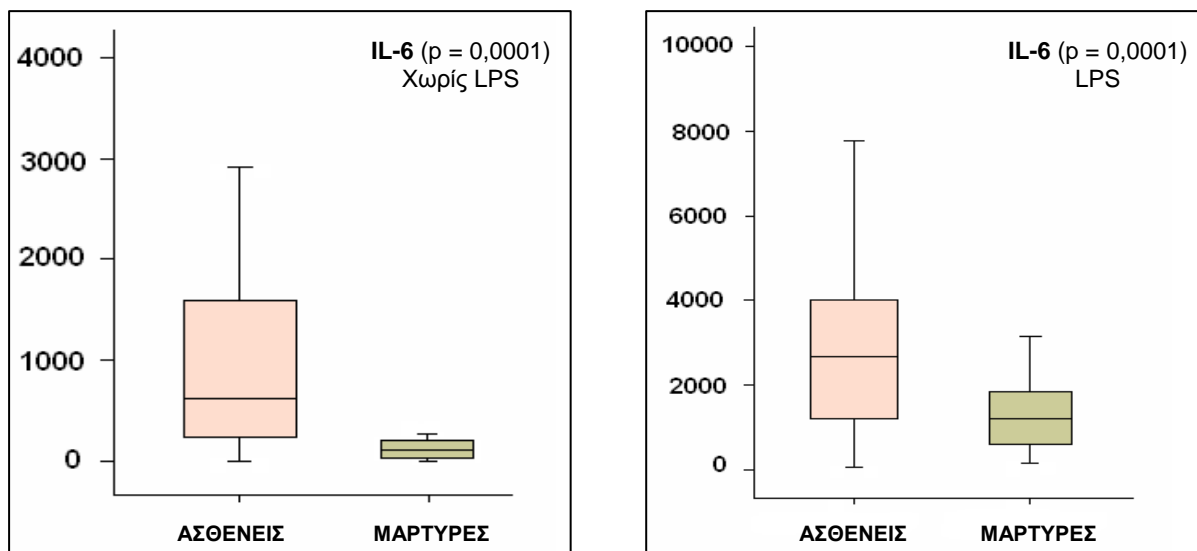
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
Χωρίς Διέγερση με LPS	1122,2 $\pm$ 1233,7	273,6 $\pm$ 481,6	3,771	<b>0,0001</b>	397,54 - 1299,63
Διέγερση με LPS	3314,5 $\pm$ 2784,6	1419,5 $\pm$ 1110,8	3,713	<b>0,0001</b>	872,01 - 2918,03

**Πίνακας 29.** Μέση τιμή  $\pm$  SD της συγκέντρωσης (pg/mL) του TNF- $\alpha$  πριν και μετά τη διέγερση με LPS

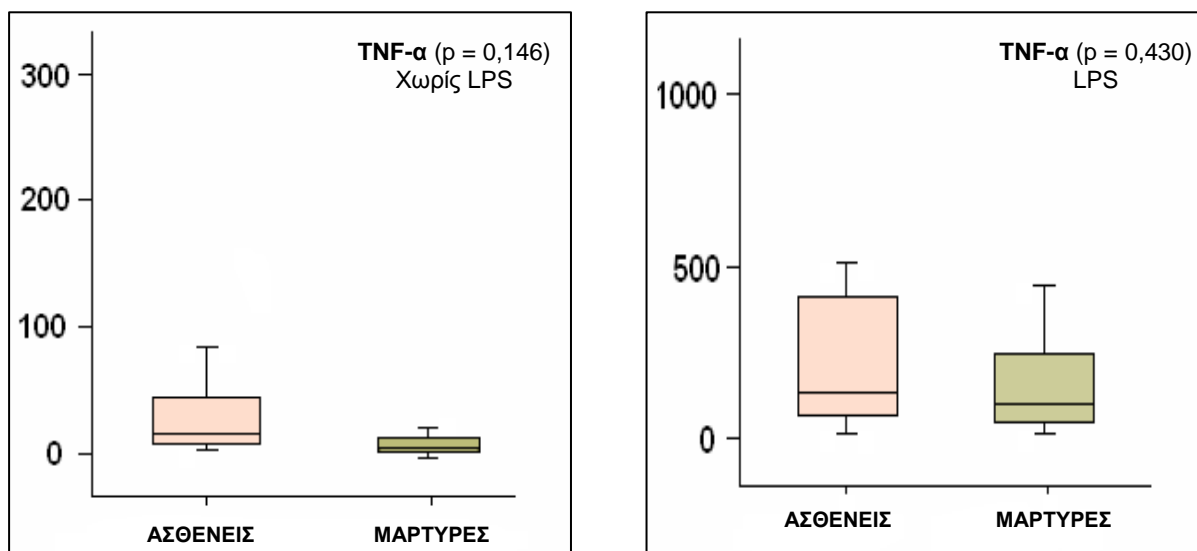
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
Χωρίς Διέγερση με LPS	43,4 $\pm$ 93,6	12,1 $\pm$ 16,1	1,475	0,146	-11,17 - 73,68
Διέγερση με LPS	338,3 $\pm$ 428,6	243,1 $\pm$ 448,6	0,794	0,430	-144,6 - 334,88



**Εικόνα 24.** Η κατανομή της συγκέντρωσης της IL-6 (αριστερά) και του TNF- $\alpha$  (δεξιά) πριν και μετά την διέγερση με LPS μεταξύ των ασθενών με κατάθλιψη και των μαρτύρων.



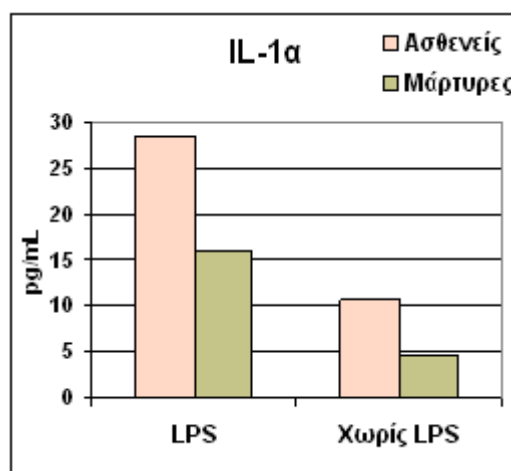
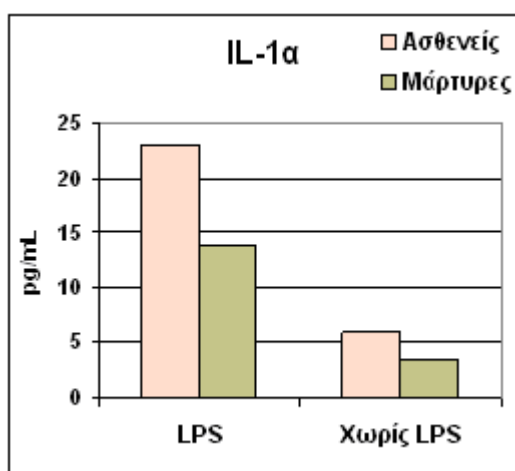
**Εικόνα 25.** Κατανομή της συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-6 μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση IL-6 και πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,001$ ) και μετά ( $p = 0,0001$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.



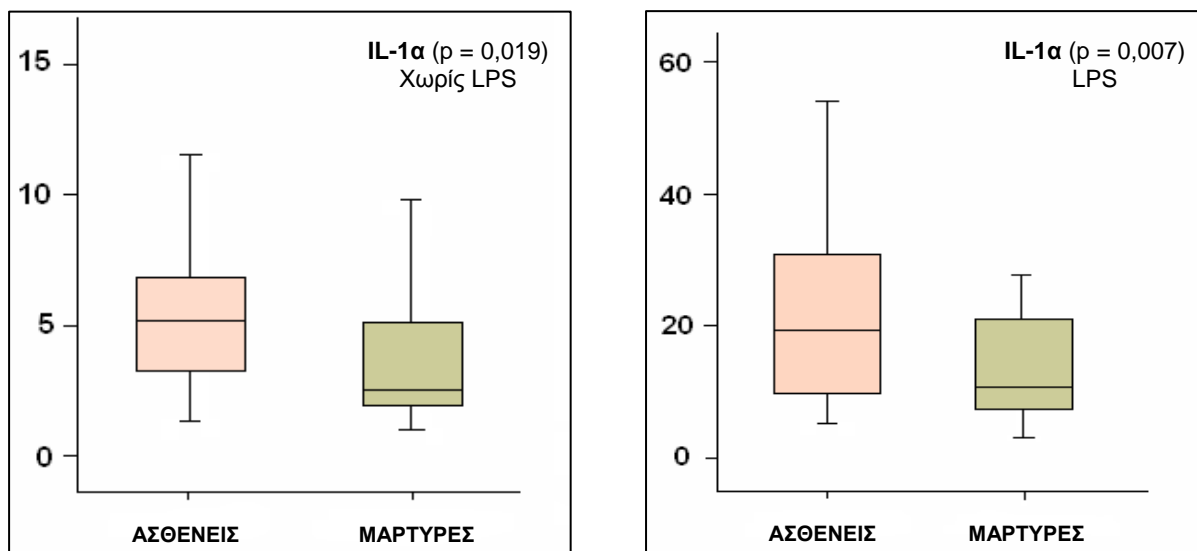
**Εικόνα 26.** Κατανομή της συγκέντρωσης (pg/mL) του TNF-α μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση TNF-α και πριν και μετά τη διέγερση με LPS χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους μάρτυρες.

**Πίνακας 30.** Μέση τιμή συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-1α πριν και μετά τη διέγερση με LPS. Οι δύο πρώτες γραμμές αφορούν την συγκέντρωση της IL-1α από το υπερκείμενο των φρεατίων της μικροπλάκας Elispot που είχε επωαστεί με την κυτταροκίνη IL-6. Οι δύο επόμενες γραμμές αφορούν την συγκέντρωση της IL-1α από το υπερκείμενο των φρεατίων της μικροπλάκας Elispot που είχε επωαστεί με την κυτταροκίνη TNF-α.

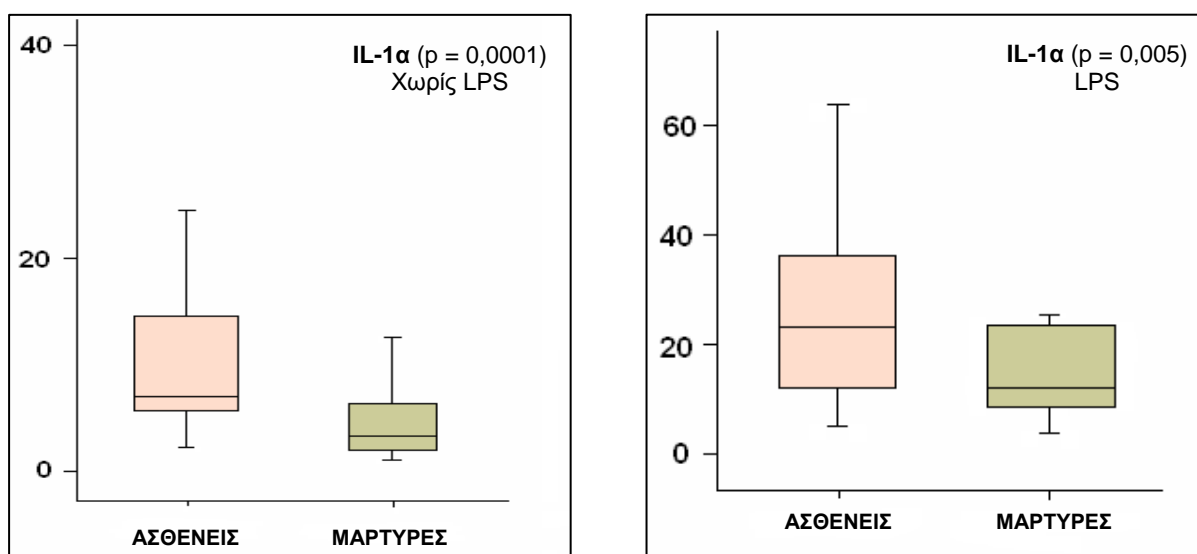
		ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI (95%)
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (pg/mL)						
IL-6	Χωρίς Διέγερση με LPS	5,9 ± 4,1	3,5 ± 2,5	2,048	<b>0,019</b>	0,41 - 4,48
	Διέγερση με LPS	23,05 ± 17,5	13,7 ± 7,8	2,802	<b>0,007</b>	2,65 - 15,94
TNF-α	Χωρίς Διέγερση με LPS	10,6 ± 8,9	4,5 ± 3,4	3,789	<b>0,0001</b>	2,902 - 9,426
	Διέγερση με LPS	28,4 ± 22,03	15,8 ± 10,5	2,951	<b>0,005</b>	4,029 - 21,04



**Εικόνα 27.** Η κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1α πριν και μετά την διέγερση με LPS μεταξύ των ασθενών με κατάθλιψη και των μαρτύρων. Αριστερά κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1α από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν προ-επωασμένα με IL-6. Δεξιά κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1α από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν προ-επωασμένα με TNF-α.



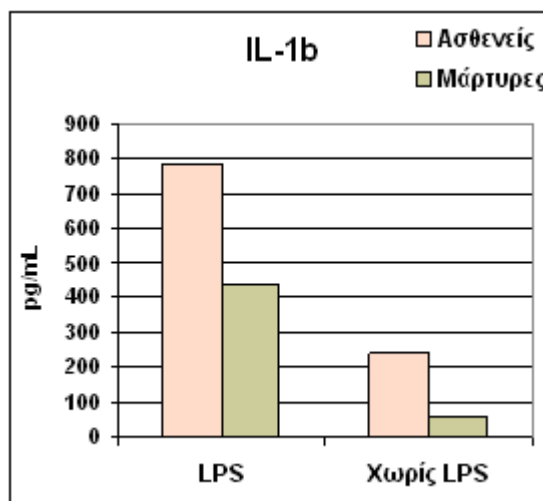
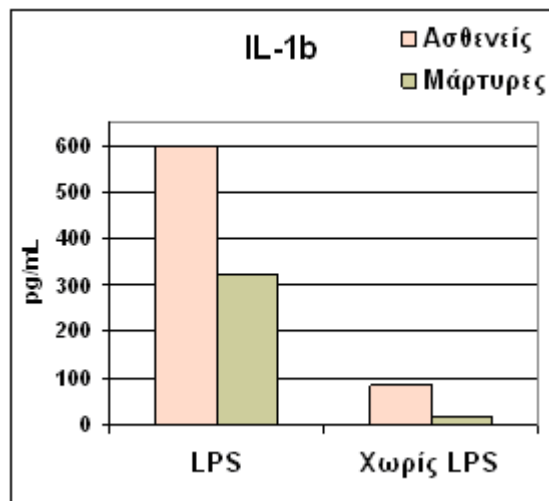
**Εικόνα 28.** Κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1α μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Η μέτρηση έγινε στο υπερκείμενο που συλλέχθηκε από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν επιστρωμένα με IL-6. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση της IL-1α πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,019$ ) και μετά ( $p = 0,007$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.



**Εικόνα 29.** Κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1α μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Η μέτρηση έγινε στο υπερκείμενο που συλλέχθηκε από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν επιστρωμένα με TNF-α. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση της IL-1α πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,0001$ ) και μετά ( $p = 0,005$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.

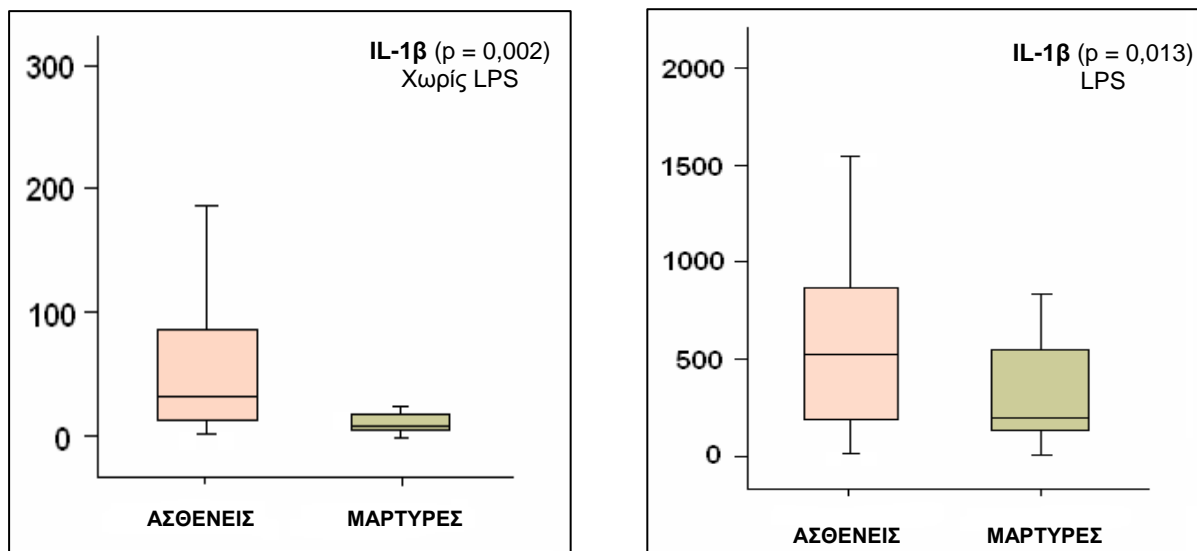
**Πίνακας 31.** Μέση τιμή συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-1β πριν και μετά τη διέγερση με LPS. Οι δύο πρώτες γραμμές αφορούν την συγκέντρωση της IL-1β από το υπερκείμενο των φρεατίων της μικροπλάκας Elispot που είχε επωαστεί με την κυτταροκίνη IL-6. Οι δύο επόμενες γραμμές αφορούν την συγκέντρωση της IL-1β από το υπερκείμενο των φρεατίων της μικροπλάκας Elispot που είχε επωαστεί με την κυτταροκίνη TNF-α.

		ΑΣΘΕΝΕΙΣ	MARTYPEΣ	t - test	p - value	CI (95%)
ΜΕΣΗ ΠΜΗ (pg/ mL)						
IL-6	Χωρίς Διέγερση με LPS	87,5 ± 134,2	15,5 ± 19,3	3,287	<b>0,002</b>	27,78 - 116,3
	Διέγερση με LPS	599,2 ± 567,7	319,4 ± 279,4	2,562	<b>0,013</b>	61,12 - 498,4
TNF-α	Χωρίς Διέγερση με LPS	238,7 ± 285,7	55,9 ± 85,7	3,685	<b>0,001</b>	83,15 - 282,4
	Διέγερση με LPS	786,6 ± 641,9	434,3 ± 344,1	2,285	<b>0,026</b>	43,62 - 661,1

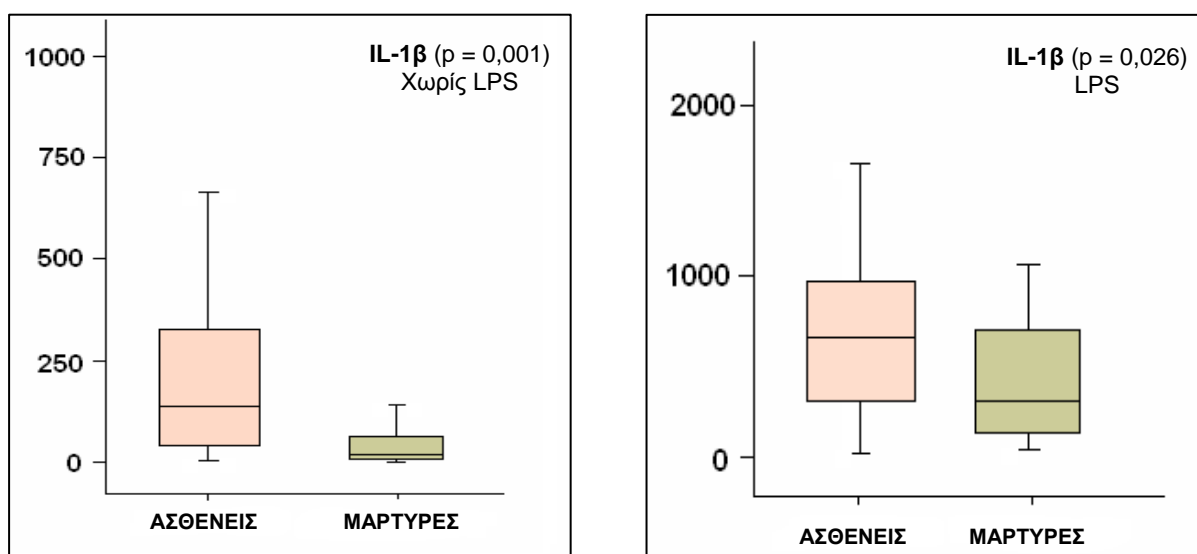


**Εικόνα 30.** Η κατανομή της συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-1β πριν και μετά την διέγερση με LPS μεταξύ των ασθενών με κατάθλιψη και των μαρτύρων. Αριστερά κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1β από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν προ-επωασμένα με IL-6. Δεξιά κατανομή της συγκέντρωσης της IL-1β από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν προ-επωασμένα με TNF-α.





**Εικόνα 31.** Κατανομή της συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-1β μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Η μέτρηση έγινε στο υπερκείμενο που συλλέχθηκε από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν επιστρωμένα με IL-6. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση της IL-1β πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,002$ ) και μετά ( $p = 0,013$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.



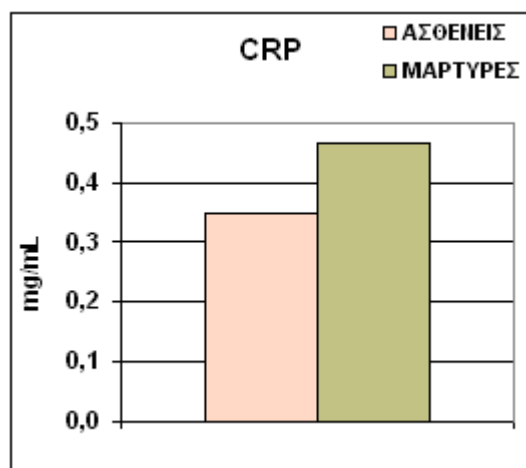
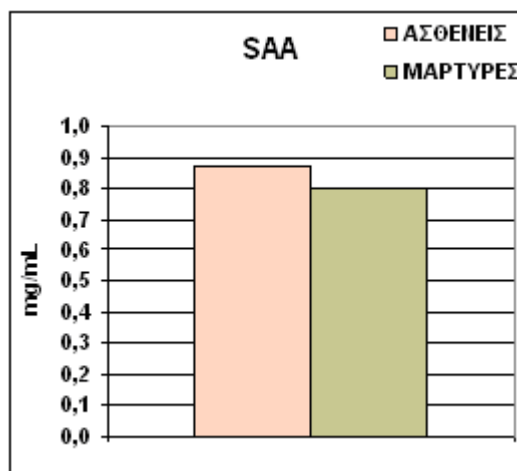
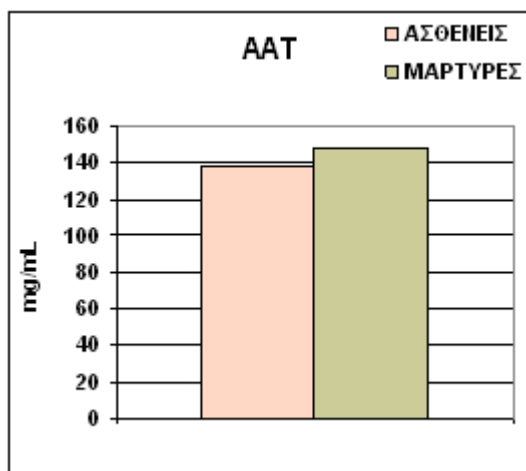
**Εικόνα 32.** Κατανομή της συγκέντρωσης (pg/mL) της IL-1β μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Η μέτρηση έγινε στο υπερκείμενο που συλλέχθηκε από τα φρεάτια της μικροπλάκας Elispot που ήταν επιστρωμένα με TNF-α. Αριστερά χωρίς διέγερση με LPS, δεξιά μετά την διέγερση των PBMC με LPS. Στους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση της IL-1β πριν τη διέγερση με LPS ( $p = 0,001$ ) και μετά ( $p = 0,026$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.

#### 4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΕΩΣ

Προσδιορίστηκαν στον ορό των ασθενών με κατάθλιψη και των μαρτύρων τα επίπεδα των ακόλουθων πρωτεϊνών οξείας φάσεως: α1-αντιθρυψίνη (ΑΤΤ), αμυλοειδές Α του ορού (SAA) και CRP. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων που μετείχαν στη μελέτη (πίν. 32, εικ. 33).

**Πίνακας 32.** Η συγκέντρωση (mg/dl) των πρωτεϊνών οξείας φάσεως στους ασθενείς και τους μάρτυρες της μελέτης.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΑΡΤΥΡΕΣ	t - test	p - value	CI 95%
<b>AAT</b>	138,23 ± 20,8	147,73 ± 34,5	-1,281	0,209	-24,543 - 5,549
<b>SAA</b>	0,87 ± 2,3	0,80 ± 0,9	0,194	0,847	-0,847 - 1,030
<b>CRP</b>	0,34 ± 0,8	0,46 ± 0,9	-0,596	0,553	-0,554 - 0,299



**Εικόνα 33.** Κατανομή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης, AAT (πάνω αριστερά), SAA (πάνω δεξιά) και CRP (κάτω αριστερά) μεταξύ ασθενών με κατάθλιψη και μαρτύρων.

**AAT:** α1-αντιθρυψίνη

**SAA:** αμυλοειδές Α του ορού

**CRP:** C-αντιδρώσα πρωτεΐνη



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανοσιακή λειτουργία των ασθενών με κατάθλιψη απασχολεί τη διεθνή βιβλιογραφία εδώ και πάρα πολλά χρόνια, κατά βάση λόγω της άποψης ότι οι ασθενείς αυτοί είναι επιρρεπείς στις λοιμώξεις [9]. Παρότι η άποψη αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί από έγκυρες επιδημιολογικές μελέτες, το ενδιαφέρον για την ανοσιακή κατάσταση των καταθλιπτικών ασθενών συνεχίζει αμείωτο, ενόψει των σύγχρονων εξελίξεων της Ψυχοανοσολογίας [20] και κυρίως της κατανόησης της λειτουργίας του υποθαλαμοϋποφυσιακού άξονα [97], αλλά και της πρόσφατα αναδυόμενης σχέσης που φαίνεται να συνδέει την κατάθλιψη με τη φλεγμονή [21, 22, 22]. Παρά ταύτα, ελάχιστες είναι ακόμη οι μελέτες που διερευνούν αξιόπιστα τις ενδεχόμενες διαταραχές των παραμέτρων των ανοσιακών λειτουργιών στην κατάθλιψη. Όπως αναφέρεται, τα γνωστικά αντικείμενα της Ανοσολογίας και της Νευροφυσιολογίας είναι τόσο μεγάλα, που ο συγκερασμός τους στο έδαφος μιας ερευνητικής προσπάθειας αξιολόγησης του κοινού τόπου τους είναι εξαιρετικά δυσχερής. Το γεγονός είναι ότι ο μεγαλύτερος όγκος της σχετικής αρθρογραφίας αναφέρεται στην εκτίμηση διαταραχών μεμονωμένων παραμέτρων, με αποτέλεσμα να είναι ακόμη πρακτικά αδύνατη η διατύπωση οριστικών συμπερασμάτων. Ακόμη και η πρόσφατη μετα-ανάλυση των Zorrilla et al (2001) [25], το μόνο ουσιαστικό που αναδεικνύει είναι η τεράστια ετερογένεια των μέχρι τότε ευρημάτων και, κατά συνέπεια, τα κενά που συνεχίζουν να υπάρχουν.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό την ταυτόχρονη και σε βάθος μελέτη μιας μεγάλης σειράς παραμέτρων της ανοσιακής λειτουργίας στον ίδιο πληθυσμό καταθλιπτικών ασθενών, σε σύγκριση με μη καταθλιπτικούς βιολογικά υγιείς μάρτυρες. Με στόχο να αναδειχθούν ευκολότερα οι πιθανές διαταραχές, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν καταθλιπτικοί ασθενείς με τη μεγαλύτερη δυνατή βαρύτητα καταθλιπτικής διαταραχής (HDRS-24 score >20), θεωρώντας ότι αυτοί θα παρουσιάζουν τις πιο ακραίες διαταραχές. Οι ανοσολογικές παράμετροι που μελετήθηκαν, αφορούσαν κατ' αρχήν την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών του αίματος. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, πέραν του μεγέθους των διαφόρων λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών, εξετάστηκαν και διάφοροι μεμβρανικοί δείκτες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και τη λειτουργικότητα κάθε υποπληθυσμού. Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο η βιολογία των αντίστοιχων ανοσοκυττάρων και των διαλυτών παραγόντων της φλεγμονής, εκτός από τον ανοσοφαινότυπο των ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, μελετήθηκε, τόσο η φαγοκυτταρική ικανότητά τους, όσο και η ικανότητά

τους για παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, πριν αλλά και μετά από κατάλληλη διέγερση.

### **Μεθοδολογική προσέγγιση**

Η μεθοδολογική προσέγγιση, που επιχειρήθηκε στην παρούσα διατριβή, είναι μοναδική στη μέχρι σήμερα σχετική βιβλιογραφία, πρώτον, αναφορικά με την ταυτόχρονη πολυπαραμετρική προσέγγιση των αντίστοιχων ανοσιακών λειτουργιών και, δεύτερον και κυριότερο, αναφορικά με την τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε. Οι μέχρι σήμερα πληροφορίες, που αναφέρονται στη σχέση κατάθλιψης-υποθαλαμοϋποφυσιακού άξονα-φλεγμονής, στηρίζονται σε ανοσοχημικές μετρήσεις της συγκέντρωσης των κυτταροκινών στον ορό. Η μεθοδολογία αυτή έχει δείχθει ότι είναι εξαιρετικά ανεπαρκής, επειδή επηρεάζεται από μια ατέλειωτη σειρά ασταθών παραγόντων. Για παράδειγμα, οι κυτταροκίνες είναι μικρομοριακές ουσίες με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής στην κυκλοφορία, αποδομούνται εξαιρετικά εύκολα *ex vivo* ή αδρανοποιούνται από διάφορους αναστολείς ή και αντισώματα που επίσης κυκλοφορούν στον ορό των ασθενών.

Έτσι, για το σκοπό αυτό, στη παρούσα διατριβή, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η σύγχρονη τεχνολογία Elispot, που φαίνεται ότι είναι απαλλαγμένη από την επίδραση ανάλογων παραγόντων. Προκειμένου, βέβαια, να επιτευχθούν αξιόπιστες μετρήσεις με αυτή την τεχνολογία, είναι απαραίτητη η αυστηρή προτύπωσή της στις συνθήκες των συγκεντρώσεων εργασίας. Λαβαίνοντας υπόψη τούς παράγοντες που επηρεάζουν τις σχετικές μετρήσεις [149], αφιερώσαμε σημαντική προσπάθεια γι' αυτό το σκοπό, με αποτέλεσμα οι πειραματικές συνθήκες που προσδιορίσαμε να εξυπηρετήσουν αξιόπιστα, όχι μόνο τους στόχους της συγκεκριμένης μελέτης, αλλά και κάθε άλλης σχετικής μελέτης σε καταθλιπτικούς ασθενείς. Επιπλέον, προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραπάνω μεθοδολογίας και με τη χρήση μιας εξαιρετικά ευαίσθητης τεχνολογίας (μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία), έγινε μέτρηση των ίδιων κυτταροκινών που ελέγχθηκαν με την τεχνολογία Elispot, στα υπερκείμενα των μικροκαλλιεργειών PBMC, οι οποίες έγιναν για τις ανάγκες της τελευταίας.

### **Διαταραχές των κυττάρων της φυσικής ανοσίας**

Η στατιστικά πολύ σημαντική αύξηση του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων, που παρατηρήθηκε στους καταθλιπτικούς ασθενείς, σε σχέση με τα υγιή άτομα, επιβεβαιώνει τα ευρήματα των μέχρι τώρα σχετικών μελετών [24, 25], φαίνεται δε να οφείλεται στην επίσης πολύ σημαντική αύξηση του αριθμού των πολυμορφοκυττάρων και των μονοκυττάρων.

Το εύρημα που δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία, είναι ότι η παραπάνω αύξηση του απόλυτου αριθμού των πολυμορφοπυρήνων και των μονοκυττάρων, στους καταθλιπτικούς ασθενείς, συνοδεύεται από ανοσοφαινοτυπικές ενδείξεις συμβατές με ενεργοποίησή τους. Σε σχέση, δηλαδή με τους υγιείς, στους καταθλιπτικούς παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των μορίων CD69 και CD11a στα πολυμορφοπύρηνα, καθώς και αύξηση της έκφρασης του CD25 συνοδευόμενη από μείωση του p1 του CD62L στα μονοκύτταρα.

Το γεγονός ότι οι καταθλιπτικοί ασθενείς παρουσιάζουν αύξηση των ενεργοποιημένων πολυμορφοπυρήνων και μονοκυττάρων στην κυκλοφορία επιβεβαιώνεται από το εύρημα ότι η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF-α) από αυτά ανευρίσκεται, επίσης, στατιστικά σημαντικά αυξημένη, σε σχέση με τους μάρτυρες. Σε αυτό συμφωνούν τα ευρήματα που προκύπτουν, τόσο από τη μεθοδολογία Elispot, όσο και από τη μέτρηση των κυτταροκινών που παράγονται από τα κύτταρα αυτά και απελευθερώνονται στα υπερκείμενα των καλλιέργειών. Σε μεθοδολογικό επίπεδο, διευκρινίζεται ότι η μέτρηση των διαλυτών κυτταροκινών στα υπερκείμενα καλλιέργειών δεν υπόκειται σε περιορισμούς ανάλογους εκείνων που παρεμβαίνουν στις μετρήσεις τους στο ορό, στο βαθμό που τα πρώτα αντιπροσωπεύουν κλειστά συστήματα που δεν περιέχουν τους αδρανοποιητές, οι οποίοι κυκλοφορούν στον ορό. Η επανάληψη των ίδιων πειραμάτων μετά από διέγερση των μονοκυττάρων με LPS δεν έδειξε σαφείς διαφορές μεταξύ καταθλιπτικών και υγιών ατόμων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ικανότητα των κυττάρων αυτών να ενεργοποιούνται δεν υπολείπεται στους καταθλιπτικούς ασθενείς.

Για την κατάσταση αυξημένης ενεργοποίησης που, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φαίνεται να χαρακτηρίζει τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας των καταθλιπτικών ασθενών θα μπορούσε ενδεχομένως να ενοχοποιηθεί η παραγωγή επαγωγικών μορίων (π.χ. IL-1) που έχει δειχθεί ότι παράγονται στο ΚΝΣ αυτών των ασθενών [96]. Ανεξαρτήτως, όμως, της αιτιολογίας του, το γεγονός αυτό είναι πολύ πιθανό ότι συμβάλει στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης, που πιθανολογείται ότι συνοδεύει την κατάθλιψη [21, 77, 78]. Ενδείξεις, πάντως, μιας τέτοιας φλεγμονώδους αντίδρασης, στο επίπεδο των πρωτεϊνών οξείας φάσης, δεν κατορθώσαμε να δείξουμε στους ασθενείς που μελετήσαμε.

Σε αντίθεση, πάντως, με την κατάσταση ενεργοποίησης των πολυμορφοπυρήνων και των μονοκυττάρων, καθώς και με την επάρκεια των μηχανισμών που οδηγούν σ' αυτή, η ικανότητα των κυττάρων αυτών να φαγοκυτταρώνουν βακτήρια και να τα καταστρέφουν μέσω του μηχανισμού οξειδωτικής έκρηξης, βρέθηκε ότι στους καταθλιπτικούς υπολείπεται

σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Στο σημείο αυτό, τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνητών [58, 59].

### **Διαταραχές των λεμφοκυττάρων**

Η λεμφοπενία που, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία παρατηρείται στους καταθλιπτικούς [25], δεν επιβεβαιώνεται από τα δικά μας αποτελέσματα. Εντούτοις, οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων φαίνονται να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ανοσοφαινοτυπικές διαταραχές. Αναφορικά με τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, οι διαταραχές αυτές είναι ανάλογες εκείνων που έχουν ήδη περιγραφεί από άλλους ερευνητές, αναφορικά με την αύξηση των μνημονικών (CD45RO) και τη συνακόλουθη μείωση των παρθένων (CD45RA) T-λεμφοκυττάρων [25]. Στη βάση αυτών των αποτελεσμάτων, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν η κατάθλιψη συνοδεύεται από επιτάχυνση των διεργασιών γήρανσης των λεμφοκυττάρων, που, όπως είναι γνωστό, χαρακτηρίζει την αύξηση της ηλικίας.

Ως προς την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, η οποία στη βιβλιογραφία αναφέρεται γενικώς ότι χαρακτηρίζει τον πληθυσμό των CD3<sup>+</sup> κυττάρων στην κατάθλιψη [21, 25], από τα ευρήματά μας προκύπτει ότι αυτή αφορά κυρίως τον υποπληθυσμό των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων.

Τέλος, στους καταθλιπτικούς ασθενείς της μελέτης μας, δεν παρατηρήθηκαν διαταραχές των υποπληθυσμών των B-λεμφοκυττάρων ούτε των NK κυττάρων. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, αναφορικά με αυτές τις διαταραχές, παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια [37, 39].

### **Συμπεράσματα**

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Στους καταθλιπτικούς ασθενείς παρατηρείται διάχυτη ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος και κυρίως των κυττάρων της φυσικής ανοσίας. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση αυτή προέρχεται αφενός από μεσολαβητές που παράγονται στο ΚΝΣ αυτών των ασθενών και αφετέρου συμβάλλει στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης που πιθανολογείται ότι συνοδεύει τη νόσο.
2. Η παρατηρούμενη μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των πολυμορφοπυρήνων και των μονοκυττάρων, καθώς και η μείωση των παρθένων βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων αποτελούν αρκετά ισχυρές ενδείξεις ότι η ικανότητα αυτών των ασθενών να

αντιμετωπίσουν ορισμένα τουλάχιστον παθογόνα είναι σημαντικά μειωμένη. Κατά τούτο, η ευπάθειά τους προς τις λοιμώξεις δεν μπορεί να αποκλειστεί.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	
Αριθμός Μητρώου:	Ημερομηνία:
Όνοματεπώνυμο:	
Ημερομηνία Γέννησης:	Ηλικία:
Τόπος Γεννήσεως:	Τόπος Διαμονής:
Διεύθυνση:	Τηλέφωνο:
Όνομα Πατρός:	Όνομα Μητρός:
Οικογενειακή Κατάσταση:	
Επάγγελμα:	
<u>Έξεις και Τρόπος Ζωής:</u> Αλκοόλ: Κάπνισμα: Χρήση ουσιών: Λοιπά:	
<u>Φαρμακευτική Αγωγή:</u> (που τυχόν λαμβάνει)	



<b>Διάρκεια θεραπείας / Συμμόρφωση στην αγωγή:</b>  <b>Εμβόλια:</b>	
<b>Προβλήματα Υγείας: (χρόνια νοσήματα, λοιμώξεις)</b>	
<b>Εισαγωγές σε Νοσοκομεία:</b>	
<b>Ψυχιατρικό Ιστορικό:</b>  Αριθμός εισαγωγών σε ψυχιατρική κλινική / Διάρκεια παραμονής	
<b>Οικογενειακό Ιατρικό Ιστορικό:</b>  <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 30%;"> <b>ΓΟΝΕΙΣ:</b>   <b>ΑΔΕΡΦΙΑ:</b> </div> <div style="width: 60%; text-align: center;"> <pre> graph TD     P((ΠΑΤΕΡΑΣ)) --- M((ΜΗΤΕΡΑ))     P --- C1[ ]     P --- C2[ ]     P --- C3((ΑΔΕΡΦΙΑ))     style C1 fill:#fff,stroke:#000     style C2 fill:#fff,stroke:#000     style C3 fill:#fff,stroke:#000             </pre> </div> </div>	
<b>ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΤΑΘΛΙΨΗΣ</b> (κατά ICD-10)	
<b><u>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ</u></b>  <b>Hamilton Depression Rating Scale (HDRS - 24)</b>  ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ <span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 50px; height: 30px; vertical-align: middle;"></span>	

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

### Hamilton Depression Rating Scale-24 (HDRS-24)

Βαθμολογική κλίμακα Hamilton για καταθλιπτικούς ασθενείς

#### ΙΣΤΟΡΙΚΟ – ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Αρ. Ασθενή: .....Ονοματεπώνυμο: .....

Ηλικία: .....Βάρος: .....Ημ/νία λήψεως Ιστορικού: .....

Οικογεν. Κατάσταση: .....Οικογεν. ιστορικό κατάθλιψης: \_\_\_\_ ναι \_\_\_\_ όχι

Άλλη ψυχική διαταραχή: \_\_\_\_ ναι \_\_\_\_ όχι. Εάν ναι ποια.....

Είδος κατάθλιψης: .....

Εκλυτικός παράγοντας: .....

1. Κανένας
2. Σωματική νόσος (εάν ναι, ποια: .....)
3. Ψυχοκοινωνικό στρες (εάν ναι, αναφέρεται: .....)
4. 2 και 3 μαζί
5. Εποχικές μεταβολές

Ηλικία ασθενούς κατά την έναρξη του πρώτου μείζονος καταθλιπτικού επεισοδίου: .....

Προηγούμενα μανιακά επεισόδια: Ναι \_\_\_\_ Όχι \_\_\_\_

Έναρξη συμπτωμάτων παρόντος επεισοδίου: (Ημερομηνία).....

#### ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

Ημερομηνία έναρξης αγωγής: .....

Διάρκεια: από ..... έως ..... Ημερήσια δόση (mg).....

Σχόλια: .....

.....

.....



## ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ

---

### 1. ΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ (Κατήφεια, απαισιοδοξία, λύπη, απελπισία, τάση να κλαίει).

- 0. Δεν υπάρχει.
- 1. Λύπη, απελπισία κλπ. που αποκαλύπτονται μόνο με σχετικές ερωτήσεις.
- 2. Ο άρρωστος αναφέρει τα παραπάνω αισθήματα χωρίς να ερωτηθεί. Κλαίει κάπου-κάπου.
- 3. Φανερώνει αυτά τα αισθήματα όχι λεκτικά, δηλ. με την έκφραση του προσώπου, τη στάση του, την ομιλία κλπ. Κλαίει συχνά.
- 4. Υπερβολικά συμπτώματα.

---

### 2. ΑΙΣΘΗΜΑΤΑ ΕΝΟΧΗΣ (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως κατηγορούσατε τον εαυτό σας για λάθη που κάνατε ή επειδή απογοητεύσατε τους άλλους ανθρώπους; Ποιες ήταν οι σκέψεις σας;)

- 0. Δεν υπάρχουν.
- 1. Αυτομομφή, αισθάνεται ότι έχει απογοητεύσει τους ανθρώπους.
- 2. Ιδέες ενοχής.
- 3. Η παρούσα αρρώστια είναι μια τιμωρία.
- 4. Ψευδαισθήσεις ενοχής (ακούει φωνές που τον κατηγορούν ή τον καταγγέλλουν ή βιώνει απειλητικές οπτικές ψευδαισθήσεις)

---

### 3. ΤΑΣΗ ΑΥΤΟΚΤΟΝΙΑΣ (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως σκεφτόσασταν ότι δεν αξίζει να ζει κανείς, ότι θα ήταν καλύτερα να έχετε πεθάνει; Μήπως σας μπήκαν ιδέες να κάνετε κακό στον εαυτό σας;)

- 0. Δεν υπάρχει.
- 1. Αισθάνεται ότι η ζωή δεν αξίζει.
- 2. Εύχεται να είχε πεθάνει.
- 3. Ιδέες αυτοκτονίας.
- 4. Απόπειρες αυτοκτονίας.

---

### 4. ΑΡΧΙΚΗ ΑΨΠΝΙΑ (Την εβδομάδα που πέρασε πως ήταν ο ύπνος σας; Μήπως είχατε δυσκολία να σας πάρει ο ύπνος; Πόσες φορές την εβδομάδα είχατε πρόβλημα να σας πάρει ο ύπνος;)

- 0. Δεν έχει δυσκολία να τον πάρει ο ύπνος.
- 1. Παραπονιέται για δυσκολία κάπου - κάπου να τον πάρει ο ύπνος.
- 2. Παραπονιέται για δυσκολία να τον πάρει το βράδυ ο ύπνος.

---

### 5. ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΑΨΠΝΙΑ (Την εβδομάδα που πέρασε σας έτυχε καθόλου αν ξυπνήσετε κατά τη διάρκεια της νύχτας;)

- 0. Όχι δυσκολία.
- 1. Ο άρρωστος είναι ανήσυχος και ταραγμένος κατά τη διάρκεια της νύχτας.
- 2. Ξυπνάει κατά τη διάρκεια της νύχτας.

---

### 6. ΟΨΙΜΗ ΑΨΠΝΙΑ (Την εβδομάδα που πέρασε τι ώρα σηκωνόσασταν από το κρεβάτι;)

- 0. Όχι δυσκολία.
- 1. Ξυπνάει πολύ νωρίς το πρωί αλλά ξανακοιμάται.
- 2. Ξυπνάει πολύ νωρίς το πρωί αλλά δε μπορεί να ξανακοιμηθεί.

---

**7. ΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε πως περνάγατε την ώρα σας; Μήπως σταματήσατε να κάνετε πράγματα που συνηθίζατε;)

0. Όχι δυσκολία.
1. Αισθήματα ανικανότητας, κόπωση ή αδυναμία σε δραστηριότητες, την εργασία ή τα χόμπι.
2. Απώλεια του ενδιαφέροντος για δραστηριότητα, εργασία ή χόμπι, ακεφιά, αναποφασιστικότητα και αμφιταλάντευση (αισθάνεται σαν να πρέπει να πιέσει τον εαυτό του για εργασία ή δραστηριότητες).
3. Περιορισμένες κοινωνικές δραστηριότητες, μειωμένη παραγωγικότητα, μείωση του πραγματικού χρόνου που ξοδεύει σε δραστηριότητες στο νοσοκομείο. Βαθμολογήστε με 3 όταν ο άρρωστος δεν δαπανάει τουλάχιστον 3 ώρες την ημέρα σε δραστηριότητες του νοσοκομείου ή σε χόμπι, πέρα από τις αγγαρείες στο τμήμα.
4. Έπαυσε να εργάζεται εξαιτίας της νόσου του. (Στο νοσοκομείο βαθμολογήστε με 4 όταν ο άρρωστος δεν απασχολείται με δραστηριότητες εκτός από αγγαρείες στο τμήμα ή όταν αυτές δεν μπορεί να τις εκτελέσει χωρίς βοήθεια).

---

**8. ΕΠΙΒΡΑΔΥΝΣΗ** (Βαθμολογείστε με βάση την παρατήρηση)

(Βραδύτητα στη σκέψη, στην ομιλία και στην κινητική συμπεριφορά, απάθεια, εμβρόντησία).

0. Κανονική ομιλία και σκέψη.
1. Ελαφρά επιβράδυνση κατά την εξέταση.
2. Σαφής επιβράδυνση κατά την εξέταση.
3. Συνέντευξη προβληματική
4. Πλήρης εμβρόντησία.

---

**9. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΗΣΥΧΙΑ** (Βαθμολογείστε με βάση την παρατήρηση)

0. Καθόλου.
1. “Παίζει” με τα χέρια, τα μαλλιά του κλπ.
2. Συστρέφει τα χέρια, δαγκώνει τα νύχια, τραβάει τα μαλλιά του, δαγκώνει τα χείλη.

---

**10. ΑΓΧΟΣ ΨΥΧΙΚΟ** (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως ήσαστε ιδιαίτερα ευερέθιστος και βρισκόσασταν συνέχεια σε ένταση;)

0. Καθόλου.
1. Αίσθημα έντασης και ευερεθιστότητα.
2. Στενοχωριέται για ασήμαντα πράγματα.
3. Φοβισμένη στάση, φανερή στην όψη και στην ομιλία.
4. Φόβοι που τους εκφράζει χωρίς να ερωτηθεί.

---

**11. ΑΓΧΟΣ ΣΩΜΑΤΙΚΟ** (Από το **γαστρεντερικό σύστημα**, ρέψιμο, δυσπεψία, διάρροια, σπασμοί, τάση για εμετό ή από το **καρδιαγγειακό**, αίσθημα παλμών, κεφαλαλγία κλπ)

0. Δεν υπάρχει.
1. Τον στενοχωρεί κατά τη διάρκεια της ημέρας.
2. Έχει συμπτώματα αλλά εξακολουθεί να εργάζεται.
3. Συμπτώματα που τον αναγκάζουν να περιορίζει τις δραστηριότητες του.
4. Τα συμπτώματα του τον κάνουν ανίκανο να εργασθεί.

---

**12. ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε πώς ήταν η όρεξη σας για φαγητό;)

- 0. Δεν υπάρχουν.
- 1. Ελαφρά συμπτώματα που εμποδίζουν τη δραστηριότητα του.
- 2. Μόνιμα συμπτώματα που περιορίζουν τις καθημερινές του δραστηριότητες του.

---

**13. ΓΕΝΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Αίσθημα βάρους στα άκρα ή το κεφάλι. Διάχυτος πονοκέφαλος ή απώλεια της ενεργητικότητας και εύκολη κόπωση).

- 0. Δεν υπάρχουν.
- 1. Ελαφρά συμπτώματα που όμως δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα του.
- 2. Μόνιμα συμπτώματα ή συμπτώματα που περιορίζουν τις καθημερινές του δραστηριότητες.

---

**14. ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε πώς ήταν η διάθεση σας)

- 0. Δεν υπάρχουν.
- 1. Ελαφρά συμπτώματα που όμως δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα του.
- 2. Μόνιμα συμπτώματα που περιορίζουν τις καθημερινές του δραστηριότητες.

---

**15. ΥΠΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε πόσο σας απασχόλησε η υγεία σας;)

- 0. Δεν υπάρχουν.
- 1. Σωματική ενασχόληση.
- 2. Υπεραπασχόληση με τη σωματική υγεία.
- 3. Μεμφίμοιρη (κλαψιάρικη) στάση πριν τις ανεπιθύμητες ενέργειες.  
Υποχόνδριο παραλήρημα.

---

**16. ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ**

**A. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ**

- 0. Όχι απώλεια βάρους.
- 1. Πιθανή απώλεια βάρους που συνδέεται με την παρούσα νόσο.
- 2. Βέβαιη (κατά τον άρρωστο) απώλεια βάρους.

**B. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΨΥΧΙΑΤΡΟ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΜΕ ΖΥΓΙΣΗ ΤΟΥ ΑΡΡΩΣΤΟΥ ΚΑΘΕ ΕΒΔΟΜΑΔΑ**

- 0. Απώλεια βάρους μικρότερη από 0,5 χιλιόγραμμα την εβδομάδα.
- 1. Απώλεια βάρους μεγαλύτερη από 0,5 χιλιόγραμμα την εβδομάδα.
- 2. Απώλεια βάρους μεγαλύτερη από 1 χιλιόγραμμα την εβδομάδα.

---

**17. ΕΠΙΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΡΟΥ (ΕΝΑΙΣΘΗΣΙΑ)**

(Η εναισθησία πρέπει να εκτιμηθεί συμφωνά με την αντίληψη και την μόρφωση του αρρώστου).

- 0. Γνωρίζει ότι είναι καταθλιπτικός και άρρωστος.
- 1. Γνωρίζει την αρρώστια αλλά αποδίδει την αιτία σε κακή διατροφή, κλίμα, υπερκόπωση, ίωση, ανάγκη για ανάπαυση κλπ.
- 2. Αρνείται εντελώς ότι είναι άρρωστος.

---

**18. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ** (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως αισθανόσασταν καλύτερα ή χειρότερα κάποια ώρα της ημέρας;)

ΠΜ	ΜΜ	
0	0	Όχι διακύμανση.
1	1	Ελαφρά διακύμανση.
2	2	Σοβαρή διακύμανση.

---

**19. ΑΠΟΠΡΟΣΩΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΜΑ ΜΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ** (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως νιώσατε ότι οι άνθρωποι γύρω σας ή τα αντικείμενα είναι μη πραγματικά και απόμακρα ή ότι είναι σαν να ζείτε σε ένα όνειρο, αποκομμένοι από τους άλλους ανθρώπους;)

0. Δεν υπάρχει.
  1. Αισθάνεται ότι δεν είναι σε επαφή με τον κόσμο γύρω του.
  2. Αισθάνεται κατά καιρούς το κάθε τι σαν σε όνειρο.
  3. Αισθάνεται ότι ο ίδιος και τα αντικείμενα δεν είναι πια μέρος της καθημερινής του ζωής.
  4. Αισθάνεται σταθερά σαν σε ονειρική κατάσταση, ότι τα πράγματα φαίνονται σαν μη πραγματικά. Αίσθημα μη πραγματικού: Τα αντικείμενα δε φαίνονται πραγματικά. Μηδενιστικές ιδέες: ο ίδιος δε φαίνεται πια πραγματικός.
- 

**20. ΠΑΡΑΝΟΪΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως σκεφτόσασταν ότι κάποιος προσπαθεί να σας κάνει κακό;)

0. Δεν υπάρχουν.
  1. Καχυποψία.
  2. Ιδέες συσχέτισεως.
  3. Παραληρήματα συσχέτισεως και διώξεως.
  4. Διωκτικές ψευδαισθήσεις.
- 

**21. ΙΔΕΟΛΗΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ** (Την εβδομάδα που πέρασε, μήπως είχατε την τάση να κάνετε πράγματα ξανά και ξανά;)

0. Δεν υπάρχουν.
  1. Ιδεοληψίες και ψυχαναγκαστικές πράξεις ή φόβοι στα οποία μπορεί ακόμη να αντιστέκεται π.χ. ενώ αναρωτιέται όλη την ημέρα στη δουλειά του αν έχει κλείσει το γκάζι φεύγοντας από το σπίτι, μπορεί να αντισταθεί στον πειρασμό να πάει στο σπίτι να δει.
  2. Ιδεοληψίες και ψυχαναγκαστικές πράξεις ή φόβοι στα οποία αναγκάζεται να υπακούει.
- 

**22. ΑΝΙΚΑΝΟΤΗΤΑ, ΑΝΗΜΠΟΡΙΑ**

0. Δεν υπάρχει.
1. Υποκειμενικά αισθήματα που έρχονται στην επιφάνεια μόνο με κατάλληλες ερωτήσεις.
2. Ο άρρωστος εκδηλώνει αυθόρμητα το αίσθημα ανημποριάς του.
3. Χρειάζεται παρότρυνση, καθοδήγηση και διαβεβαίωση να εκτελέσει τις αγγαρείες στο τμήμα ή να περιποιηθεί τον εαυτό του.
4. Χρειάζεται να τον βοηθήσει κάποιος για να ντυθεί, να περιποιηθεί τον εαυτό του, να φάει, να τακτοποιήσει το κρεβάτι του και φροντίσει την ατομική του καθαριότητα.

---

### 23. ΑΠΕΛΠΙΣΙΑ

0. Δεν υπάρχει.
1. Κατά διαστήματα αμφιβάλλει ότι “τα πράγματα θα καλυτερέψουν”, αλλά μπορεί να ενθαρρύνεται.
2. Νιώθει σταθερά απελπισμένος, αλλά αποδέχεται την ενθάρρυνση.
3. Εκφράζει αισθήματα αποθάρρυνσης, απόγνωσης, απαισιοδοξίας που δε μπορεί να διώξει.
4. Αυτόματα και απρόσφορα επιμένει: “Ποτέ δε θα γίνω καλά” ή κάπως ανάλογα.

---

**24. ΑΝΑΞΙΟΤΗΤΑ** (Διακύμανση από ελαφρά μείωση της αυτό-εκτίμησης, αίσθημα κατωτερότητας, αυτό-υποτίμηση μέχρι παραληρητικές ιδέες αναξιότητας).

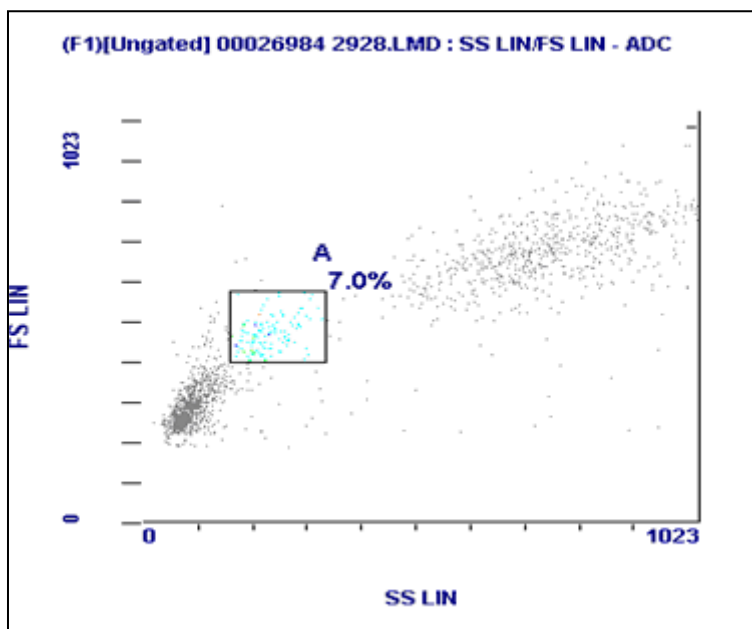
0. Δεν υπάρχει.
1. Φανερώνει αισθήματα αναξιότητας (απώλεια της αυτό-εκτίμησης) μόνο κατά την εξέταση.
2. Αυτόματα φανερώνει αισθήματα αναξιότητας (απώλεια της αυτό-εκτίμησης).
3. Ο άρρωστος εκδηλώνει αυθόρμητα ότι “δεν είναι καλός”, “είναι κατώτερος” κλπ.
4. Παραληρητικές ιδέες αναξιότητας π.χ. “Είμαι ένας σωρός από σκουπίδια” ή κάτι ανάλογο.

**ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ (Σύνολο).....**

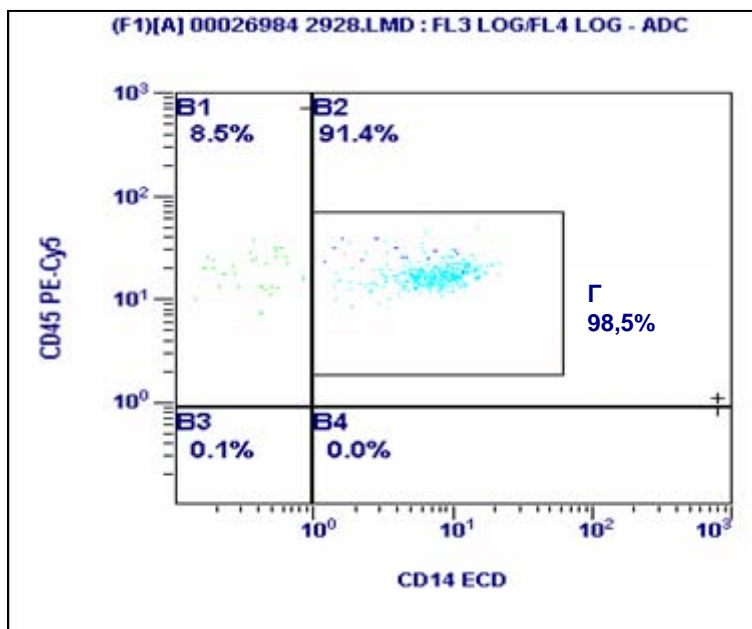


## ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

## 1. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ



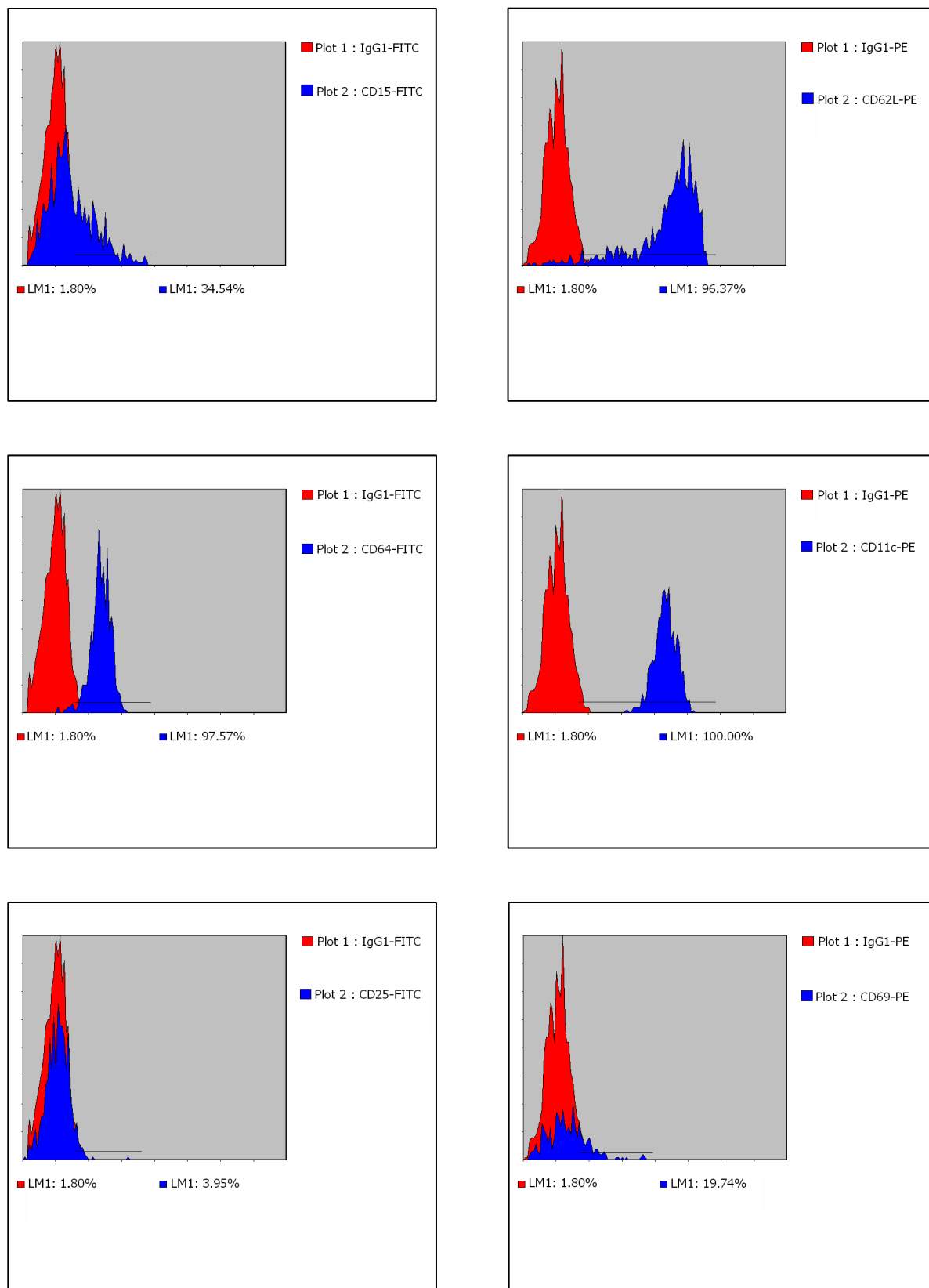
**Εικόνα 1.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) Α αφορά τα μονοκύτταρα, το ποσοστό των οποίων είναι 7.0 % επί του συνόλου των WBC.



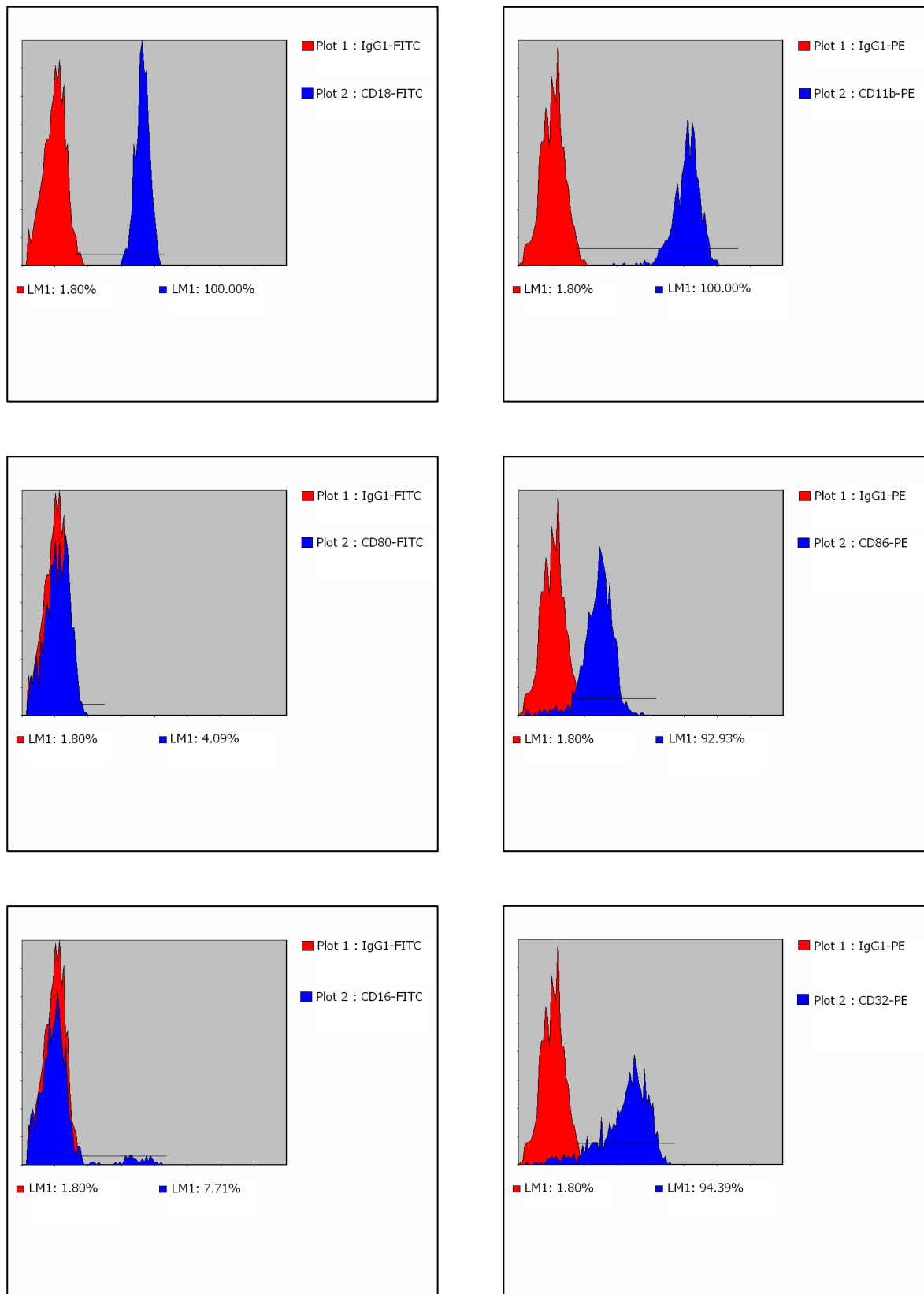
**Εικόνα 2.** Εστιάζοντας στο παράθυρο Α (εικ. 1) γίνεται επιβεβαίωση ότι περικλείεται ο πληθυσμός των μονοκυττάρων λόγω του ότι συνεκφράζουν τον πανλευκό δείκτη CD45 και τον συνυποδοχέα του LPS CD14 (Γ).

Διασφαλίστηκε ότι έχει ανακτηθεί ο υπό διερεύνηση πληθυσμός εφόσον το 98,5% είναι  $CD45^+/CD14^+$ . Μέσα σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (Γ) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των μονοκυττάρων.

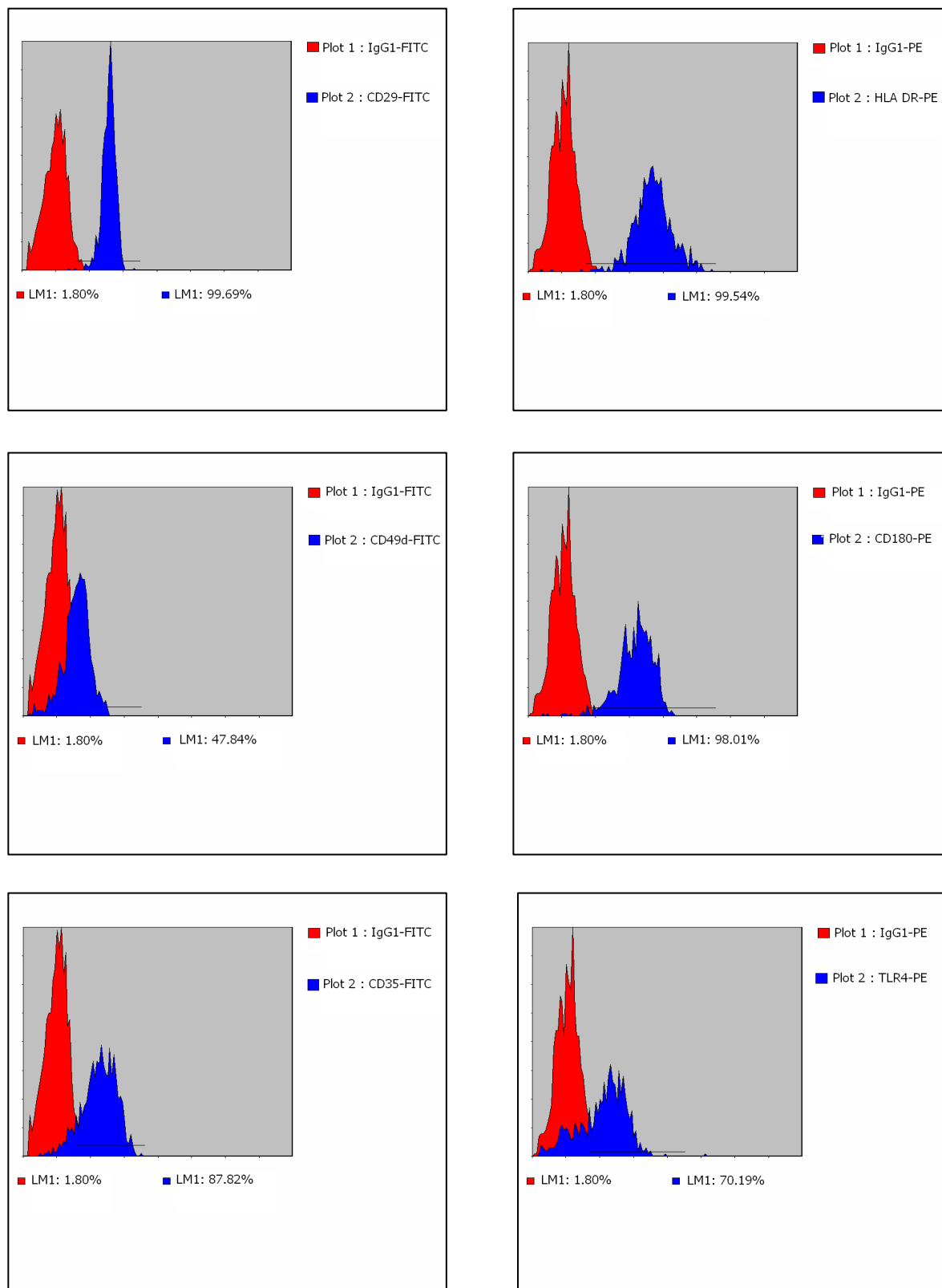
**Εικόνα 3.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο Γ (εικ. 2) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των μονοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD15, CD62L, CD64, CD11c, CD25, CD69. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.



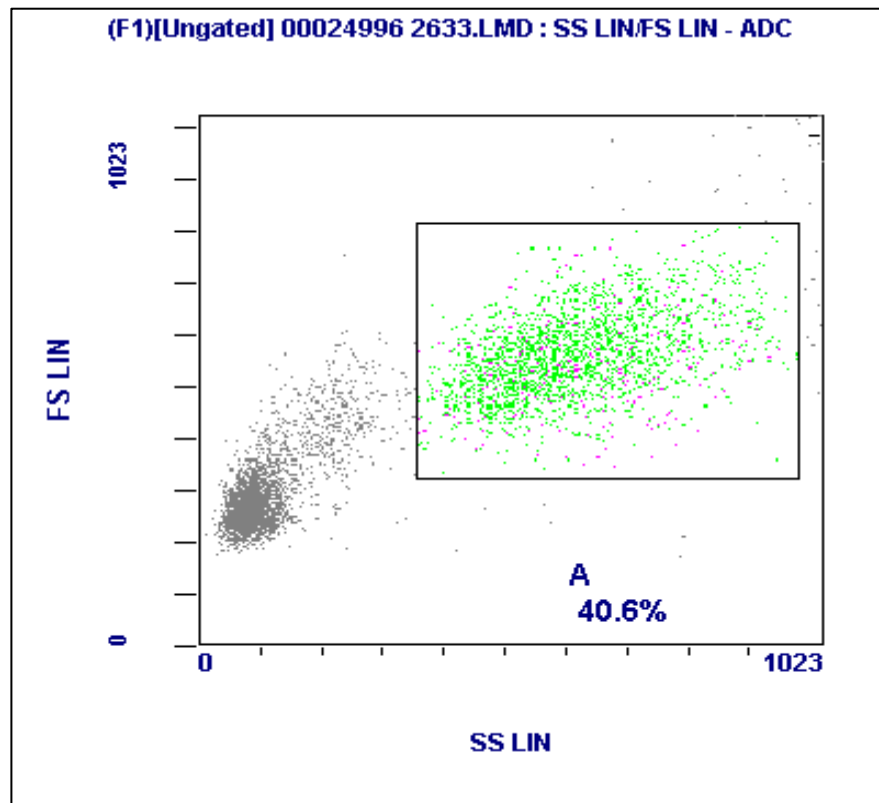
**Εικόνα 4.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο Γ (εικ. 2) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των μονοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD18, CD11b, CD80, CD86, CD16, CD32. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.



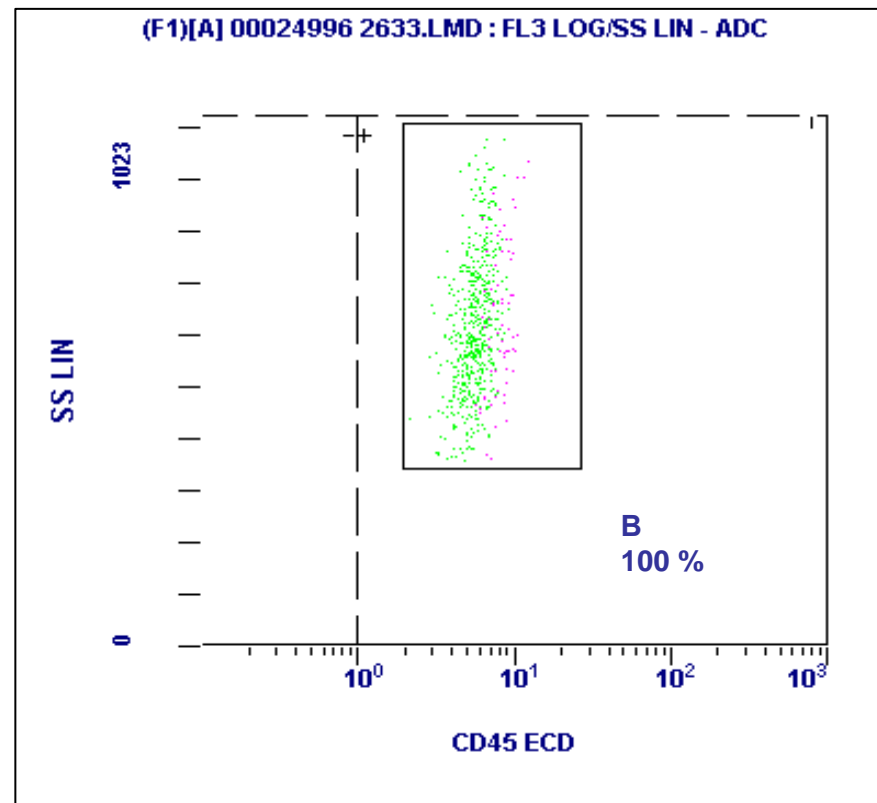
**Εικόνα 5.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο Γ (εικ. 2) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των μονοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD29, HLA-DR, CD49d, CD180, CD35, TLR-4. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.



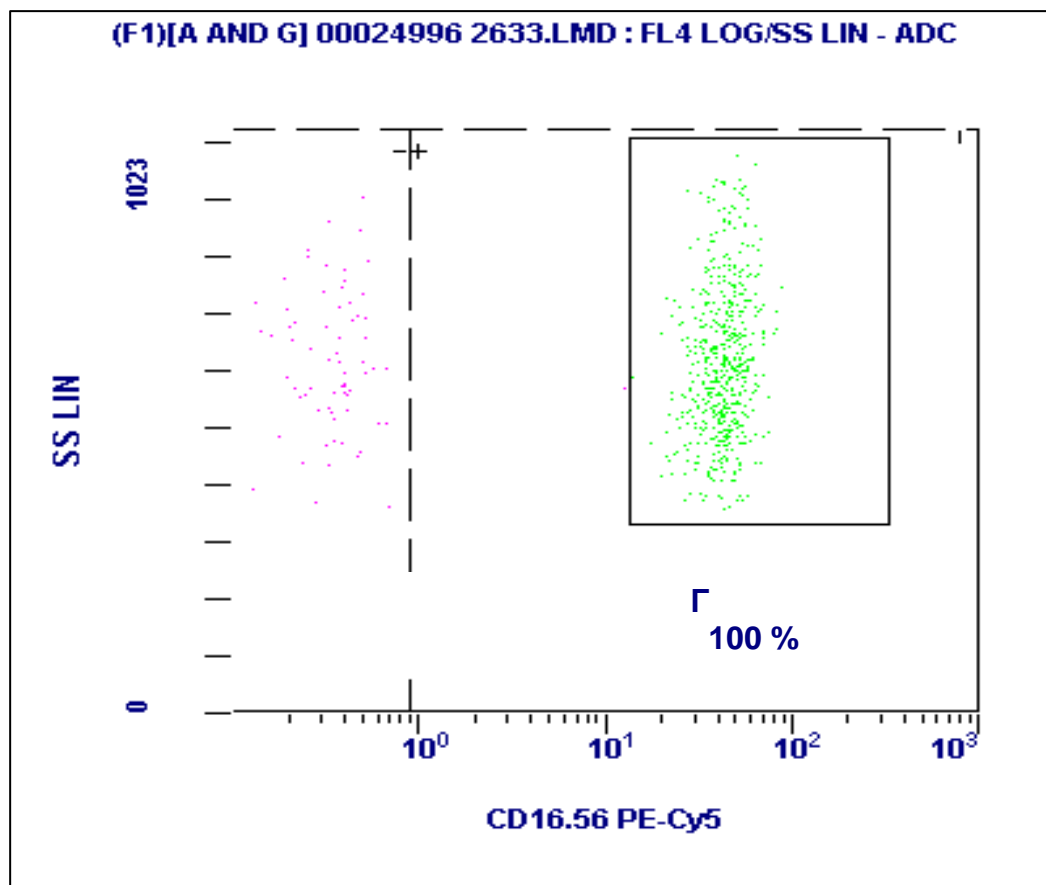
## 2. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ



**Εικόνα 6.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) **A** αφορά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα, το ποσοστό των οποίων είναι 40.6 % επί του συνόλου των WBC.

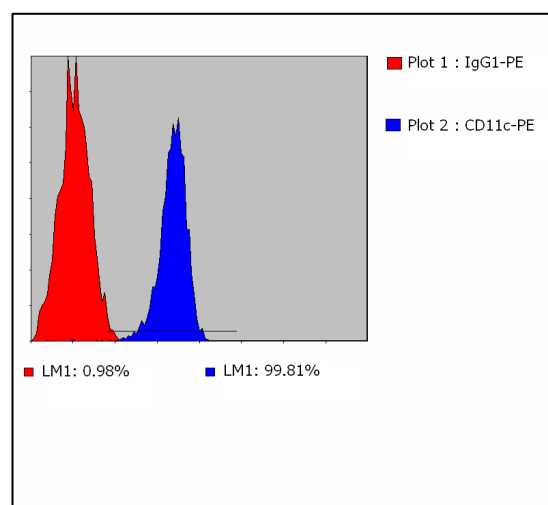
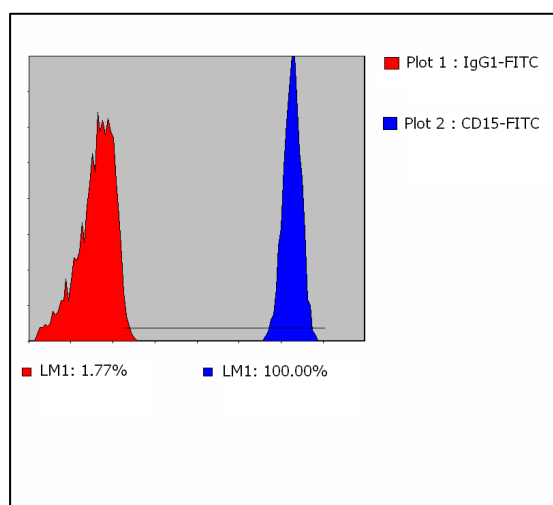
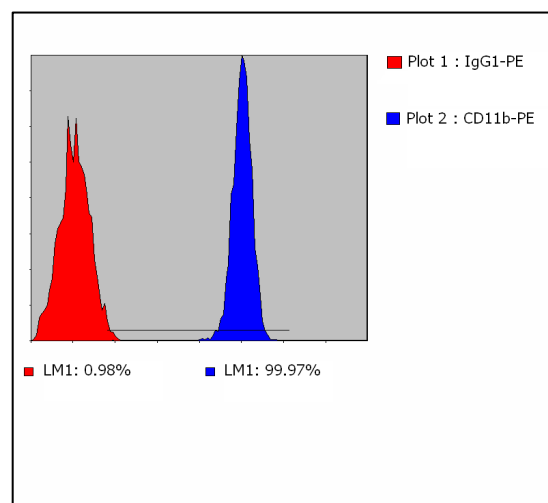
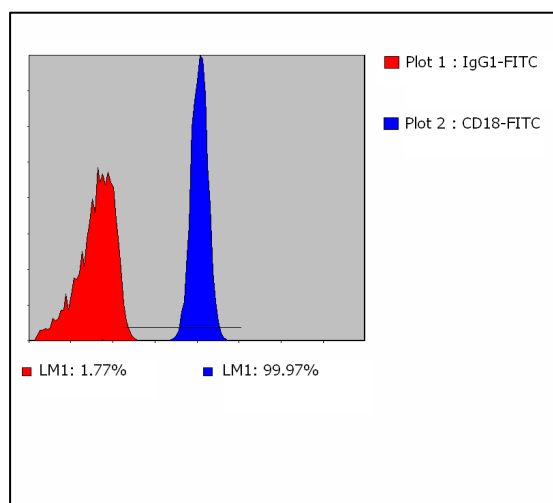


**Εικόνα 7.** Εστιάζοντας στο παράθυρο **A** (εικ. 6) γίνεται επιβεβαίωση ότι περιλαμβάνεται ο πληθυσμός των πολυμορφοπύρηνων λόγω του ότι εκφράζουν τον πανλευκό δείκτη CD45 (**B**). Σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (**B**) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων.

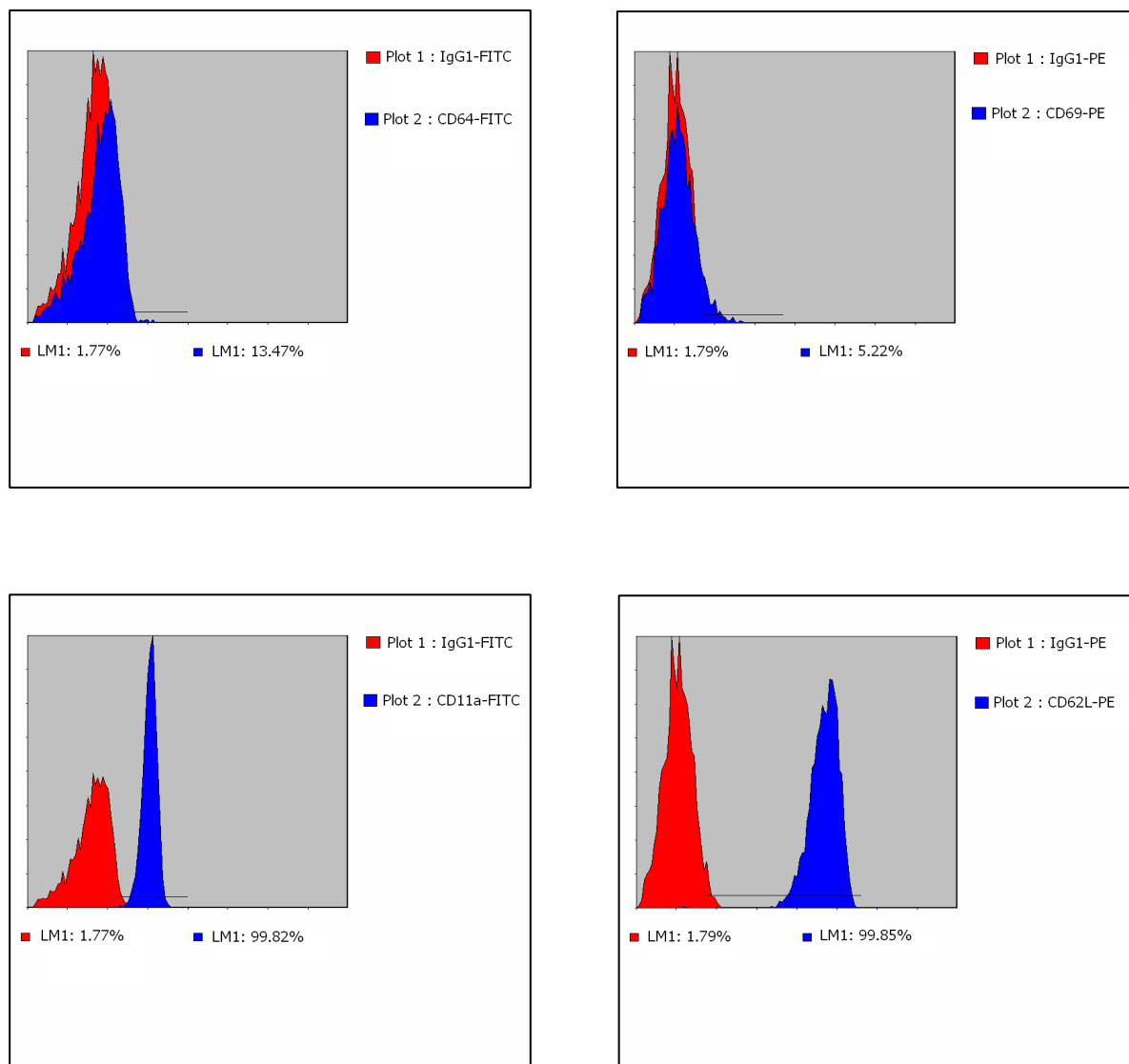


**Εικόνα 8.** Εστιάζοντας στο παράθυρο **A** (εικ. 6) γίνεται επιβεβαίωση ότι περικλείεται ο πληθυσμός των πολυμορφοπύρηνων λόγω του ότι εκφράζουν τον δείκτη CD16,56 (**Γ**).

**Εικόνα 9.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο Γ (εικ. 7) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD18, CD11b, CD15, CD11c. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισотυπικού δείγματος.

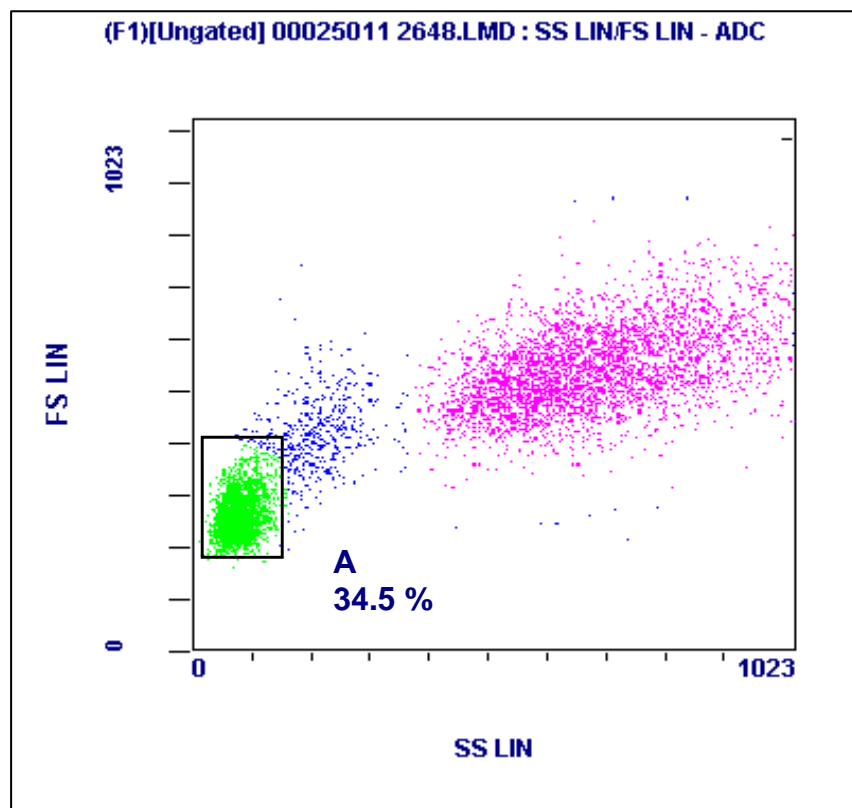


**Εικόνα 10.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο Γ (εικ. 7) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD64, CD69, CD11a, CD62L. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.

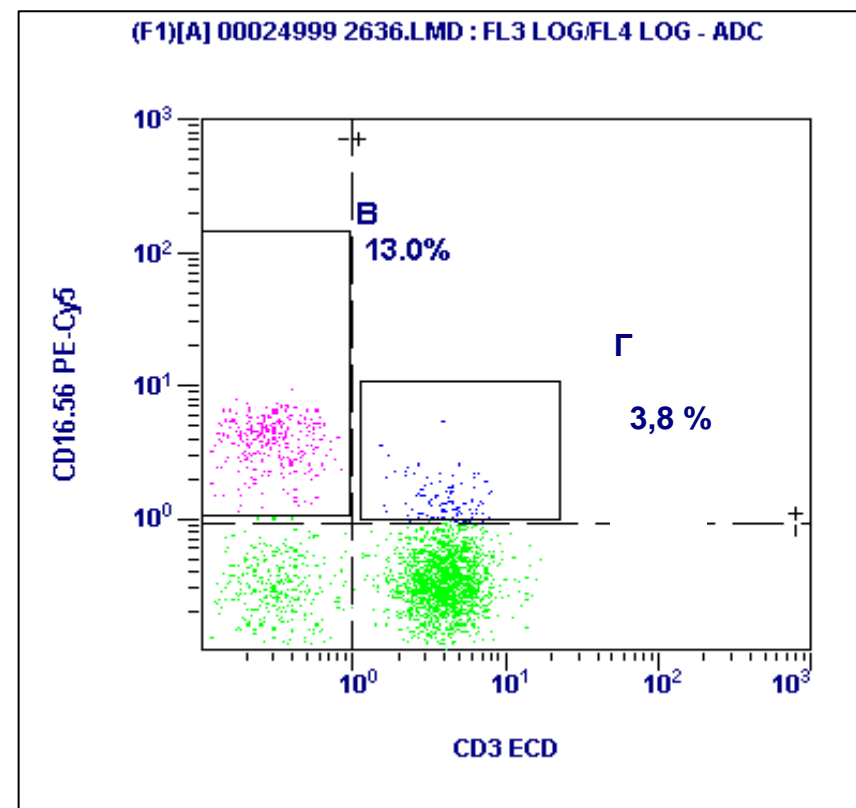




### 3. ΦΥΣΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (NK κύτταρα)



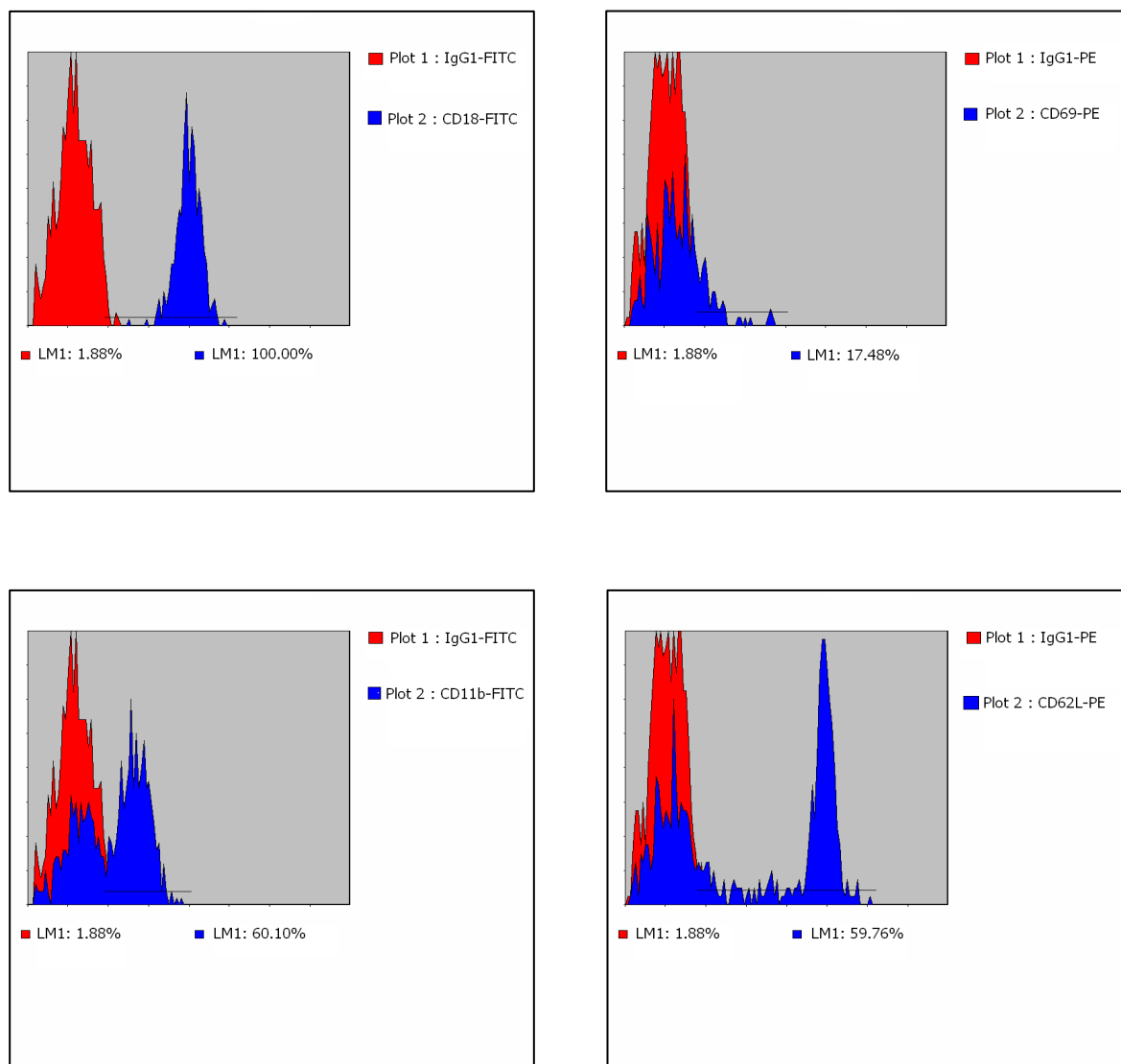
**Εικόνα 11.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) **A** αφορά τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό των οποίων είναι 34.5 % επί του συνόλου των WBC.



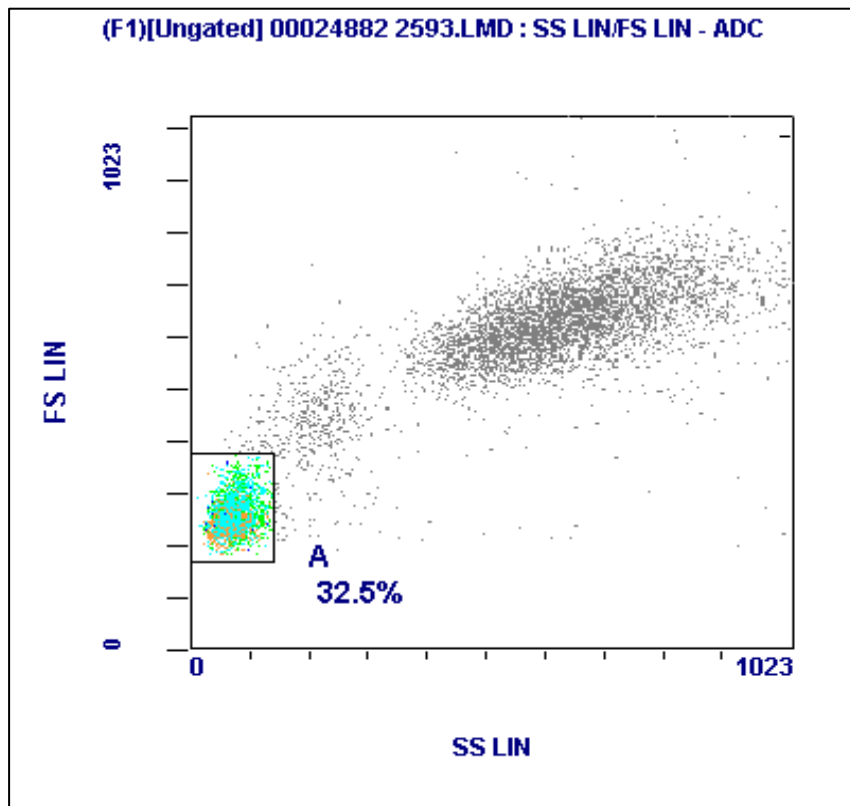
**Εικόνα 12.** Εστιάζοντας στο παράθυρο **A** (εικ. 11) απομονώνεται ο πληθυσμός των NK κυττάρων, λόγω του ότι εκφράζει τους δείκτες CD16,56 και δεν εκφράζει τον δείκτη CD3 (**B**). Μέσα σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (**B**) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των NK κυττάρων.

Παράλληλα απομονώνονται τα NK-like κύτταρα τα οποία συνεκφράζουν τους δείκτες CD16,56 και CD3 (**Γ**).

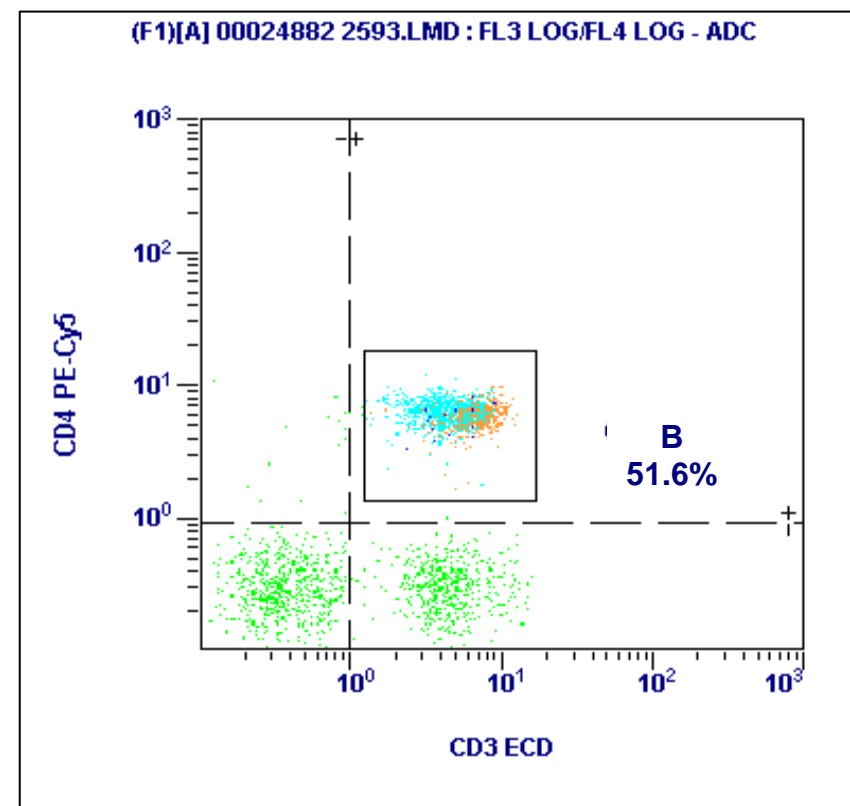
**Εικόνα 13.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 12) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD18, CD69, CD11b, CD62L. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.



#### 4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ Τ- ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

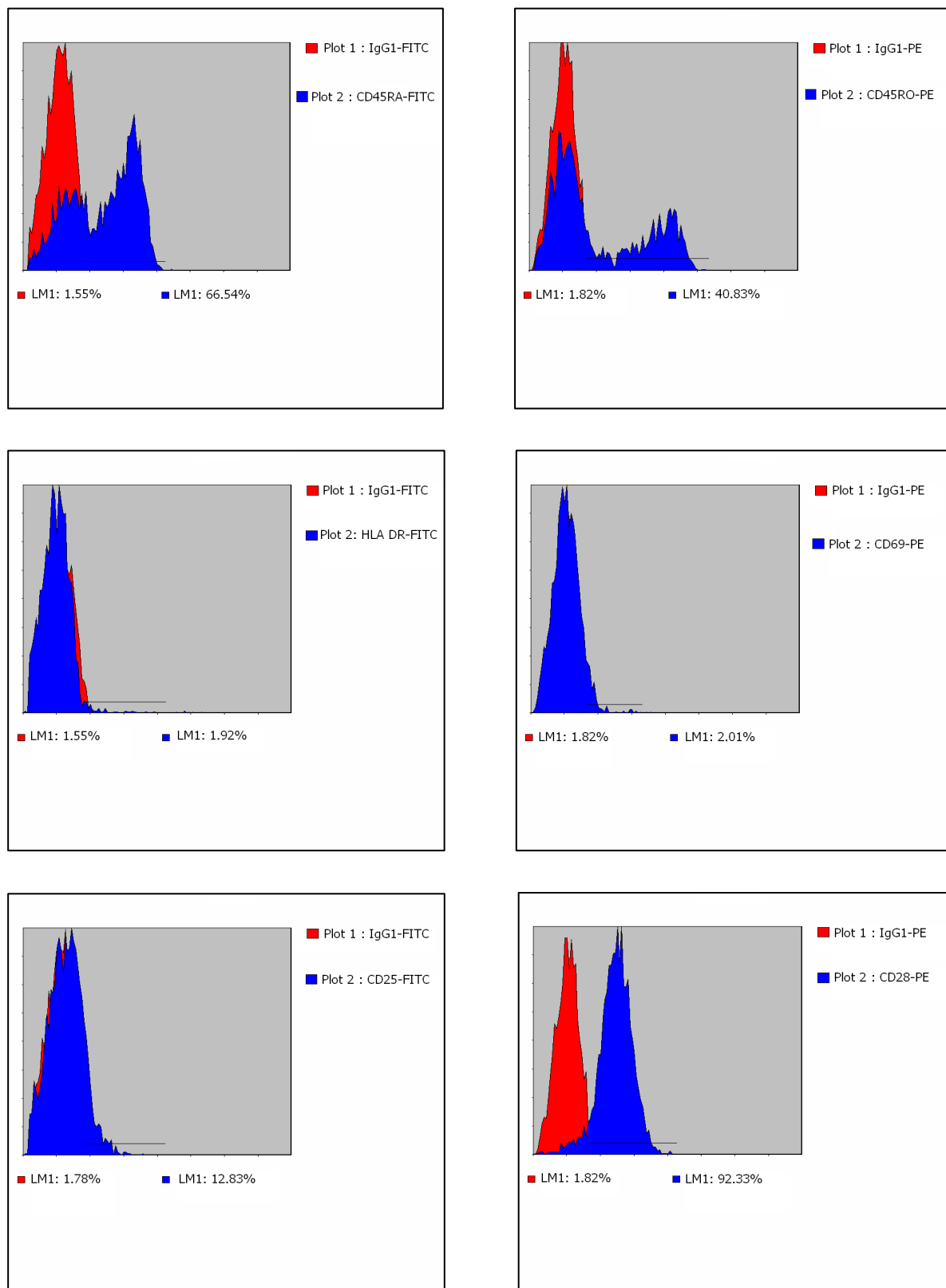


**Εικόνα 14.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) **A** αφορά τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό των οποίων είναι 32.5 % επί του συνόλου των WBC.

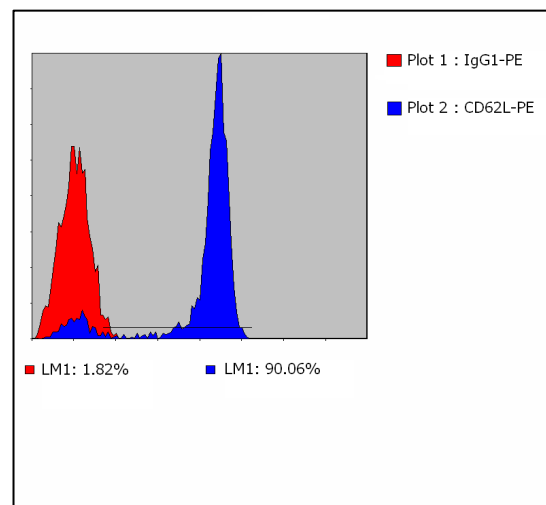
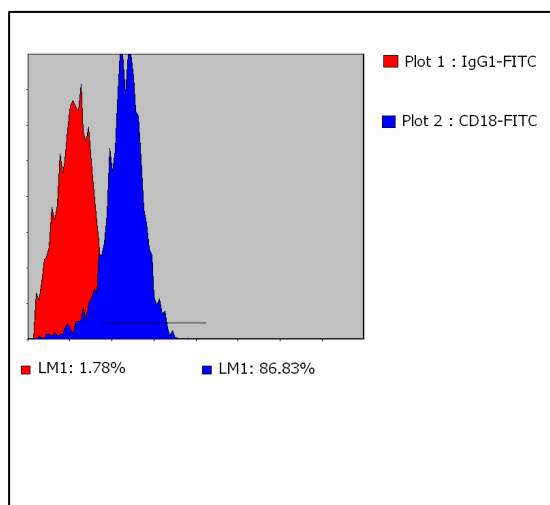
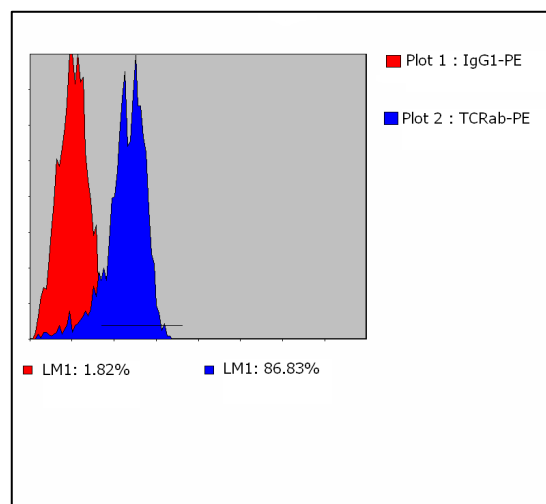
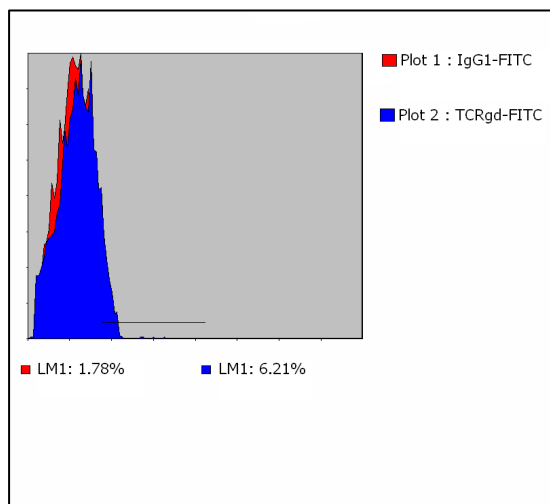


**Εικόνα 15.** Εστιάζοντας στο παράθυρο **A** (εικ. 14) απομονώνεται ο πληθυσμός των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, λόγω του ότι συνεκφράζουν τους δείκτες CD3 και CD4 (**B**). Μέσα σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (**B**) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων.

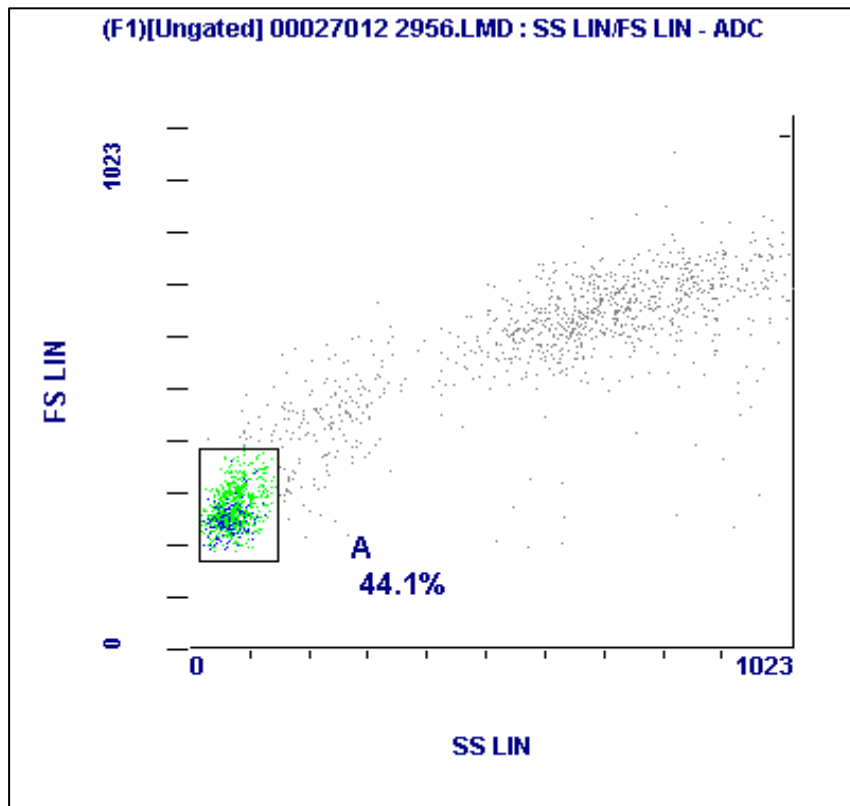
**Εικόνα 16.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 15) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD45RA, CD45R0, HLA-DR, CD69, CD25, CD28. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισотυπικού δείγματος.



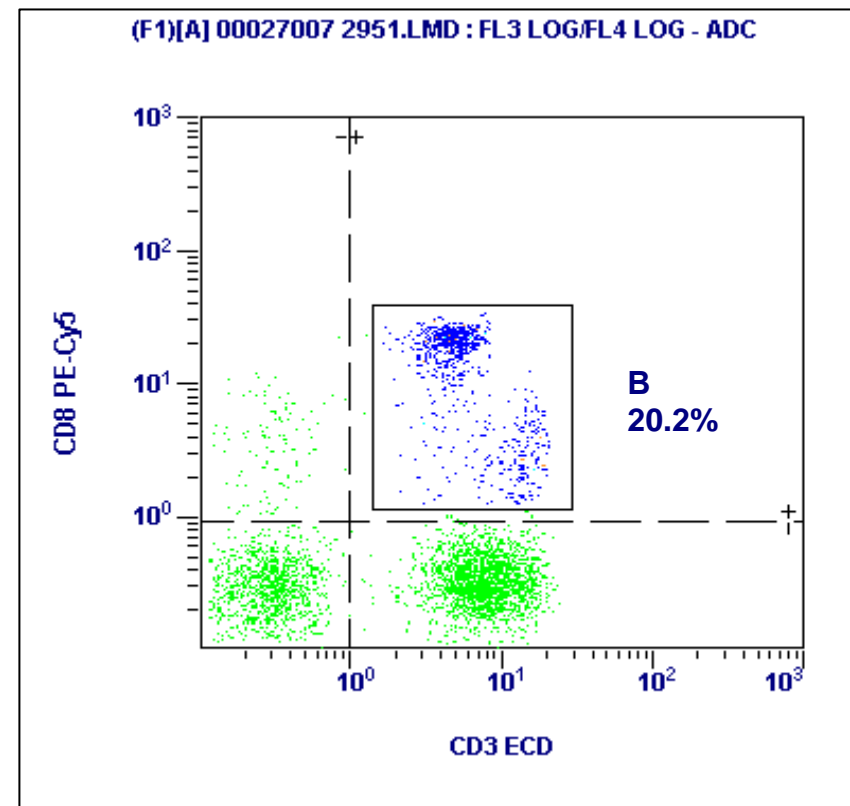
**Εικόνα 17.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 15) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες TCR-γδ, TCR-αβ, CD18, CD62L. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.



## 5. ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΑ T- ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

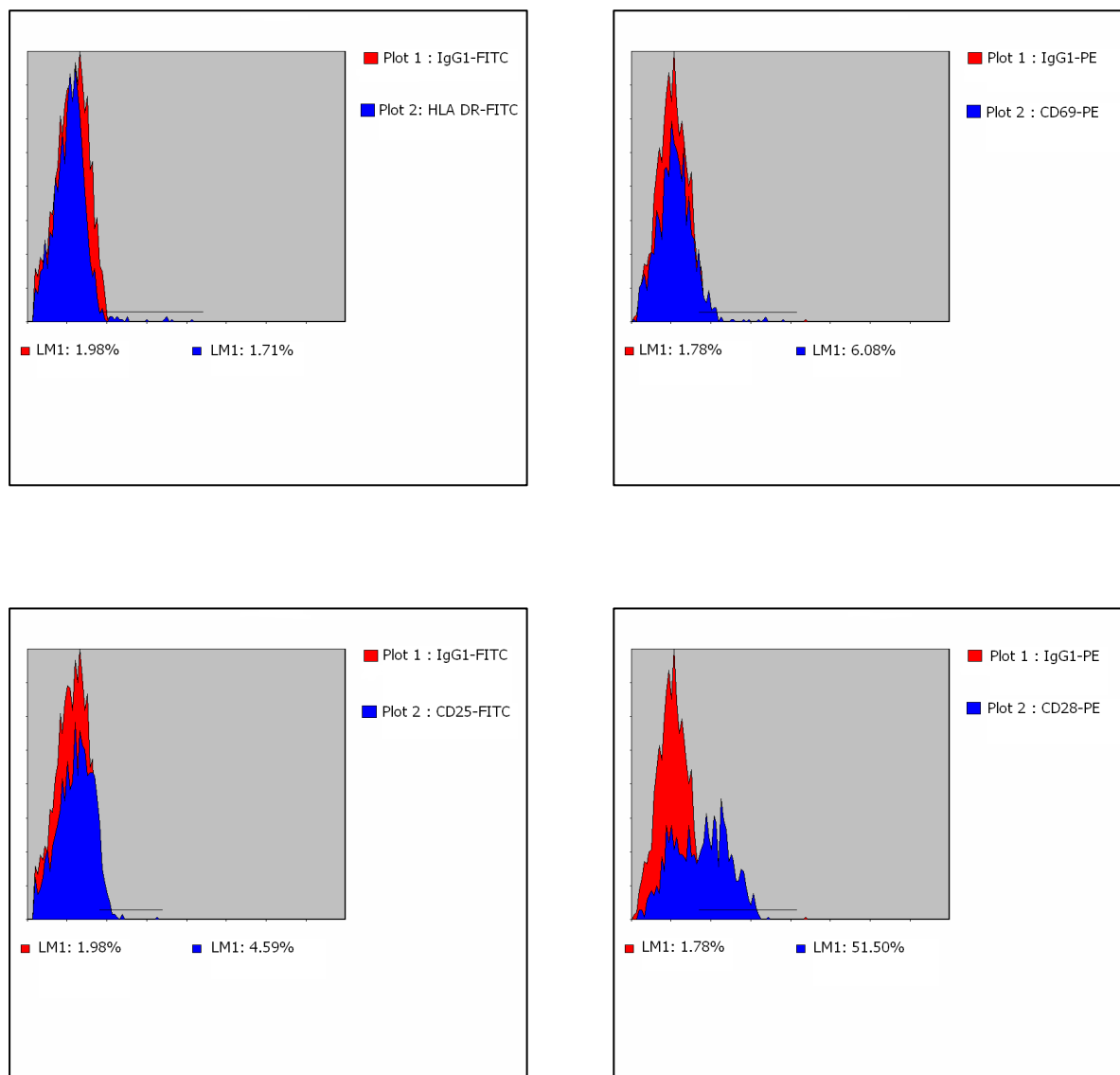


**Εικόνα 18.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) A αφορά τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό των οποίων είναι 44.1 % επί του συνόλου των WBC.

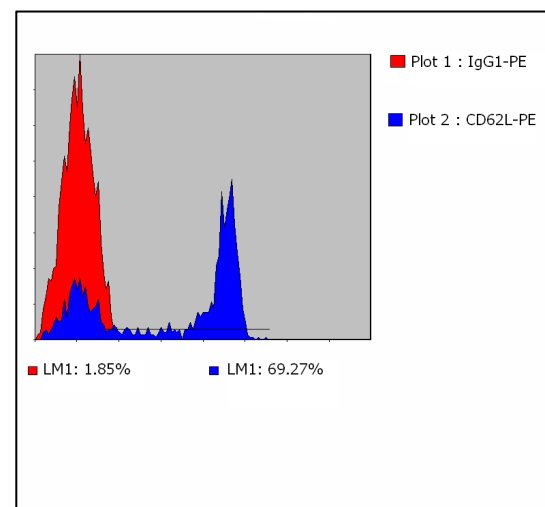
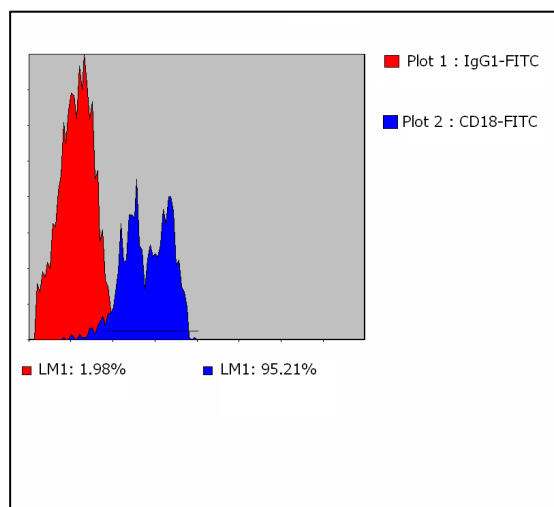
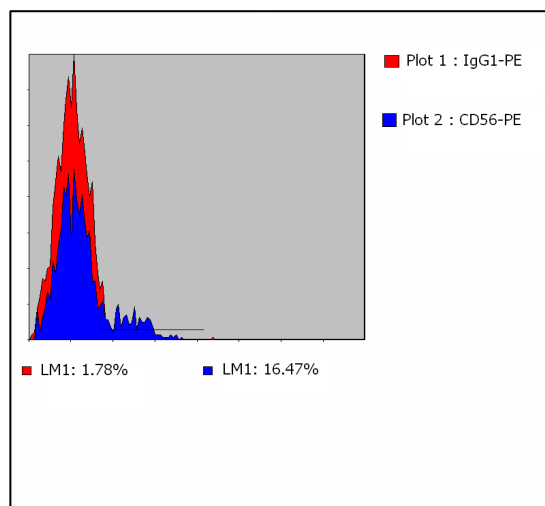
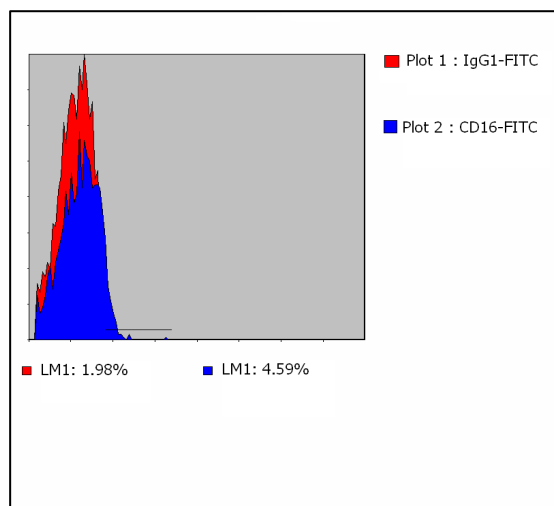


**Εικόνα 19.** Εστιάζοντας στο παράθυρο A (εικ. 18) απομονώνεται ο πληθυσμός των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων, λόγω του ότι συνεκφράζουν τους δείκτες CD3 και CD8 (B). Μέσα σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (B) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των κυτταρολυτικών T- λεμφοκυττάρων.

**Εικόνα 20.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 19) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των κυτταρολυτικών Τ-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες HLA-DR, CD69, CD25, CD28. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.

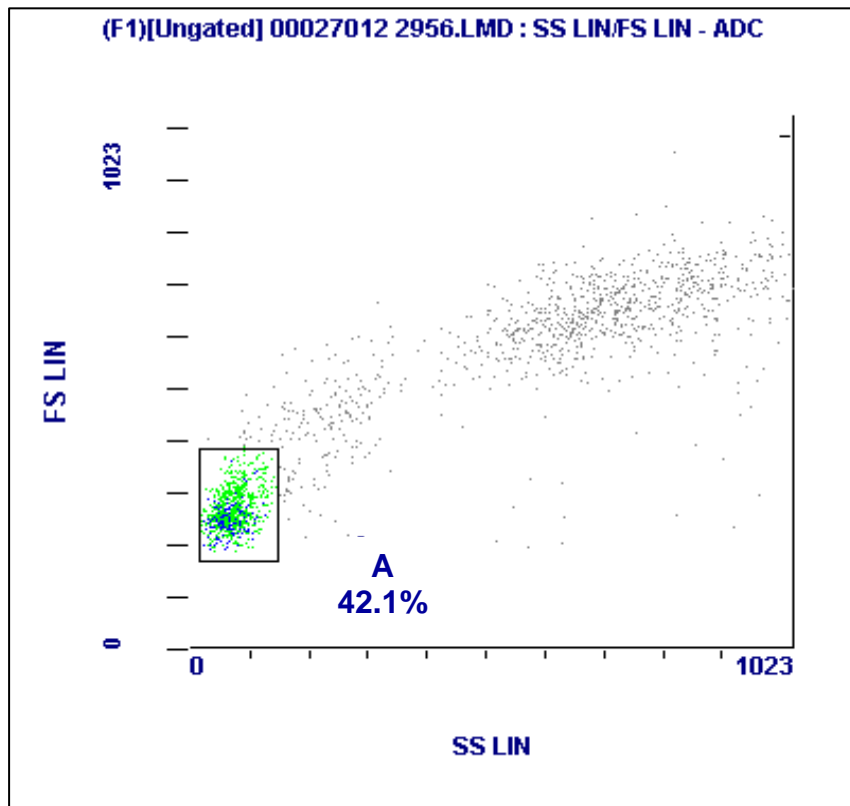


**Εικόνα 21.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 19) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των κυτταρολυτικών Τ-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD16, CD56, CD18, CD62L. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισotypικού δείγματος.

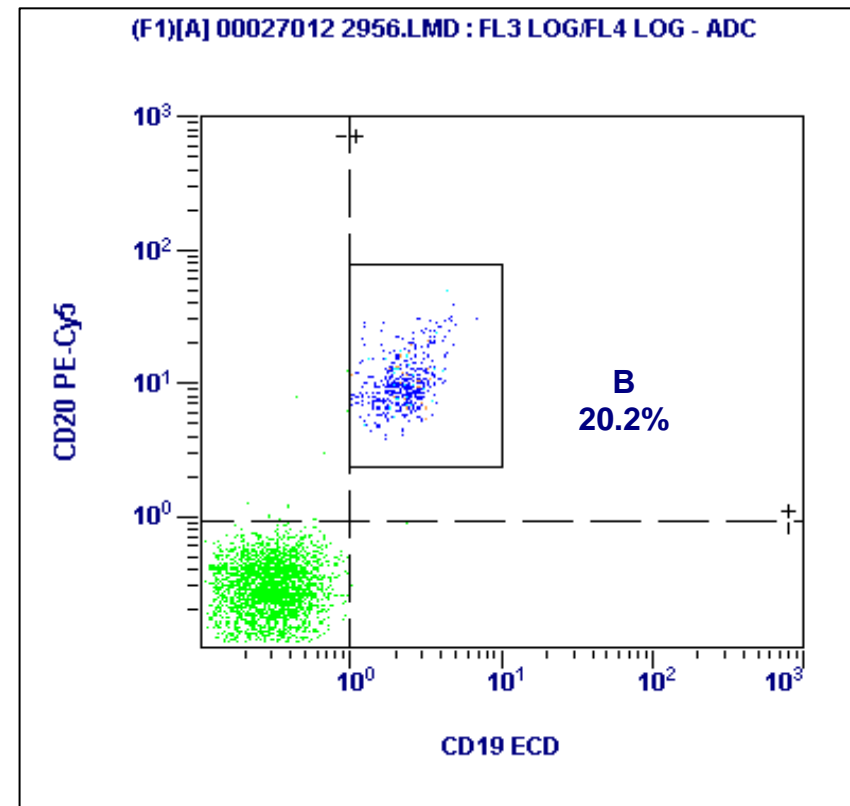




## 6. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

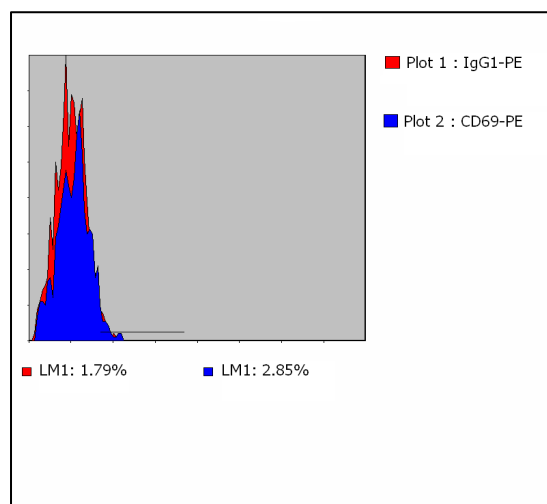
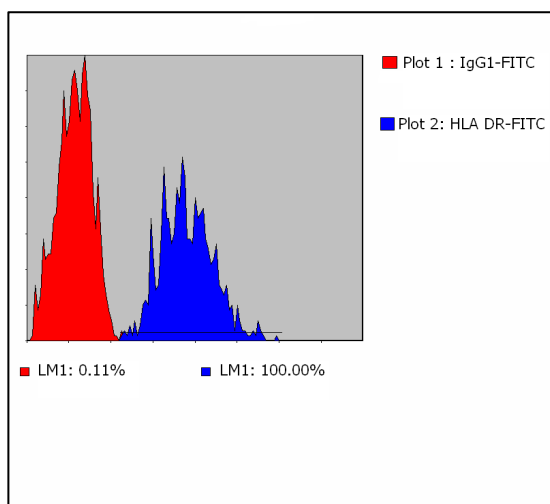
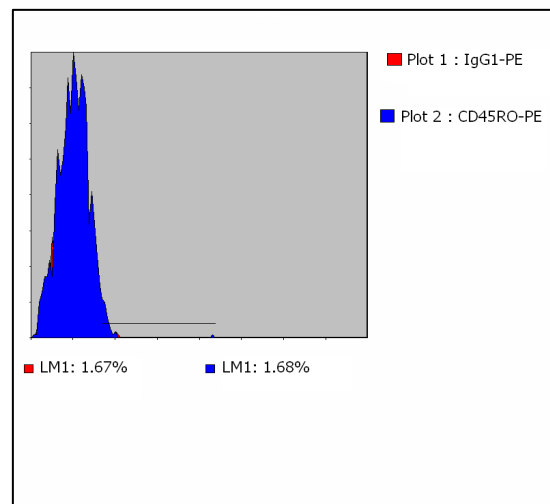
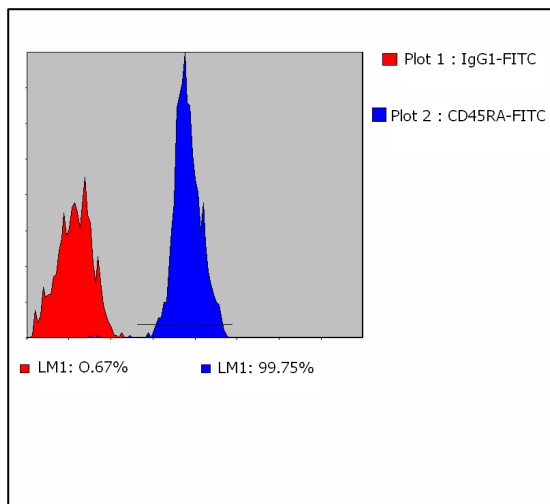


**Εικόνα 22.** Διάκριση WBC με βάση τον πρόσθιο (FS) και τον πλάγιο σκεδασμό (SS). Το σκεδαστικό παράθυρο (gate) **A** αφορά τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό των οποίων είναι 42.1 % επί του συνόλου των WBC.

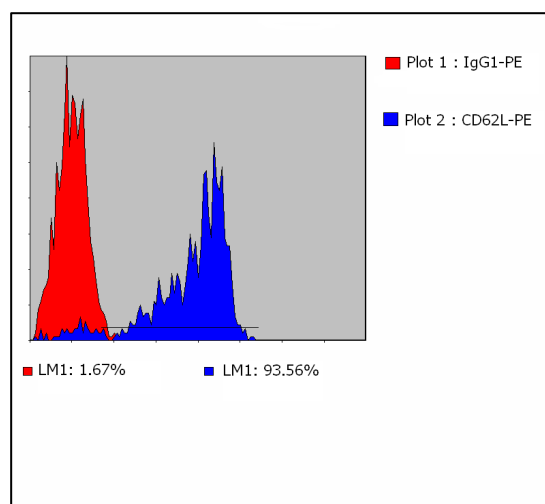
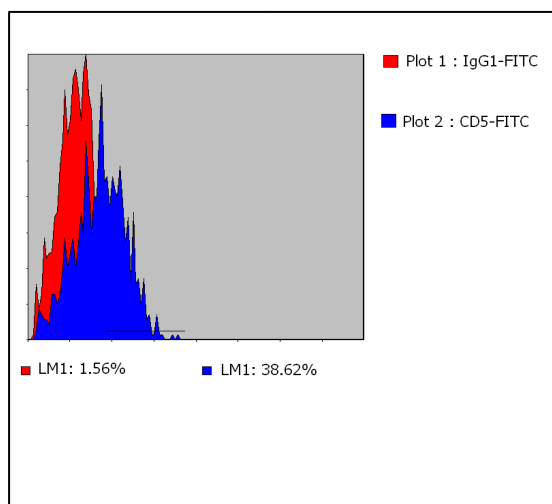
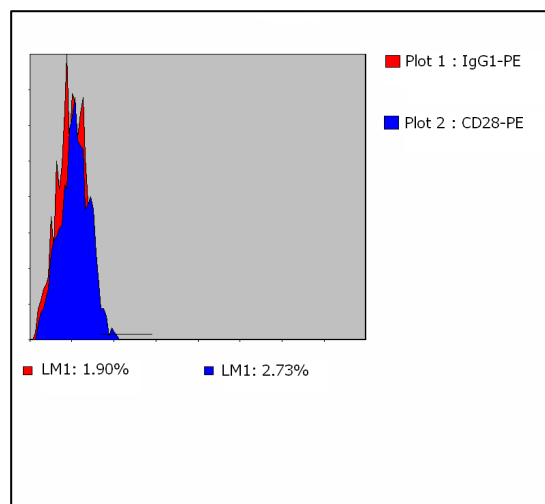
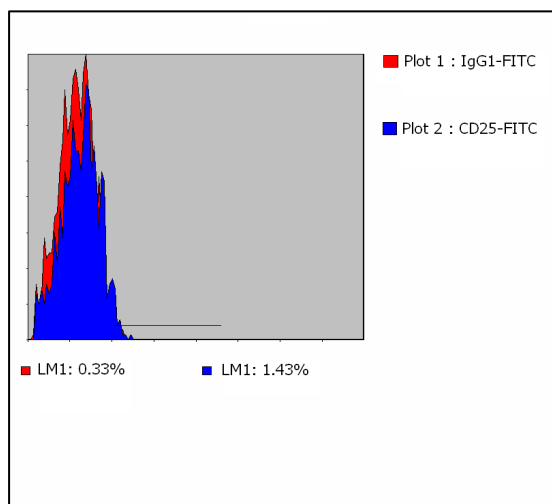


**Εικόνα 23.** Εστιάζοντας στο παράθυρο **A** (εικ. 22) απομονώνεται ο πληθυσμός των Β-λεμφοκυττάρων, λόγω του ότι συνεκφράζουν τους δείκτες CD19 και CD20 (**B**). Σε αυτό το σκεδαστικό παράθυρο (**B**) θα γίνει ο προσδιορισμός όλων των δεικτών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των Β-λεμφοκυττάρων.

**Εικόνα 24.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 23) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των Β-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD69. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισotypικού δείγματος.



**Εικόνα 25.** Εστιάζοντας στο σκεδαστικό παράθυρο **B** (εικ. 23) γίνεται διερεύνηση ειδικών μεμβρανικών δεικτών των Β-λεμφοκυττάρων. Ιστογράμματα κατανομής των αληθώς θετικών κυττάρων για τους δείκτες CD25, CD28, CD5, CD62L. Το ποσοστό παρουσιάζεται αφού έχει αφαιρεθεί η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

**ΣΚΟΠΟΣ** Οι διαταραχές ανοσιακής λειτουργίας στην κατάθλιψη δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, ενώ το σχετικό ενδιαφέρον επανέρχεται στο προσκήνιο ενόψει των επιδράσεων που αποδεικνύεται ότι έχει η λειτουργία του υποθάλαμο-υπόφυσεο-επινεφριδιακού άξονα στη νόσο, αλλά και των ενδείξεων σχετικά με μια πιθανή σχέση της κατάθλιψης με τη φλεγμονή. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό την ταυτόχρονη μελέτη μιας σειράς παραμέτρων της ανοσιακής λειτουργίας στον ίδιο πληθυσμό καταθλιπτικών ασθενών, σε σύγκριση με μη καταθλιπτικούς βιολογικά υγιείς μάρτυρες.

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ** Το υλικό αποτέλεσαν 47 ασθενείς (9 άνδρες και 38 γυναίκες, ηλικίας  $47,23 \pm 10,24$  ετών) με ενδογενή κατάθλιψη και HDRS > 20, καθώς και 26 μάρτυρες (5 άνδρες και 21 γυναίκες, ηλικίας  $41,23 \pm 13,89$  ετών). Έγινε ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων και μελέτη της έκφρασης μορίων διαφοροποίησης και ενεργοποίησης σε κάθε ένα από αυτούς τους πληθυσμούς. Μελετήθηκε με τη μέθοδο Elispot πριν και μετά από διέγερση με LPS σε κυτταροκαλλιέργειες PBMC, καθώς και με μέτρηση τους στα υπερκείμενα των αντίστοιχων κυτταροκαλλιεργιών η ικανότητα των μονοκυττάρων για αυτόματη και μετά από διέγερση παραγωγή των κυτταροκινών IL-6, IL-1α, IL-1β και TNF-α. Ελέγχθηκε η ικανότητα των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων να φαγοκυτταρώνουν *E. coli* και η επάρκεια της οξειδωτικής τους έκκρισης. Τέλος έγινε νεφελομετρικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών οξείας φάσεως CRP, αμυλοειδές Α του ορού και α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνη.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στους ασθενείς με κατάθλιψη υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων ( $p = 0,006$ ), των ουδετερόφιλων ( $p = 0,003$ ) και των μονοκυττάρων ( $p = 0,001$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ειδικότερα στα μονοκύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του CD25 ( $p = 0,020$ ) στους καταθλιπτικούς ασθενείς και μείωση της έντασης φθορισμού (pi) του CD62L ( $p = 0,031$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες. Στα πολυμορφοπύρηνια στους ασθενείς βρέθηκε αύξηση της έκφρασης ( $p = 0,013$ ) και του pi του CD69 ( $p = 0,027$ ), καθώς και αύξηση της έκφρασης του CD11a ( $p = 0,05$ ). Στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε στους ασθενείς αύξηση της έκφρασης του

CD45RO ( $p = 0,007$ ), μείωση της έκφρασης του CD45RA ( $p = 0,048$ ), μείωση του  $p_i$  του HLA-DR ( $p = 0,023$ ) και αύξηση του  $p_i$  του CD69 ( $p = 0,024$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες. Στα κυτταρολυτικά T-λεμφοκύτταρα βρέθηκε στους ασθενείς αύξηση της ποσοστιαίας έκφρασης του HLA-DR ( $p = 0,032$ ) και του CD16 ( $p = 0,032$ ) καθώς και αύξηση του  $p_i$  του CD18 ( $p = 0,053$ ). Όσον αφορά τα NK κύτταρα και τα B-λεμφοκύτταρα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των καταθλιπτικών ασθενών.

Η ικανότητα των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων να φαγοκυτταρώνουν βακτήρια και να τα καταστρέφουν μέσω του μηχανισμού οξειδωτικής έκρηξης, βρέθηκε ότι στους καταθλιπτικούς υπολείπεται σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ( $p = 0,0001$ ) συγκριτικά με τους μάρτυρες.

Η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) βρέθηκε, στατιστικά σημαντικά αυξημένη, σε σχέση με τους μάρτυρες. Σε αυτό συμφωνούν τα ευρήματα που προκύπτουν, τόσο από τη μεθοδολογία Elispot, όσο και από τη μέτρηση των κυτταροκινών που παράγονται από τα κύτταρα αυτά και απελευθερώνονται στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Στους καταθλιπτικούς ασθενείς παρατηρείται διάχυτη ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος και κυρίως των κυττάρων της φυσικής ανοσίας. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση αυτή προέρχεται αφενός από μεσολαβητές που παράγονται στο ΚΝΣ αυτών των ασθενών και αφετέρου συμβάλει στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης που πιθανολογείται ότι συνοδεύει τη νόσο.
2. Η παρατηρούμενη μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των πολυμορφοπυρήνων και των μονοκυττάρων, καθώς και η μείωση των παρθένων βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων αποτελούν αρκετά ισχυρές ενδείξεις ότι η ικανότητα αυτών των ασθενών να αντιμετωπίσουν ορισμένα τουλάχιστον παθογόνα είναι σημαντικά μειωμένη. Κατά τούτο, η ευπάθειά τους προς τις λοιμώξεις δεν μπορεί να αποκλειστεί.

# ABSTRACT

## Contribution to the study of immune function of depressed patients

Vasiliki D. Zisi

PhD Thesis

**OBJECTIVE** The present study was designed with the aim to investigate in detail and at the same time an extended panel of parameters of immune function at the same population of depressed patients in comparison to non depressed biologically healthy individuals.

**MATERIALS AND METHODS** In the study 47 patients (9 men and 38 women, of age  $47,23 \pm 10,24$ ) diagnosed with endogenous depressive disorder, HDRS > 20 were included, as well as, 26 healthy controls (5 men and 21 women, of age  $41,23 \pm 13,89$ ). Flow cytometry was used to investigate the phagocytic capacity and the oxidative burst of monocytes and polymorphonuclear cells against *E. coli*. Furthermore, an immunophenotypic analysis was conducted on leukocytes and their subpopulations by assessing the expression of specific cell surface markers with the use of the appropriate monoclonal antibodies. The levels of the cytokines IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined with both the Elispot assay and with the use of Multiplexed Particle-based Flow cytometry. Finally, the levels of CRP, SAA and  $\alpha_1$ -antitrypsin (all acute phase proteins) were determined by nefelelemetry.

**RESULTS** A statistically significant increase of the absolute number of leukocytes ( $p = 0,006$ ), neutrophils ( $p = 0,003$ ) and monocytes ( $p = 0,001$ ) was observed at the depressed patients compared to the healthy controls. Specifically, on monocytes the expression of CD25 ( $p = 0,020$ ) and the mean fluorescence intensity (pi) of CD62L ( $p = 0,031$ ) were found increased and decreased respectively in depressed patients. On the polymorphonuclear cell population both the expression and the mean fluorescence intensity pi of CD69 ( $p = 0,027$ ) as well as the expression of CD11a ( $p = 0,05$ ) were found increased in depressed patients compared to controls. The T-helper cell population of the depressed patients showed increased expression of CD45RO ( $p = 0,007$ ), reduction of CD45RA

( $p = 0,048$ ) expression, decreased HLA-DR pi ( $p = 0,023$ ) and increased CD69 pi ( $p = 0,024$ ). The expression of HLA-DR ( $p = 0,032$ ) and of CD16 ( $p = 0,032$ ) as well as the CD18 pi ( $p = 0,053$ ) were found increased on the T-cytolytic cell population. No statistically significant differences were observed on the NK and B cell populations of depressed patients compared to healthy controls.

The phagocytic capacity and the oxidative burst of monocytes and polymorphonuclear cells against *E. coli* was found decreased (statistically significant) ( $p = 0,0001$ ) on depressed patients.

A statistically significant increase was found on the production of proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) on depressed patients, an observation confirmed by the results of both the Elispot assay and Multiplexed Particle-based Flow cytometry.

## CONCLUSION

1. A diffuse activation of the immune cells, especially the innate immunity ones, of depressed patients was observed. It is possible that on the one hand the above activation is a product of the action of mediators that derive from the CNS of the depressed patients and on the other that it contributes to the initiation of an inflammatory reaction that might accompany the depressive state.
2. The observed reduction of phagocytic capacity and oxidative burst of monocytes and polymorphonuclear cells as well as the reduced number of naïve T-helper lymphocytes might indicate the impaired ability of the patients to respond against at least certain pathogens. In this sense, their susceptibility towards infections should not be underestimated.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. MADDOCK C, PARIANTE CM. How does stress affect you? An overview of stress, immunity, depression and disease. *Epidemiol Psychiatr Soc* 2001;10:153-62.
2. MYRRAY CJ, LOPEZ AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498-1504.
3. FRYERS T, MELZER D, JENKINS R. Social Inequalities and the Common Mental Disorders: a systematic review of the evidence. *Soc Psychiatry Epidemiol* 2003;38:229-37.
4. FELDMAN E, MAYOU R, HAWTON K, ARDERN M, SMITH EB. Psychiatric disorders in medical in-patients. *Q J Med* 1987;63:405-12.
5. MADIANOS MG, STEFANIS CN. Change in the prevalence of the symptoms of depression and depression across Greece. *Soc Psychiatry Epidemiol* 1992;27:211-19.
6. STEFFENS DC, SKOOG I, NORTON MC, HART AD, TSCHANZ JT, PLASSMAN BL, WYSE BW, WELSH-BOHMER KA, BREITNER JC. Prevalence of depression and its treatment in an elderly population: the Cache county study. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:601-7.
7. FRYERS T, BRUGHA T, MORGAN Z, SMITH J, HILL T, CARTA M, LEHTINEN V, KOVES, V. Prevalence of psychiatric disorder in Europe: the potential and reality of meta-analysis. *Soc Psychiatr Epidemiol* 2004;39:899-905.
8. PAYKELA ES, BRUGHAB T, FRYERS T. Size and burden of depressive disorders in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15:411-23.
9. IRWIN M. Psychoneuroimmunology of depression: Clinical implications. *Brain Behav Immun* 2002;16:1-16.
10. GLASSMAN AH, SHAPIRO PA. Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry* 1998;155:4-11.
11. MUSSELMAN DL, EVANS DL, NEMEROFF CB. The relationship of depression to cardiovascular disease: Epidemiology, biology and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55:580-92.
12. COHEN S, DOYLE WJ, SKONER DP, RABIN BS, GWALTNEY JM JR. Social ties and susceptibility to the common cold. *JAMA* 1997;25:1940-48.
13. COHEN S, WILLIAMSON GM. Stress and infectious diseases in humans. *Psychol Bull* 1991;109:5-24.
14. COHEN S, DAVID AJ, TYRRELL DA, SMITH AP. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N Engl J Med* 1991;325:606-12.
15. COHEN S, WILLIAM J, DOYLE WJ, SKONER DP. Psychological stress, cytokines production, and severity of upper respiratory illness. *Psychom Med* 1999;61:175-80.
16. ARVIN AM. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1992; 166:35-41.

- 
17. IRWIN M, COSTLOW C, WILLIAMS H, ARTIN KH, CHAN CY, STINSON DL, LEVIN MJ, HAYWARD AR, OXMAN MN. Cellular immunity to varicella-zoster virus in patients with major depression. *J infect Dis* 1998;178:104-8.
  18. ZORILLA EP, JAMES MA, MCKAY JR, LUBORSKY L, SCHMIDT K. Relation of stressors and depressive symptoms to clinical progression of viral illness. *Am J Psychiatry* 1996;153:626-35.
  19. CRUESS DG, DOUGLAS SD, PETITTO JM, HAVE TT, GETTES D, DUBE B, CARY M, EVANS DL. Association of resolution of major depression with increase natural killer cell activity among HIV-seropositive women. *Am J Psychiatry* 2005;162:2125-130.
  20. BLALOCK JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994;10:504-10.
  21. MAES M, SMITH R, SCHARPE S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinol* 1995;20:111-16.
  22. MAES M. Evidence for immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog. Neuro Psychopharmacology & Biol Psychiat* 1995;19:11-38.
  23. KRONFOLD Z. Immune dysregulation in major depression: a critical review of existing evidence. *Int J Psychopharmacol* 2002;5:333-43.
  24. HERBERT TB, COHEN S. Depression and Immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull* 1993;113:472-86.
  25. ZORILLA EP, LUBORSKY L, MCKAY JP, ROSENTHAL R, HOULDIN A, TAX A, MCCORKLE R, SELIGMAN DA, SCHMIDT K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun* 2001;15: 199-26.
  26. KRONFOLD Z, TURNER R, NASRALLAH H, WINOKUR G. Leukocyte regulation in depression and schizophrenia. *Psychiatry Res* 1984;13:13-18.
  27. RAVINDRAN AV, GRIFFITHS J, MERALI Z, ANISMAN H. Variations of lymphocytes subsets associated with stress in depressive populations. *Psychoneuroendocrinol* 1996;21:659-71.
  28. SCHLEIFER SJ, KELLER SE, BOND RN, MEYERSON AT, RASKIN MJ, DAVIS KL, STEIN M. Lymphocyte function in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1984;41:484-86.
  29. DARKO DF, ROSE J, GILLIN JC, GOLSHAN S, BAIRD SM. Neutrophilia and lymphopenia in major mood disorders. *Psychiatry Res* 1988;25:243-51.
  30. KUBERA M, VAN BOCKSTAELE D, MAES M. Leukocyte subsets in treatment-resistant major depression. *Pol J Pharmacol* 1999;51:547-9.
  31. SCHLEIFER SJ, KELLER SE, BARTLETT JA, ECKHOLDT HM, DELANEY BR. Immunity in young adults with major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 1996;153:477-82.
  32. IRWIN M, PATTERSON TL, SMITH TL, CALDWELL C, BROWN SA, GILLIN JC, GRANT I. Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry* 1990;27: 22-30.

- 
33. MAES M, VAN DER PLANKEN M, STEVENS WJ, PEETERS D, DECLERCK LS, BRIDTS CH, SCHOTTE C, COSYNS P. Leukocytosis, Monocytosis and Neutrophilia: Hallmarks of severe depression. *J Psychiat Res* 1992;26:125-34.
  34. MAES M, LAMBRECHTS J, SUY E, VANDERVORST C, BOSMANS E. Absolute number and percentage of circulating natural killer, non-MHC-restricted T cytotoxic, and phagocytic cells in unipolar depression. *Neuropsychobiology* 1994;29:57-63.
  35. MAES M, LAMBRECHTS J, BOSMANS E, JACOBS J, SUY E, VANDERVORST C, DEJONCKHEERE C, MINNER B, RAUS J. Evidence for systemic immune activation during depression: Results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. *Psychol Med* 1992;22:45-53.
  36. MAES M, STEVENS WJ, DECLERCK LS ET AL. A significant increased number and percentage of B cells in depressed subject: results of flow cytometric measurements. *J Affect Dis* 1992;24:127-34.
  37. RAVINDRAN AV, GRIFFITHS J, MERALI Z ET AL. Lymphocyte subsets associated with major depression and dysthymia: modification by antidepressant treatment. *Psychos Med* 1995;57:555-63.
  38. RAVINDRAN AV, GRIFFITHS J, MERALI Z ET AL. Circulating lymphocyte subsets in major depression and dysthymia with typical and atypical features. *Psychos Med* 1998;60:283-89.
  39. NATELSON BH, DENNY T, ZHOU X-D ET AL. Is depression associated with immune activation? *J Affect Dis* 1999;24:115-20.
  40. ROBERTSON MJ, SCHACTERLE RS, MACKIN GA, WILSON SN, BLOOMINGDALE KL, RITZ J, KOMAROFF AL. Lymphocyte subset differences in patients with chronic fatigue syndrome, multiple sclerosis and major depression. *Clin Exp Immunol* 2005;141:326-32.
  41. SCHLATTER J, ORTUNO F, CERVERA-ENGUIG S. Lymphocyte subsets and lymphokine production in patients with melancholic versus nonmelancholic depression. *Psychiatry Res* 2004;128:259-65.
  42. MAES M, STEVENS WJ, DECLERCK LS, BRIDTS CH, PEETERS D, SCHOTTE C, COSYNS P. Significantly increased expression of T-cell activation markers (interleukin-2 and HLA-DR) in depression: further evidence for an inflammatory process during that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1993;17:241-55.
  43. IRWIN M. Immune correlates of depression. *Adv Exp Med Biol* 1999;461:1-24.
  44. KRONFOL Z, SILVA J JR, GREDEN J, DEMDINSKI S, GARDNER R, CARROLL B. Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sci* 1983;33:241-7.
  45. ZAHARIA MD, RAVINDRAN AV, GRIFFITHS J, MERALI Z, ANISMAN H. Lymphocyte proliferation among major depressive and dysthymic patients with typical or atypical features. *J Affect Disord* 2000;58:1-10.

- 
46. NUNES S.O.V., REICHE E.M.V., MORIMOTO H.K., MATSUO Y., ITANO E.N., XAVIER E.C.D., YAMASHITA C.M., VIEIRA V.R., MENOLI A.V., SILVA S.S., COSTA F.B., REICHE F.V., SILVA F.L.V., KAMINAMI M.S. Immune function and hormonal activity in adults suffering from depression. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:581-87.
  47. BAUER ME, GAUER GJ, LUZ C, SILVEIRA RO, NARDI NB, VON MUHLEN CA. Evaluation of immune parameters in depressed patients. *Life Sci* 1995;57:665-74.
  48. DARKO DF, WILSON NW, GILLIN JC, GOLSHAN S. A critical appraisal of mitogen-induced lymphocyte proliferation in depressed patients. *Am J Psychiatry* 1991;148: 337-44.
  49. EVANS DL, PEDERSEN CA, FOLDS JD. Major depression and immunity: preliminary evidence of decreased natural killer cell populations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1988;12:739-48.
  50. FRANK MG, WIESELER FRANK JL, HENDRICKS SE, BURKE WJ, JOHNSON DR. Age at onset of major depressive disorder predicts reduction in NK cell number and activity. *J Affect Disord* 2002;71:159-67.
  51. SEIDEL A, VOLKER A, HUNSTIGER M, RINK L, BEHNISCH A, KIRCHNER H. Increased CD56+ Natural Killer and related cytokines in major depression. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:83-85.
  52. FLENTGE F, VAN DEN BERG M D, BOUHUYS A L. Increased of NK-T cells in aged depressed patients not treated with antidepressive drugs. *Soc Biol Psychiatry* 2000;48: 1024-27.
  53. COVER H, IRWIN M. Immunity and depression: insomnia, retardation, and reduction of natural killer cell activity. *J Behav Med* 1994;17:217-23.
  54. CALDWELL C, IRWIN M, LOHR J. Reduced natural killer cell cytotoxicity in depression but not in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1991;30:1131-38.
  55. MAES M, BOSMANS E, SUY E, MINNER B, RAUS J. Immune cell parameters severely depressed patients: negative findings. *J Affect Disord* 1989;17:121-8.
  56. SCHLEIFER SJ, KELLER SE, BOND RN, COHEN J, STEIN M. Major depressive syndrome and immunity: Role of age, sex, severity, and hospitalization. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46:81-87.
  57. MILLER GE, COHEN S, HERBERT TB. Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients. *Psychosom Med* 1999;61:850-60.
  58. MCADAMS C, LEONARD BE. Neutrophil and monocyte phagocytosis in depressed patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology & Biol. Psychiat* 1993;12:971-84.
  59. SCHLATTER J, ORTUNO F, CERVERA-ENGUIG S. Monocytes parameters in patients with dysthymia versus major depression. *J Affect Disord* 2004;78:243-47.
  60. KRONFOL Z, NAIR M, GOODSON J, GOAEL K, HASKETT R, SCHWARTZ S. Natural Killer cell activity in depressive illness: a preliminary report. *Biol Psychiatry* 1989;26:753-56.

- 
61. IRWIN , M, CALDWELL C, SMITH TL, BROWN S, SCHUCKIT MA, GILLIN J.C. Major depressive disorder, alcoholism and reduced natural killer cell cytotoxicity. *Arch Gen Psychiatry* 1990;47:713-18.
  62. SCHLEIFER SJ, KELLER SE, MEYERSON AT, RASKIN MJ, DAVIS KL, STEIN M. Lymphocyte function in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1984;41:484-86.
  63. ROTHERMUNDT M, AROLT V, PETERS M, GUTBRODT H, FENKER JAN, KERSTING A, KIRCHNER H. Inflammatory markers in major depression and melancholia. *J Affect disord* 2001;63:93-102.
  64. MAES M, SCHARPE S, MELTZER HY, COSYNS P. Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression. *Biol Psychiatry* 1993;34:690-701.
  65. MAES M, SCHARPE S, VAN GROOTEL L, UYTENBROECK W, COOREMAN W, COSYNS P, SUY E. Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. *J Affect Disord* 1992;24:183-92.
  66. SONG C ET AL. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. *J Affect Disord* 1994;30:283-8.
  67. HORNIG M, GOODMAN DB, KAMOUN M, AMSTERDAM JD. Positive and negative acute phase proteins in affective subtypes. *J Affect Disord* 1998;49:9-18
  68. MAES M, SCHARPE S, VAN GROOTEL L, UYTENBROECK W, COOREMAN W, COSYNS P, SUY E. Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. *J Affect Disord* 1992;24:183-92.
  69. PAPANICOLAOU DA, WILDER RL, MANOLAGAS SC, CHROUSOS GP. The pathophysiology roles of interleukin-6 in humans disease. *Ann Intern Med* 1998;128:127-37.
  70. BERK M, WADEE A.A., KUSCHKE R.H., O'NEIL-KERR A. Acute phase proteins in major depression. *J Psychosom Res* 1997;43:529-34.
  71. LANQUILLON S, KRIEG C, BENING-ABU-SHACH U, VEDDER H. Cytokine production and treatment response in depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 2000;22:370-79.
  72. JOYCE P.R.H.C.R., MULDER R.T., SELLMAN J.D., WILSON D.A., BOSWELL D.R. Elevated levels of acute phase proteins in major depression. *Biol Psychiatry* 1992;32: 1035-41.
  73. HSU-KO KUO, CHUNG-JEN YEN, CHIA-HSUIN CHANG, CHEN-KO KUO, JEN-HAU CHEN, FARZANEH SOROND. Relation of C-reactive protein, cognitive disorders, and depression in the general population: systemic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2005;4:371-80.
  74. DANNER M, KASL SV, ADAMSON JL, VACCARINO V. Association between depression and elevated C-reactive protein. *Psychosomatic Med* 2003;65:347-56.

- 
75. FORD DE, ERLINGER TP. Depression and C-reactive protein in US adults: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2004;164: 1010-14.
  76. PANAGIOTAKOS DB, PITSAVOS C, CHRYSOHOOU C, ET AL. Inflammation, coagulation, and depressive symptomatology in cardiovascular disease-free people: the ATTICA study. *Eur Heart J* 2004;25:492-99.
  77. RAISON RL, CAPURON L, MILLER AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006;27:24-31.
  78. IRWIN MR, MILLER AH. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun* 2007;21:374-83.
  79. SMITH RS. The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses* 1991;35:298-306.
  80. NIIRENAN A, LAAKSONEN R, IIVANAINEN M ET AL. Behavioral assessment of patients treated with alpha-interferon. *Acta Psychiatry Scand* 1988;78:622-27.
  81. BLALOCK SJ, DEVELLIS RF, BROWN GK ET AL. Validity of the Center of Epidemiological Studies Depression. *Arthritis Rheum* 1989;32:991-7.
  82. ENDRES S, REZA G, KELLY VE ET AL. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acid on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989;320:265-68.
  83. MAES M. Major Depression and activation of the inflammatory response system. In: Dantzer R, Wollman EE, Yirmiya R. Cytokines, stress and depression. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 25-46
  84. BONACCORSO S, MELTZER H, MAES M. Psychological and behavioural effects of interferon-alpha. *J Affect Disord* 2000;13:673-77.
  85. THOMAS AJ, DAVIS S, MORRIS C, JACKSON E, HARRISON R, O'BRIEN JT. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am J Psychiatry* 2005;162:175-77.
  86. CRADDOCK D, THOMAS A. Cytokines and late-life depression. *Essent Psychopharmacol* 2006;7:42-52.
  87. MAES M, MELTZER HY, BOSMANS E, BERGMANS R, VANDOOOLAEGHE E, RANJAN R, DESNYDER R. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disord* 1995;34:301-9.
  88. MAES M, SCHARPE S, MELTZER HY, OKAYLI G, BOSMANS E, D'HONDT P, VAN DEN BOSSCHE BV, COSYNS P. Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression : further evidence for an immune response. *Psychiatry Res* 1994;54:143-60.
  89. SLUZEWSKA A, RYBAKOWSKI J, BOSMANS E, SOBIESKA M, BERGHMANS R, MAES M, WIKTOROWICZ K. Indicators of immune activation in major depression. *Psychiatry Res* 1996;64:161-67.

90. MAES M, MELTZER HY, BOSMANS E, BERGMANS R, VANDOOOLAEGHE E, RANJAN R, DESNYDER R. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disord* 1995;34:301-9.
91. MAES M, SCHARPE S, MELTZER Y, BOSMANS E, SUY E, CALABRESE J, COSYNS P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res* 1993;49:11-27.
92. MAES M, BOSMANS E, DE JONGH R, KENIS G, VANDOOOLAEGHE E, NEELS H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 1997;9:853-8.
93. SHEIDEL A, AROLT V, HUNSTIGER M, RINK L, BEHNISCH A, KIRCHNER H. Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand J Immunol* 1995;41:434-38.
94. KAESTNER F, HETTICH M, PETERS M, SIBROWSKI W, HETZEL G, PONATH G, AROLT V, CASSENS U, ROTHERMUNDT . Different activation patterns of proinflammatory cytokines in melancholic and non-melancholic major depression are associated with HPA axis activity. *J Affect Disord* 2005;87:305-11.
95. BRAMBILLA F, MAGGIONI M. Blood levels of cytokines in elderly patients with major depression. *Acta Psychiatrica Scand* 1998;97:309-31.
96. OLGA J.G. SCHIEPERS, MARIEKE C. WICHERS, MICHAEL MAES. Cytokines and major depression. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:201-17.
97. KUBERA M, MAES M. Serotonin – immune interactions in major depression. Neuro-immune interactions in Neurological and Psychiatric Disorders. Springer-Verlag, Berlin 2000;79-87.
98. SCHIEPERS OJ, WICHERS MC, MAES M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:201-17.
99. GIBBONS JL, MCHUGH PR. Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatry Res* 1963 ;1:162-71.
100. MURPHY BE. Steroids and depression. *Steroids Biochem Mol Biol* 1991;38:537-59.
101. NEMEROFF CB, WIDERLOV E, BISSETTE G, WALLEUS H, KARLSSON I, EKLUND K KILTS CD, LOOSEN PT, VALE W. Elevated concentrations of CSF corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 1984;226: 1342-44.
102. CAROL B. The Dexamethasone Suppression Test for melancholia. *Br J Psychiat* 1982;140:292-304.
103. ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΥΓΕΙΑΣ. Ταξινόμηση ICD-10 Ψυχικών Διαταραχών και Διαταραχών Συμπεριφοράς της Συμπεριφοράς. Απόδοση στα Ελληνικά και επιμέλεια: Στεφανής Κ, Σολδάτος Κ, Μαυρέας Β. Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής. Εκδόσεις ΒΗΤΑ. Αθήνα 1992.

- 
104. RIESEBERG M, KASPER C, REARDON KF, SCHEPER T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:350-60.
105. HERZENBERG LA, DE ROSA SC. Monoclonal antibodies and the FACKS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 2000;21:383-90.
106. SCHEFFOLD A, KERN F. Recent developments in flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:350-60.
107. KUHNS MS, DAVIS MM, GARCIA KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006;24:133-9.
108. RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006;24:419-66.
109. KONIG R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 2002;14:75-83.
110. DONO M, CERRUTI G, ZUPO S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2105-11.
111. COLE DK, GAO GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator. *Cell Mol Immunol* 2004;1:81-8.
112. HARRIS ES, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 2000;275:23409-12.
113. TRIANTAFILOU M, TRIANTAFILOU K. Lipopolysaccharide: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-04.
114. JERALA R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 2007; 297:353-63.
115. FUKUDA M, HIRAOKA N, YEH JC. C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. *J Cell Biol* 1999;147:467-70.
116. RAVETCH JV, BOLLAND S. IgG-Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-290.
117. TAKAI T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2005;25:1-18.
118. SATO S, JANSEN PJ, TEDDER TF. CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B-lymphocyte signaling. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13158-62.
119. BOBBITT KR, JUSTEMENT LB. Regulation of MHC class II signal transduction by the B-cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol* 2000;165:5588-96.
120. PEROSA F, FAVOINO E, CARAGNANO MA, PRETE M, DAMMACCO F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2005;4:526-31.
121. WANG X, RICKERT M, GARCIA KC. Structure of the quaternary complex of interleukine-2 with each alpha, beta and gamma receptors. *Science* 2005;310:1159-63.
122. KIM HP, IMBERT J, LEONARD WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:349-56.



- 
123. SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-26.
124. GREENWALD RJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-48.
125. ROOZENDAAL R, CARROLL MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* 2007;219:157-66.
126. HOLMES N. CD45:al is not yet crystal clear. *Immunology* 2006;117:145-55.
127. HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:107-37.
128. CROSSIN KL, KRUSHEL LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000;218:260-79.
129. PANICKER AK, BUHUSI M, THELEN K, MANESS PF. Cellular signaling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci* 2003;8:900-11.
130. NICHOLSON IC. CD62L (L-selectin). *J Biol Regul Homeost Agents* 2002;16:144-46.
131. SANCHO D, GOMEZ M, SANCHEZ-MADRID F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005;26:136-40.
132. NAGAI Y, SHIMAZU R, OGATA H, AKASHI S, SUDO K, YAMASAKI H, HAYASHI S, YWAKURA Y, KIMOTO M, MIYAKE K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell lipopolysaccharide. *Blood* 2002;99:1699-705.
133. TURNER D. The human leukocyte antigen (HLA) system. *Vox Sang* 2004;87:87-90.
134. MIYAKE K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol* 2004;16:11-16.
135. DIVANOVIC S, TROMPETTE A, PETINIOT LK, ALLEN JL, FLICK LM, BELKIDE Y, MADAN R, HAKY JJ, KARP CL. Regulation of TLR-4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105. *J Leukoc Biol* 2007;82:265-71.
136. FAVIER B, BURROUGHS NJ, WEDDERBURN L, VALITUTTI S. TCR dynamics on the surface of living T cells. *Int Immunol* 2001;13:1525-32.
137. MOSER B, EBERL M. gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007;215:89-102.
138. MCCUTCHEON M, WEHNER N, WENSKY A, KUSHNER M, DOAN S, HSIAO L, CALABRESI P, HA T, TRAN TV, TATE KM, WINKELHAKE J, SPACK EG. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Meth* 1997;210:149-55.
139. FUJIIHASHI K, MCGHEE J, BEAGLEY K, MCPHERSON D, MCPHERSON S, HUANG C-M, KIYONO H. Cytokine-specific ELISPOT assay: single cell analysis of IL-2, IL-4, and IL-6 producing cells. *J Immunol Meth* 1993;160:181-85.
140. KALYUZHNY AE. Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 2005;302:15-31.

- 
141. SACHDEVA N, ASTHANA D. Cytokine quantitation: technologies and applications. *Front Biosci* 2007;1:4682-95.
142. DE JAGER W, TE VELTHUIS H, PRAKKEN BJ, KUIS W, RIJKERS GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:133-9.
143. KALYUZHNY A, STARK S. A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2001;1:93-7.
144. VIGNALI DA. Multiplexed particle- based flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 2000;243:243-255.
145. SZODARAY P ET AL. Circulating cytokines in Primary Sjogren's Syndrome determined by a Multiplex Cytokine Array System. *Scand J Immunol* 2004;59:592-99.
146. JOOS TO, STOLL D, TEMPLIN MF. Miniaturised multiplexed immuno assays. *Current Opinion in Chemical Biology* 2001;6:76-80.
147. PRUSSIN C. Cytokine flow cytometry: Understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997;17:195-202.
148. CARSON RT, VIGNALI DAA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1999;227:41-48.
149. BRITTEN CM, GOUTTEFANGEAS C, WELTERS MJ, PAWELEC G, KOCH S, OTTENSMEIER C, ET AL. The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol Immunother* 2007;25:4051-7.