

Д-р Диана Илиева Пендичева-Духленска

ФАРМАКОГЕНЕТИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ АМБУЛАТОРНИ ПАЦИЕНТИ
С РЕКУРЕНТНО ДЕПРЕСИВНО РАЗСТРОЙСТВО, ЛЕКУВАНИ СЪС СЕЛЕКТИВНИ
ИНХИБИТОРИ НА ОБРАТНОТО ЗАХВАЩАНЕ НА СЕРОТОНИН (СИСТ)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Направление: 7. „Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: 7.1. „Медицина”

Научна специалност: Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)

Научни ръководители:

Проф. д-р Надка Иванова Бояджиева, д.м.н.

Доц. Радка Петрова Кънева, д.б.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Витан Влахов, д.м.н.

Доц. д-р Иван Ламбев, д.м.

Плевен, 2016

Дисертационният труд е представен на 137 страници и е онагледен с 31 фигури и 30 таблици. Библиографията обхваща 214 литературни източника, от които 193 на латиница и 21 на кирилица.

Преданалитичната обработка на биологичните материали и молекулярно-генетичният анализ са извършвани поетапно в МУ-Плевен и Център по Молекулярна Медицина – гр. София (ЦММ) и са базирани на 5 научноизследователски проекта, финансирани от МУ-Плевен.

Всички изследвания, свързани с дисертационния труд, са съобразени с Универсалната декларация на ООН за правата на човека и Декларацията на СМА от Хелзинки относно етичните принципи при биомедицински изследвания, включващи човешки същества, и са оценени с 5 положителни рецензии от Комисия по етика на научноизследователската дейност (КЕНИД) при МУ-Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Разширен катедрен съвет на катедра „Фармакология и токсикология ” при Медицински университет – гр. Плевен.

**Публичната защита на дисертационния труд
ще се състои на 26. 01. 2017 г. (четвъртък) от 13:30 часа
в зала „Амброаз Паре”, ТЕЛЕЦ, Медицински Университет – Плевен.**

Състав на Научно жури:

Председател:

Доц. д-р Катя Ковачева, д.м. – становище

Членове:

Проф. д-р Витан Влахов, д.м.н. – рецензия

Доц. д-р Иван Ламбев, д.м. – рецензия

Доц. Радка Кънева, д.б. – становище

Доц. д-р Петър Маринов, д.м. – становище

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на МУ – Плевен:

www.mu-pleven.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ | 4 |
| ВЪВЕДЕНИЕ | 5 |
| I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 7 |
| 1. Цел | 7 |
| 2. Задачи | 7 |
| II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 8 |
| 1. Дизайн и програма на изследването | 8 |
| 2. Материали | 9 |
| 2.1. Клиничен контингент | 9 |
| 2.2. Биологичен материал | 11 |
| 2.3. Реактиви и апаратура | 11 |
| 3. Методи | 16 |
| 4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ | 20 |
| 4.1. Социодемографски и клинични характеристики | 20 |
| 4.2. Статистически анализ на полиморфизми на кандидат-гени | 23 |
| Проверка за отклонения от закона на Харди-Вайнберг | 23 |
| Качествена оценка и визуализация на продуктите от PCR анализ на полиморфни кандидат-гени <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>SLC6A4</i> и <i>BDNF</i> | 23 |
| Сравнителен анализ на алелни и генотипни честоти на полиморфизми <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*17</i> , <i>5-HTTLPR</i> , <i>rs25531</i> , <i>rs57098334</i> , <i>rs6265</i> , <i>rs12273363</i> и <i>rs16917237</i> | 26 |
| 4.3. Регресионен анализ | 37 |
| 5. ОБСЪЖДАНЕ | 43 |
| 5.1. Полиморфизми на <i>CYP2D6/CYP2C19</i> , депресия и терапия със СИСТ | 43 |
| 5.2. Полиморфизми на <i>SLC6A4</i> , серотонинов транспорт и терапия със СИСТ | 46 |
| 5.3. Полиморфизми на <i>BDNF</i> , невропластичност и терапия със СИСТ | 47 |
| 5.4. Обобщение, предимства и ограничения на проучването | 48 |
| 6. ИЗВОДИ | 49 |
| 7. ПРИНОСИ (самооценка) | 51 |
| 8. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА | 52 |
| 8.1. Публикации | 52 |
| 8.2. Участия в научни форуми | 53 |
| 8.3. Научноизследователски проекти, свързани с дисертацията | 54 |

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|---------------------|---|
| ASEC | The Antidepressant Side-Effect Checklist |
| BDNF | Brain Derived Neurotrophic factor |
| COMT | Catechol-O-methyltransferase |
| CREB-cAMP | cAMP Response Element Binding Protein |
| CYP | Cytochrome P450 |
| CYP2D6 | Cytochrome P450 2D6 |
| CYP2C19 | Cytochrome P450 2C19 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide |
| dNTP | Deoxynucleotide Triphosphate |
| ddNTP | Dideoxynucleotide Triphosphate |
| DSM | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders |
| GWAS | Genome Wide Association Studies |
| HAMD | Hamilton Depression Rating Scale |
| 5-HT (R) | 5-Hydroxytryptamine, Serotonin |
| 5-HTTLPR | Serotonin-Transporter-Linked Polymorphic Region |
| HTR | 5-Hydroxytryptamine Receptor, Serotonin Receptor |
| HWE | Hardy-Weinberg Equilibrium |
| K ₃ EDTA | 3-Potassium Ethylenediaminetetraacetic Acid |
| MAO-A | Monoamine oxidase A |
| MAF | Minor Allele Frequency |
| MDD | Major Depressive Disorder |
| MDDR | Major Depressive Disorder: Recurrent |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PKA | Protein Kinase A |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| rs4795541 | 43-bp Insertion/Deletion (Insdel) Polymorphism |
| rs25531 | A>G Polymorphism |
| rs6265 | Single Nucleotide Polymorphism (G196A) in the BDNF gene (Val66Met) |
| rs57098334 | 2nd Intron VNTR |
| SIGH-D | Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale |
| SLC6A4 | Serotonin transporter |
| VNTR | Variable Number Tandem Repeat |
| DSM | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders |
| ДСН-IV-ТР | Диагностичен и статистически наръчник на психичните разстройства |
| НЛР | Нежелани лекарствени реакции |
| СМА | Световна медицинска асоциация |

ВЪВЕДЕНИЕ

Депресията е сред най-разпространените психични разстройства в съвременното общество. Поне веднъж, на различен етап от живота, при един на всеки пет души от възрастното население на земята съществува вероятност от проява на страданието, като жените са засегнати два пъти по-често от мъжете, независимо от расата или етноса на индивида. По данни на СЗО, до 2020 г. се очаква депресията да стане второто след ХИВ-инфекция/СПИН социалнозначимо заболяване, водещо до инвалидизиране и носещо подчертана икономическа тежест за обществото. За България, по данни от проведено епидемиологично проучване на психичната болестност (EPIBUL), пожизнената болестност за афективните разстройства (вкл. депресия) е 6.2%, като само през 2013 г. са регистрирани 6412 пациенти с депресивен епизод и 8573 с рекурентно (рецидивиращо) депресивно разстройство [Миланова, 2010; Зарков и съавт., 2010]. Наше проучване [Зарков, 2015] посочва едногодишна болестност 2,8% за разстройства на настроението, втора по честота след тревожните разстройства.

Наред с ключовите симптоми на заболяването (потиснато настроение, загуба на интерес, липса на енергия и отсъствие на радост/удоволствие от преживяното), често придружени с понижен апетит и разстройство на съня и в различна степен нарушаващи функционирането на пациента, допълнителни усложняващи фактори са фенотипната хетерогенност на проявите, тежестта и вариращата продължителност на депресивния епизод (от няколко седмици до 3-6 месеца), присъствието на атипични и/или психотични черти, потенциалният суицидален риск, както и възможността разстройството да рецидивира и хронифицира. Мултифакторната генеза и многообразието в характеристиките на заболяването затрудняват не само конкретизирането на причинно-следствената връзка, но и дефинитивния избор на начално и поддържащо лечение, превенцията и дългосрочната прогноза [Lohoff et al, 2010]. Оценката на клиничните и индивидуални фактори изисква паралелно проследяване на генетични, екологични, епигенетични и множество други променливи с предполагаемо влияние върху сложната природа на лекарствения отговор [de Leon, et al. 2016].

Лечението на депресията е комплексно и интердисциплинарно, с прилагане най-често на утвърдени медикаментозни методи и психотерапия, съчетани при необходимост с електроконвулсивна терапия или транскраниална магнитна стимулация, навлизаща напоследък в клиничната практика. В терапевтичен план, за да бъде отчетен ефект от антидепресивното лечение на остър епизод, приемът на назначените медикаменти трябва да продължи най-малко месец (често до 6 м.), като неадекватен отговор на начална терапия се наблюдава при около 1/3 от

пациентите, а приблизително 60% от тях не достигат пълна клинична ремисия дори при сходни условия на средата [Monkrieff et al, 2005; Serretti et al, 2010]. В проспективни проучвания [Rush et al., 2006] се съобщава за алармиращо висока честота на отсъствие на ремисия след поредица от адекватни лечебни подходи.

Редица съвременни изследвания са насочени към установяването на демографски, клинични и биологични фактори, определящи терапевтичния изход, но все още липсват реално приложими ориентирни. Отчетливите индивидуални разлики в терапевтичното повлияване и днес затрудняват категоричната прогноза и налагат преосмислено персонализиране на лечебния подход, базирано на нови знания за множественото естество на лекарствените отговор. Неотменима е потребността от внимателно проследяване на НЛР, добро фармакотерапевтично сътрудничество и информиране за реалната оценка на състоянието от пациента и близките му. Самооценката също е неделима част от комплексната терапевтична картина. Необходима е и ефективна скринингова диагностика, с цел своевременно и адекватно лечение на депресивните разстройства [Маринов, 2013].

В търсене на надеждни биологични предиктори, съвременната психофармакогенетика (и напоследък, психофармакогеномика) поставя акцент върху изучаването на генетични варианти, свързани с ефикасната фармакотерапия на депресията. Фармакогеномиката на антидепресантите, основана на текущите хипотези за дефицит в норадренергичната, допаминергична и/или серотонинергична невротрансмисия, генерира лавина от съобщения за генетично обусловените отклонения в метаболизма на медикаментите и експресията на лекарствените таргети. Въпреки обещаващите резултати, затруднения произтичат от сложната полигенна йерархия на психотропния отговор и от факта, че дори при пълна яснота относно ролята на фармакогенетичните фактори, те могат да обяснят едва 40% от вариациите. Ограничения поставя и необходимостта от проучване на комбинации от локуси с малък размер на ефекта, както и дефицитът на знания относно функцията на редица гени с предполагаемо отношение към ефикасността на антидепресантите [de Leon et al, 2016; Fabbri, Serretti, 2015; Pirmohamed et al., 2014; Сычев, 2011; Савельева, 2009].

Все по-често се дискутира потребността от широкогеномни асоциативни проучвания, фокусирани не само върху панели от генетични варианти, но изследващи в цялост функционалните единици, въввлечени в неврофизиологичната регулация на раними мозъчни процеси, засегнати от депресивното разстройство.

Вероятно бъдещото развитие на науката ще внесе баланс в позиционирането на психофармакогеномиката, която днес разбираемо не е пощадена от пристрастия и увлечения относно нейната значимост. Но, безусловно, предстои дълъг изследователски път към все още непроучени и провокиращи с хетерогенността си фактори, формиращи индивидуалния облик на депресията.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва честотата на генетични варианти на известни полиморфни кандидат-гени, имащи отношение към фармакогенетиката на антидепресантите, при български пациенти с рекурентно депресивно разстройство и здрави лица и да се проучи влиянието на установените полиморфизми върху клиничната динамика и индивидуалния терапевтичен отговор на пациентите при остро лечение със СИСТ.

2. ЗАДАЧИ

1. Извършване на дедуктивен подбор и анализ на полиморфни фармакогенетични кандидат-гени по литературни данни, насочващи към значима популационна честота при сходни социодемографски характеристики, връзка с патогенезата на депресивни разстройства и отношение към фармакотерапията с антидепресанти, в частност СИСТ.

2. Избор на метод за генотипиране, изготвяне на адаптирани протоколи и оптимизиране на условията за ДНК-анализ на селектираните полиморфизми.

3. Генотипиране на подбраните варианти в група пациенти с рекурентно депресивно разстройство, лекувани със СИСТ, и в контролна група неродствени лица без психични заболявания.

4. Определяне на алелната и генотипна честоти на селектираните ДНК-полиморфизми при пациенти и контроли и сравняване на установените честоти с резултати от генетични проучвания в европейската и българската популации.

5. Проучване ролята на външни фактори с отношение към терапевтичния отговор на СИСТ и проследяване на връзката им с генотипа.

6. Фармакогенетичен анализ на взаимодействието и връзката на установените полиморфизми с тежестта и хода на актуалния и предходни депресивни епизоди, индивидуалното терапевтично повлияване от СИСТ в острата фаза на лечение и клиничния изход от заболяването за периода на проучването.

7. Анализ на самооценката на наблюдавани в хода на лечението НЛР, връзката им с установения генотип и значимостта им за терапевтичното съдействие на пациента.

8. Определяне на групи пациенти с носителство на рискови алели и изготвяне на индивидуални препоръки за ориентиран избор на антидепресант при следващ депресивен епизод за пациентите с доказан проблемна генотип.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Дизайн и програма на изследването

Дизайн: Асоциативно проучване тип „случай-контрола“

- Фаза I: Асоциативно проучване на варианти в кандидат-гени за генетична връзка със заболяването при пациенти и контроли.
- Фаза II: Асоциативно проучване на варианти в кандидат-гени за фармакогенетична връзка с терапията при пациенти. На този етап проучването е проспективно, лонгитудинално и натуралистично; с ретроспективна оценка на хода на заболяването.

Ниво на доказателство: Според критериите на Медицина на доказателствата в областта на психичното здраве, проучването е с ниво на доказателност IIIb: Нерандомизирано, неконтролирано, с голям размер на извадката ($n > 100$) [Soldani et al., 2005; Ghaemi, 2011]. Период на наблюдение: До 6 месеца след назначаване на медикаментозното лечение, с изследване в началото (ден 0), на 1-ва, 2-ра, 4-та, 6-та и 18-та седмица от терапията.

Програма:

Етап I: Подготвителен. Подбор на полиморфни кандидат от литературни източници и информационни генетични база данни; участие в конкурси за научноизследователски проекти, изготвяне на критерии за подбор на участниците; изработване на диагностичен инструментариум, оформяне на етични документи.

Етап II: Клиничен. Подбор на пациенти и контроли; запознаване на участниците с целите и методите на проучването и получаване на писмено информирано съгласие за включване във фармакогенетично проучването; ретроспективна оценка на заболяването при пациенти по данни от медицински досиета, поставяне на диагноза, оценка на тежестта на депресия и назначаване на лечение; първо попълване на Въпросник за самооценка на странични ефекти на антидепресанти (ASEC).

Етап III: Преданалитичен. Вземане на биологичен материал; транспорт и съхраняване на проби венозна кръв за изолиране на ДНК; изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв, кодиране и съхраняване на пробите при подходящи условия в „ДНК-банка“.

Етап IV: Аналитичен. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК, нормализиране до необходимата за ДНК-анализ концентрация; кодиране и съхраняване на нормализираните разтвори; ДНК-амплификация на полиморфен локус чрез PCR метод и оценка на качеството и количеството на намножените фрагменти чрез агарозна гел-електофореза; рестрикционен анализ (RFLP) на амплифицирани ДНК фрагменти за установяване на специфични локуси и електрофоретично тестване на получените продукти.

Етап V: Периодичен. Психометрична оценка на депресия в хода на провежданото лечение, като част от рутинното проследяване на клиничния отговор; периодично клинично наблюдение; оценка на НЛР и терапевтичното съдействие на пациента (ASEC).

Етап VI: Заключителен. Отчитане на резултатите от генотипирането и клиничното наблюдение, статистическа обработка и анализ; стратификация на пациентите и изготвяне на индивидуални препоръки за следващо лечение..

2. МАТЕРИАЛИ

Всички изследвания, на които се базира настоящият труд, са съобразени с Универсалната декларация на ООН за правата на човека и Декларацията на СМА от Хелзинки относно етичните принципи при биомедицински изследвания, включващи човешки същества, както и с актуалните национални документи в областта на генетичните изследвания.

На всеки етап, извършената изследователска дейност е оценявана и наблюдавана от Комисия по етика на научноизследователската дейност при МУ-Плевен (КЕНИД) и е подкрепена с 5 положителни рецензии относно научните, медицински и етични аспекти на проектите, свързани с дисертацията (НИП №18/02012, №12/2011, №.20/2009; №10/2008, №22/2007).

2.1. Клиничен контингент

Обект на проучването са амбулаторни пациенти и здрави лица, разпределени в две групи, съобразно формулираните критерии за включване и изключване.

Група I: Амбулаторни пациенти с рекурентно депресивно разстройство (N=100). Броят им е съобразен с честотата на изследваните полиморфизми сред европейската популация. Обхванати са основно пациенти от района на Централна и Северозападна България, насочени от общопрактикуващ лекар или друг специалист за консултация с психиатър в ДКЦ-2 – гр. Плевен, за периода 2009–2010 г., отговарящи на критериите за включване, информирани с писмен формуляр за същността на проучването и предоставили писмено съгласие за участие. Пациентите са включвани нерандомизирано, по реда на посещение в психиатричен кабинет.

Критерии за включване:

- Амбулаторни пациенти на специализиран психиатричен кабинет, неродствени, с принадлежност към европейската раса.
- Възраст 18-64 год.
- Диагноза по ДСН-IV-ТР: Тежко депресивно разстройство с умерено изразен до тежък рекурентен епизод без психотични симптоми.
- Продължителност на заболяването ≥ 3 год.

- Брой епизоди ≥ 2 .
- HAM-D21 ≥ 16 .
- Назначена фармакотерапия със СИСТ (Paroxetine), прилагана през целия период под систематичен контрол от психиатър.
- Получено Писмено информирано съгласие за генетични изследвания.

Критерии за изключване:

- Възраст до 18 г. и над 64 г.
- Планирана или диагностицирана бременност.
- Тежък рекурентен епизод с психотични симптоми.
- Биполярни разстройства.
- Други психични заболявания.
- Назначена фармакотерапия с други групи антидепресанти и/или други психотропни лекарства за периода на наблюдение.
- Придружаващи неконтролирани тежки соматични заболявания.
- Придружаващи тежки неврологични заболявания.
- Злоупотреба с алкохол и вещества, предизвикващи зависимост, налична в предходните 6 месеца преди включване в проучването.
- Отсъствие на Писмено информирано съгласие за генетични изследвания.

Група II: Контролна група лица от бялата раса без психични заболявания (N=142) съответстващи по пол и възраст на групата пациенти. Подборът на популационната извадка е извършван по реда на постъпване за профилактично изследване на клинично-лабораторни показатели в Клинична лаборатория на ДКЦ-Плевен ЕООД. Оценката на критериите за включване и изключване е извършена от неангажиран с проучването лекар-специалист по данни от медицински досиета, касаещи общото здраве на лицето и при отсъствие на конфликт на интереси. Включените здрави контроли са информирани с писмен формуляр за същността на проучването и са предоставили писмено съгласие за участие, одобрени от КЕНИД при МУ-Плевен.

Критерии за включване:

- Дееспособни лица от европейската раса.
- Възраст 18-64 год.
- Получено Писмено информирано съгласие за генетични изследвания
- Потвърдено от личен лекар отсъствие на психично заболяване.
- Отсъствие на близкородствена връзка с пациентите.
- Отсъствие на фамилна история за психични заболявания

Критерии за изключване:

- Възраст до 18 г. и над 64 г.
- Отсъствие на Писмено информирано съгласие за генетични изследвания

- Бременност.
- Фармакотерапия с психотропни лекарства, провеждана в момента на наблюдение.
- Психични разстройства.
- Органични заболявания.
- Неконтролирани соматични и/или неврологични заболявания.

2.2. Биологичен материал

- *Венозна кръв за преданалитична обработка*

На всички пациенти и популационна група лица е взета 7 мл венозна кръв 30 мин. до 1 час след хранене във вакутейнер с K₃EDTA (Becton Dickinson, GmbH, Heidelberg, Germany) за изолиране на високомолекулна ДНК от ядрени кръвни клетки. Вакутейнерите с кръвни проби са съхранявани при +4°C до 48 часа преди екстракция на ДНК.

- *Високомолекулна ДНК от ядрени кръвни клетки за генетичен анализ*

Изолирането на високомолекулна ДНК от венозна кръв на пациенти е извършено по адаптиран протокол с мануален метод за солева екстракция чрез изсолване на белтъци [Miller et al., 1988], основан на ензимно клетъчно лизиране и химическа екстракция с цел отстраняване на клетъчни протеини, РНК и други макромолекули, с последващо утаяване на пречистената ДНК в абсолютен алкохол.

В контролната група лица ДНК за аналитични цели е екстрахирана с китове (Chemagic DNA Blood kits) чрез полуавтоматизирана система за сепариране с магнитни частици Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) по адаптирани препоръки на производителя (Chemagen AG).

2.3. Реактиви и апаратура

- *За изолиране на ДНК по метода на мануална солева екстракция*

Апаратура

Центрофуга с гнезда за 50 мл епруветки

Автоматични пипети с променлив обем

Термостат сух 37°-70° (за поддържане на 37°C)

Хладилник с камера 4°

Фризер на -20°C

Лабораторна везна с точност до 0,001 g

Аналитична везна с точност до 0,0001 g

Лабораторен миксер

Електромагнитна бъркалка

Клатачна машина

pH-метър с точност до 2-ри знак

Буферни разтвори и реактиви (Табл. 1)

Таблица 1: Буферни разтвори и реактиви за солева екстракция на ДНК.

| Реактиви | pH | Концентрация | Количество | ddH ₂ O |
|----------------------------------|-----|---|--------------------------|--------------------|
| Еритроцитлизиращ буфер | 7,4 | 155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA | 82,9 g 10 g 0.37 g | до 1000 ml |
| Нуклеолизиращ буфер | 8,0 | 75 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA | 4,39 g 8.93g | до 1000 ml |
| Преситен разтвор на NaCl | - | 6 M NaCl | 360 g | до 1000 ml |
| TE буфер (за съхранение на ДНК) | 7,4 | 10 mM TRIS-HCL (S-Sodium) 0,1 mM EDTA | 1,21 g 0,04 g | до 1000 ml |
| 10% натриев додецил сулфат (SDS) | - | 10% разтвор | 10 g | до 100 ml |
| Протеиназа К | - | 10 mg/ml | 0.01 g | 1 ml |
| Абсолютен етанол | - | 99,8% | - | - |
| Етанол | - | 80% | 80,24 ml | до 1000 ml |

- За изолиране на ДНК чрез полуавтоматизирана система за сепариране с магнитни частици Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) (Фиг. 1).



Фиг. 1. Полуавтоматизирана система за сепариране с магнитни частици Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen).

Буферни разтвори и реактиви

Елуиращ буфер: 10 mM Трис–HCl pH=8.0; ТЕ буфер pH=8.0

Свързващ буфер 2 и промиващ буфер 3, съдържащи етанол

Магнитни частици, хомогенизирани чрез разбъркване (Фиг. 2)

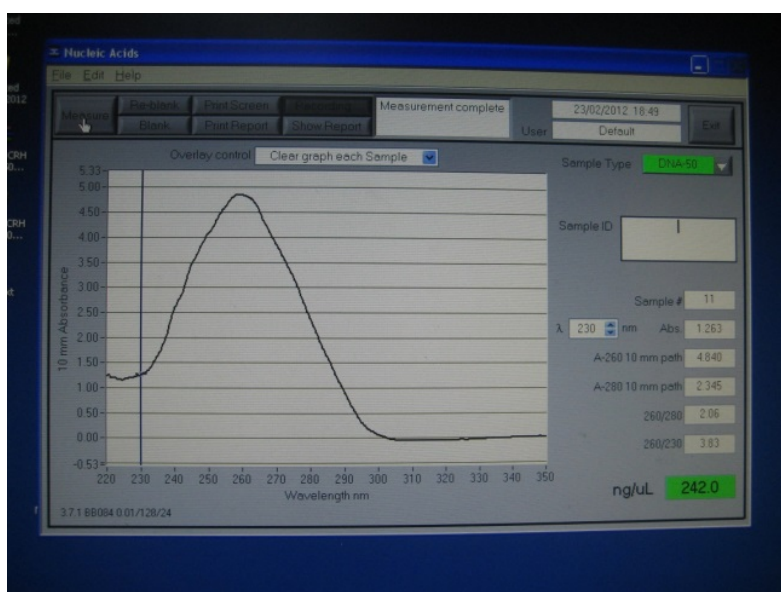


Фиг. 2. Подготовка на пробите и краен етап на магнитно сепариране.

- За оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК

Качествената оценка и визуализация на продуктите е извършена след оцветяване с етидиев бромид чрез агарозна гел-електрофореза и UV-трансилюминация, последвани от фотодокументация със система MINIBIS PRO на визуализираните фрагменти.

Концентрацията на изолираната ДНК е измервана автоматично чрез апарат NanoDrop (Thermo Scientific) за отношение на абсорбциите между 1.7 и 2.0, показващо отсъствие на примеси от белтъци и РНК (Фиг.3).



Фиг. 3. Визуализация на качествена оценка на продуктите с апарат NanoDrop (Thermo Scientific).

- За кодиране в база данни и генериране на анонимен баркод (Фиг. 4)



Фиг. 4. Кодирание и анонимизиране на пробите.

- За ДНК-амплификация на полиморфен локус чрез PCR

Апаратура

PCR апарати (Фиг. 5, 7)

Автоматични пипети с променлив обем

Лабораторна везна с точност до 0,001 g

Аналитична везна с точност до 0,0001 g

Термостат сух, поддържащ 37°C за инкубиране на пробите при RFLP

Микровълнова печка

Вана за хоризонтална агарозна гел-електрофореза (Фиг. 6)

UV-илюминатор за визуализация на продуктите (Фиг. 6)

Фотодокументационна система



Фиг. 5. PCR апарат Elta'90. Фиг. 6. Вана за хоризонтална агарозна гел-електрофореза; UV-илюминатор за визуализация на продуктите.



Фиг. 7. Real-time PCR (Rotor-Gene™ 6000), с високоразделителен метод на топене на ДНК и визуализация с флуоресцентно оцветяване.

Състав и количество на PCR реактиви (Табл. 2)

Таблица 2. PCR реактиви.

| Компоненти на реакционната смес за маркера | Концентрация | | Количество (µl) |
|--|--------------|-------------|-----------------|
| | Изходна | Крайна | |
| ДНК | 10 ng/µl | 4 ng/µl | 8 |
| Буфер(с MgCl ₂) | 10x | 1x | 2 |
| Праймер F | 20 pmol/µl | 0,2 pmol/µl | 0.2 |
| Праймер R | 20 pmol/µl | 0,2 pmol/µl | 0.2 |
| dNTP | 2 mM | 0.4 mM | 4 |
| Таq-полимераза | 5U/µl | 0.0125U/µl | 0.05 |
| dH ₂ O | | | 5.55 |
| Краен обем | | | 20 |

Състав и количество на реактивите за агарозна гел-електрофореза (Табл. 3)

Таблица 3. Състав и количество на реактивите за агарозната гел електрофореза.

| Използвани реактиви | Състав | Количество | H ₂ O |
|------------------------------------|--|-----------------------------|------------------|
| 2% агарозен гел | Агароза 1x TBE буфер | 2g 10ml | До 100ml |
| 10xTBE буфер pH=8,0 | 90mM Tris HCl 90mM борна киселина 1mM Na ₂ EDTA | 108g 55g 9,52g | до1000ml |
| Етидиев бромид 10mg/ml | | 5µl | |
| Разтвор за нанасяне на пробите 10x | 0,25% бромфенолово синьо 15% Ficoll или 30% глицерол 2mM EDTA | 0,25g 15g 3g 0,74g | До 100ml |

3. МЕТОДИ

Диагностицирането и лечението на заболяването, проследяването на динамиката в състоянието и оценката на терапевтичния и клиничен изход са извършвани от лекар-психиатър и психотерапевт с 30-годишен опит в лечението на афективни разстройства и добро познаване на оценъчния инструментариум. Част от дизайна на проучването е консултиран с ръководители на сектори и клиники по психиатрия в МУ-Плевен и МУ-София, както и с водещи експерти от центрове по психиатрична фармакогеномика в Англия и Великобритания.

Диагностичните и оценъчни скали са преведени, адаптирани и валидизирани за клинично приложение при български пациенти и са свободно достъпни за използване с научноизследователски цели.

Преданалитичната обработка на биологичните материали и молекулярно-генетичният анализ на ДНК-полиморфизмите е извършван поетапно в МУ-Плевен и Център по Молекулна Медицина – гр. София (ЦММ) лично от изследователя, със съдействието на екип от експерти в ЦММ и след проведен едномесечен курс на обучение в базисни молекулярни техники и 3 курса за работа със специфичен аналитичен софтуер, подкрепени със сертификати. Визуализираните резултатите са консултирани от специалисти по молекулярна биология и биохимия към ЦММ.

Протоколите за генетичен анализ са адаптирани и тествани с участието на изследователя, с експертната подкрепа на научните ръководители и съдействието на специалисти в областта на молекулярната генетика в МУ-Плевен, ЦММ и МУ-София.

Диагностични и клинични методи

За клиничните цели на проучването са приложени следните методи:

- Полуструктурирано диагностично интервю със самостоятелно изработена Карта на пациента с 13 показателя, включващи демографски данни, диагноза по МКБ-10 и ДСН-IV-ТР, фамилна и лекарствена анамнеза, вредни навици, медикаментозна терапия на основно и придружаващи заболявания, честота и тежест на предходни епизоди; съобщени НЛР, поетапен изход от лечението и установени генетични варианти.

- Ръководство за провеждане на структурирано интервю по скалата за оценка на депресията на Хамилтън (Български превод SIGH-D: Авторско право© 1988, 1992, 1996) с разрешено възпроизвеждане от изследователи и лекари в клиники; превод на български език)

- Психометрична оценка на тежестта и хода на заболяването със Скала на Хамилтън за депресия на български език (Hamilton Rating Scale for Depression, HAM-D), в началото и периодично на 2-ра, 4-та, 6-та и 18-та седмица от лечението.

- Регистриране на нежелани лекарствени реакции с Въпросник за самооценка на странични ефекти на антидепресанти (ASEC® 2009 The Royal College of Psychiatrists), преведен и адаптиран от изследователския екип със съгласието и потвърждението на Британски Кралски колеж на психиатрите [Uher, R. et al., 2009].

Методи за оценка на терапевтичния отговор

- Динамично клинично наблюдение и оценка на състоянието от специалист.
- Медикаментозна терапия: Пароксетин филмирани таблетки 20 мг за перорално приложение в начална ДД = 20 мг еднократно дневно. Титриране на дозата до 40-50 мг, в зависимост от клиничната картина и при отсъствие на подобрение след 2-ра седмица на лечение. При проява на тежки НЛР, корекция на дозата на ½ (10 мг). Допуска се придружаващо лечение с бензодиазепини до 2-3 седмици от началото на лечението. За пациенти с придружаващи хронични заболявания, различни от критериите за изключване, се допуска прием на поддържащо лечение, което се документира.
 - Тежест на депресивен епизод по HAMD при постъпване: Липса (0-7), Лек (8-13), Умерен (14-19), Тежък (20-25), Много тежък (над 25);
Подобрение: при ≥25% редукция на HAMD след 2-ра седмица от лечението.
 - Отговор: редукция на HAMD ≥ 50% след 6-та седмица от лечението.
 - Ремисия: HAMD ≤ 7.
 - Изход от лечение след 18 седмици: пълен отговор (ремисия) при 0-7 точки; парциален отговор при 8-14 точки и незадоволителен отговор (над 15 т.)
 - Краен изход – проследяване до 6 мес. за настъпване на ремисия, парциална ремисия или неповлияване.
 - Отчитане на необходимостта от повишаване на препоръчаната в националните стандарти и от производителя терапевтична доза или промяна на медикамента.
 - Оценка на терапевтичното съдействие на пациента чрез Въпросник за самооценка на странични ефекти на антидепресанти (ASEC® 2009 The Royal College of Psychiatrists), регулярно явяване на контролни прегледи в периода на проследяване, съблюдаване на терапията или отказ от назначеното лечение.

Методи за изолиране на ДНК и молекулярно-генетичен анализ

- Изолиране на ДНК от венозна кръв с китове за изолиране на ДНК от кръв (Chemagic DNA Blood kits) чрез апаратура за изолиране с магнитни частици (Chemagic Magnetic Separation Module) по установени лабораторни протоколи и препоръки на производителя (Chemagen AG).

- ДНК-амплификация на полиморфен участък и ДНК-анализ на полиморфизми чрез стандартна полимеразна верижна реакция PCR, PCR-RFLP и 7900 Real-time PCR по съвместно адаптирани и оптимизирани протоколи в ЦММ гр София [Саръева, Цветкова, 2008; Джебир, 2011; Иванова 2011, Цвеова, 2012].

7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)

Методът TaqMan® служи за количествен анализ при генотипиране на полиморфизми и е подходящ за изследване на SNP. Съставът и количеството на използваните реактиви за TaqMan® реакция е представен в Табл. 4.

Таблица 4. Крайни концентрации на компонентите, използвани за амплификация. Успеваемостта при генотипирането в настоящото изследване е над 95%.

| Компоненти на анализа | Разреждане на SNP x 20 | Разреждане на SNP x 40 |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| PCR MIX | 2,5 mL | 2,5 mL |
| SNP mix | 0,25 mL | 0,125 mL |
| dH ₂ O | 1 mL | 1,375 mL |
| DNA | 1 mL | 1 mL |

Термален профил за всички амплификации:

Стъпка 1: 95°C за 10 мин. – 1 цикъл

Стъпка 2: 92°C за 15 сек. – 40 цикъла

60°C за 60 сек. – 40 цикъла

Кандидат-ген SLC6A4

- Определяне на 43bp ins/del (5-HTTLPR) вариант на *SLC6A4* гена по адаптиран и оптимизиран протокол с метода PCR.

- Тестване на амплифицираните фрагменти чрез агароза гел електрофореза за определяне на S и L алели на 5-HTTLPR.

- Рестрикционен анализ (RFLP) за установяване на еднонуклеотидна замяна A/G (rs25531 SNP) в промоторния регион на *SLC6A4* гена.

- Тестване на рестрикционните продукти чрез агароза гел електрофореза за определяне на LA/LG и SA/SG алели на rs25531 SNP.

- Оптимизиране на протокол за ДНК анализ на rs57098334 (STin2 VNTR) с PCR метод и приложение за установяване на тандемния повтор.

- Тестване на амплифицираните фрагменти чрез агароза гел електрофореза за определяне на STin2 VNTR варианти.

- Фотодокументация и първична обработка на данните.

Кандидат-ген CYP2D6

- Амплификация на полиморфен локус със стандартна PCR и определяне на CYP2D6*4 полиморфизми чрез алел-специфична PCR (AS-PCR).
- Тестване на амплифицираните фрагменти чрез агароза гел електрофореза за определяне на носителство на полиморфния алел.
- Фотодокументация и първична обработка на данните.

Кандидат-ген CYP2C19

- Амплификация на полиморфни локуси CYP2C19*2 и *17 по адаптиран протокол с полимеразна верижна реакция в реално време (Rotor-Gene™ 6000) , с високоразделителен метод на топене на ДНК и визуализация с флуоресцентно оцветяване при пробите на пациенти и контроли.
- Фотодокументация и първична обработка на резултатите.

Кандидат-ген 5- HTTLPR

- Секвенция на праймери за изследване на 5- HTTLPR [Wendland et al; 2006]
Прав: 5'- TCCTCCGCTTTGGCGCCTCTTCC- 3'
Обратен: 5'- TGGGGGTTGCAGGGGAGATCCTG- 3'

Качествена оценка и визуализация на продуктите

Качествената оценка е извършена след оцветяване с етидиев бромид чрез агарозна гел-електрофореза и UV-трансилюминация, последвани от фотодокументация (MINIBIS PRO) на визуализираните фрагменти (Фиг. 6).

Методи за статистическа обработка и анализ на получените резултати

Използвани са дескриптивни методи за описание и представяне на данните в таблици, графики и числови величини за относителен дял със средна стойност (стандартно отклонение SD) или медиана за интервални променливи.

Приложени са: Student's t-тест за независими извадки, еднофакторен и двуфакторен дисперсионен ANOVA анализ за значимост на междугруповите разлики, Odds ratio анализ при 95% доверителен интервал, χ^2 -тест на Пирсън и тест на Фишер (за малки проби) за изследване на зависимости. . Извършен е регресионен анализ на всички комбинации на ковариант и генетичен фактор.

Възприето е ниво на значимост на тестовете $p < 0.05$ ($\alpha = 95\%$). Обработката на данните е извършена със статистически софтуер Statgraphics plus for Windows, IBM SPSS Statistics 19.0, MS Excell (2010) и PLINK 1.9.

4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

4.1. Социодемографски и клинични характеристики

Селектирана беше таргетна група пациенти $n=100$ (мъже и жени) с диагноза рекурентно депресивно разстройство по ДСН-IV-ТР – с умерено изразен до тежък рекурентен епизод без психотични симптоми, лекувани със СИСТ и отговарящи на установените критерии за подбор. Възраст: 45.58 ± 11.08 ; мъже $n=31$, жени $n=69$.

В хода на наблюдението, след втората седмица от лечението, един от пациентите отключи антидепресант-асоциирана мания, терапията беше променена, а участникът беше изключен от проучването, с което размерът на извадката се редуцира на 99 пациенти.

В контролната група лица без психични заболявания бяха включени 142 лица, съответстващи по пол и възраст на групата пациенти. Възраст: 47.54 ± 12.08 ; мъже $n=49$, жени $n=93$. Мъжете и жените са разпределени с напълно съизмерим относителен дял при пациентите и контролите ($\chi^2=0,468$; $p=0,577$). Контролите са средно с 2,4 години по-възрастни, но тестът показва недостоверна разлика ($t=-1,55$; $p>0,05$).

Разпределение на пациенти и контроли по социодемографски показатели и проучвани клинични и придружаващи фактори (Табл. 5-18).

Таблица 5. Разпределение на пациентите и контролите по пол.

| Пол | Пациенти | Контроли | Общо |
|-----------|----------|----------|--------|
| Мъже брой | 30 | 49 | 79 |
| % | 30,3% | 34,5% | 32,8% |
| Жени брой | 69 | 93 | 162 |
| % | 69,7% | 65,5% | 67,2% |
| Общо | | | |
| Брой | 99 | 142 | 241 |
| % | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Таблица 6. Разпределение на пациентите по семеен статус.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-----------|------|------|-----------|---------------|
| Семеен | 78 | 32,4 | 78,8 | 78,8 |
| Несемеен | 11 | 4,6 | 11,1 | 89,9 |
| Разведен | 8 | 3,3 | 8,1 | 98,0 |
| Вдовец | 2 | ,8 | 2,0 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 7. Разпределение на пациентите по образователен ценз.

| Образование | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-------------|------|------|-----------|---------------|
| Основно | 2 | ,8 | 2,0 | 2,0 |
| Средно | 57 | 23,7 | 57,6 | 59,6 |
| Висше | 21 | 8,7 | 21,2 | 80,8 |
| друго | 19 | 7,9 | 19,2 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 8. Разпределение на пациентите по местоживеене.

| Местоживеене | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|--------------|------|------|-----------|---------------|
| Град | 66 | 27,4 | 66,7 | 66,7 |
| Село | 15 | 6,2 | 15,2 | 81,8 |
| Друго | 18 | 7,5 | 18,2 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 9. Разпределение на пациентите по трудова заетост.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|------------|------|------|-----------|---------------|
| Работещ | 70 | 29,0 | 70,7 | 70,7 |
| Безработен | 10 | 4,1 | 10,1 | 80,8 |
| Учащ | 6 | 2,5 | 6,1 | 86,9 |
| Пенсионер | 13 | 5,4 | 13,1 | 100,0 |

Таблица 10. Разпределение на пациентите по фактор „тютюнопушене“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|------------------------------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 55 | 22,8 | 55,6 | 55,6 |
| Епизодично (до 10 ц./ден) | 22 | 9,1 | 22,2 | 77,8 |
| По 1 к./ден | 21 | 8,7 | 21,2 | 99,0 |
| Над 1 к./ден | 1 | 2,4 | 1,0 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100 | |

Таблица 11. Разпределение на пациентите по фактор „употреба на алкохол“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|------------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 58 | 24,1 | 58,6 | 58,6 |
| Епизодично | 31 | 12,9 | 31,3 | 89,9 |
| Регулярно | 9 | 3,7 | 9,1 | 99,0 |
| Ексцесивно | 1 | ,4 | 1,0 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 12. Разпределение на пациентите по фактор „стресогенни събития“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|----------------------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 55 | 22,8 | 55,6 | 55,6 |
| Остра психотравма | 30 | 12,4 | 30,3 | 85,9 |
| Хронична психотравма | 14 | 5,8 | 14,1 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 13. Разпределение на пациентите по фактор „суицидни тенденции“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|---------------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 91 | 37,8 | 91,9 | 91,9 |
| Да | 7 | 2,9 | 7,1 | 99,0 |
| Суициден опит | 1 | ,4 | 1,0 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 14. Разпределение на пациентите по фактор „хоспитализации“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|--------------------|------|------|-----------|---------------|
| Без хоспитализации | 95 | 39,4 | 96,0 | 96,0 |
| С хоспитализация | 4 | 1,7 | 4,0 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 15: Разпределение на пациентите по фактор „честа смяна на АД“.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-----------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 56 | 23,2 | 56,6 | 56,6 |
| Да | 43 | 17,8 | 43,4 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 16: Разпределение на пациентите по предходна анамнеза за НЛР.

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-----------|------|------|-----------|---------------|
| Не | 60 | 24,9 | 60,6 | 60,6 |
| Да | 39 | 16,2 | 39,4 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

Таблица 17: Разпределение на пациентите по брой на депресивните епизоди

| Категории | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-----------|------|------|-----------|---------------|
| 1 | 4 | 1,7 | 4,1 | 4,1 |
| 2 | 44 | 18,3 | 44,9 | 49,0 |
| 3 | 27 | 11,2 | 27,6 | 76,5 |
| 4 | 13 | 5,4 | 13,3 | 89,8 |
| 5 | 6 | 2,5 | 6,1 | 95,9 |
| 6 | 4 | 1,7 | 4,1 | 100,0 |
| Общо | 98 | 40,7 | 100,0 | |

Таблица 18. Телесно тегло (BMI).

| Категории BMI | Брой | % | Валиден % | Кумулативен % |
|-----------------------|------|------|-----------|---------------|
| Норма | 54 | 22,4 | 54,5 | 54,5 |
| Наднормено тел. тегло | 36 | 14,9 | 36,4 | 90,9 |
| Затлъстяване | 9 | 3,7 | 9,1 | 100,0 |
| Общо | 99 | 41,1 | 100,0 | |

4.2. Резултати от статистически анализ на полиморфизми на кандидат-гени

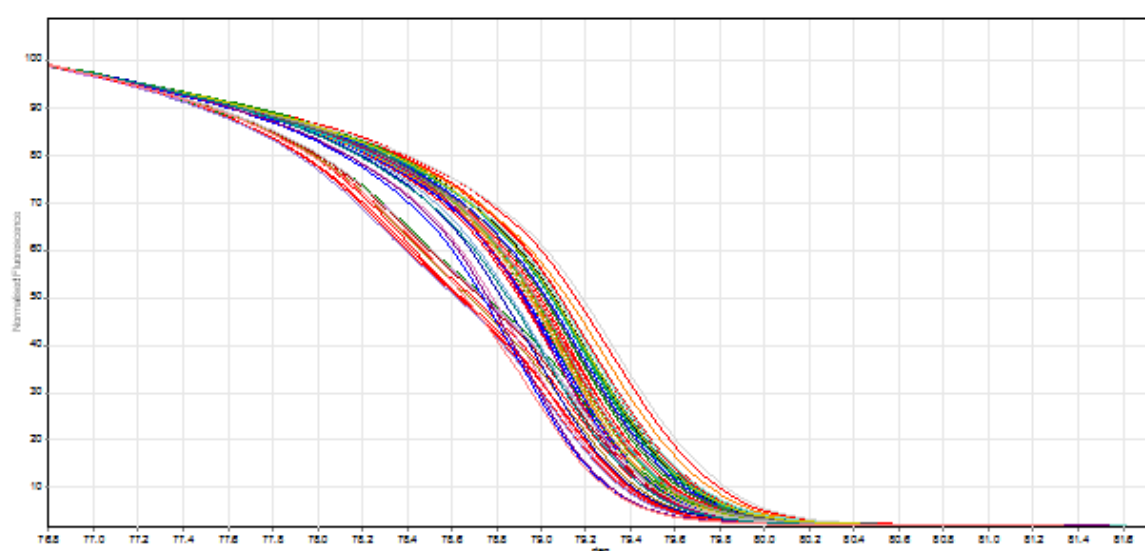
Общи положения при проведения анализ: За значими бяха приети стойности на p под 0.05 ($\alpha = 95\%$).

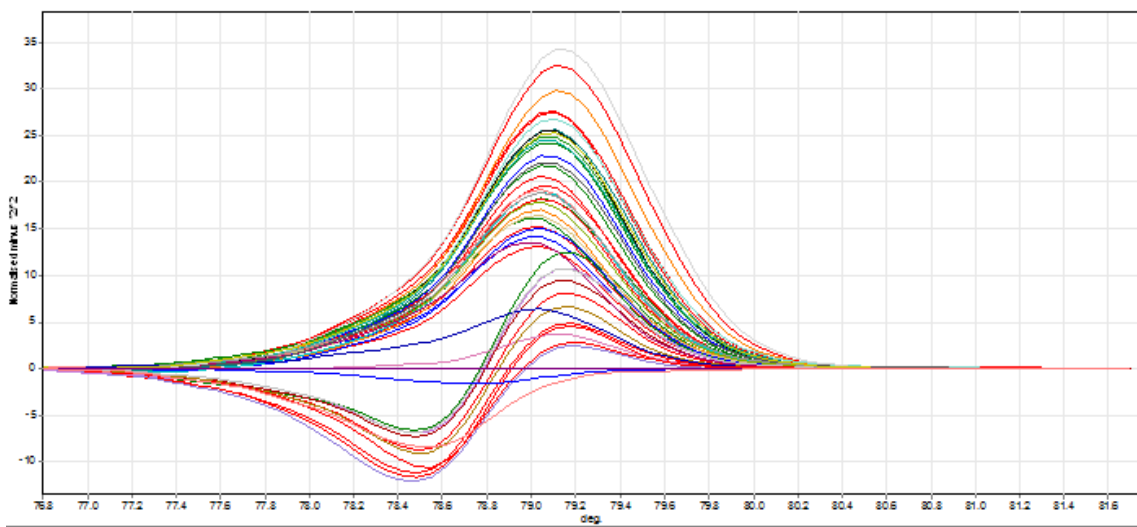
Проверка за отклонения от закона на Харди-Вайнберг

За определяне на биалелните генетични варианти, които могат да се използват за по-нататъшен анализ без въвеждане на изкривяване или големи неточности, се извърши оценка на съответствието на данните с очакванията според закона на Харди-Вайнберг. Проверката за разлика между очаквания и наблюдавания брой хетерозиготи в изследваната извадка не показва значими отклонения, което позволява заключението, че изследваните варианти са в равновесие и са информативни.

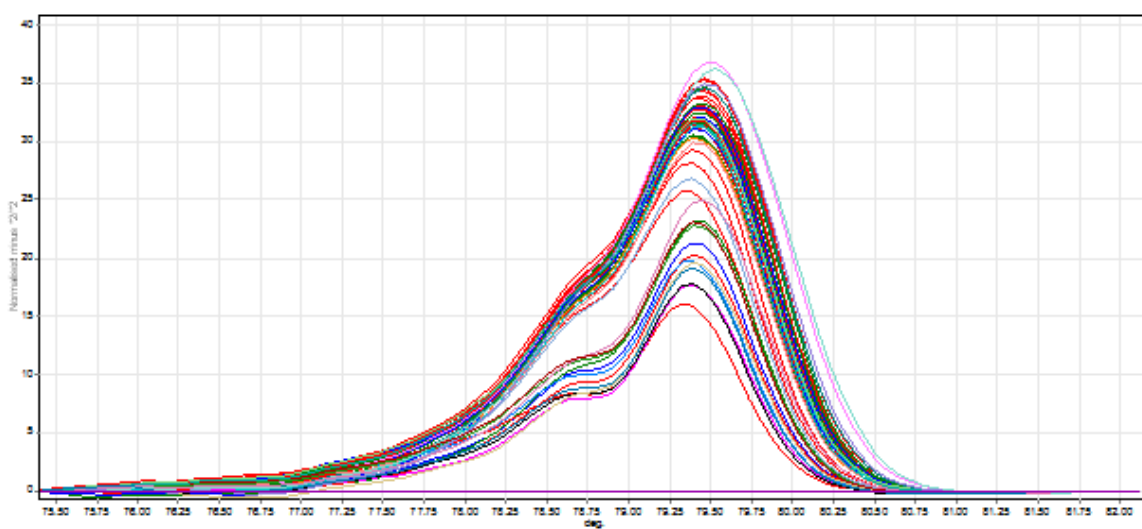
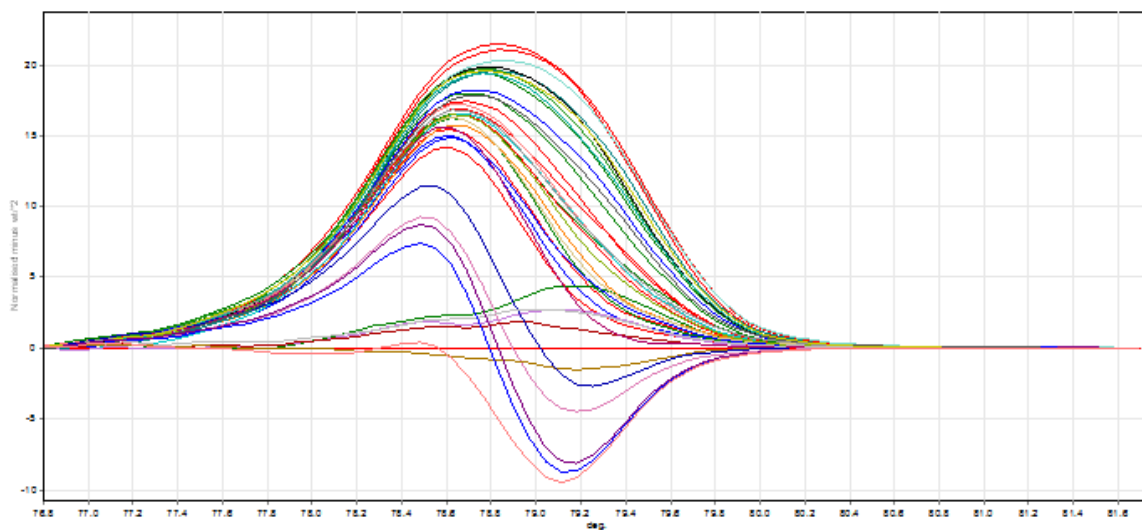
Качествена оценка и визуализация на продуктите

CYP2C19 ген (полиморфизми *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17*) (Фиг. 8, 9)





Фиг. 8. Визуализация на продуктите от HRM анализ на *CYP2C19*2* при контроли.

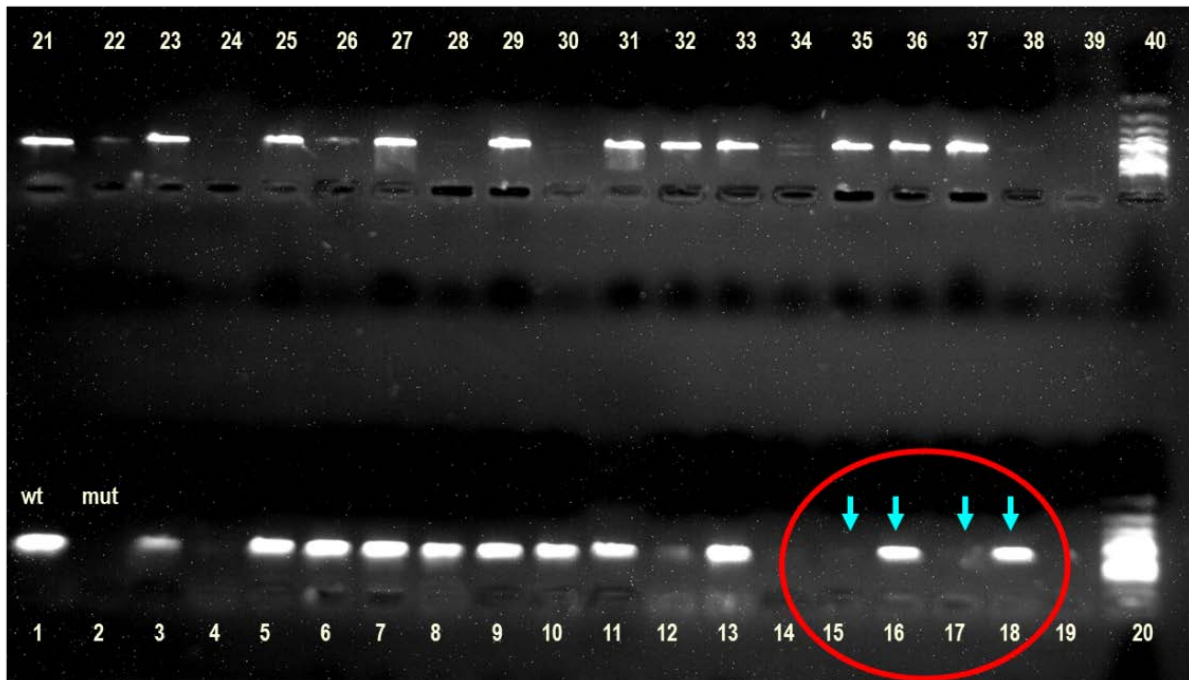


Фиг. 9. Визуализация на продуктите от HRM анализ на *CYP2C19*2* при пациенти.

CYP2D6 ген (CYP2D6*4)

Fig. 1: Gel electrophoresis paired pattern of allele-specific PCR products from CYP2D6*4 variant allele amplification for 18 different patients.

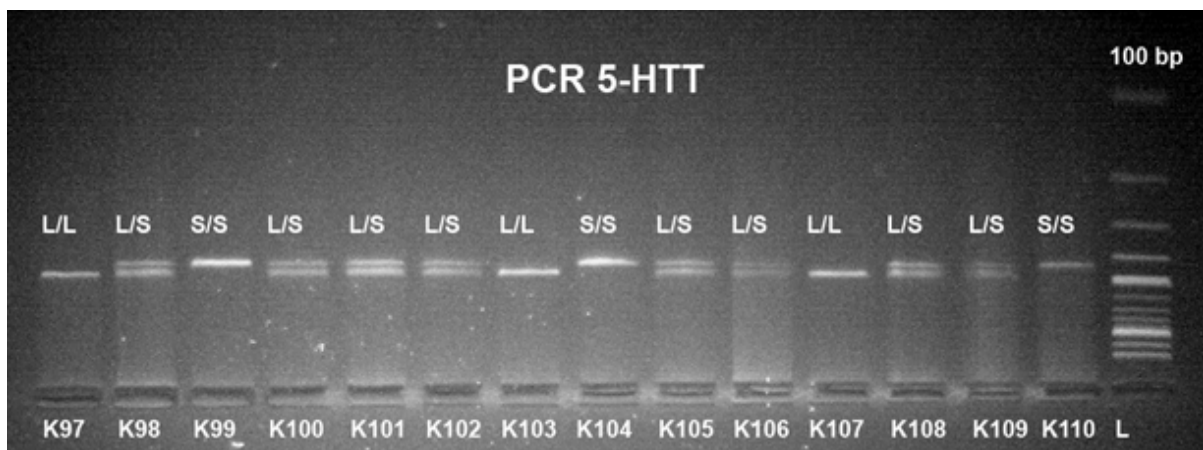
Lanes 1-8 and 11-18: patient patterns; lanes 9 and 19: negative controls, lanes 20 and 40 : 1kb DNA Ladder markers.



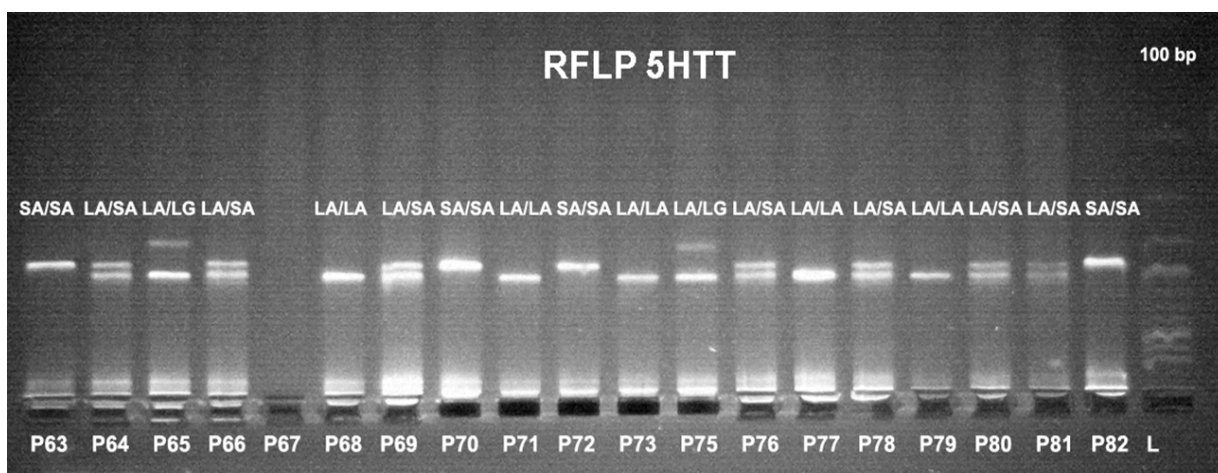
Lanes 15-16 and 17-18: -/mut PM (homozygous poor metabolizer)

Фиг 10. Алел-специфичен PCR на CYP2D6*4 при пациенти.

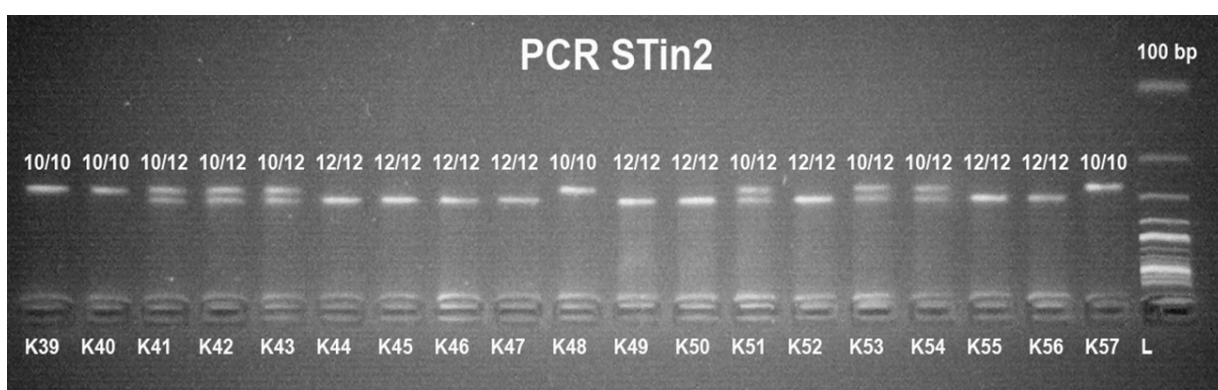
- SLC6A4 ген (полиморфизми 5-HTTLPR, STin2) (Фиг. 11-14)



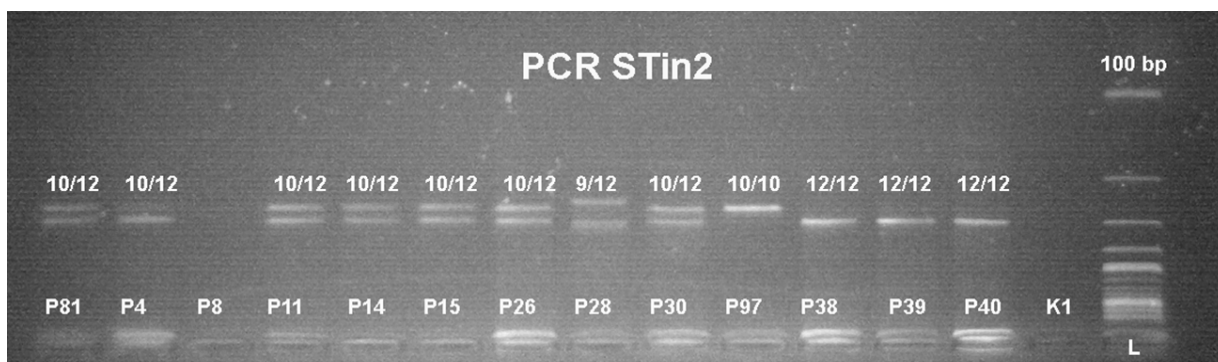
Фиг. 11. Визуализация на продуктите от ДНК амплификация на 5-HTTLPR.



Фиг. 12. Визуализация на продуктите от RFLP на rs25531 SNP при пациенти.



Фиг. 13. Визуализация на продуктите от PCR на STin2 при контроли.



Фиг. 14. Визуализация на продуктите от PCR на STin2 при пациенти.

Сравнителен анализ на алелната и генотипна честота на изследваните полиморфизми при пациенти и контроли

CYP2C19 ген

За сравнение на честотите беше използван стандартен хи-квадрат тест. Честотите на редките алели в извадката не показаха значима разлика между групата на контролите и тази на пациентите с изключение на *CYP2C19*17* ($p=0.02824$, $OR=0.6082$, протективен алел).

Полиморфизъм CYP2C19*2

Резултатите от генотипните и алелни честоти са представени в Табл. 19.

Таблица 19: Сравнение на честотата на алел CYP2C19*2 при пациенти и контроли.

| Контроли | Брой | Честота | Пациенти | Брой | Честота |
|--------------|-----------|---------------|----------|------|---------|
| wt/wt | 106 | 0,75 | wt/wt | 76 | 0,76 |
| wt/*2 | 32 | 0,23 | wt/*2 | 24 | 0,24 |
| *2/*2 | 4 | 0,03 | *2/*2 | 0 | 0 |
| | 142 | | | 100 | |
| wt | 242 | 0,85 | wt | 176 | 0,88 |
| *2 | 42 | 0,15 | *2 | 24 | 0,12 |
| | 284 | | | 200 | |
| Контроли | | | Пациенти | | |
| wt/wt | Присъства | Отсъства | wt/wt | Да | Не |
| | 106 | 36 | | 76 | 24 |
| P_pearson | 0,8 | | | | |
| P one-tailed | 0,46 | | | | |
| P two-tailed | 0,88 | | | | |
| Odds ratio | 1,0755 | 0.5934-1.9491 | | | |
| wt/*2 | Присъства | Отсъства | wt/*2 | Да | Не |
| | 32 | 110 | | 24 | 76 |
| P_pearson | | | | | |
| P one-tailed | 0,45 | | | | |
| P two-tailed | 0,87 | | | | |
| Odds ratio | 0,79 | 0.593-1.9872 | | | |
| *2/*2 | Присъства | Отсъства | *2/*2 | Да | Не |
| | 4 | 138 | | 0 | 100 |
| P_pearson | | | | | |
| P one-tailed | 0,11 | | | | |
| P two-tailed | 0,14 | | | | |
| Odds ratio | 0 | | | | |

| | | | | | |
|--------------|-----------|---------------|-----------|-----|-----|
| wt | Присъства | Отсъства | wt | yes | no |
| | 242 | 42 | | 176 | 24 |
| P_pearson | 0,38 | | | | |
| P one-tailed | 0,4 | | | | |
| P two-tailed | 0,2 | | | | |
| Odds ratio | 1,2727 | 0.7433-2.1792 | | | |
| | | | | | |
| *2 | Присъства | Отсъства | *2 | Да | Не |
| | 42 | 242 | | 24 | 176 |
| P_pearson | 0,38 | | | | |
| P one-tailed | 0,4 | | | | |
| P two-tailed | 0,2 | | | | |
| Odds ratio | 0,7857 | 0.4589-1.3453 | | | |
| | | | | | |

Полиморфизъм CYP2C19*17

Резултатите от генотипните и алелни честоти са представени в Табл. 20.

Таблица 20. Сравнение на генотипните и алелни честоти на CYP2C19*17 при пациенти и контроли.

| | | | | | |
|----------------|-----------|---------------|----------------|------|---------|
| Контроли | Брой | Честота | Пациенти | Брой | Честота |
| wt/wt | 69 | 0,49 | wt/wt | 64 | 0,64 |
| wt/*17 | 65 | 0,46 | wt/*17 | 36 | 0,36 |
| *17/*17 | 8 | 0,06 | *17/*17 | 0 | 0 |
| | 142 | | | 100 | |
| wt | 203 | 0,71 | wt | 168 | 0,82 |
| *17 | 81 | 0,29 | *17 | 36 | 0,18 |
| | 284 | | | 204 | |
| Контроли | | | Patients | | |
| wt/wt | Присъства | Отсъства | wt/wt | Да | Не |
| | 69 | 73 | | 64 | 36 |
| P_pearson | 0.017 | | | | |
| P one-tailed | 0.012 | | | | |
| P two-tailed | 0.018 | | | | |
| Odds ratio | 1,88 | 1.1132-3.1777 | | | |
| | | | | | |

| | | | | | |
|----------------|-----------|---------------|----------------|-----|-----|
| wt/*17 | Присъства | Отсъства | wt/*17 | yes | no |
| | 65 | 73 | | 36 | 64 |
| P_pearson | 0.08 | | | | |
| P one-tailed | 0.057 | | | | |
| P two-tailed | 0.1 | | | | |
| Odds ratio | 0.6317 | 0.3727-1.0708 | | | |
| | | | | | |
| *17/*17 | Присъства | Отсъства | *17/*17 | yes | no |
| | 8 | 134 | | 0 | 100 |
| P_pearson | | | | | |
| P one-tailed | 0.01 | | | | |
| P two-tailed | 0.02 | | | | |
| Odds ratio | 0 | | | | |
| | | | | | |
| wt | Присъства | Отсъства | wt | yes | no |
| | 203 | 81 | | 168 | 36 |
| P_pearson | 0.0055 | | | | |
| P one-tailed | 0.007 | | | | |
| P two-tailed | 0.03 | | | | |
| Odds ratio | 1,86 | 1,1961-2,8989 | | | |
| | | | | | |
| *17 | Присъства | Отсъства | *17 | yes | no |
| | 81 | 203 | | 36 | 168 |
| P_pearson | 0.0055 | | | | |
| P one-tailed | 0.007 | | | | |
| P two-tailed | 0.03 | | | | |
| Odds ratio | 0.537 | 0.345-0.8361 | | | |
| | | | | | |

STin2-P

Не бяха установени статистически значими разлики в честотата на полиморфизмите при пациенти и контроли в групата на мъжете. При проверка на хипотезата в групата на жените, беше установена статистически значима по-висока честота на алел 9 при пациентите от женски пол $p < 0,01$.

Резултатите от сравнението на генотипните и алелни честоти на полиморфизми на *STin2-P* при пациенти и контроли са представени в Табл. 21.

Таблица 21. Сравнение на генотипните и алелни честоти на полиморфизми на *STin2-P* при пациенти и контроли.

| Контроли | Брой | % | | Пациенти | Брой | % |
|----------|------|---------|--|----------|------|---------|
| 12_12 | 51 | 37,23% | | 12_12 | 32 | 32,00% |
| 10_12 | 68 | 49,64% | | 10_12 | 43 | 43,00% |
| 10_10 | 18 | 13,14% | | 10_10 | 20 | 20,00% |
| 9_10 | 0 | 0,00% | | 9_10 | 3 | 3,00% |
| 9_12 | 0 | 0,00% | | 9_12 | 2 | 2,00% |
| | 137 | 100,00% | | | 100 | 100,00% |
| 12 | 170 | 62,04% | | 12 | 109 | 54,50% |
| 10 | 104 | 37,96% | | 10 | 86 | 43,00% |
| 9 | 0 | 0 | | 9 | 5 | 2,50% |
| | 274 | 100,00% | | | 200 | 100,00% |

Контроли

Пациенти

| 12_12 | присъства | отсъства | | 12_12 | присъства | отсъства | |
|--------------|-----------|---------------|-----|-------|-----------|----------|-----|
| | 51 | 86 | 137 | | 32 | 68 | 100 |
| P one-tailed | 0.2 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.4 | | | | | | |
| Odds ratio | 0.7935 | 0.4603-1.3679 | | | | | |
| 10_12 | присъства | отсъства | | 10_12 | присъства | отсъства | |
| | 68 | 69 | 137 | | 43 | 57 | 100 |
| P one-tailed | 0.18 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.35 | | | | | | |
| Odds ratio | 0.7655 | 0.4557-1.2857 | | | | | |
| 10_10 | присъства | отсъства | | 10_10 | присъства | отсъства | |
| | 18 | 119 | 137 | | 20 | 80 | 100 |
| P one-tailed | 0.1 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.2 | | | | | | |
| Odds ratio | 1,65 | 0.8232-3.3183 | | | | | |

| | | | | | | | |
|--------------|-----------|---------------|-----|------|-----------|----------|-----|
| 9_10 | присъства | отсъства | | 9_10 | присъства | отсъства | |
| | 0 | 137 | 137 | | 3 | 97 | 100 |
| P one-tailed | 0.07 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.07 | | | | | | |
| Odds ratio | Infinity | NaN-Infinity | | | | | |
| 9_12 | присъства | отсъства | | 9_12 | присъства | отсъства | |
| | 0 | 137 | 137 | | 2 | 98 | 100 |
| P one-tailed | 0.17 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.17 | | | | | | |
| Odds ratio | Infinity | NaN-Infinity | | | | | |
| 12 | присъства | отсъства | | 12 | присъства | отсъства | |
| | 170 | 104 | 274 | | 109 | 91 | 200 |
| P one-tailed | 0.06 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.1 | | | | | | |
| Odds ratio | 0.7328 | 0.5061-1.061 | | | | | |
| 10 | присъства | отсъства | | 10 | присъства | отсъства | |
| | 104 | 170 | 274 | | 86 | 114 | 200 |
| P one-tailed | 0.15 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.29 | | | | | | |
| Odds ratio | 1,23 | 0.8506-1.7877 | | | | | |
| 9 | присъства | отсъства | | 9 | присъства | отсъства | |
| | 0 | 274 | 274 | | 5 | 195 | 200 |
| P one-tailed | 0.01 | | | | | | |
| P two-tailed | 0.01 | | | | | | |
| Odds ratio | Infinity | NaN-Infinity | | | | | |

При проверка на хипотезата в групата на жените, беше установена статистически значима по-висока честота на алел 9 при пациентите от женски пол ($p < 0,01$).

Изследване на модели на действие на разглежданите генетични варианти

При асоциативния анализ на генетичните варианти с конкретни клинични характеристики бяха разгледани четири основни модела - генотипен, алелен, доминантен и рецесивен. Беше използван точният тест на Фишър, тъй като групите в някои случаи са малки и тестове като хи-квадрат не дават достоверни резултати в такива условия.

Асоциативното проучване не показва данни за асоциация на промоторния полиморфизъм 5-HTTLPR с рекурентно депресивно разстройство в изследваната извадка от пациенти. При сравняване на алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли не са установени статистически значими разлики при тесен и широк фенотипен модел (Табл. 20).

Динамиката на подобрението в клиничното състояние и в субективната оценка на НЛР за периода са представени на фиг. 14. и фиг.15.

Таблица 22. Сравняване на алелните и генотипни честоти на 5-HTTLPR полиморфизми между пациенти и контроли.

| CHR | SNP | A1 | A2 | TEST | AFF | UNAFF | P |
|-----|------------|----|----|---------|---------|----------|--------|
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | GENO | 0/8/32 | 0/15/44 | 0.6309 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | TREND | 8/72 | 15/103 | 0.5306 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | ALLELIC | 8/72 | 15/103 | 0.6545 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | DOM | 8/32 | 15/44 | 0.6309 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | REC | 0/40 | 0/59 | 1 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | GENO | 1/10/29 | 1/22/36 | 0.4289 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | TREND | 12/68 | 24/94 | 0.3173 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | ALLELIC | 12/68 | 24/94 | 0.3563 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | DOM | 11/29 | 23/36 | 0.2843 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | REC | 1/39 | 1/58 | 1 |
| 11 | rs6265 | T | C | GENO | 2/12/26 | 2/15/42 | 0.6975 |
| 11 | rs6265 | T | C | TREND | 16/64 | 19/99 | 0.4937 |
| 11 | rs6265 | T | C | ALLELIC | 16/64 | 19/99 | 0.5696 |
| 11 | rs6265 | T | C | DOM | 14/26 | 17/42 | 0.518 |
| 11 | rs6265 | T | C | REC | 2/38 | 2/57 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | GENO | 3/15/22 | 2/19/38 | 0.5056 |
| 11 | rs16917237 | T | G | TREND | 21/59 | 23/95 | 0.2632 |
| 11 | rs16917237 | T | G | ALLELIC | 21/59 | 23/95 | 0.2976 |
| 11 | rs16917237 | T | G | DOM | 18/22 | 21/38 | 0.4044 |
| 11 | rs16917237 | T | G | REC | 3/37 | 2/57 | 0.3909 |
| 11 | rs12273363 | C | T | GENO | 1/7/31 | 1/15/43 | 0.6701 |
| 11 | rs12273363 | C | T | TREND | 9/69 | 17/101 | 0.567 |
| 11 | rs12273363 | C | T | ALLELIC | 9/69 | 17/101 | 0.6691 |
| 11 | rs12273363 | C | T | DOM | 8/31 | 16/43 | 0.4842 |
| 11 | rs12273363 | C | T | REC | 1/38 | 1/58 | 1 |
| 17 | 5HTTP | S | L | GENO | 6/17/17 | 13/26/20 | 0.5954 |
| 17 | 5HTTP | S | L | TREND | 29/51 | 52/66 | 0.2955 |
| 17 | 5HTTP | S | L | ALLELIC | 29/51 | 52/66 | 0.3042 |
| 17 | 5HTTP | S | L | DOM | 23/17 | 39/20 | 0.4051 |
| 17 | 5HTTP | S | L | REC | 6/34 | 13/46 | 0.4443 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | GENO | 5/10/25 | 3/23/33 | 0.2078 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | TREND | 20/60 | 29/89 | 0.9486 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | ALLELIC | 20/60 | 29/89 | 1 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | DOM | 15/25 | 26/33 | 0.5401 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | REC | 5/35 | 3/56 | 0.2628 |

Таблица 23. Сравняване на алелните и генотипни честоти на пациенти по фактор „честа смяна на антидепресанти“.

| CHR | SNP | A1 | A2 | TEST | AFF | UNAFF | P |
|-----|------------|----|----|---------|---------|----------|--------|
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | GENO | 0/8/35 | 0/15/41 | 0.472 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | TREND | 8/78 | 15/97 | 0.3394 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | ALLELIC | 8/78 | 15/97 | 0.5029 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | DOM | 8/35 | 15/41 | 0.472 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | REC | 0/43 | 0/56 | 1 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | GENO | 0/14/29 | 2/18/36 | 0.6411 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | TREND | 14/72 | 22/90 | 0.5245 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | ALLELIC | 14/72 | 22/90 | 0.5817 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | DOM | 14/29 | 20/36 | 0.8321 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | REC | 0/43 | 2/54 | 0.5036 |
| 11 | rs6265 | T | C | GENO | 1/11/31 | 3/16/37 | 0.7572 |
| 11 | rs6265 | T | C | TREND | 13/73 | 22/90 | 0.4221 |
| 11 | rs6265 | T | C | ALLELIC | 13/73 | 22/90 | 0.4561 |
| 11 | rs6265 | T | C | DOM | 12/31 | 19/37 | 0.6625 |
| 11 | rs6265 | T | C | REC | 1/42 | 3/53 | 0.6306 |
| 11 | rs16917237 | T | G | GENO | 1/18/24 | 4/16/36 | 0.3225 |
| 11 | rs16917237 | T | G | TREND | 20/66 | 24/88 | 0.7599 |
| 11 | rs16917237 | T | G | ALLELIC | 20/66 | 24/88 | 0.8633 |
| 11 | rs16917237 | T | G | DOM | 19/24 | 20/36 | 0.4141 |
| 11 | rs16917237 | T | G | REC | 1/42 | 4/52 | 0.3843 |
| 11 | rs12273363 | C | T | GENO | 1/7/34 | 1/15/40 | 0.496 |
| 11 | rs12273363 | C | T | TREND | 9/75 | 17/95 | 0.3676 |
| 11 | rs12273363 | C | T | ALLELIC | 9/75 | 17/95 | 0.4017 |
| 11 | rs12273363 | C | T | DOM | 8/34 | 16/40 | 0.3457 |
| 11 | rs12273363 | C | T | REC | 1/41 | 1/55 | 1 |
| 17 | 5HTTP | S | L | GENO | 8/20/15 | 11/23/22 | 0.8653 |
| 17 | 5HTTP | S | L | TREND | 36/50 | 45/67 | 0.8202 |
| 17 | 5HTTP | S | L | ALLELIC | 36/50 | 45/67 | 0.8843 |
| 17 | 5HTTP | S | L | DOM | 28/15 | 34/22 | 0.6807 |
| 17 | 5HTTP | S | L | REC | 8/35 | 11/45 | 1 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | GENO | 3/12/28 | 5/21/30 | 0.5519 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | TREND | 18/68 | 31/81 | 0.2995 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | ALLELIC | 18/68 | 31/81 | 0.3204 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | DOM | 15/28 | 26/30 | 0.3051 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | REC | 3/40 | 5/51 | 1 |

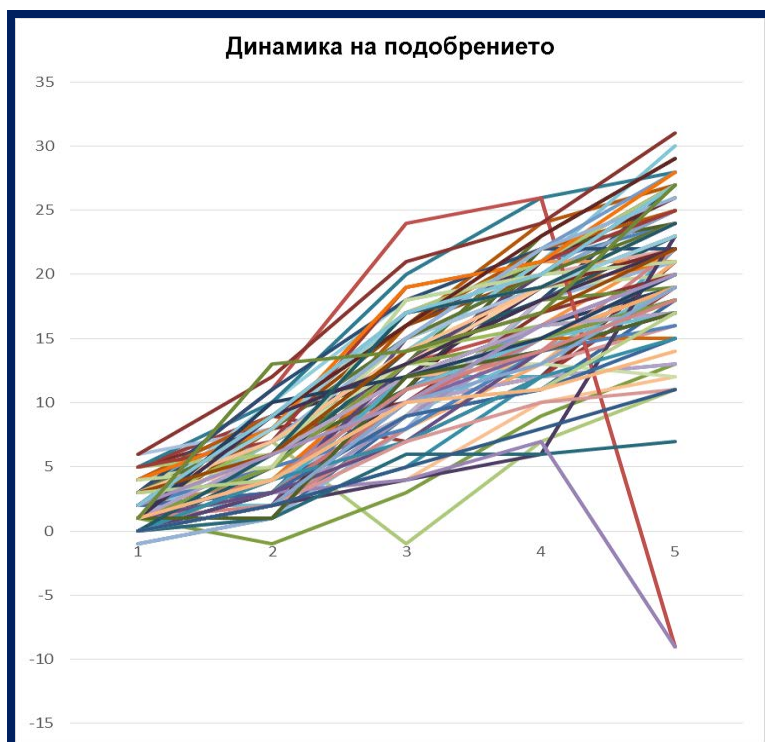
Таблица 24. Сравняване на алелните и генотипни честоти на пациенти по фактор „НЛР при предходно лечение с АД.

| CHR | SNP | A1 | A2 | TEST | AFF | UNAFF | P |
|-----|------------|----|----|---------|---------|----------|--------|
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | GENO | 0/8/31 | 0/15/45 | 0.6364 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | TREND | 8/70 | 15/105 | 0.6055 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | ALLELIC | 8/70 | 15/105 | 0.8209 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | DOM | 8/31 | 15/45 | 0.6364 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | REC | 0/39 | 0/60 | 1 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | GENO | 0/11/28 | 2/21/37 | 0.4738 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | TREND | 11/67 | 25/95 | 0.2094 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | ALLELIC | 11/67 | 25/95 | 0.262 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | DOM | 11/28 | 23/37 | 0.3873 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | REC | 0/39 | 2/58 | 0.5176 |
| 11 | rs6265 | T | C | GENO | 1/12/26 | 3/15/42 | 0.7493 |
| 11 | rs6265 | T | C | TREND | 14/64 | 21/99 | 0.9375 |
| 11 | rs6265 | T | C | ALLELIC | 14/64 | 21/99 | 1 |
| 11 | rs6265 | T | C | DOM | 13/26 | 18/42 | 0.8253 |
| 11 | rs6265 | T | C | REC | 1/38 | 3/57 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | GENO | 1/17/21 | 4/17/39 | 0.293 |
| 11 | rs16917237 | T | G | TREND | 19/59 | 25/95 | 0.5611 |
| 11 | rs16917237 | T | G | ALLELIC | 19/59 | 25/95 | 0.6018 |
| 11 | rs16917237 | T | G | DOM | 18/21 | 21/39 | 0.2978 |
| 11 | rs16917237 | T | G | REC | 1/38 | 4/56 | 0.6455 |
| 11 | rs12273363 | C | T | GENO | 0/7/31 | 2/15/43 | 0.4732 |
| 11 | rs12273363 | C | T | TREND | 7/69 | 19/101 | 0.1882 |
| 11 | rs12273363 | C | T | ALLELIC | 7/69 | 19/101 | 0.2025 |
| 11 | rs12273363 | C | T | DOM | 7/31 | 17/43 | 0.338 |
| 11 | rs12273363 | C | T | REC | 0/38 | 2/58 | 0.5203 |
| 17 | 5HTTP | S | L | GENO | 7/18/14 | 12/25/23 | 0.8944 |
| 17 | 5HTTP | S | L | TREND | 32/46 | 49/71 | 0.9796 |
| 17 | 5HTTP | S | L | ALLELIC | 32/46 | 49/71 | 1 |
| 17 | 5HTTP | S | L | DOM | 25/14 | 37/23 | 0.8348 |
| 17 | 5HTTP | S | L | REC | 7/32 | 12/48 | 1 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | GENO | 2/12/25 | 6/21/33 | 0.5643 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | TREND | 16/62 | 33/87 | 0.2896 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | ALLELIC | 16/62 | 33/87 | 0.3134 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | DOM | 14/25 | 27/33 | 0.4092 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | REC | 2/37 | 6/54 | 0.4742 |

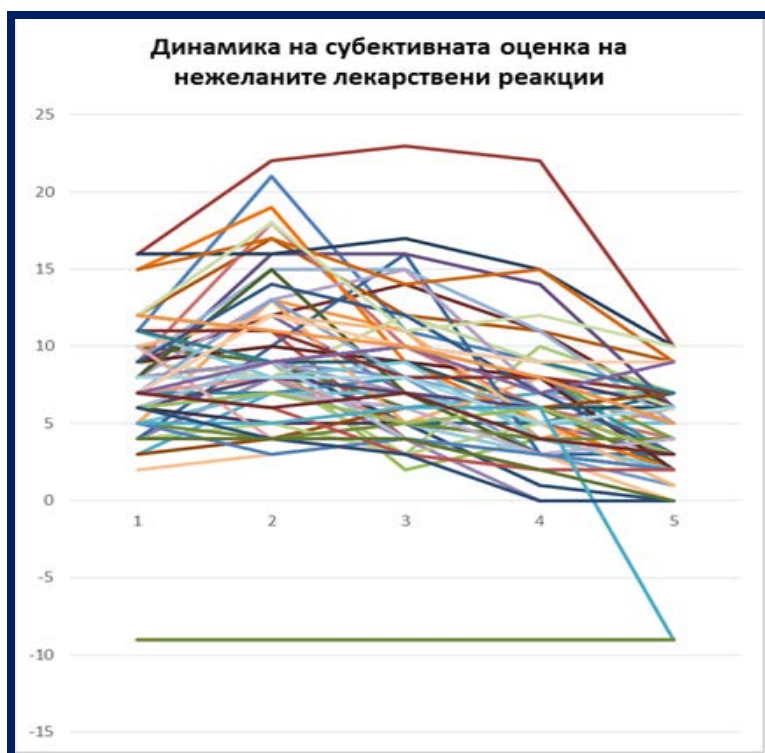
Таблица 25. Сравняване на алелните и генотипни честоти на пациенти по фактор „отсъствие на задоволителен отговор.

| CHR | SNP | A1 | A2 | TEST | AFF | UNAFF | P |
|-----|------------|----|----|---------|-------|----------|--------|
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | GENO | 0/2/3 | 0/21/73 | 0.3291 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | TREND | 2/8 | 21/167 | 0.3622 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | ALLELIC | 2/8 | 21/167 | 0.3272 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | DOM | 2/3 | 21/73 | 0.3291 |
| 10 | CYP2C19_2 | 2 | wt | REC | 0/5 | 0/94 | 1 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | GENO | 0/3/2 | 2/29/63 | 0.3942 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | TREND | 3/7 | 33/155 | 0.2982 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | ALLELIC | 3/7 | 33/155 | 0.3928 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | DOM | 3/2 | 31/63 | 0.3355 |
| 10 | CYP2C19_17 | 17 | wt | REC | 0/5 | 2/92 | 1 |
| 11 | rs6265 | T | C | GENO | 0/2/3 | 4/25/65 | 0.6926 |
| 11 | rs6265 | T | C | TREND | 2/8 | 33/155 | 0.848 |
| 11 | rs6265 | T | C | ALLELIC | 2/8 | 33/155 | 0.6911 |
| 11 | rs6265 | T | C | DOM | 2/3 | 29/65 | 0.647 |
| 11 | rs6265 | T | C | REC | 0/5 | 4/90 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | GENO | 0/2/3 | 5/32/57 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | TREND | 2/8 | 42/146 | 0.8627 |
| 11 | rs16917237 | T | G | ALLELIC | 2/8 | 42/146 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | DOM | 2/3 | 37/57 | 1 |
| 11 | rs16917237 | T | G | REC | 0/5 | 5/89 | 1 |
| 11 | rs12273363 | C | T | GENO | 0/2/3 | 2/20/71 | 0.39 |
| 11 | rs12273363 | C | T | TREND | 2/8 | 24/162 | 0.5243 |
| 11 | rs12273363 | C | T | ALLELIC | 2/8 | 24/162 | 0.6248 |
| 11 | rs12273363 | C | T | DOM | 2/3 | 22/71 | 0.5934 |
| 11 | rs12273363 | C | T | REC | 0/5 | 2/91 | 1 |
| 17 | 5HTTP | S | L | GENO | 0/3/2 | 19/40/35 | 0.7189 |
| 17 | 5HTTP | S | L | TREND | 3/7 | 78/110 | 0.4927 |
| 17 | 5HTTP | S | L | ALLELIC | 3/7 | 78/110 | 0.5312 |
| 17 | 5HTTP | S | L | DOM | 3/2 | 59/35 | 1 |
| 17 | 5HTTP | S | L | REC | 0/5 | 19/75 | 0.5799 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | GENO | 0/3/2 | 8/30/56 | 0.5765 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | TREND | 3/7 | 46/142 | 0.7071 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | ALLELIC | 3/7 | 46/142 | 0.7111 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | DOM | 3/2 | 38/56 | 0.6462 |
| 22 | CYP2D6_4 | 4 | wt | REC | 0/5 | 8/86 | 1 |

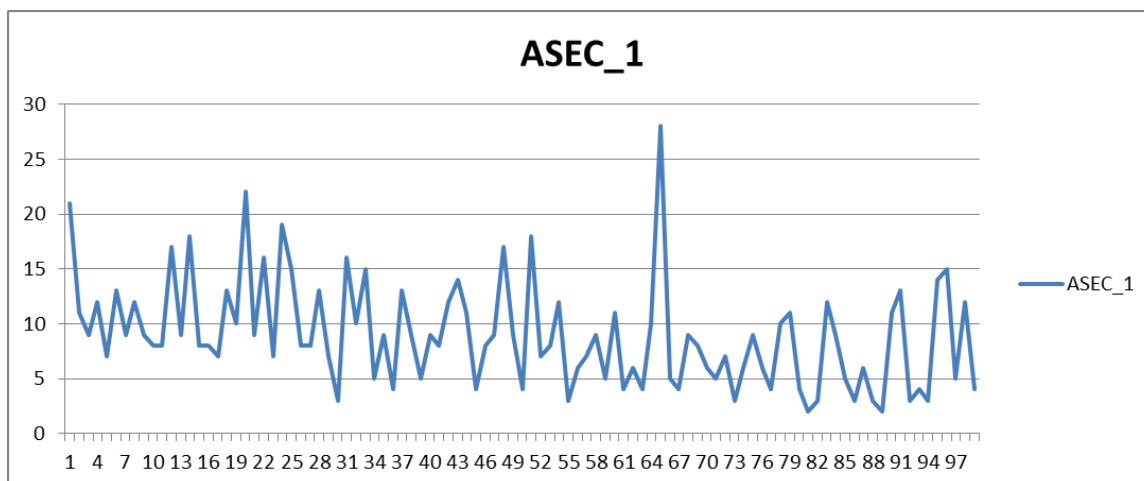
Динамиката на подобрението в клиничното състояние в проценти редукция по HAMD за седмица 1-5 е илюстрирано на Фиг. 15. Динамиката в субективната оценка на НЛР през острия период на лечение по ASEС е отразена на Фиг. 16-19.



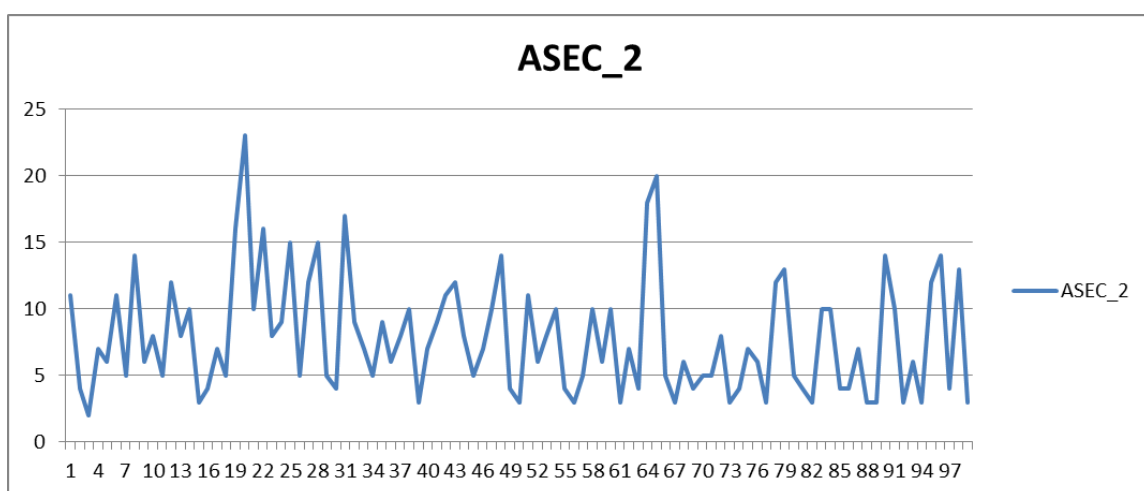
Фиг. 15. Динамика на подобрението в клиничното състояние за периода.



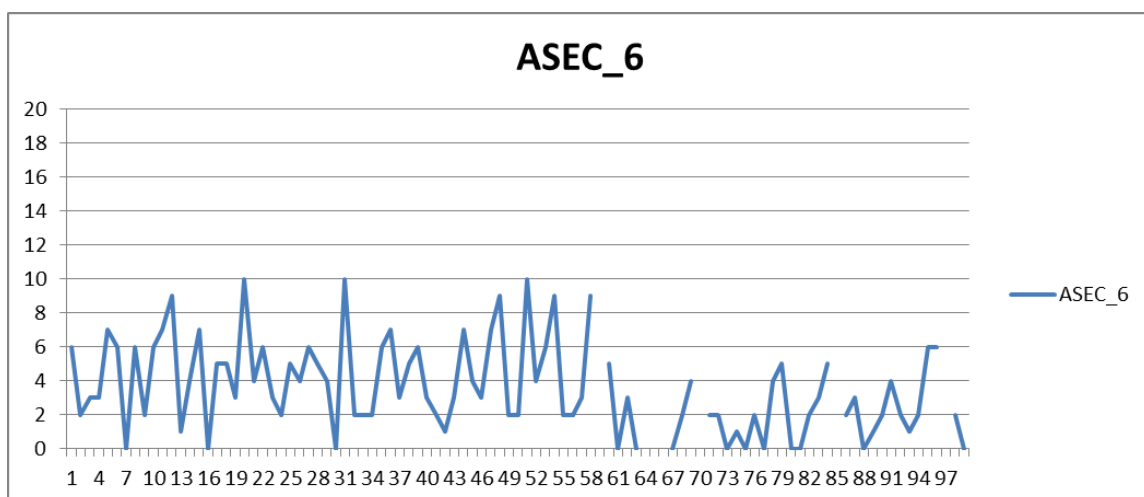
Фигура 16. Динамика на субективната оценка на НЛР за периода.



Фиг. 17. Субективна оценка на НЛР на първа седмица от терапията.



Фиг. 18. Субективна оценка на НЛР на втора седмица от терапията.



Фиг. 19. Субективна оценка на НЛР на шеста седмица от терапията.

4.3. Регресионен анализ

В общия случай вида на регресията с взаимодействие е:

$$Y = b_0 + b_1.ADD + b_2.COV1 + b_3.ADD \times COV1 + error$$

В настоящия регресионния анализ са използвани 12 коварианта: пол, BMI, тютюнопушене, употреба на алкохол, стресогенни фактори, фамилна история на заболяването, начало на депресивното разстройство, брой епизоди, продължителност на заболяването, суицидни тенденции, хоспитализации и честа смяна на антидепресанти.

Извършени са два отделни етапа на регресионен анализ:

- В първия като количествен белег (фенотип) е приета редукцията на точките по скалата на Хамилтън поотделно на 1-ва, 2-ра, 4-та, 6-та и 18-та седмица, като абсолютна и като процентна промяна. Разгледана е потенциалната асоциация само на генетичните маркери с фенотипа, а след това бяха направени анализи за всички комбинации от един ковариант и един генетичен фактор. Оценена е и потенциалната връзка на генетичните фактори с наивния естиматор на скоростта на промяна на отговора (средната промяна за единица време), като не е открита значима връзка.

- Във втория етап като количествен белег е използвано нивото на субективната оценка на нежелани реакции по ASEC за седмици 0-6. Извършени са регресионни анализи на всички комбинации от един ковариант и един генетичен фактор.

- Извършени са и тестове с повече от един ковариант, но те се оказаха незначими, което означава, че установяването на позитивни резултати в тях би било случайно или би довело до пренагаждане на модела и замъгляване на анализа.

За всички включени коварианти са тествани две версии на регресията - с и без взаимодействие между коварианта (cov) и генетичния фактор (gen). При анализи с взаимодействие е препоръчително да се отчита само значимостта и регресионните коефициенти на члена на взаимодействието (cov x gen), затова всички основни параметри (самите ковариант и генетичен фактор) не са разглеждани в тези резултати.

Проверена е потенциалната връзка на всеки от ковариантите с генотипа:

- Вариант rs16917237 показва връзка с придружаващата терапия ($p=0.02697$), като тя беше изключена от регресионния анализ.

- Тютюнопушенето като количествен фенотип показва връзка с 4 от 7 биалелни генетични фактори ($p=0.03$ до 0.003) и беше изключено като ковариант от регресионния анализ.

- Открити са общо 170 значими сигнала от регресионния анализ. Трябва да се отбележи, че поради огромното количество извършени тестове (над 3000), при опит за корекция на границата на значимост (α) по Bonferroni или по Benjamini-Hochberg всички тези резултати стават незначими.

Интересни за отбелязване са следните наблюдавани зависимости:

- За коварианти „стресогенни фактори“ и „суицидна нагласа“, тълкувани като количествени, тъй като са подредени по възходящ ред на силата, се отчете значим ефект върху отговора в един модел с повечето генетични фактори на 6-та седмица. За някои генетични фактори е значим и членът на взаимодействието, тоест ефектът на генетичния и външния фактор се допълват. На 18-та седмица този ефект намалява.

- Анализът на връзката на генетичните фактори с промяната в тежестта по скалата на Хамилтън за втората седмица от лечението при *CYP2D6*4* показва, че за всеки такъв алел отчетената промяна (към подобрение) в стъпки се увеличава средно с 0.2. За 4-та седмица този вариант продължава да показва гранична значимост (малко над 0.05), след което влиянието му отслабва.

Таблица 26. Връзка на генетичните фактори с промяната в тежестта по скалата на Хамилтън на втора седмица от лечението.

| Chr | SNP | BP | N | BETA | SE | R2 | T | P |
|-----|------------|----------|----|-----------|---------|-----------|----------|----------------|
| 10 | CYP2C19*2 | 94762624 | 99 | -0.007437 | 0.1422 | 2.82e-005 | -0.05231 | 0.9584 |
| 10 | CYP2C19*17 | 94762625 | 99 | -0.02703 | 0.1151 | 0.0005677 | -0.2347 | 0.8149 |
| 11 | rs6265 | 27658369 | 99 | 0.1184 | 0.1073 | 0.0124 | 1.104 | 0.2725 |
| 11 | rs16917237 | 27680836 | 99 | 0.07097 | 0.1015 | 0.00501 | 0.6989 | 0.4863 |
| 11 | rs12273363 | 27723312 | 99 | 0.0742 | 0.1245 | 0.003687 | 0.5961 | 0.5525 |
| 17 | 5-HTTLPR | 30194319 | 99 | -0.05 | 0.08212 | 0.003807 | -0.6088 | 0.5441 |
| 22 | CYP2D6*4 | 42126499 | 99 | 0.2129 | 0.09107 | 0.05336 | 2.338 | 0.02143 |

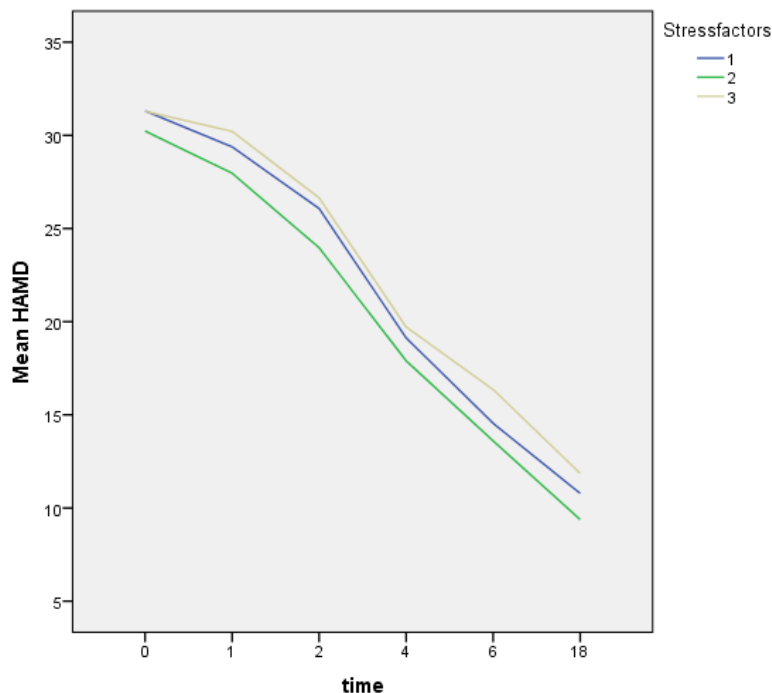
Таблица 27. Връзка на генетичните фактори с промяната в тежестта по скалата на Хамилтън на четвърта седмица от лечението.

| Chr | SNP | BP | N | BETA | SE | R2 | T | P |
|-----|------------|----------|----|-----------|--------|------------|----------|----------------|
| 10 | CYP2C19*2 | 94762624 | 99 | -0.131 | 0.2296 | 0.003344 | -0.05231 | 0.5697 |
| 10 | CYP2C19*17 | 94762625 | 99 | -0.1588 | 0.1856 | 0.007486 | -0.2347 | 0.3945 |
| 11 | rs6265 | 27658369 | 99 | 0.07388 | 0.1745 | 0.001844 | 1.104 | 0.673 |
| 11 | rs16917237 | 27680836 | 99 | 0.1 | 0.1644 | 0.003801 | 0.6989 | 0.5444 |
| 11 | rs12273363 | 27723312 | 99 | -0.03445 | 0.2019 | 0.003687 | 0.5961 | 0.8648 |
| 17 | 5-HTTLPR | 30194319 | 99 | -0.006897 | 0.1331 | 0.0003033 | -0.6088 | 0.9588 |
| 22 | CYP2D6*4 | 42126499 | 99 | 0.2888 | 0.1486 | 2.767e-005 | 2.338 | 0.05479 |

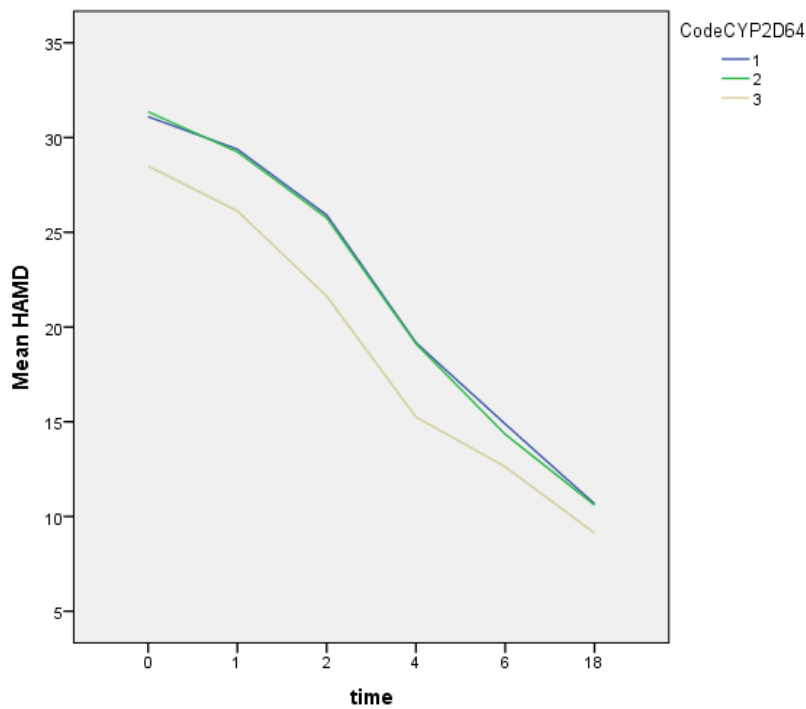
Таблица 26. Връзка на генетичните фактори с промяната в тежестта по скалата на Хамилтън на шеста седмица от лечението.

| Chr | SNP | BP | N | BETA | SE | R2 | T | P |
|-----|------------|----------|----|-----------|--------|-----------|---------|---------------|
| 10 | CYP2C19*2 | 94762624 | 99 | 0.01087 | 0.2116 | 2.72e-005 | 0.05137 | 0.9591 |
| 10 | CYP2C19*17 | 94762625 | 99 | -0.1892 | 0.1703 | 0.01256 | -1.111 | 0.2694 |
| 11 | rs6265 | 27658369 | 99 | 0.1685 | 0.1598 | 0.01134 | 1.055 | 0.2941 |
| 11 | rs16917237 | 27680836 | 99 | 0.1419 | 0.1508 | 0.009049 | 0.9411 | 0.349 |
| 11 | rs12273363 | 27723312 | 99 | -0.1572 | 0.1852 | 0.007455 | -0.8491 | 0.3979 |
| 17 | 5-HTTLPR | 30194319 | 99 | -0.008621 | 0.1224 | 5.11e-005 | -0.0704 | 0.944 |
| 22 | CYP2D6*4 | 42126499 | 99 | 0.1872 | 0.138 | 0.01861 | 1.356 | 0.1781 |

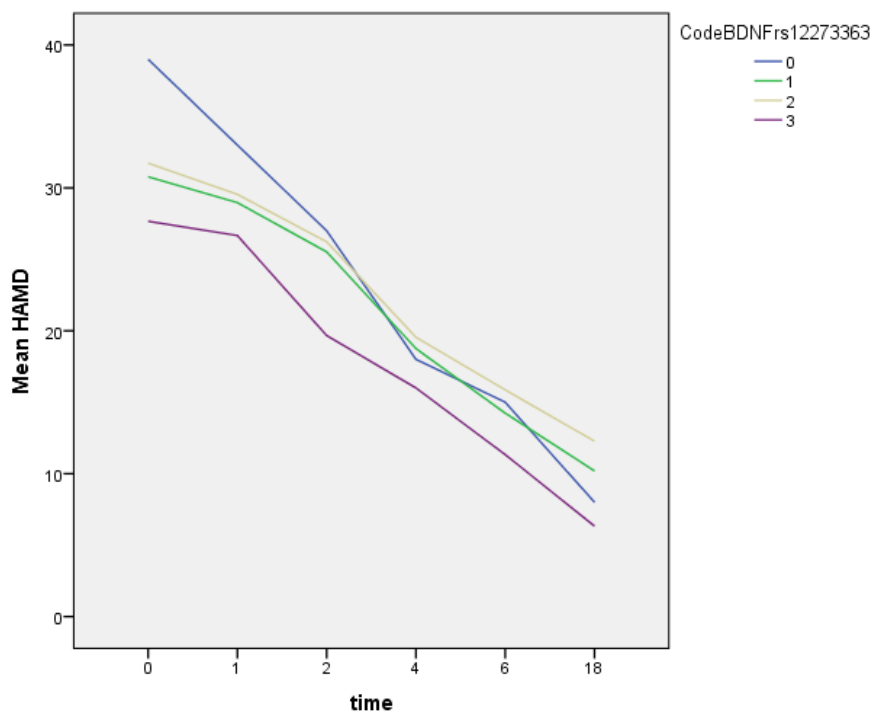
- При разглеждането на ASEC стойностите, ковариантите „честа смяна на антидепресанти“ и „повишена честота на наблюдавани при предходни епизоди НЛР“ са значими на 1-ва и 2-ра седмица (и водят до повишаване на ASEC резултата), а по-късно ефектът на предходни НЛР изчезва, което може да се интерпретира като значимо взаимодействие на генетичния и външния фактор с влияние върху самооценката на нежелани реакции през първите две седмици от лечението.



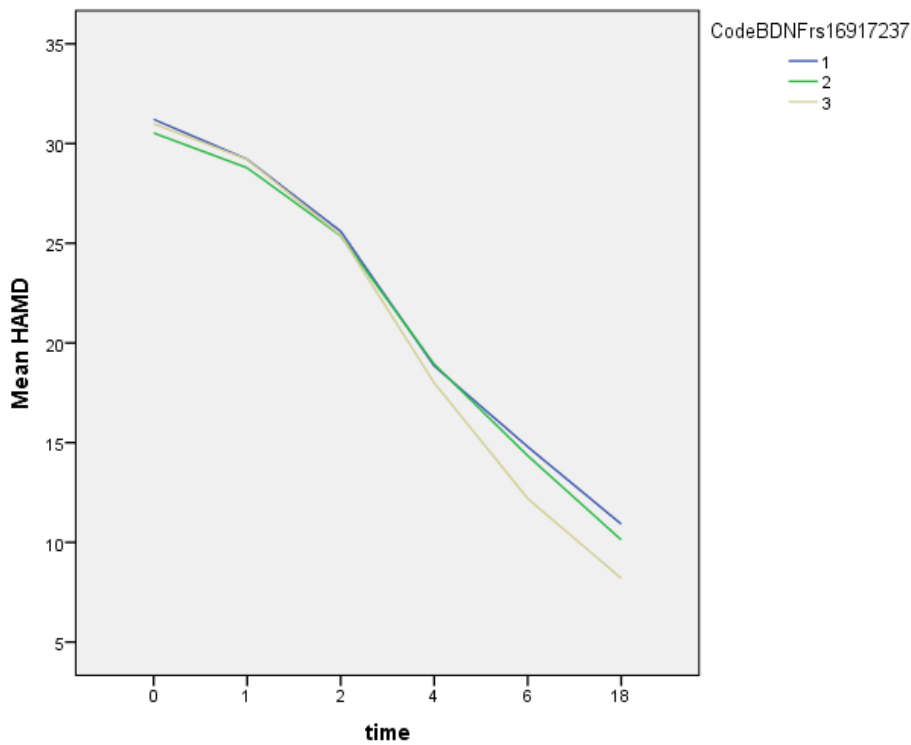
Фиг. 20. Влияние на кофактор „стресогенни събития“ върху промяната на средните стойности по HAMD за периодите на оценка във времето.



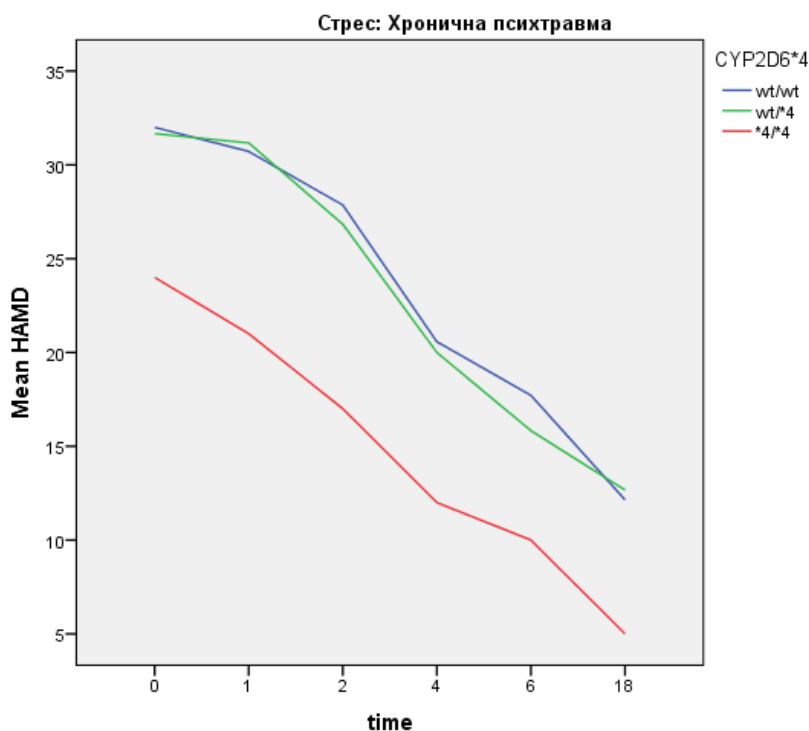
Фиг. 21. Влияние на *CYP2D6*4* върху промяната на средните стойности по HAMD за периодите на оценка във времето.



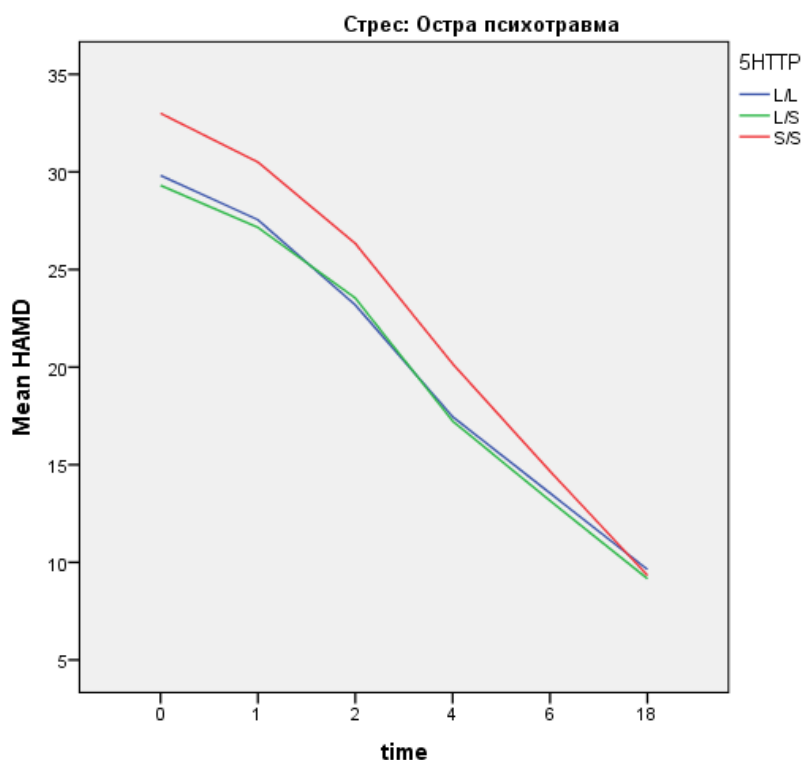
Фиг. 22. Влияние на *BDNF rs12273363* върху промяната на средните стойности по HAMD за периодите на оценка във времето.



Фиг. 23. Влияние на *BDNF rs16917237* върху промяната на средните стойности по HAMD за периодите на оценка във времето.



Фиг. 24. Комплексно влияние на кофактор „стресогенни събития“ (хронична психотравма) и *CYP2D6*4* върху промяната на средните стойности по HAMD за периодите на оценка във времето.



Фиг. 25. Комплексно влияние на кофактор „стресогенни събития“ (остра психотравма) и *CYP2D6*4* върху промяната на средните стойности по HAM-D за периодите на оценка във времето.

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Полиморфизми на *CYP2D6* / *CYP2C19*, депресия и терапия със СИСТ

Полиморфизми на CYP2D6 / CYP2C19 и депресия

В настоящото проучване не беше установена значима връзка на изследваните полиморфизми на *CYP2D6* и *CYP2C19* с развитието на депресия. Генотипните и алелни честоти на *CYP2D6*4* съответстват на публикуваните данни при здрави индивиди от европейската популация и подкрепят доказателствата за отсъствие на значимо влияние върху предразположението към депресивни и личностни разстройства. Относно *CYP2C19*, установената от нас липса на отклонения в генотипните и алелни честоти на *CYP2C19*2* между пациенти и контроли е в противовес с твърденията на някои автори за предполагаема асоциация на този вариант със заболяването, но потвърждава съвременната концепция за отсъствие на убедителни доказателства в подкрепа на отчетливото му влияние върху риска от депресия [Persson et al., 2014]. При анализа на *CYP2C19*17*, обаче, установихме значимо по-високи генотипни и алелни честоти на полиморфизма в популационната извадка от психично здрави лица ($p=0.02824$,

OR=0.6082). Доколко *CYP2C19*17* е действително протективен алел по отношение на заболяването за българската популация следва да бъде проследено от други наши автори.

Полиморфизми на CYP2D6/CYP2C19 и фенотип на лекарствен отговор

Заложеното от нас фармакогенетично изследването на подобрите метаболитни кандидат-гени се базира на съществени доказателства, свързващи генотипните варианти на *CYP2D6* и *CYP2C19* с фенотипните фармакокинетични параметри и с резултатите от лечение при прилагане на СИСТ [Bijl et al., 2008; Gaedik A, 2008; Kirchheiner J et al., 2009; Fabbri et al., 2015].

Системата за категоризиране на доказателства относно ролята на генотипа оценява като умерено до високо значимо качеството на метаболитните фармакогенетични проучванията при СИСТ и подкрепя научните основи на издадените от Консорциума за изпълнение на фармакогенетиката (CPIC) насоки за дозиране на трицикличните антидепресанти през 2013 г., последвани от препоръки за дозиране на СИСТ през 2015 г. [CPIC; Hicks et al., 2013; Hicks et al., 2015]. Терапевтичните насоки се базират основно на резултатите от генетични тестове и следва да се прилагат в неотделимо съображение с лекарствени, клинични и други фактори, свързани с лекарствения отговор. Сравнителният директен анализ на резултатите от конвенционално и генотип-базирано лечение със СИСТ е следваща стъпка в клиничното приложение, изискваща готовност на специалистите за използване и интерпретиране на фармакогенетични данни.

Използваната от нас номенклатура със звезда (*) дефинира множество съвременни подварианти, които не се разграничават при стандартно генотипиране, но това не е ограничение в интерпретацията на *CYP2D6*4*, поради причина, че всички *4-варианти споделят една и съща мутация 1846G>A, водеща до нарушен „сплайсинг“ и отсъствие на функционален протеин, с фенотип ЛМ („лоши метаболизатори“) при хомозиготите по мутантния алел.

Друг проблем при оценяване на резултатите е наличието на генни дубликации, мултипликации или делеции (Copy Number Variants, CNV), които не са обект на рутинно генетично изследване и не са включени в това проучване. Отсъствието на такъв род данни, обаче, поставя ограничения в правилното тълкуването на фенотипна изява ММ („междинни метаболизатори“) и ЕМ („екстензивни“ или „бързи“ метаболизатори) при изследваните от нас пациенти, поради което ориентировъчните терапевтични препоръки за избор на антидепресант при следващо лечение са изготвени само за хомозиготите по мутантния алел.

По последни съобщения, новооткрит SNP в региона на дисталния енхансер е в състояние да промени алелната активност на транскрипционно ниво, но липсва достатъчно информация за точната алелна локализация и посоката на промяна и до момента се свързва основно с *CYP2D6*2*, поради което не налага допълнителни ограничения в нашата интерпретация [Wang D et al., 2014].

Нашите резултати за биалелните генотипни честоти на *CYP2D6*4* при пациенти са съпоставими с тези при здравата европейска популация и се доближават до публикуваните от други български автори [Atanassova et al., 2000; Саръева и съавт., 2008]. Установеното разпределение по генотип **1/*1* (хомозиготи по нормален алел „див тип“), **1/*4* (хетерозиготи с един мутантен алел) и **4/*4* (хомозиготи по мутантен алел), съответно 0,59, 0,33 и 0,08, най-близко кореспондира с данните за българската популация на Atanassova et al. (2000), съответно 0,59, 0,31 и 0,1. Извършеният в настоящото проучване анализ на влиянието на *CYP2D6*4* върху крайния изход от терапията с пароксетин не показва значима връзка с генотипа, което съобщават за СИСТ и други автори [Reyes-Barron et al., 2016]. При проследяване на динамиката на лекарствения отговор, обаче, носителството на нефункционалния алел показва значима връзка с редукцията по НАМ-D и отчетливо подобрене на втора и четвърта седмица от лечението ($p=0.02143$; $p=0.05479$), което кореспондира с доказателствата за *CYP2D6* генотип-зависими отклонения в концентрацията на пароксетин в началото на терапията, публикувани от хърватски автори [Bozina et al., 2005; 2011]. Интересен за отбелязване е фактът, че в нашите резултати установихме набелязана тенденция за понижена ранимост към хронични стресогенни събития при хомозиготно носителство на *CYP2D6*4*, но, поради малкия брой случаи, не беше достигната статистическа значимост, което ни ограничава в категоричността на изводите и изисква целенасочено проследяване с разширяване на извадката.

По отношение на *CYP2C19*2* (най-честият нефункционален алел в европейската популация), въпреки доказани от редица автори фармакокинетичен ефект на генотипа, данните за реално негово отражение върху фармакотерапията със СИСТ са все още твърде противоречиви [Thakur et al., 2005; Zanger et al., 2012]. Този нефункционален алел, както и високоактивният функционален *CYP2C19*17*, нямат пряко отношение към метаболизма на пароксетина и в нашето проучване са изследвани за връзка с предшестваща медикаментозна експозиция, брой прилагани антидепресанти и анамнеза за предходни НЛР при лечение с други СИСТ. Установеното от нас отсъствие на значими разлики в проследяваните показатели при всеки от тестваните генетични модели съответства на фармакогенетичната реалност до момента и изисква детайлизирано проучване при лечение с *CYP2C19*-зависими СИСТ (циталопрам, есциталопрам и, отчасти, сертралин), както и потвърждение от други колективи в страната. В допълнение, в

нашата извадка от пациенти отсъстваха хомозиготни носители на нефункционалния алел (при генотипна честота 0,03 в контролната група), което ограничава цялостната оценка на *CYP2C19**2-базирания фармакотерапевтичен ефект, но позволява заключения за отсъствието на влияние върху риска от депресия.

5.2. Полиморфизми на *SLC6A4*, серотонинов транспорт и терапия със СИСТ

5-HTTLPR, *rs25531*, *STin2* и експресия на *SLC6A4* гена

Полиморфизмът *5-HTTLPR* е локализиран в промотърния регион на *SLC6A4*-гена и най-често се проявява като дълъг или къс алел (L или S), получени в резултат на инсерция/делеция (инс/дел) на тандемно повтарящ се елемент от 44 базови двойки [Heils et al., 1996]. Съобщава се за дву- до трикратно по-висока транскрипционна активност на L-алела (с 16 повтора), в сравнение с S-алела (с 11 повтора) [Lesh et al., 1996; 2005]. Както е известно, няколко SNPs, разположени в или в близост до *5-HTTLPR*, могат да променят влиянието му върху експресията на *SLC6A4*. Сред тях най-добре проучен е *rs25531 G/A*, чието присъствие редом с L-алела редуцира експресията на гена по подобие на S-алела и практически „обръща“ крайния ефект на дългия алел. В клиничен смисъл се предполага, че носителството на *rs25531* може да повлияе „биалелно-базирания“ терапевтичният отговор в трудно предсказуема посока, поради което редица автори оценяват ролята на *5-HTTLPR* от позицията на „триалелния модел“, заложен и в настоящото проучване. За повече яснота, крайното интерпретиране на нашите клинични резултати е извършено след корекция на генотипа, съобразена с установеното наличие или отсъствие на изследвания *rs25531* и следва да се тълкува в смисъла на „биалелно“.

Друг често проучван полиморфизъм на *SLC6A4* е *STin2*, променлив по брой тандемен повтор (17 bp VNTR) в интрон 2 на гена, чиято хетерогенност е свързана с твърде противоречиви за европейската популация резултати и с по-отчетливо влияние на 12/12 и 10/12 генотипа върху клиничния отговор на СИСТ в азиатската популация [Kim et al., 2000; Lee et al., 2004; Niitsu et al., 2013; Fabbri et al., 2013]. Препоръчително е проследяване на взаимодействието между упоменатите полиморфизми при оценка на фенотипа, което беше заложено в нашето проучване.

Полиморфизми на *SLC6A4* гена и терапия със СИСТ

Подобно на други съобщения, нашите резултати не показаха статистически значимо влияние на *SLC6A4*-генотипа върху лекарствения отговор на СИСТ [Mago et al., 2009; Porcelli et al., 2011]. Установена беше значимо по-висока честота на

алел 9 на *STin2* при пациентите от женски пол ($p < 0,01$), но това изследване изисква допълнително верифициране от други наши автори, поради ниската честота на този алел в европейската популация. Интересни за отбелязване са резултатите от регресионния анализ, насочващи към влияние на ковариантите стресогенни събития и суицидна нагласа в модел с повечето генетични фактори на 6-та седмица от терапията ($p = 0.01379$ за *5-HTTLPR*) както и набелязаната тенденция към по-високи средни стойности на HAM-D при S/S генотип в съчетание с анамнеза за преживяна остра психотравма, което е в подкрепа на подобни резултати, съобщавани от международни екипи [Serretti et al., 2006; Huezo-Diaz et al., 2009].

Нашите изследвания върху самооценката на НЛР не потвърдиха ролята на S-алела като риск-фактор за СИСТ-индуцирани странични ефекти, докладвани от някои автори [Popp et al., 2006].

5.3. Полиморфизми на BDNF гена, невропластичност и терапия със СИСТ

След преосмисляне на властващите доскоро концепции за възможно повлияване на невроналния растеж и диференциация само в периода на развитие на нервната система, съвременната неврофизиология отрежда значимо място на невротрофичните фактори в регулацията и реорганизацията на невроналната и синаптична пластичност и преживяемост в зряла възраст. Днес е известно, че дефицитът на невротрофична подкрепа има отношение към патогенезата на депресивните разстройства, а антидепресивната терапия доказано влияе върху възстановяването и баланса на мозъчните невротрофични процеси, контролиращи гъвкавостта при генериране на широка гама централно регулирани реакции.

Фармакогенетичните проучвания върху полиморфизми на *BDNF* гена отчитат положителен молекулен ефект върху резултатите от антидепресивно лечение основно при хетерозиготен генотип на варианта rs6265, което не беше потвърдено в нашето проучване. В тази връзка, необходимо е многократно възпроизвеждане при хора на резултатите от фармакогенетични проучвания върху животински модели, които насочват към негативно влияние на твърде високите нива на BDNF върху афективните процеси. Трудности произтичат и от значителното алелно и генотипно разнообразие в носителството на rs6265 сред глобалната човешка популация. Твърде противоречиви са и резултатите от проучвания върху процесите, свързани с регулация на генната експресия, включително индукцията на *BDNF*. При изследваните от нас пациенти не беше доказана връзка на *BDNF* вариантите с крайния терапевтичен отговор, но беше набелязана тенденция за влияние на генотипа върху динамиката на редукция на симптомите по HAM-D, с най-отчетливо влияние между четвъртата и шестата седмица от лечението с пароксетин при SNP rs12273363, rs16917237.

5.4. ОБОБЩЕНИЕ

Предимства на проучването

- Етническата хомогенност на извадката от пациенти и контроли от бялата европейска популация, самоопределили се като етнически българи.
- Географската и регионална хомогенност на участниците, набирани от Централна и Северна България.
- Стандартизираният терапевтичен режим с един антидепресант (пароксетин в ДД=20-40 мг еднократно дневно сутрин) и допустим прием на ниска доза бензодиазепин (клоназепам в ДД=0,5-1 мг в началото на лечението).
- Намаленият риск от вариране на диагностичната и терапевтична оценка при мултицентрова психиатрична експертиза.
- Оценката на критерии като начало и давност на заболяването, брой епизоди, пол, възраст, фамилност, придружаващи заболявания и др., които потенциално влияят върху клиничния изход. Счита се, че подборът на пациенти с фамилност на заболяването, ранно начало и по-голяма тежест на психичното заболяване увеличава силата на генетичното влияние.
- Препоръчителният при генетични проучвания баланс между търсена хомогенност на извадката (но малък брой случаи) и риск от хетерогенност на извадката (но голям брой случаи), като в нашето проучване целяхме подбор на по-хомогенна популация пациенти.

Ограничения на проучването

- Малкият генетичен размер на ефекта при психичните заболявания. За наблюдаваната извадка от 100 пациенти се очаква размер на ефекта до 0,4, което се наблюдава при повечето проучвания с подобен дизайн. Отчитайки относително ниската честота на носителство на някои от полиморфизмите и разсейването на случаите, размерът на ефекта се очаква да бъде дори по-нисък, което е неизбежно в едноцентрови натуралистични условия.
- Според критериите на медицината на доказателствата в областта на психичното здраве, брой на случаите $n \leq 100$ определя ниво на доказателност IIIb-IIIc при проучвания, подобни на проведеното, което ограничава възможностите за генерализирани заключения и препоръки.
- По-малък шанс за истински положителни резултати при малки проучвания, малък размер на ефекта, повече тествани зависимости, гъвкавост на дефинициите и оценката на изхода от лечение което е характерно за изследванията в областта на психичните заболявания, включително рекурентното депресивно разстройство.

6. ИЗВОДИ

1. Разпределението на изследваните алелни и генотипни честоти на фармакогенетичните полиморфизми *CYP2A6*4*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17*, *5HTTLPR*, *STin2*, *rs6265*, *rs12273363*, *rs16917237* при пациентите с рекурентно депресивно разстройство и здравите лица е близко до честотите, описани за европейската популация и докладвани от наши автори.
2. Не се установява значима асоциация на проучените полиморфизми с риска от развитие на депресивно разстройство, освен при *CYP2C19*17*, който при здрави лица в нашето проучване се проявява като протективен алел.
3. Носителство на алел 9 на *STin2* се установява в статистически значима по-висока честота при пациентите от женски пол и отсъства в контролната група, но поради малкия брой на случаите и ниската честота от 1% за европейската популация, е необходимо резултатите да бъдат потвърдени от други наши проучвания при пациенти с рекурентна депресия, преди да бъдат генерализирани.
4. Не се доказва значима връзка на изследваните генетични варианти *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17*, *5HTTLPR*, *STin2*, *rs6265*, *rs12273363*, *rs16917237* с крайния терапевтичен отговор, но са очертани тенденции за влияние на генотипа върху динамиката на редукция на симптомите по оценъчната скала, което най-отчетливо се установява между четвъртата и шестата седмица от лечението с пароксетин.
5. За част от анализирани външни фактори (стресогенни събития и суицидна нагласа), може да се твърди за значим ефект на взаимодействие с повечето генетични фактори върху отговора на четвърта седмица от терапията, като ефектът намалява на по-късните етапи.
6. Установява се взаимодействие на генетичните с външни фактори, като честота на антидепресанти и повишена честота на наблюдавани при предходни епизоди нежелани лекарствени реакции, със значимо влияние върху самооценката на нежеланите лекарствени реакции, съобщавани през първите две седмици от лечението.
7. Отчита се значима промяна към подобрене на втора и четвърта седмица от лечението при носителство на *CYP2D6*4* алел, с гранична значимост на четвърта седмица и отслабване на влиянието в следващите етапи на терапията с пароксетин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установените в настоящото проучване значими връзки и тенденции могат да бъдат полезни за бъдещи разширени проучвания с допълнително прецизиране на дизайна и включване на новооткрити кандидат-гени с влияние върху лекарственния отговор. Създадената база данни може да послужи на този етап за определяне на метаболитния фенотип при хомозиготно носителство на минорен алел най-вече при двата изследвани метаболитни гена CYP2D6 и CYP2C19, като съхраняваните в ДНК банка проби могат да бъдат повторно изследвани в условията на новите геномни технологии.

Очаква се получената информация за алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфизми при извадката от амбулаторни пациенти с рекурентна депресия и проследяването на връзката им с терапевтичното повлияване и поносимостта към СИСТ да допринесат за по-детайлното опознаване на факторите, определящи междуиндивидуалните разлики в размера на лекарственния ефект. При убедителни потвърдителни резултати от други наши автори, проучването би могло да позволи разширяване на изследователската дейност и разработване на индивидуални препоръки за ориентиран избор на антидепресивно лечение при пациенти с рекурентно депресивно разстройство.

Въпреки изследователските ни надежди за бързо клинично внедряване на установените от нас резултати, зряло осъзнаваме, че, на настоящия етап от развитието на психофармакогенетичното познание, все още сме твърде далеч от дефинитивни твърдения относно ролята на унаследените и епигенетично модифицирани фактори върху естеството на терапевтичния отговор при лечение с антидепресанти. Безспорно, всяко значимо фармакогенетично изследване при рекурентно депресивно разстройство изисква оценката на панел от експерти и положително възпроизвеждане в реална среда, а генерализирането на изводите от едноцентрови проучвания за целите на клиничната практика би било израз на изследователски наивитет.

7. ПРИНОСИ (самооценка)

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Проведено е за първи път фармакогенетично проучване за асоциираност на полиморфни кандидат-гени с хода на заболяването и проведеното лечение с антидепресанти от класа на СИСТ при български пациенти с рекурентно депресивно разстройство.
2. Проучена е мултифакторната генеза на лекарствения отговор на антидепресанти и е проследено влиянието на унаследени и външни фактори върху изхода от терапия при добре характеризирана хомогенна извадка от пациенти в реална доболнична среда.
3. Преведен и приложен е Въпросник за самооценка на НЛР на антидепресанти, подходящ за амбулаторни условия и с официалното разрешение от Лондонски Кралски колеж на психиатрите да бъде ползван с позоваване за изследователски и клинични цели.
4. Разработена е детайлизирана методика на проучването, плод на дългогодишно обмислян дизайн и основана на опита на международни и наши екипи, която би улеснила изследователската дейност на други български колективи.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН И ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

1. Потвърдено е наличието на взаимодействия между някои от изследваните полиморфизми на фармакогенетични кандидат-гени (*SLC6A4*, *BDNF*, *CYP2C19*) с риска от депресия.
2. Потвърдено е влиянието на полиморфизма *CYP2D6**4 върху началния лекарствен отговор с тенденция към подобрене през 2-ра седмица от лечението и отслабване на влиянието след 6-та седмица.
3. Потвърдено е взаимодействието на генетични с външни и личностни фактори (стесогенни събития и суицидни тенденции), влияещо върху лекарствения отговор до 6-та седмица от терапията и с намаляващ ефект към 18-та седмица.
4. Анализирани са алелните и генотипни честоти на генетични варианти в метаболитните гени *CYP2D6* и *CYP2C19*, кодиращи експресията на изоензими с водеща роля в метаболизма на психотропните лекарства, за които са налице международни препоръки за съобразено с лекарствения фенотип дозиране на антидепресантите от класовете на СИСТ и ТЦА и които могат да послужат като ориентир в реалната клинична практика.

8. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

8.1. ПУБЛИКАЦИИ

В специализирани научни списания в чужбина

1. Diana Pendicheva, Radka Kaneva, Ivo Duhlenki, Petkana Hristova, Mina Ivanova, Gyulnas Dzhebir, Reni Tzveova. Is initial response to paroxetine associated with BDNF polymorphisms? A two-week pilot study on Bulgarian patients with recurrent major depressive disorder. In: A current perspective on health sciences. Ed. Kaptanoglu A. Y. Trakia University, 2014;187-99.

В специализирани научни списания в България

1. D. Pendicheva, R. Tzveova, A. Pandurska. Variants in metabolic genes and their influence on the treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. Trakia Journal of Sciences. 2012;10(1):225-29.
2. Пендичева, Д., И. Духленки, Р. Кънева, А. Пандурска, Р. Марев, Д. Мицевски. Роля на генетичните полиморфизми на чернодробните цитохром P450 2C19 (CYP2C19) изоензими за определяне на индивидуалния отговор при терапия с психотропни лекарства. Рецептор – Български психиатричен журнал. 2009;1:25-33.

В сборници с доклади в пълен текст от научни форуми в България

1. Пендичева Д., И. Духленки, А. Пандурска. Генотипизиране на цитохром P450 2D6 при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи лечение с антидепресанти. Сборник с доклади от Международна научна конференция “Предизвикателствата пред науката във връзка с членството на България в ЕС”, 7-8 юни 2007 год., гр. Стара Загора, България. Изд. къща “СУБ-Стара Загора”, 2007; 7:184-190.
2. Пендичева Д., И. Духленки, А. Пандурска, Р. Марев, Д. Мицевски. Генотипизиране на цитохром P450 2C19 при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи лечение с антидепресанти. Сборник с доклади (електронен носител) от Международна научна конференция “Българската наука и Европейското изследователско пространство”, 5-6 юни 2008, гр. Стара Загора, България. Изд. къща “СУБ-Стара Загора”, 2008. Секция “Медико-биологични науки”, 3, стр. 1-5.
3. Пендичева Д., И. Духленки, Р. Кънева, А. Пандурска. Анализ на 5-HTTLPR и CYP 2D6*4 генетични варианти при пациент с рецидивиращо депресивно разстройство и антидепресант-асоцирана мания – клиничен случай. Секция „Медикобиологични науки” Сборник с материали от XI Международна научна конференция „50 години СУБ-Стара Загора”, 2-3 юни 2011 г., гр. Стара Загора. Електронен ресурс. 2011:1-5.

8.2. ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА ОТ УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Научни съобщения в България

1. Пендичева Д., И. Духленски, А. Пандурска. Генотипизиране на цитохром P450 2D6 при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи лечение с антидепресанти. Сборник на Международна научна конференция "Предизвикателствата пред науката във връзка с членството на България в ЕС", 7-8 юни 2007 год., гр. Стара Загора, България. 2007:6:1-5. <http://dspace.uni-sz.bg/handle/123456789/89>
2. Пендичева Д., И. Духленски, А. Пандурска, Р. Марев, Д. Мицевски. Генотипизиране на цитохром P450 2C19 при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи лечение с антидепресанти. Сборник с Международна научна конференция "Българската наука и Европейското изследователско пространство", 5-6 юни 2008, гр. Стара Загора, България. Електронен ресурс. COBIB.BG. 2008 <http://vbbgw.izum.si/scripts/cobiss?command=DISPLAY&base=COBIB&RID=1231114468>
3. D. Pendicheva, R. Tzveova, A. Pandurska. Variants in metabolic genes and their influence on the treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. Юбилейна научна конференция с международно участие на Медицински факултет – гр. Стара Загора „30 години висше медицинско образование“, 21-22 май 2012, гр. Стара Загора.
4. Пендичева Д., Кънева Р., Цвеова Р., Джебир Г., Духленски И. Прогностична („преемптивна“) фармакогеномика и оценка на риска от нежелани лекарствени реакции към антидепресанти. Годишен симпозиум „Акад. Чудомир Начев“: Генетика и геномика на комплексните заболявания, 25. 10. 2014 г., Президиум на БАН, гр. София.

Научни съобщения в чужбина

1. Pendicheva D., I. Duhlenski, R. Kaneva, R. Saraeva, A. Pandurska, R. Marev. Influence of different factors on drug response to antidepressants in patients with depression. XIV World Congress of Psychiatry, 20-25 September 2008, Prague, Czech Republic. Journal of Czech and Slovak Psychiatry. 2008;104(Suppl.2):P-01-217:918.
2. Diana Pendicheva, Radka Kaneva, Gyulnas Cebir, Reni Tzveova, Antoaneta Pandurska. Analysis of the Intron 2 VNTR Polymorphism (STin2) of the Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) in a Sample of Bulgarian Outpatients with Recurrent Major Depressive Disorder. XX-th World Congress of Psychiatric Genetics "Confronting of complexity of brain and behavior". 14-18 October, 2012, Hamburg, Germany. Presentation abstracts; P35:111.
3. Pendicheva D, Kaneva R, Duhlenski I, Hristova P, Ivanova M, Dzhebiu G, Tzveova R. Is initial response to paroxetine associated with BDNF polymorphisms? A two-

week pilot study on Bulgarian patients with recurrent major depressive disorder. 1st Balkan Congress on health Sciences; 14-16 May, Trakya University, Edirne, Turkey
1st International Balkan Conference on Health Sciences; 14-16 May 2014, Edirne, Turkey. Abstract book, Health Sciences (Medical) 2014; p. 9.

8.3. НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. НИП № 22/2007г., МУ-Плевен: „Фармакогенетично изследване на CYP2D6*4 и CYP2D6*5 алелни полиморфизми при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи антидепресивна терапия” (главен изследовател).
2. НИП № 10/2008г., МУ-Плевен: „Фармакогенетично изследване на CYP2C19*2 и CYP2C19*3 алелни полиморфизми при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи антидепресивна терапия” (главен изследовател).
3. НИП № 20/2009г., МУ-Плевен: „Фармакогенетично изследване на S- и L- алелни варианти на 5-HTTLPR при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи антидепресивна терапия (главен изследовател)
4. НИП № 12/2011г., МУ-Плевен. „Фармакогенетично изследване на индел промоторен полиморфизъм (5-HTTLPR), еднонуклеотиден полиморфизъм (rs25531 SNP) и вариабилен тандемен повтор във втори интрон (Stin2 VNTR) на серотонин транспортер гена (SLC6A4) при пациенти с депресивни разстройства, провеждащи лечение с антидепресанти” (главен изследовател).
5. НИП № 18/2012г., МУ-Плевен: „Фармакогенетично изследване на Val66Met полиморфизъм (rs6265 SNP) на BDNF гена при амбулаторни пациенти с рецидивиращо депресивно разстройство, провеждащи лечение със селективни инхибитори на обратното захващане на серотонина (SSRI)” (главен изследовател).

PHARMACOGENETIC STUDY ON OUTPATIENTS WITH RECURRENT DEPRESSIVE DISORDER TREATED WITH SELECTIVE SEROTONIN REUPTAKE INHIBITORS (SSRIs)

SUMMARY

Background: Depressive disorders contribute to the most part of disability adjusted life years caused by mental illness worldwide. Major depression tends to become the second factor for death and disability from chronic diseases by 2020 (WHO). In Europe, about 1/4 of people may experience depressive symptoms at some point in their lives. According to EPIBUL, 40.3% of Bulgarian depressive patients have attempted suicide. Efforts have been focused on early diagnosis and timely treatment to optimize clinical outcome (Health 2020). Different antidepressants (ADs) have been commonly prescribed to treat moderate-to severe depression. Although the SSRI-class has proven to be equally effective, safer and better tolerated, about 1/3 of patients may not respond adequately to treatment and could experience ADRs causing non-adherence and non-compliance. There is sufficient evidence that around 42% of variance in AD response is associated with common polymorphisms in genes regulating the pharmacological determinants of clinically used drugs. Regardless of many positive studies on the nature of functional variants in AD-related pharmacokinetic/ pharmacodynamic genes associated with metabolism and central regulation of monoamines, evidence is still not enough to support the routine clinical application of pharmacogenetic knowledge.

Objective: This study aimed to estimate the frequency of common genetic variants in antidepressant-related candidate genes in Bulgarian patients with recurrent depressive disorder compared to healthy subjects and to investigate the impact of the identified polymorphisms on clinical performance and individual response to acute treatment with SSRIs.

Materials and Methods: The two-phase association study was performed in 2009-2016 at MU-Pleven and MMC-Sofia, Bulgaria. The research was funded by MU-Pleven and approved by the institutional Ethic Committee. All 242 participants were unrelated Bulgarian Caucasians, males and females aged 18-64. Of them, 99 were patients with recurrent depression (DSM-IV-TR) and 142 were mentally healthy subjects. A written informed consent was obtained a priori. Clinical examinations were performed at first visit, with follow-up conducted on 1st, 2nd, 4th, 6th and 18th week. The HAMD was applied to assess presence and severity of depression. The Bulgarian translation of ASEC (© 2009 The Royal College of Psychiatrists; Uher, R. et al. 2009) was done and used with permission for assessment of ADRs. Genomic DNA was extracted from venous blood and molecular analysis was performed by standard PCR, TaqMan® and high-resolution melting on Rotor-Gene Q (Qiagen). Allele and genotype distributions of selected polymorphisms were compared between patients and controls by using Fisher's exact probability test. The test was also used for analysis of associations between genetic variants and clinical characteristics under four genetic models. Single and multiple linear regression with step-wise approach was applied to assess the influence of genetic and other factors on treatment response to the SSRI paroxetine (20-40 mg/day) and dynamics of ASEC points.

Results: A total of 241 participants completed the study. Characteristics of patients: mean age 45.58, SD=11.08; 31 males/69 females; number of previous episodes: mean 2.8 (2-6); years of disease: 6.35, SD=3.9; HAMD on first visit: mean 30.97, SD=4.95; one male developed acute mania after 2nd week and was excluded from the study. Characteristics of healthy subjects: mean age 47.54 SD=12.08; 49 males/69 females. We analyzed nine polymorphisms in candidate genes CYP2D6, CYP2C19, SLC6A4 and BDNF, namely CYP2D6*4, CYP2C19*2, CYP2C19*17, 5-HTTLPR, rs25531, rs57098334, rs6265, rs12273363 and rs16917237. The frequency of CYP2C19*17 allele was significantly increased in the healthy population ($p=0.02824$, OR=0.6082, protective allele). The allele 9 of rs57098334 was presented in 5.1% of patients and its frequency was statistically higher in females ($p<0.01$). Twelve co-variants were tested with two versions of regression (with or without interaction with the genetic factor) and a total of 170 positive signals were found. The analysis was performed in two stages: with phenotype of HAMD reduction and ASEC change, respectively. The co-factors "stressful life events" and "suicidality" showed significant effect on the treatment response in one model with most genetic factors in week 6 ($p=0.01379$ for 5-HTTLPR); the effect decreased by 18th week. The CYP2D6*4 allele demonstrated 0.2 step improvement in HAMD on 2nd week and a borderline impact with 0.05-step improvement by 4th week, but not later. Regarding the co-factors "antidepressants switch" and "previous ADRs to antidepressants", their interaction with the genetic factor influenced the reported side effects (increased ASEC results) during the first 2 weeks of treatment.

Conclusion: This small naturalistic study may contribute to better understanding and further comprehensive analysis of the complex pharmacogenetic nature of recurrent depression in our country. Hopefully, it could accelerate the investigation of novel polymorphic genes and their interactions with specific depression endophenotypes for the purpose of personalized treatment. At this early stage, our positive findings need to be reproduced in larger groups of patients and to be replicated with newer genomic technologies by multidisciplinary teams.

Key words: pharmacogenetics, recurrent depression, candidate genes, SSRIs, paroxetine.