

A depresszió biomarkereinek vizsgálata

Doktori tézisek

Halmi Zsuzsa

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Székely Anna, Ph.D., habil. egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Unoka Zsolt Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kabai Péter, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Túry Ferenc, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Polgár Patrícia, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Speer Gábor, Ph.D., ambulanciavezető
főorvos

Budapest
2015

1. Bevezetés

A hangulatzavarok csoportjába sorolt kórképek a leggyakoribb pszichiátriai betegségek közé tartoznak, melyek típusosan viszonylag korai kezdetűek és krónikus lefolyásúak. Ennek megfelelően – a velük járó személyes szenvedésen túl – a hozzájuk kapcsolódó direkt (kórházi kezelés, gyógyszerek) és indirekt költségek (a munkaképtelenség, illetve a korai halálozás miatt elvesztett termelőerő) is tekintélyes anyagi terhet rónak a különböző nemzetek költségvetésére. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslései szerint 2020-ra nemzetközi viszonylatban a depresszió lesz a második legfőbb oka a megváltozott munkaképességnek, az egészségügyi költségvetést terhelő kiadásoknak és a korai halálozásnak. Sajnálatos módon a jelenleg rendelkezésre álló terápiás eszköztár használatával a major depressziós betegek kezelése csak részlegesen tekinthető megoldottnak, mivel a páciensek tekintélyes hányada egyáltalán nem, vagy csak kismértékben reagál a gyógyszeres terápiára. További problémát okoz a mellékhatások miatt vagy egyéb okokból megjelenő terápiás együttműködés hiánya. A hangulatzavarok kóroktanának kutatása évtizedek óta intenzíven művelt ága az orvostudománynak. Ezen belül is többféle módszertani megközelítés létezik, melyek egyike a különféle hangulatzavarok genetikai meghatározottságát vizsgálja. A pszichiátriai genetikai kutatás eredményei egyrészt hozzásegíthetnek azon vulnerábilis személyek azonosításához, akik stresszhelyzetek hatására depresszióval „reagálnak”, másrészt olyan új molekuláris targetekre hívhatják fel a figyelmet, melyeket az innovatív gyógyszerfejlesztők felhasználhatnak a jövő antidepresszívumainak megtervezésénél.

A dolgozatom alapjául szolgáló vizsgálatokat major depressziós epizódban (MDE) szenvedő betegpopulációban végeztük el azzal a céllal, hogy két, potenciális biomarker szerepét jobban megismerhessük. Az egyik biomarker egy fehérje, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) perifériás szintje, melyet a terápiás válasszal összefüggésben elemeztünk. A másik vizsgált marker genetikai jellegű, és a depresszióra való hajlam öröklött rizikófaktoraként esetlegesen segíthetné a korai diagnózis felállítását. A P2RX7 (purin receptor P2X, ligand-függő ion-csatorna-7) gén-polimorfizmusok és a depresszió asszociációját szakirodalmi adatok vetették fel. Egyes vizsgálati eredmények alapján mind a VEGF, mind pedig a P2RX7 gén terméke szerepet játszhat a hangulatzavarok kialakulásának patomechanizmusában.

Jelen munkámban eset-kontroll és dimenzionális modellben vizsgáltam a P2RX7 két polimorfizmusának esetleges asszociációját az unipoláris major depresszió (MDD) és a bipoláris zavar (BPD) előfordulásával, illetve a depressziós tünetsúlyossággal. A vizsgált két

polimorfizmus közül az egyik a szakirodalomból is ismert exon polimorfizmus (Gln460Arg, rs2230912), a másik egy feltételezett mikroRNS kötőhely polimorfizmus (rs1653625), melyet eddig mások még nem vizsgáltak.

2. Célkitűzések

A bemutatásra kerülő munka fő célkitűzése **két olyan biomarker (a VEGF fehérjeszint és a P2RX7 gén polimorfizmusok) vizsgálata volt**, melyek – az aktuális irodalmi adatok alapján – **összefüggésben állhatnak a depresszió súlyosságával, illetve előre jelezhetik a terápia sikerességét**. A vizsgálatba MDD-vel és BPD-vel diagnosztizált betegeket, valamint egészséges kontroll személyeket vontunk be.

2.1 A periférián mérhető VEGF fehérjeszint mint lehetséges terápiás prediktor

Szakirodalmi eredmények alapján feltételezhető volt, hogy a VEGF jelentős szerepet játszik mind a hangulatzavarok patomechanizmusának molekuláris háttérében, mind azok kezelésében. Jelen vizsgálat célja annak a kérdésnek a megválaszolása volt, hogy a kezelés megkezdése előtt, illetve a 28 napos kezelés után mért **perifériás VEGF szint összefüggésben áll-e az MDE-ben szenvedők gyógyszeres terápiájának sikerességével**.

2.2 A P2RX7 genetikai polimorfizmusai mint a depresszió lehetséges rizikófaktorai

Genetikai asszociáció-vizsgálatainkban arra a kérdésre igyekeztünk választ kapni, hogy **kimutatható-e összefüggés a P2RX7 gén bizonyos variánsai (rs2230912 és rs1653625) mint lehetséges rizikófaktorok, valamint az MDD, illetve a BPD előfordulása között**. Ezt a kérdést eset-kontroll vizsgálati modell alkalmazásával teszteltük. Ezen túlmenően **dimenzionális megközelítési módot** is alkalmaztunk, mivel ez kismértékű genetikai hatások azonosítását is lehetővé teszi. Ebben az esetben kérdésünk az volt, hogy **kimutatható-e összefüggés a vizsgált genetikai markerek és a depressziós tünetek súlyossága között**. A „depresszió” és „szorongás” kvantitatív fenotípusait a Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) és a Montgomery–Åsberg Depresszió Pontozó Skála (MADRS) segítségével jellemeztük.

3. Módszerek

A dolgozatomban bemutatott eredmények több mint 400 hangulatzavarban szenvedő beteg, valamint közel 560 kontroll személy kiterjedt fenotípusos jellemzésén, illetve biomarkerei alapján létrehozott változók adatain alapulnak. Az egyes elemzések almintáiba olyan különböző kritériumok mentén válogattuk be a személyeket, mint például az életkor, a klinikai státusz (diagnózis), vagy az érvényes genetikai és fenotípusos adatok megléte. A klinikai mintát aktuálisan MDE-ben szenvedő betegek alkották, akiket a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömbjének Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztályán vagy a Nyírő Gyula Kórház Pszichiátriai Osztályán kezeltek. A klinikai minták kontrolljaként létrehozott csoportba az Eötvös Loránd Tudományegyetemen folyó pszichogenetikai kutatásokban résztvevő hallgatókat vontunk be. Vizsgálati személyeink egy nagyobb battéria részeként töltötték ki a dolgozatban szereplő Hospital Anxiety and Depression Scale-t (HADS), valamint e mellett a betegek körében a Montgomery-Åsberg Depresszió Pontozó Skála (MADRS) is felvételre került. Valamennyi bemutatásra kerülő vizsgálathoz a szükséges etikai engedélyeket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB; engedély szám: 4514-0/2010-1018EKU(294/PI/10.) hagyta jóvá.

A VEGF biomarkerrel kapcsolatos vizsgálatokban aktuálisan MDE-ben szenvedő 34 fekvőbeteg (9 férfi és 25 nő; átlagéletkor 44,6(±12,6) év) vett részt, akiknek elsődleges diagnózisa MDD (N=21) vagy BPD (N=13) volt. Nem választottuk be azokat a beteget, akiknek a MADRS összpontszáma az első viziten 20 pont alatti volt, illetve fennállt bármilyen kardiovaszkuláris eredetű, rosszindulatú vagy vérképzőszervi megbetegedés, esetleg rheumatoid arthritis probléma. A VEGF plazma-szintjének méréseit az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztályán dr. Dobos Judit végezte. A depressziós tünetek súlyosságát – szakképzett pszichiáterek segítségével – a MADRS tünetbecslő skálával mértük fel. A plazma VEGF szinteket, valamint a depresszió súlyosságát két időpontban (kezelés előtt és 28 napos kezelés után) összetartozó mintás eljárások alapján vizsgáltuk. Elemzéseinkhez a mintát két csoportra osztottuk: a *'kezelésre reagálók'* kontroll viziten mért MADRS pontszáma legalább feleannyi volt, mint az első viziten mért pontszám, ellenkező esetben a beteg a *'kezelésre nem-reagálók'* csoportjába került. Ezekben az alcsoportokban szintén összehasonlítottuk a kezelés előtti és utáni VEGF szinteket. Végül dimenzionális elemzéssel regresszió-analízis alapján vizsgáltuk a VEGF

szint és a MADRS pontszám összefüggéseit, hogy igazoljuk a VEGF esetleges biomarker szerepét.

A genetikai markerek vizsgálata két mintán zajlott: az első vizsgálatban 171 depressziós epizódban szenvedő beteg vett részt (MDD=107, BPD=64; átlagéletkor 48,5(±11,0) év, 25,1% férfi és 74,9% nő). Ezen a mintán csak az exon polimorfizmus (rs2230912) került meghatározásra allél-specifikus TaqMan próbák felhasználásával. A kiterjesztett mintán ezen kívül meghatároztuk a P2RX7 mikroRNS kötőhely polimorfizmusát (rs1653625) is allél-specifikus TaqMan próbák és RT-PCR felhasználásával. A P2RX7 kandidáns gén polimorfizmusainak meghatározása a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Genetikai és Patobiokémiai Intézetében, a Molekuláris Genetikai Laboratóriumban (MGL, a laboratórium vezetője: dr. Sasvári-Székely Mária) történt. Ebben a két vizsgálatban összesen 315 beteg (MDD=195; BPD=120; átlagéletkor 47,3(±11,5) év, 24,8% férfi és 75,2% nő) és 373 kontroll személy (átlagéletkor: 28,3(±12,4) év; nemi megoszlás: 30,0% férfi, 70,0% nő) vett részt. Mivel a betegek átlagéletkora jóval meghaladta a kontroll mintáét, a kontrollcsoporton belül elkülönítettünk egy idősebb személyekből álló, ún. 'korra-korrigált' kontroll csoportot (N=163; átlagéletkor 37,8(±12,9) év). Elsőként kinegyzet próbák segítségével végeztünk eloszlás vizsgálatot, hogy a depresszióra hajlamosító rizikó-tényezőket meghatározzuk. Ezt követően a dimenzionális vizsgálatokban a HADS, illetve a MADRS pontszámok alapján egyszempontos varianciaanalízis segítségével azonosítottuk a tünetsúlyosságot befolyásoló genotípusokat. A kontroll csoport és a klinikai alcsoportok pontszámainak, és a vizsgált polimorfizmusok interakció-elemzését kétszempontos kovarianciaanalízis alapján teszteltük.

4. Eredmények

4.1 A VEGF perifériás szintjének változása a kezelés során

A MADRS pontszámok alapján a kontroll viziten a '*kezelésre reagálók*' csoportja – amint az várható volt – kifejezettebb javulást mutatott, mint a '*kezelésre nem-reagálók*' csoportjáé. Az így mért átlagérték a '*kezelésre reagálók*' csoportjában kb. 75%-kal volt alacsonyabb ($p < 0,0001$) a kontroll viziten, mint a beválasztáskor, míg ugyanez az arány a '*kezelésre nem-reagálók*' csoportjában mindössze 25% volt ($p < 0,001$). Ugyanakkor a **periférián mért plazma VEGF szintek** sem a teljes vizsgált populációban, sem a '*kezelésre reagálók*', sem a '*kezelésre nem-reagálók*' alcsoportjaiban **nem változtak szignifikáns módon a vizsgált 28 napos kezelési időszakban.**

4.2 A VEGF kezdeti perifériás szintje mint a terápiás válasz lehetséges prediktora

Eredményeink – statisztikailag tendenciózus szinten – arra utaltak, hogy a *'kezelésre nem-reagálók'* csoportjának VEGF szintje a kezelés előtt magasabb volt, mint a *'kezelésre reagálók'* csoportjáié ($p=0,055$), és ez a különbség kimutatható volt a 28 napos kezelési periódus végén is ($p=0,097$). Ugyanakkor **dimenzionális modell** alkalmazásával pontosabb összefüggéseket kaptunk a kezdeti perifériás VEGF szint és a 28 napos kezelés után MADRS-sal becsült depresszió pontszámok között: **a kezelés előtt mért VEGF szint szignifikáns ($p=0,02$) prediktora a kezelési periódus végén MADRS-sal becsült tünetsúlyosságnak.** A bemutatott eredmények alapján a periférián mért VEGF szint az MDE-ben szenvedők várható terápiás válaszána egyik lehetséges biomarkerévé válhat, amennyiben eredményeinket további, független vizsgálatok is megerősítik.

4.3 A P2RX7 génvariánsai mint a depresszió lehetséges rizikófaktorai (eset-kontroll modell)

Eset-kontroll modellt alkalmazva nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző betegcsoportok (MDD, BPD) és a kontroll csoport P2RX7 gén exon polimorfizmusának (rs2230912) allél-, illetve genotípus eloszlásában sem az első mintában, sem a kiterjesztett mintán történt replikáció során. Ezt a modellt alkalmazva nem találtunk különbséget a P2RX7 gén mikroRNS kötőhely polimorfizmusának (rs1653625) vonatkozásában sem.

4.4 P2RX7 rs2230912 G-allélja mint a depresszió súlyosságának lehetséges biomarkere (dimenzionális modell)

A depresszió, illetve a szorongás kérdőíves jellemzésével végzett dimenzionális megközelítési módot alkalmazva a P2RX7 exon polimorfizmus (rs2230912) génváltozatai és a tünetek súlyossága között szignifikáns összefüggést kaptunk mind az első mintában, mind pedig a kiterjesztett mintán történt replikáció során. **Azok az MDD-s és BPD-s betegek, akik az rs2230912 polimorfizmus G-allélját hordozzák, magasabb pontszámokat értek el a HADS depresszió és szorongás alszáján (depresszió: $p=0,0004$; szorongás: $p=0,012$).** Ugyanakkor a kontroll csoport HADS pontszámaira nem volt hatással a vizsgálati személyek genotípusa. A kiterjesztett mintán végzett vizsgálatok ezt az összefüggést megerősítették és pontosították a BPD mintára. Eredményeink szerint **az exon polimorfizmus (rs2230912) G-**

allélját hordozó BPD-s személyek magasabb HADS depresszió ($p=0,003$), valamint magasabb MADRS ($p=0,028$) pontszámokkal jellemezték tüneteik súlyosságát.

4.5 A P2RX7 mikroRNS kötőhely polimorfizmusa (rs1653625) mint a depresszió súlyosságának lehetséges biomarkere (dimenzionális modell)

A depresszió dimenzionális vizsgálatának eredménye szerint az rs1653625 polimorfizmus C-allélját hordozó BPD-s betegek depressziós tünetsúlyossága mindkét depresszió skálán alacsonyabb volt, mint az AA genotípust hordozóké (HADS: $p=0,017$; MADRS: $p=0,019$).

5. Következtetések

Különböző megközelítési módokkal vizsgáltuk a periférián mérhető *VEGF plazma-szint* és a gyógyszeres terápia lehetséges összefüggéseit. A teljes betegcsoportot vizsgálva az első viziten, valamint a 28 napos kezelés után mért VEGF szintekben nem találtunk szignifikáns különbséget. A 'kezelésre reagálók' és a 'kezelésre nem-reagálók' alcsoportjaiban mért kezelés előtti és utáni VEGF szintekben azonban trend szintű összefüggést mutattunk ki: az első viziten mért VEGF szint a 'kezelésre reagálók' csoportjában alacsonyabb volt, mint a 'kezelésre nem-reagálók' csoportjában ($p=0,055$), amely különbség a 28 napos kezelés végén is kimutatható volt ($p=0,097$). Dimenzionális megközelítési módot alkalmazva szignifikáns ($p=0,02$) összefüggést mutattunk ki a kezelés előtt mért VEGF szint és a MADRS-sal mért depressziós tünetsúlyosság között: a kezdeti relatíve alacsony perifériás VEGF szint alacsony MADRS pontszámokat valószínűsített a kezelés 28 napját követő második viziten. Eredményeink alapján a VEGF szint a major depressziós epizódban szenvedők hatékony kezelésének egyik lehetséges biomarkere lehet, ha magának a terápiának a hatékonyságát kvantitatív módszerekkel mérjük. A VEGF szint változásával kapcsolatos eredményeink összhangban vannak az utóbbi évek szakirodalmában fellelhető adatokkal, melyek szerint a VEGF szerepet játszhat a depresszió patogenezisében, valamint az antidepresszív kezelést kísérő molekuláris elváltozásokban.

Genetikai asszociáció-analíziseinkben egyrészt összefüggést kerestünk az általunk vizsgált P2RX7 polimorfizmusok (rs2230912 és rs1653625) mint a depresszió lehetséges rizikófaktorai, valamint az unipoláris major depresszió (MDD) és a bipoláris zavar (BPD) előfordulása között. Eset-kontroll modellt alkalmazva nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes betegalcsoportok (MDD, BPD) és a kontroll csoport allél-, illetve genotípus

eloszlásában sem a P2RX7 exon polimorfizmusának (rs2230912), sem a feltételezett mikroRNS kötőhely polimorfizmusának (rs1653625) vonatkozásában. Dimenzionális megközelítési mód alkalmazásával arra kerestük a választ, hogy vajon kimutatható-e összefüggés az általunk vizsgált genetikai markerek és a kérdőívekkel megbecsült depressziós tünetsúlyosság között. Eredményeink szerint az első mintában azok az MDD-s és BPD-s betegek, akik az rs2230912 exon polimorfizmus G-allélját hordozzák, a HADS depresszió és szorongás alsóskáláján szignifikánsan ($p=0,0004$; $p=0,012$) súlyosabb tünetekről számoltak be. A kiterjesztett mintán végzett vizsgálatok eredményei pontosították és részben megerősítették ezt az összefüggést: azok a BPD-s személyek, akik az rs2230912 polimorfizmus G-allélját hordozták, szignifikánsan magasabb pontszámokat értek el nemcsak a HADS depresszió ($p=0,003$), de a MADRS tünetbecslő skálán ($p=0,028$) is. Ezek az eredmények alátámasztják azokat a szakirodalmi adatokat, melyek összefüggést találtak a P2RX7 exon polimorfizmusa és a depresszió előfordulása közt, és rámutatnak arra, hogy a dimenzionális modell az eset-kontroll modellnél érzékenyebb eszköz a genetikai asszociáció-vizsgálatokban. A P2RX7 mikroRNS kötőhely polimorfizmust (rs1653625) kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a depresszió vonatkozásában. Ebben az esetben is a dimenzionális modell hozott pozitív eredményeket: szignifikáns összefüggést mutattunk ki a mikroRNS kötőhely variánsok és a BPD-s betegek HADS vagy MADRS skálával felmért depressziós tünetsúlyossága között.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 A dolgozat alapját képező közlemények

Halmi Z, Dome P, Vereczkei A, Rahman OA, Szekely A, Gonda X, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2013) Associations between depression severity and purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms. *J Affect Disord* 150(1):104-9. (IF.: 3.705)

Halmi Z, Dome P, Dobos J, Gonda X, Szekely A, Sasvari-Szekely M, Faludi G, Lazary J. (2013) Peripheral vascular endothelial growth factor level is associated with antidepressant treatment response: Results of a preliminary study. *J Affect Disord*, 144(3):269-73. (IF.: 3.705)

Hejjas K, Szekely A, Domotor E, **Halmi Z**, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2009) Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: A dimensional approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B:295–9. (IF.: 3.932)

6.2 A dolgozathoz szorosan nem kapcsolódó közlemények

Kotyuk E, Nemeth N, **Halmi Z**, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Szekely A. (2013) A hangulati dimenziók és a glia-eredetű növekedési faktort kódoló gén polimorfizmusainak összefüggése depresszióval diagnosztizált mintán. *Neuropsychopharmacol Hung*, 15(2):63-72.

Dome P, **Halmi Z**, Dobos J, Lazary J, Gonda X, Kenessey I, Sallai T, Makkos Z, Faludi G. (2012) Investigation of circulating endothelial progenitor cells and angiogenic and inflammatory cytokines during recovery from an episode of major depression. *J Affect Disord*, 136(3):1159-63. (IF.: 3.295)

Szekely A, Kovacs-Nagy R, Bányai É, Gósi-Greguss A, Varga K, **Halmi Z**, Ronai Z, Sasvari-Szekely M. (2010) Association between hypnotizability and the catechol-o-methyltransferase (COMT) polymorphism. *Int J Clin Exp Hypn*, 58(3): 301-15. (IF.: 1.842)

Halmi Z, Dömötör E, Balogh G, Sárosi A, Faludi G, Székely A. (2008) Egy új hangulati kérdőív validálása egészséges mintán. *Neuropsychopharmacol Hung*, 10(3): 151-157.