

Znaczenie polimorfizmu i ekspresji genu Dvl3 w etiologii zaburzeń depresyjnych nawracających

Polymorphism and expression of the Dvl3 gene in the etiology of depressive disorder

Marlena Zajączkowska¹, Monika Talarowska¹, Janusz Szmraj²,
Piotr Gałęcki¹

¹ Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Klinika Psychiatrii Dorosłych

² Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biochemii Medycznej

Summary

Aim. The aim of this study was to investigate the role of the Dvl3 gene in the etiology of depression by comparison of Dvl3 mRNA expression, Dvl3 protein levels and polymorphism at locus rs1969253 located in the intron of the Dvl3 gene in patients suffering from depression versus healthy controls, as well as to search for clinical variables related to polymorphism or expression of the analyzed gene.

Material and methods. Study group involved 181 individuals suffering from recurrent depressive disorder or depressive episode. Control group consisted of 102 healthy individuals. Sample of peripheral blood was obtained from each participant to measure Dvl3 mRNA expression, Dvl3 protein levels and polymorphism at locus rs1969253. Patients were examined on study entry with the Hamilton Depression Scale and data on the gender, age and course of disorder were gathered. Obtained data were analyzed statistically.

Results. Significantly decreased Dvl3 mRNA expression and Dvl3 protein levels were found in patients suffering from depression in comparison to healthy individuals. Expression of the Dvl3 gene in depressed patients was not affected by the patients' gender, age, number of episodes, severity of symptoms, duration of the illness or age of onset. The analysis of polymorphism at locus rs1969253 indicated that individuals with genotypes CA and CC had over 3 times higher risk of having depression in comparison to individuals with AA genotype (OR = 3.3; 95% CI = 1.56–6.99). No relationship was observed between the polymorphism and the analyzed clinical variables.

Conclusions. Changes in expression and polymorphism of the Dvl3 gene may play a role in the pathogenetic mechanism of depressive disorder.

Słowa kluczowe: depresja, gen Dvl3

Key words: depression, Dvl3 gene

Wstęp

Depresja jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń psychicznych i coraz bardziej kosztownym problemem zdrowotnym [1]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) zaburzenia depresyjne dotyczą obecnie około 350 milionów ludzi na świecie i są trzecią przyczyną niesprawności wywołanej przez choroby (mierzoną za pomocą wskaźnika DALY – *Disability Adjusted Life Years*) [2]. Ryzyko zachorowania na depresję w ciągu całego życia wynosi średnio około 8–12% i różni się znacząco w różnych krajach [3]. Przebieg choroby ma w większości przypadków charakter przewlekły i nawracający [4], wiąże się z krótszą przewidywaną długością życia i wysokim ryzykiem samobójstwa [5].

Uznaje się, że etiologia zaburzeń depresyjnych jest wieloczynnikowa i znaczenie mają zarówno czynniki środowiskowe, jak i skomplikowane i wzajemnie powiązane uwarunkowania psychologiczne i biologiczne danej jednostki. Do najlepiej udowodnionych mechanizmów patogenetycznych w depresji należą zaburzenia przewodnictwa monoaminergicznego, co jest podstawą współczesnej farmakoterapii, oraz zwiększona aktywność osi podwzgórze–przysadka–nadnercza [6, 7]. Ostatnie lata przyniosły również wiele dowodów na rolę układu odpornościowego oraz procesów zapalnych w etiologii depresji [8, 9]. U chorych obserwuje się zwiększone poziomy cytokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF – α , białek ostrej fazy, układu dopełniacza, jak i enzymów biorących udział w reakcji zapalnej [10–12]. Kolejnymi istotnymi czynnikami patogenetycznymi mogą być neutrofiliny regulujące proliferację i przeżywalność neuronów w OUN, takie jak BDNF [13, 14]. Zaburzenia ich poziomu w połączeniu z innymi mechanizmami skutkują obserwowanymi w przebiegu depresji zmianami strukturalnymi mózgu, takimi jak: zmniejszenie objętości hipokampu, ciał migdałowatych, struktur podkorowych, a także zmniejszenia grubości kory mózgowej w obrębie płatów czołowych, skroniowych i ciemieniowych [15, 16].

Coraz więcej wiadomo również na temat genetycznego podłoża depresji. Obserwacje bliźniąt monozygotycznych oraz rodzin, w których występuje depresja, pozwalają ustalić udział czynników genetycznych w etiologii depresji na około 36–37% [17, 18]. Także szacunki oparte na badaniach asocjacyjnych całego genomu (*Genome Wide Association Studies* – GWAS) wskazują, że genetyczna komponenta depresji to co najmniej 32% [19]. Choć badacze od wielu lat próbują ustalić genotypy predysponujące do wystąpienia depresji, dotychczasowe obserwacje nie dały satysfakcjonujących wyników. Przez wiele lat główną metodą badań genetycznych stosowaną w psychiatrii były badania genów kandydujących oraz analizy sprzężeń w rodzinach dotkniętych danym zaburzeniem. Potencjalny związek z ryzykiem zachorowania na depresję przypisywano głównie genom kodującym enzymy odpowiedzialne za syntezę i rozkład neuroprzekazników, transportery oraz receptory dla serotoniny, dopaminy i innych neuroprzekazników [20, 21]. Badania te często prowadzone były na małych grupach pacjentów, a ich wyniki cechowała niska powtarzalność. Nowe możliwości przyniosło zastosowanie w psychiatrii badań asocjacyjnych całego genomu, które nie ograniczają badanej puli genów do tych, które są związane ze znanymi patomechanizmami [22]. Badania GWAS polegają na analizie ogromnej liczby polimorfizmów pojedynczych

nukleotydów (*Single Nucleotide Polimorfism* – SNP) w całym genomie i pozwalają na identyfikację częstych genotypów łączących się z daną chorobą czy cechą. W wielu chorobach psychicznych, np. w schizofrenii czy chorobie afektywnej dwubiegunowej, badania asocjacyjne wskazały na istotną statystycznie zależność na poziomie genomowym między polimorfizmami kilku czy kilkunastu genów a występowaniem tych chorób [23, 24]. W wypadku zaburzeń depresyjnych dotychczasowe badania GWAS nie dały jednoznacznych wyników ani nie pokrywały się z obserwacjami płynącymi z badań genów kandydujących [25].

Metaanaliza badań GWAS przeprowadzona w 2013 roku dla zaburzeń depresyjnych objęła 18 759 uczestników, jednak okazało się, że to wciąż zbyt mała grupa, by wykryć istotne statystycznie zależności między analizowanymi SNP a występowaniem zaburzeń depresyjnych [26]. Najbliżej osiągnięcia poziomu istotności statystycznej dla całej grupy badanej były polimorfizmy 2 rejonów chromosomów autosomalnych: rs 11579964 (chr1: 222 605 563 bp; $P = 1,0 \times 10^{-7}$) oraz rs 7647854 (chr3: 186 359 477 bp; $P = 6,5 \times 10^{-7}$) [26]. Natomiast w podgrupie kobiet oraz w wypadku nawracających zaburzeń depresyjnych blisko osiągnięcia istotnego wyniku był region chr3: 185.3Mb rs 1969253 w obrębie intronu genu Dvl3 (disheveled 3) kodującego białko będące elementem szlaków sygnałowych Wnt [26]. Wiadomo już, że jako element szlaków sygnałowych zależnych od Wnt białko Dvl3 oraz jego izoformy Dvl1 i Dvl2 biorą udział w embriogenezie, w tym neurogenezie, jak i w utrzymywaniu homeostazy dorosłych tkanek [27, 28]. Badania na zwierzętach sugerują również rolę białka Dvl3 w regulacji procesów pamięci, interakcji społecznych i nastroju [28–30].

Celem tej pracy jest poszerzenie wiedzy na temat genu Dvl3 i jego potencjalnego znaczenia dla etiologii zaburzeń depresyjnych przez ocenę polimorfizmu rs 1969253 oraz ekspresji genu Dvl3 na poziomie mRNA i na poziomie białka u osób dotkniętych zaburzeniami depresyjnymi w porównaniu z osobami zdrowymi oraz poszukiwanie zależności między ekspresją genu Dvl3 i polimorfizmem rs 1969253 a zmiennymi klinicznymi w przebiegu ZDN.

Material

W badaniu wzięło udział 283 pełnoletnich, niespokrewnionych uczestników polskiego pochodzenia. Uczestników badania podzielono na dwie grupy. Grupę eksperymentalną z zaburzeniami depresyjnymi (ZD) liczącą 181 pacjentów stanowiły osoby hospitalizowane psychiatrycznie z rozpoznaniem epizodu depresyjnego (F32) lub zaburzeń depresyjnych nawracających (F33.0–F33.8) według ICD-10 (WHO, 1992). Z badania wyłączono pacjentów, u których oprócz zaburzeń depresyjnych rozpoznano także inne choroby psychiczne lub uzależnienie od SPA (z wyjątkiem kofeiny i nikotyny), uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, choroby nowotworowe, poważne choroby neurologiczne oraz ciężkie i przewlekłe choroby zapaalne. Dane dotyczące przebiegu choroby zbierano za pomocą *Zbiorczego Międzynarodowego Wywiadu Diagnostycznego* (*Composite International Diagnostic Interview* – CIDI). Gromadzono także dane na temat wieku w momencie rozpoznania depresji, liczby przeżytych epizodów depresyjnych oraz oceniano nasilenie zaburzeń przy włączeniu

do badania z użyciem *Skali Depresji Hamiltona*. Dane te pozyskiwane były przez tego samego lekarza na początku hospitalizacji, w objawowej fazie choroby. Od każdego pacjenta przy pomocy wykwalifikowanego personelu medycznego pobrano 5 ml krwi żyłnej do badań genetycznych.

Grupę kontrolną (GK) stanowiły 102 zdrowe psychicznie osoby z negatywnym wywiadem w kierunku chorób psychicznych w rodzinie, u których – podobnie jak w grupie badanej – nie występowały choroby nowotworowe, poważne choroby neurologiczne oraz ciężkie i przewlekłe choroby zapalne. Ocenę stanu psychicznego w GK również oparto na kryteriach CIDI.

Udział w badaniu był dobrowolny, a podawane dane oraz wyniki zostały użyte jedynie do zbiorczych analiz statystycznych. Każdy z uczestników po zapoznaniu się z celem i przebiegiem badania wyraził pisemną zgodę na udział w nim. Przed przeprowadzeniem badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, nr RNN/733/14/KB z dnia 28.10.2014 roku.

Metody

Metody badań genetycznych

Ocena ekspresji genu Dvl3 na poziomie mRNA

Izolację całkowitego RNA z jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej pacjentów wykonano za pomocą odczynnika do izolacji DNA TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) zgodnie ze standardami jednostopniowej metody izolacji RNA (*Acid-Guanidinium-Phenol-Chlorophorm Method* – AGPC) [31]. Absorbancję wyizolowanego RNA mierzono z użyciem spektrofotometru (Picodrop) przy $\lambda = 260$ nm w celu oznaczenia stężenia całkowitego RNA. Jakość całkowitego RNA sprawdzono zestawem Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta za pomocą 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Reakcję odwrotnej transkrypcji (*Reverse Transcription* – RT) przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu TaqMan® RNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniami producenta, używając swoistych sond fluorogenicznych (Applied Biosystems): Hs 00610261_m1, Hs04194366_g1 specyficznych kolejno dla genów: *Dvl3* i *RPL13A*. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono za pomocą zestawu TaqMan® Universal PCR Master Mix, No UNG (Applied Biosystems) według protokołu dostarczonego przez producenta. W celu obliczenia względnej ekspresji na poziomie mRNA zastosowano metodę porównawczą Ct [32, 33]. W metodzie tej poziom ekspresji danego genu (wartość *RQ*) w badanej próbce normalizowany był względem dobranej kontroli endogennej. Poziom ekspresji genu *Dvl3* w poszczególnych próbkach normalizowano wobec genu referencyjnego *RPL13A* wybranego z kilku wcześniej analizowanych genów (*GAPD* – dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego, cyclophilin, 18S rRNA, *RPL13a* – gen białka rybosomalnego L13a). Pomiary fluorescencji pozwoliły na ilościową ocenę poziomów mRNA przez ustalenie wartości cyklu progowego (*Cycle threshold* – Ct). Analizy przeprowadzono za pomocą ABI Prism 7900 HT Fast

Real Time PCR System (SDS Software). Dla każdej próby przeprowadzono kontrolę negatywną (*No Template Control* – NTC), w której cDNA zastępowano dejonizowaną wodą. Względne poziomy ekspresji genów otrzymano, stosując standardowe obliczenia według wzoru $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i wyrażono jako krotność zmian w próbce kontrolnej [32, 33].

Oznaczanie stężenia białka Dvl3 we krwi obwodowej

Stężenie białka *Dvl3* w surowicy pacjentów i kontroli oznaczano testem ELISA, wykorzystując zestaw *Dvl3* ELISA Kit (MyBiosource, San Diego, CA, USA) według protokołów dostarczonych przez producenta. β -aktynę wykorzystano jako kontrolę endogenną stężenia białka w próbkach i oznaczono zestawem Human Actin Beta (ACTb) ELISA Kit (BMASAY) zgodnie z zaleceniami producenta. Do dołków opłaszczonych przeciwciałami specyficznymi wobec analizowanych białek dodano 100 μ l frakcji cytozolowej ($\rho_{\text{białko}} = 0,5$ mg/ml) i inkubowano. Zawartość usuwano, a dołki płukano trzema zmianami w 10 mM buforze PBS i inkubowano ze 100 μ l biotynylowanych przeciwciał specyficznych wobec analizowanych białek. Następnie zawartość usuwano, a dołki płukano trzema zmianami w 10 mM buforze PBS i inkubowano ze 100 μ l ABC Working Solution. Zawartość usuwano, a dołki płukano pięcioma zmianami w 10 mM buforze PBS i inkubowano z 90 μ l substratu TMB. Po dodaniu 100 μ l TMB Stop Solution absorbancję próbek mierzono za pomocą mikropłytkowego czytnika fotometrycznego Multiskan Ascent (Thermo Labsystems) przy $\lambda = 450$ nm.

Genotypowanie SNP rs 1969253 genu Dvl3

Genomowy DNA ekstrahowano z leukocytów krwi obwodowej, stosując standardowe procedury zgodnie z protokołem producenta (A & A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Ilość i jakość wyizolowanego DNA analizowano za pomocą NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., DE, USA). Genotypy polimorfizmu identyfikowali asystenci nieznający statusu klinicznego uczestników, od których pochodziły badane próbki, za pomocą testu TaqMan discrimination assay. Użyto starterów specyficznych dla TagMan SNP (*Dvl3*) assay code C_316872_10 dla rs 1969253. Reakcję PCR wykonano z użyciem HT Real Time PCR system 7900 (Applied Biosystems) według standardowej procedury. Dyskryminację alleliczną przeprowadzono na produkcie otrzymanym po zakończeniu reakcji PCR. Analizy produktów amplifikacji dokonano z użyciem oprogramowania SDS, wersja 1.2. Wydajność amplifikacji obliczano z nachylenia krzywych standardowych uzyskanych na podstawie indywidualnych pomiarów każdej sondy podczas testowania rozcieńczonych próbek heterozygotycznych. Próbki bez matrycy użyto jako kontroli negatywnej.

Ocena nasilenia depresji

Do oceny nasilenia zaburzeń depresyjnych w grupie eksperymentalnej zastosowano 21-itemową *Skalę Depresji Hamiltona* (*Hamilton Depression Rating Scale* – HDRS), którą przebadano każdego pacjenta przy przyjęciu. Nasilenie objawów oceniane było

na czteropunktowej skali (od 0 do 4 punktów, w 13 itemach, w pozostałych od 0 do 2 punktów). Punktacji z 4 ostatnich pytań nie włączono do całkowitego wyniku. Wynik sklasyfikowano zgodnie ze standardową punktacją [34].

Metody obliczeń statystycznych

Obliczenia statystyczne wykonywano z użyciem programu komputerowego STATISTICA PL, wersja 12. Cechy jakościowe w badanej populacji opisano za pomocą wybranych wskaźników struktury; częstości występowania cech podawano w procentach. Dla cech ilościowych obliczano średnią arytmetyczną (M). Za miarę rozrzutu przyjęto odchylenie standardowe (SD) oraz zakres wartości (podając wartości minimum i maksimum). Test Shapiro–Wilka został użyty do oceny normalności rozkładu zmiennych – odbiegały one we wszystkich przypadkach od rozkładu normalnego. W stosunku do zmiennych nieparametrycznych do porównań statystycznych pomiędzy badanymi grupami zastosowano odpowiednie testy nieparametryczne: test χ^2 Pearsona (dla zmiennych jakościowych), test zgodności rozkładów U Manna–Whitneya oraz test Kruskala–Wallisa (dla zmiennych ilościowych). Do oceny wzajemnych powiązań między wybranymi zmiennymi ilościowymi bądź porządkowymi użyto współczynnika korelacji rang R -Spearmana.

Równowaga Hardy’ego–Weinberga (HWE) została określona za pomocą SNP-stats [35]. Uwzględniono trzy genotypy dla polimorfizmu rs 1969253: AA, AC i CC. Różnice w rozkładzie genotypu między grupą badaną a grupą kontrolną oceniano za pomocą ilorazu szans (OR), 95% przedziału ufności (CI) i testu chi-kwadrat, stosując model regresji liniowej skorygowany o płeć i wiek. Testowano 5 modeli dziedziczenia. W celu wyboru najlepszego modelu dziedziczenia stosowano kryterium informacyjne Akaikego. Do statystycznego porównania różnych genotypów w odniesieniu do zmiennych ilościowych wykorzystano nieparametryczny test Kruskala–Wallisa. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Charakterystyka badanej grupy

Średni wiek wszystkich przebadanych osób ($N = 283$) wynosił: $M = 40,94$ roku, odchylenie standardowe (SD) = 13,67, minimalny wiek – 18 lat, maksymalny – 67 lat. Grupy różniły się znacząco pod względem wieku; nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami pod względem płci. Charakterystykę grupy z zaburzeniami depresyjnymi i grupy kontrolnej co do wieku i płci oddaje tabela 1. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że występuje istotna statystycznie różnica w poziomie ekspresji genu *Dvl3* na poziomie mRNA i białka między pacjentami cierpiącymi na zaburzenia depresyjne a osobami zdrowymi z grupy kontrolnej (tab. 1). U osób chorujących na ZD średni poziom ekspresji mRNA oraz średnie stężenie białka *Dvl3* były niższe niż u osób zdrowych.

Tabela 1. Porównanie badanych grup pod względem wieku, płci, ekspresji genu Dvl3 na poziomie mRNA i białka

Zmienna	ZD (n = 181)	GK (n = 102)	Porównanie grup ZD z GK
Wiek (M±SD)	47,59±11,29	29,16±8,68	Z = 10,56; p < 0,01*
Płeć męska (n, %)	72 (39, 78%)	35 (34, 31%)	$\chi^2 = 0,83$; p = 0,36
Poziom ekspresji mRNA (M±SD)	0,11±0,03	0,15±0,06	Z = - 4,26; p < 0,01*
Stężenie białka Dvl3 (M±SD)	13,03±3,04	16,58±5,59	Z = - 4,68; p < 0,01*

ZD – grupa pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi; GK – grupa kontrolna; n – liczebność badanej populacji; M – średnia; SD – odchylenie standardowe; Z – wartość Z w teście U Manna–Whitneya; χ^2 – wartość testu chi² Pearsona; p – poziom istotności statystycznej, * – p istotne statystycznie.

Grupa badana i kontrolna różniły się istotnie pod względem wieku, natomiast wiek nie korelował z poziomem ekspresji mRNA ani stężeniem białka Dvl3 w grupie badanej. Istotną zależność między wiekiem a ekspresją genu Dvl3 obserwowano wśród osób zdrowych i co ciekawe – była to korelacja dodatnia (starsze osoby wykazywały wyższe poziomu ekspresji genu Dvl3 od osób młodszych). Biorąc pod uwagę fakt, że średnia wieku w grupie kontrolnej była istotnie niższa niż w grupie eksperymentalnej, należy się spodziewać, że przy dobranej pod względem wieku grupie kontrolnej obserwowane różnice ekspresji genu Dvl3 na poziomie mRNA i białka byłyby nawet większe niż w naszym badaniu. Płeć nie miała związku z ekspresją genu Dvl3 w żadnej z analizowanych grup (tab. 2).

Tabela 2. Analiza zależności między wiekiem i płcią a ekspresją genu Dvl3 na poziomie mRNA i białka w badanych grupach

Zmienne	ZD		GK	
	R	p	RS	p
Wiek & Ekspresja mRNA genu Dvl3	-0,06	0,43	0,25	p = 0,01*
Wiek & Ekspresja białka Dvl3	-0,06	0,42	0,26	p < 0,01*
	Z	p	Z	p
Płeć & Ekspresja mRNA genu Dvl3	0,62	0,53	0,9	p = 0,37
Płeć & Ekspresja białka DVL3	0,74	0,46	0,82	p = 0,41

ZD – grupa pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi; GK – grupa kontrolna; Z – wartość Z w teście U Manna–Whitneya; R – wartość R w teście korelacji porządku rang Spearmana; p – poziom istotności statystycznej; * – p istotne statystycznie.

W tabeli 3 przedstawiono kliniczną charakterystykę grupy ZD pod względem liczby hospitalizacji, wieku zachorowania, czasu trwania choroby, liczby przebytych epizodów depresji oraz wyników *Skali Depresji Hamiltona* w dniu włączenia do badania. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między żadną z analizowanych zmiennych klinicznych a ekspresją genu Dvl3 na poziomie mRNA i białka oraz polimorfizmem rs 1969253, co również obrazuje tabela 3.

Tabela 3. Kliniczna charakterystyka grupy pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne oraz analiza zależności między zmiennymi klinicznymi a ekspresją genu *Dvl3* na poziomie mRNA i białka oraz polimorfizmem rs 1969253

Zmienna	Charakterystyka kliniczna grupy ZD (n = 181)				Ekspresja mRNA genu <i>Dvl3</i>	Ekspresja białka <i>DVL3</i>	Polimorfizm rs 1969253
	M	Min.	Maks.	SD	RS (p)	RD (p)	H (2, N = 181) (p)
Liczba hospitalizacji	2,12	1	12	1,98	-0,08 (p = 0,26)	-0,091 (p = 0,22)	2,09 (p = 0,35)
Wiek zachorowania	41,19	14	66	11,83	-0,07 (p = 0,32)	-0,073 (p = 0,33)	5,16 (p = 0,08)
Czas trwania choroby	6,39	1	40	7,32	-0,03 (p = 0,67)	-0,031 (p = 0,68)	3,81 (p = 0,15)
Liczba epizodów depresji	4,72	1	20	5,50	-0,07 (p = 0,35)	-0,070 (p = 0,35)	0,16 (p = 0,92)
HDRS w dniu przyjęcia	22,58	5	37	6,39	-0,07 (p = 0,36)	-0,068 (p = 0,37)	1,45 (p = 0,49)

ZD – grupa pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi; n – liczebność badanej populacji; M – średnia; Min. – wartość minimalna; Maks. – wartość maksymalna; SD – odchylenie standardowe; RS – wartość R w teście korelacji porządku rang Spearmana; H – wartość H w teście Kruskala–Wallisa; p – poziom istotności statystycznej; HDRS – Skala Depresji Hamiltona; * – p istotne statystycznie.

Porównano również ekspresję genu *Dvl3* między pacjentami, którzy doświadczyli pierwszego epizodu depresji ($N = 67$), a pacjentami cierpiącymi na zaburzenia depresyjne nawracające ($N = 113$), jednak nie obserwowano istotnych różnic ani w wypadku ekspresji mRNA genu *Dvl3* ($Z = 0,56$; $p = 0,58$), ani dla ekspresji białka *Dvl3* ($Z = 0,42$; $p = 0,67$). Pacjenci ci nie różnili się również co do genotypu w miejscu polimorficznym rs 1969253 ($Z = 0,65$; $p = 0,72$).

Test dokładny dla testowania hipotezy o równowadze Hardy’ego–Weinberga wykazał w grupie kontrolnej zgodność rozkładu genotypów z prawem Hardy’ego–Weinberga ($p = 0,21$). Częstość allelu C w locus rs 1969253 w obrębie genu *Dvl3* wśród osób cierpiących na zaburzenia depresyjne nawracające była istotnie wyższa niż u osób nieobarczonych tą chorobą (55% vs. 39%; $p < 0,001$) (tab. 4). Model regresji liniowej, skorygowany o płeć i wiek, wykazał statystycznie znaczące różnice w rozkładzie genotypów między pacjentami z depresją a osobami zdrowymi. Przetestowano kilka modeli genotypowych o najniższej wartości AIC dla modelu dominującego, w którym osoby z genotypem CA i CC były ponad trzykrotnie bardziej zagrożone rozwojem depresji (OR = 3,30; 95% CI: 1,56–6,99) w porównaniu z osobami z genotypem AA (tab. 4).

Tabela 4. Różnice w rozkładzie genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu genetycznego rs 1969253 między pacjentami z depresją a osobami zdrowymi (n = 283, wynik skorygowany o płeć i wiek)

Model dziedziczenia	Genotyp rs 1969253	ZD (n, %)	GK (n, %)	OR (95% CI)	p	AIC
Kodominujący	AA	38 (20, 99%)	41 (40, 2%)	1,00	p < 0,01*	230
	CA	86 (47, 51%)	42 (41, 18%)	2,90 (1,29–6,56)**		
	CC	57 (31, 49%)	19 (18, 63%)	3,98 (1,62–9,81)**		
Dominujący	A/A	38 (20, 99%)	41 (40, 2%)	1,00	p < 0,01*	228,6
	C/A-C/C	143 (79, 01%)	61 (59, 8%)	3,30 (1,56–6,99)**		
	Allel	ZD (n, częstość alleli)	GK (n, częstość alleli)	OR (95% CI)	p	
	A	162 (0,45)	224 (0,61)	1,00	p < 0,01*	
	C	200 (0,55)	80 (0,39)	3,46 (2,49–4,80)**		

ZD – grupa pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi; GK – grupa kontrolna; n – liczebność badanej populacji; OR – iloraz szans; CI – przedział ufności; AIC – kryterium informacyjne Akaikego; p – poziom istotności statystycznej; * – p istotne statystycznie; ** – wartość powyżej 1 oznacza istotny czynnik ryzyka.

Omówienie wyników

W literaturze przedmiotu można znaleźć niewiele doniesień na temat polimorfizmu i ekspresji genu Dvl3 w kontekście zaburzeń depresyjnych. W przeprowadzonym przez nas badaniu wykazano istotną różnicę w ekspresji genu Dvl3 na poziomie mRNA i białka, jak również różnicę polimorfizmu rs 1969253 między osobami chorymi a zdrowymi. Jansen i wsp. [36] w badaniu przeprowadzonym na grupie 1848 osób, w którym mierzono ekspresję kilkuset genów we krwi obwodowej w trakcie trwania epizodu depresyjnego w porównaniu z osobami w remisji oraz osobami zdrowymi, wykazali, że w trakcie epizodów dochodzi do zmian ekspresji genu Dvl3 (co ciekawe, zaobserwowali oni zwiększenie ekspresji Dvl3 w trakcie trwania epizodu depresyjnego), do hamowania ekspresji genów zaangażowanych w szlaki prowadzące do aktywacji komórek NK (*Natural Killer*) oraz do wzmożonej ekspresji interleukiny 6 (IL-6). U osób chorujących na depresję w badaniu pośmiertnym obserwowano zmniejszoną transkrypcję białka Dvl3 w jądrach połączeniowych będących elementami układu nagrody i odgrywających znaczącą rolę w odczuwaniu przyjemności oraz poznawczym przetwarzaniu awersji, motywacji i przyjemności [29]. Podobne obserwacje poczyniono na zwierzęcym modelu zaburzeń depresyjnych – w jądrach połączeniowych myszy podatnych na stres psychospołeczny obserwowano obniżoną transkrypcję izoform Dvl1, Dvl2 i Dvl3 w porównaniu z odpornymi myszami, a farmakologiczne zablokowanie aktywności białek Dvl promowało zachowania depresyjne u myszy [29]. Mutacje genów Dvl1 i Dvl3 mogą prowadzić do przemijającego embrionalnego

rozszerzenia mózgu podczas formowania głębokich warstw kory mózgowej i zmiany w interakcjach społecznych, jak i stereotypowych zachowań u dorosłych zwierząt, czemu można zapobiegać przez farmakologiczną aktywację kanonicznego szlaku Wnt w okresie wczesnej kortykogenezы [30].

Białka Dvl odgrywają istotną rolę w namnażaniu, różnicowaniu i migracji komórek podczas embriogenezy [37, 38]. W układzie nerwowym dodatkowo biorą udział w formowaniu neurytów, tworzeniu synaps, polaryzacji neuronów, jak również w kształtowaniu osi przednio-tylnej oraz grzbietowo-brzusznego zróżnicowania cewy nerwowej [39, 40]. Szlak sygnałowy Wnt jest także jednym z głównych regulatorów neurogenezy w hipokampach osób dorosłych, co sugeruje, że izoformy białka Dvl zaangażowane są w procesy uczenia się i pamięci [41]. Aktywacja szlaku Wnt poprawia pamięć epizodyczną, a jego zablokowanie zapobiega konsolidacji pamięci długotrwałej bez wpływu na pamięć krótkotrwałą, co jest najprawdopodobniej związane z dysfunkcją szlaków dopaminergicznych [42, 43]. Na poziomie komórkowym wyłączenie funkcji szlaku Wnt prowadzi do zaburzenia procesu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, niezbędnego do trwałego zapamiętania, w tym reakcji ruchowych i wspomnień, w których powstawaniu bierze udział układ nagrody [44]. Obniżenie aktywności sygnalizacji Wnt u ludzi może się łączyć z osłabieniem funkcji poznawczych związanym z wiekiem, a także z patofizjologią choroby Alzheimera [45]. W eksperymentalnym modelu zwierzęcych zmian neurodegeneracyjnych zaobserwowano związek między niższymi poziomami jądrowego Dvl3 a utratą neuronów w hipokampie, a aktywacja szlaku Wnt hamowała utratę pamięci i poprawiała funkcje synaptyczne [42].

Nadekspresję genu Dvl3 zaobserwowano natomiast w leukocytach osób wyizolowanych społecznie, co prawdopodobnie wynika z udziału genu Dvl3 w procesie proliferacji komórek podczas aktywacji mechanizmów zapalnych [46]. Podwyższone poziomy Dvl3 odnotowano także w korze przedczołowej oraz prądkowiu szczurów po leczeniu lekami przeciwpsychotycznymi, co – jak sugerują autorzy badania – może być związane z obserwowanym działaniem neurotroficznym tych leków [47, 48].

Nasze badanie oprócz różnic w ekspresji między osobami chorymi na depresję a zdrowymi kontrolami wykazało również istotną statystycznie zależność między występowaniem depresji a polimorfizmem rs 1969253 genu Dvl3 w badanej grupie. Metaanaliza GWAS z 2013 roku nie wykazała, by polimorfizm rs 1969253 miał istotne znaczenie na poziomie genomowym w etiologii depresji, był on wszakże jednym z SNP najbliższych osiągnięcia progu istotności statystycznej w podgrupie kobiet i wśród osób cierpiących na ZDN [26]. Kolejne badania GWAS nie potwierdziły znaczenia polimorfizmu rs 1969253, jednak tylko kilka z dotychczas przeprowadzonych badań GWAS dało istotne statystycznie wyniki. Pierwsze z nich przeprowadzono na homogennej grupie chińskich kobiet z zaburzeniami depresyjnymi nawracającymi o ciężkim nasileniu objawów i wskazało ono na dwa SNP: jeden w pobliżu genu *SIRT1* i drugi w obrębie intronu genu *LHPP* [49]. Drugie badanie objęło 75 607 osób z depresją europejskiego pochodzenia i grupę kontrolną składającą się z 231 747 uczestników i wskazało na 15 istotnych SNP [50]. Kolejne badanie, wykorzystujące nieco inną metodologię opartą na metodzie HRHM (*Haplotype-block-based Regional Heritability Mapping*) wykazało znaczenie genu *TOX2* [51]. Połączenie wyników

dwóch wcześniejszych metaanaliz i przeanalizowanie ponad 70 tysięcy uczestników pozwoliło wykryć zależność między występowaniem depresji a locus rs 9825823, zlokalizowanym w intronie genu *FHIT* [52]. Natomiast analiza z uwzględnieniem wieku zachorowania potwierdziła istotne statystycznie znaczenie między występowaniem depresji a polimorfizmem innego regionu chromosomu 3, którego znaczenie sugerowano w metaanalizie GWAS z 2013 roku – a mianowicie regionu rs 7647854, który był powiązany z 50% przypadków depresji o późniejszym początku (powyżej 27. roku życia) [53]. Według autorów tego badania podłoże genetyczne zaburzeń depresyjnych zaczynających się w bardzo młodym wieku jest zbliżone do ChAD i schizofrenii [53]. W naszym badaniu nie obserwowaliśmy zależności między wiekiem zachorowania a polimorfizmem czy ekspresją genu *Dvl3*.

W najnowszym badaniu, opublikowanym w kwietniu 2018 roku, zebrano grupę 135 458 pacjentów z depresją oraz grupę kontrolną obejmującą 344 901 osób; badanie to wskazało na 44 loci powiązane z depresją, wśród których 4 najistotniejsze loci zlokalizowane są w obrębie genów *OLFM4*, *NERG1*, *RBFOX1* i *LRFN5*. Badanie to wskazało również związek ryzyka depresji z niskim poziomem edukacji, wyższym BMI oraz wspólne tło genetyczne ze schizofrenią [54].

Warto w tym miejscu odpowiedzieć na pytanie, dlaczego badania GWAS, które pozwoliły na wykrycie genetycznego podłoża wielu innych chorób dziedzicznych poligenowo, w tym np. schizofrenii czy choroby afektywnej dwubiegunowej, napotykały trudności ze znalezieniem genów odpowiedzialnych za dziedziczenie predyspozycji do wystąpienia zaburzeń depresyjnych. Powodów jest kilka. Badania GWAS standardowo obejmują częste polimorfizmy, czyli takie, które występują u przynajmniej 5% populacji, a ich efekt w kształtowaniu fenotypu jest zwykle niewielki. W wypadku zaburzeń depresyjnych liczba zaangażowanych loci o niewielkim efekcie może być wyjątkowo duża i przewyższać liczbę SNP istotnych w innych chorobach psychicznych, jak np. w schizofrenii czy chorobie afektywnej dwubiegunowej [55]. Dodatkowo depresja jest chorobą często występującą w populacji [56] i charakteryzującą się niejednorodną etiologią (depresja sezonowa, poporodowa, atypowa, z towarzyszącym lękiem, z objawami psychotycznymi, u pacjentów po traumatycznych przeżyciach, towarzysząca chorobom somatycznym itd.), a więc prawdopodobnie równie różnorodny jest stopień udziału czynników genetycznych w etiologii depresji, jak i różne są warianty genetyczne predysponujące do odmiennych endofenotypów depresji [57, 58]. Poza tym część pacjentów zostaje nieprawidłowo zakwalifikowana do grupy pacjentów z depresją, gdyż epizody depresyjne mogą być wstępem do rozwoju innych zaburzeń psychicznych, a z kolei w grupie kontrolnej mogą znaleźć się osoby, które dopiero w przyszłości zachorują na zaburzenia jednobiegunowe, co ma istotne znaczenie dla wyników badań GWAS [59]. Powyższe czynniki powodują, że dla uzyskania istotnych statystycznie wyników w badaniach GWAS niezbędna jest bardzo duża grupa uczestników, a pierwsze badania GWAS w depresji przeprowadzane były na zbyt małych populacjach i dawały wyniki, które nie były powtarzalne [22]. Nie można również zapominać o dominującym wpływie czynników środowiskowych w etiologii depresji i ich wzajemnych interakcjach z czynnikami genetycznymi [60].

Nasze badanie ma kilka ważnych ograniczeń, przede wszystkim istotną statystycznie różnicę wieku między grupą osób z zaburzeniami depresyjnymi a grupą kontrolną. Zostało ponadto przeprowadzone na niewielkiej grupie badanej, co mogło rzutować na brak zależności między zmiennymi klinicznymi a polimorfizmem czy ekspresją genu Dvl3. Mimo tych ograniczeń zaobserwowaliśmy jednak istotną różnicę ekspresji genu Dvl3 między osobami z depresją a osobami zdrowymi, uzyskane wyniki zaś są spójne w zakresie ekspresji na poziomie mRNA i białka. Wykazaliśmy też istotne znaczenie polimorfizmu genu Dvl3 dla ryzyka wystąpienia zaburzeń depresyjnych w badanej grupie.

Wnioski

Wykrycie częstych SNP powiązanych z depresją otwiera pole dla dalszych badań, których celem jest wyjaśnienie roli genów i produktów ich ekspresji w patogenezie tej częstej choroby, co może zaowocować nowymi metodami zapobiegania, diagnostyki i leczenia depresji. Wcześniejsze obserwacje oraz wyniki prezentowane w tej pracy wskazują, że gen Dvl3 może być jednym z genów, których polimorfizm oraz zmiany ekspresji odgrywają istotną rolę w etiologii depresji.

Badanie finansowane ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – grant nr 502-03/5-062-02/502-54-212.

Piśmiennictwo

1. Birnbaum HG, Kessler RC, Kelley D, Ben-Hamadi R, Joish VN, Greenberg PE. *Employer burden of mild, moderate, and severe major depressive disorder: Mental health services utilization and costs, and work performance.* *Depress. Anxiety* 2010; 27(1): 78–89.
2. WHO. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-statistics>.
3. Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Berglund P, Bijl RV, De Graaf R, Vollebergh W i wsp. *The epidemiology of major depressive episodes: Results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys.* *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 2003; 12(1): 3–21.
4. Hardeveld F, Spijker J, De Graaf R, Nolen WA, Beekman AT. *Recurrence of major depressive disorder and its predictors in the general population: Results from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS).* *Psychol. Med.* 2013; 43(1): 39–48.
5. Angst J, Angst F, Gerber-Werder R, Gamma A. *Suicide in 406 mood-disorder patients with and without long-term medication: A 40 to 44 years' follow-up.* *Arch. Suicide Res.* 2005; 9(3): 279–300.
6. Owens MJ, Nemeroff CB. *Role of serotonin in the pathophysiology of depression: Focus on the serotonin transporter.* *Clin. Chem.* 1994; 40(2): 288–295.
7. Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K i wsp. *Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients.* *Science.* 1984; 226(4680): 1342–1344.
8. Kubera M, Kenis G, Bosmans E, Zieba A, Dudek D, Nowak G i wsp. *Plasma levels of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist in depression: Comparison between the acute state and after remission.* *Pol. J. Pharmacol.* 2000; 52(3): 237–341.

9. Gałecki P. *Peripheral markers of inflammation, oxidative & nitrosative stress pathways and memory functions as a new target of pharmacotherapy in depression*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 2018; 80(Pt C): 167.
10. Gałecki P, Gałecka E, Maes M, Chamielec M, Orzechowska A, Bobińska K i wsp. *The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder*. J. Affect. Disord. 2012; 138(3): 360–366.
11. Mihailova S, Ivanova-Genova E, Lukanov T, Stoyanova V, Milanova V, Naumova E. *A study of TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, and IFN- γ gene polymorphisms in patients with depression*. J. Neuroimmunol. 2016; 293: 123–128.
12. Song C, Dinan T, Leonard BE. *Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls*. J. Affect. Disord. 1994; 30(4): 283–388.
13. Castrén E, Rantamäki T. *Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: Implications for pharmacological treatment*. CNS Drugs 2010; 24(1): 1–7.
14. Zhao G, Zhang C, Chen J, Su Y, Zhou R, Wang F i wsp. *Ratio of mBDNF to proBDNF for differential diagnosis of major depressive disorder and bipolar depression*. Mol. Neurobiol. 2017; 54(7): 5573–5582.
15. Zhang H, Li L, Wu M, Chen Z, Hu X, Chen Y i wsp. *Brain gray matter alterations in first episodes of depression: A meta-analysis of whole-brain studies*. Neurosci. Biobehav. Rev. 2016; 60: 43–50.
16. Hwang JP, Lee TW, Tsai SJ, Chen TJ, Yang CH, Lirng JF i wsp. *Cortical and subcortical abnormalities in late-onset depression with history of suicide attempts investigated with MRI and voxel-based morphometry*. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2010; 23(3): 171–184.
17. Middeldorp CM, Birley AJ, Cath DC, Gillespie NA, Willemsen G, Statham DJ i wsp. *Familial clustering of major depression and anxiety disorders in Australian and Dutch twins and siblings*. Twin. Res. Hum. Genet. 2005; 8(6): 609–615.
18. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. *Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis*. Am. J. Psychiatry 2000; 157(10): 1552–1562.
19. Lubke GH, Hottenga JJ, Walters R, Laurin C, Geus de EJ, Willemsen G i wsp. *Estimating the genetic variance of major depressive disorder due to all single nucleotide polymorphisms*. Biol. Psychiatry 2012; 72(8): 707–709.
20. Opmeer EM, Kortekaas R, Aleman A. *Depression and the role of genes involved in dopamine metabolism and signalling*. Prog. Neurobiol. 2010; 92(2): 112–133.
21. López-León S, Janssens AC, González-Zuloeta Ladd AM, Del-Favero J, Claes SJ, Oostra BA i wsp. *Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder*. Mol. Psychiatry 2008; 13(8): 772–785.
22. Sullivan PF. *The psychiatric GWAS consortium: Big science comes to psychiatry*. Neuron 2010; 68(2): 182–186.
23. Consortium SPG-WASG. *Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci*. Nat. Genet. 2011; 43(10): 969–976.
24. Lee SH, Ripke S, Neale BM, Faraone SV, Purcell SM, Perlis RH i wsp. *Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs*. Nat. Genet. 2013; 45(9): 984–994.
25. Dunn EC, Brown RC, Dai Y, Rosand J, Nugent NR, Amstadter AB i wsp. *Genetic determinants of depression: Recent findings and future directions*. Harv. Rev. Psychiatry 2015; 23(1): 1–18.
26. Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, Breen G i wsp. *A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder*. Mol. Psychiatry 2013; 18(4): 497–511.

27. Gao C, Chen YG. *Dishevelled: The hub of Wnt signaling*. Cell Signal 2010; 22(5): 717–727.
28. Tsang M, Lijam N, Yang Y, Beier DR, Wynshaw-Boris A, Sussman DJ. *Isolation and characterization of mouse dishevelled-3*. Dev. Dyn. 1996; 207(3): 253–362.
29. Wilkinson MB, Dias C, Magida J, Mazei-Robison M, Lobo M, Kennedy P i wsp. *A novel role of the WNT-dishevelled-GSK3 β signaling cascade in the mouse nucleus accumbens in a social defeat model of depression*. J. Neurosci. 2011; 31(25): 9084–9092.
30. Belinson H, Nakatani J, Babineau BA, Birnbaum RY, Ellegood J, Bershteyn M i wsp. *Prenatal β -catenin/Brn2/Tbr2 transcriptional cascade regulates adult social and stereotypic behaviors*. Mol Psychiatry 2016; 21(10): 1417–1433.
31. Chomczynski P, Sacchi N. *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on*. Nat. Protoc. 2006; 1(2): 581–585.
32. Schmittgen TD, Livak KJ. *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat. Protoc. 2008; 3(6): 1101–1108.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods 2001; 25(4): 402–408.
34. Demyttenaere K, De Fruyt J. *Getting what you ask for: On the selectivity of depression rating scales*. Psychother. Psychosom. 2003; 72(2): 61–70.
35. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. *SNPStats: A web tool for the analysis of association studies*. Bioinformatics 2006; 22(15): 1928–1929.
36. Jansen R, Penninx BW, Madar V, Xia K, Milaneschi Y, Hottenga JJ i wsp. *Gene expression in major depressive disorder*. Mol. Psychiatry 2016; 21(3): 339–347.
37. Li F, Chong ZZ, Maiese K. *Winding through the WNT pathway during cellular development and demise*. Histol. Histopathol. 2006; 21(1): 103–124.
38. Zhang X, Zhu J, Yang GY, Wang QJ, Qian L, Chen YM i wsp. *Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C*. Nat. Cell Biol. 2007; 9(7): 743–754.
39. Ciani L, Salinas PC. *WNTs in the vertebrate nervous system: From patterning to neuronal connectivity*. Nat. Rev. Neurosci. 2005; 6(5): 351–362.
40. Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. *Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling*. Cell 2000; 100(5): 525–535.
41. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A i wsp. *Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis*. Nature. 2005; 437(7063): 1370–1375.
42. Vargas JY, Fuenzalida M, Inestrosa NC. *In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model*. J. Neurosci. 2014; 34(6): 2191–2202.
43. Maguschak KA, Ressler KJ. *Wnt signaling in amygdala-dependent learning and memory*. J. Neurosci. 2011; 31(37): 13057–13067.
44. Diaz-Ruiz O, Zhang Y, Shan L, Malik N, Hoffman AF, Ladenheim B i wsp. *Attenuated response to methamphetamine sensitization and deficits in motor learning and memory after selective deletion of β -catenin in dopamine neurons*. Learn. Mem. 2012; 19(8): 341–350.
45. Inestrosa N, De Ferrari GV, Garrido JL, Alvarez A, Olivares GH, Barría MI i wsp. *Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration*. Neurochem. Int. 2002; 41(5): 341–344.
46. Cole SW, Hawkey LC, Arevalo JM, Sung CY, Rose RM, Cacioppo JT. *Social regulation of gene expression in human leukocytes*. Genome Biol. 2007; 8(9): R189.

47. Alimohamad H, Sutton L, Mouyal J, Rajakumar N, Rushlow WJ. *The effects of antipsychotics on beta-catenin, glycogen synthase kinase-3 and dishevelled in the ventral midbrain of rats.* J. Neurochem. 2005; 95(2): 513–525.
48. Sutton LP, Honardoust D, Mouyal J, Rajakumar N, Rushlow WJ. *Activation of the canonical Wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3.* J. Neurochem. 2007; 102(1): 153–169.
49. Cai N, Bigdeli T, Kretschmar W, Li Y, Liang J i wsp. *Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder.* Nature 2015; 523(7562): 588–591.
50. Hyde CL, Nagle MW, Tian C, Chen X, Paciga SA, Wendland JR i wsp. *Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent.* Nat. Genet. 2016; 48(9): 1031–1036.
51. Zeng Y, Navarro P, Shirali M, Howard DM, Adams MJ, Hall LS i wsp. *Genome-wide regional heritability mapping identifies a locus within the TOX2 gene associated with major depressive disorder.* Biol. Psychiatry 2017; 82(5): 312–321.
52. Direk N, Williams S, Smith JA, Ripke S, Air T, Amare AT i wsp. *An analysis of two genome-wide association meta-analyses identifies a new locus for broad depression phenotype.* Biol. Psychiatry 2017; 82(5): 322–329.
53. Power RA, Tansey KE, Buttenschön HN, Cohen-Woods S, Bigdeli T, Hall LS i wsp. *Genome-wide association for major depression through age at onset stratification: Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium.* Biol. Psychiatry 2017; 81(4): 325–335.
54. Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A i wsp. *Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression.* Nat. Genet. 2018; 50(5): 668–681.
55. Demirkan A, Penninx BW, Hek K, Wray NR, Amin N, Aulchenko YS i wsp. *Genetic risk profiles for depression and anxiety in adult and elderly cohorts.* Mol. Psychiatry 2011; 16(7): 773–783.
56. Bromet E, Andrade LH, Hwang I, Sampson NA, Alonso J, de Girolamo G i wsp. *Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode.* BMC Med. 2011; 9: 90.
57. Manchia M, Cullis J, Turecki G, Rouleau GA, Uher R, Alda M. *The impact of phenotypic and genetic heterogeneity on results of genome wide association studies of complex diseases.* PLoS One 2013; 8(10): e76295.
58. Kendler KS, Aggen SH, Neale MC. *Evidence for multiple genetic factors underlying DSM-IV criteria for major depression.* JAMA Psychiatry 2013; 70(6): 599–607.
59. Wray NR, Lee SH, Kendler KS. *Impact of diagnostic misclassification on estimation of genetic correlations using genome-wide genotypes.* Eur. J. Hum. Genet. 2012; 20(6): 668–674.
60. Mullins N, Power RA, Fisher HL, Hanscombe KB, Euesden J, Iniesta R i wsp. *Polygenic interactions with environmental adversity in the aetiology of major depressive disorder.* Psychol. Med. 2016; 46(4): 759–770.

Adres: Marlena Zajączkowska
Klinika Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
91-229 Łódź, ul. Aleksandrowska 159
e-mail: marlena.zajaczkowska@gmail.com

Otrzymano: 6.08.2018

Zrecenzowano: 14.10.2018

Otrzymano po poprawie: 28.10.2018

Przyjęto do druku: 8.02.2019