



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΙΚΡΟ ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ, ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ ΣΤΡΕΣ  
ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΛΟΙΜΩΞΗ:  
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ  
ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΙΚΡΟ ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ, ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ ΣΤΡΕΣ  
ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΛΟΙΜΩΞΗ:  
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ  
ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»





Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαδοπούλου Ζωής: 14-10-2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 757α/19-12-2013

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα:

Σύρρου Μαρίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας Πανεπιστημίου Πατρών  
Θυφρονίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Ανοσολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-01-2014

«Γενετική και επιγενετική προδιάθεση σε πρώιμη λοίμωξη»

Τροποποίηση θέματος διδακτορικής διατριβής: 910<sup>α</sup>/21-1-2020

«Μικρό βάρος γέννησης, ενδομήτριο στρες και πρώιμη λοίμωξη: γενετικοί και περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 929<sup>α</sup>/29-6-2020**

1. Θυφρονίτης Γεώργιος, Καθηγητής Μοριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μουζάκη Αθανασία, Καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών
3. Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας-Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
4. Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ζακοπούλου Βικτωρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειδικών Μαθησιακών Δυσκολιών: Πρώιμης ανίχνευσης και παρέμβασης του Τμήματος Λογοθεραπείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σιώμου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Φίλιου Μιχαέλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 07-07-2021

Ιωάννινα 13-09-2021

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατισιάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας





*«The years of anxious searching in the dark, with their intense longing,  
their alternations of confidence and exhaustion,  
and final emergence into light—only those who have experienced it can understand that. »*

*Albert Einstein*



*Αφιερωμένη στους γονείς μου*



# Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Σύρρου Μαρίκας.

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Σύρρου Μαρίκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, για την καθοδήγησή της και για τις βάσεις που με βοήθησε να θέσω σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο. Επίσης, ένα πραγματικά μεγάλο ευχαριστώ για τη γενικότερη υποστήριξη και κατανόηση που έδειξε κατά τη διάρκεια όλων αυτών των χρόνων. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής κ. Θυφρονίτη Γεώργιο και κα. Μουζάκη Αθανασία για την καθοδήγησή τους, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ευχαριστώ πολύ και την κα. Φίλιου Μιχαέλα (Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), την κα. Σιώμου Αικατερίνη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), τον κ. Λαμπρόπουλο Αλέξανδρο (Καθηγητή Γενικής Βιολογίας-Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης) και την κα. Ζακοπούλου Βικτωρία (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Λογοθεραπείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την κα. Τσώνη Κωνσταντίνα, Παιδίατρο-Νεογνολόγο του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης και την κα. Δρόσου-Αγακίδου Βασιλική, Καθηγήτρια Νεογνολογίας ΑΠΘ, για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων των νεογνών. Επίσης, ευχαριστώ πολύ την ομάδα της κας. Λήδας Χατζή (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Προληπτικής Ιατρικής στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας) για την παραχώρηση των δειγμάτων των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη. Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου της κας Φίλιου Μιχαέλας για τη συνεργασία και τη βοήθειά τους προκειμένου να επιτευχθούν τα πειράματα για την ανάλυση των δειγμάτων των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη. Τη δική της συμβολή στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής είχε και η κα. Αργυρώ Σγουρού, Επίκουρη Καθηγήτρια της Σχολής Θετικών Επιστημών του Ανοικτού Πανεπιστημίου Ελλάδας και την ευχαριστώ πολύ γι' αυτό. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Πέτρο Πετρίκη, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Κοινωνικής Ιατρικής και Ψυχικής Υγείας, για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη βοήθειά του. Ακόμα, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη

του εργαστηρίου του κ. Γεωργίου Ιωάννη (Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και κλινικής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) για την απλόχερη βοήθειά τους, όποτε χρειάστηκα κάτι από αυτούς. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Σπύλλα (μέλος του εργαστηρίου του κ. Θυφρονίτη Γεώργιου), για τις συζητήσεις μας και την πολύτιμη βοήθεια και κατανόηση.

Οι στιγμές που έχω περάσει στο εργαστήριο με τη Δρ. Μαριάντζελα Βλαίκου θα μείνουν χαραγμένες στη μνήμη μου. Την ευχαριστώ πολύ για την καθοδήγηση και την εκπαίδευση το πρώτο μου διάστημα στο εργαστήριο, για την αρμονική συνεργασία που είχαμε, για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση όποτε χρειάστηκε και για τις δύσκολες αλλά και ευχάριστες εμπειρίες που έχουμε περάσει μαζί. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας που συνεργαστήκαμε άριστα όλα αυτά τα χρόνια. Τη Δρ. Στεφανία Μάντζιου, την Δρ. Βιολέττα Μαλταμπέ, τον Δρ. Γεώργιο Μαρκόπουλο, τη Δρ. Παναγιώτα Κασσιούμη και την Δρ. Ευγενία Ρουπακιά και την υποψήφια διδάκτορα Ντανιέλα Θεοδωρίδου για τις συζητήσεις, την υποστήριξη, τις συμβουλές, τη συνεργασία και για πολλά άλλα.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου που όλα αυτά τα χρόνια με ανέχτηκαν να γκρινιάζω και με ενθάρρυναν όταν κάτι δεν πήγαινε καλά και χαιρόντουσαν με τον ενθουσιασμό μου όταν είχα καλά αποτελέσματα. Ευχαριστώ πάρα πολύ!

Ολοκληρώνοντας αυτή τη διαδρομή, εκτός από τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο και τους φίλους μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που στάθηκε δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια με αγάπη, κατανόηση και συμπαράσταση. Ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου, Λάζαρο και Ρούλα και τον αδερφό μου Αντώνη, που στήριξαν αυτή μου την επιθυμία και με αγάπη και συνεχή υποστήριξη είναι δίπλα μου. Φυσικά, σημαντικό ρόλο όλα αυτά τα χρόνια έπαιξαν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς μου που όλα αυτά τα χρόνια αγωνιούσαν μαζί μου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε κάποιον που έμαθε σχεδόν απ' έξω την παρουσίαση από τις πολλές πρόβες που άκουσε και με βοήθησε να ξεπεράσω το άγχος μου.



# Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	7
<b>1.1 Το στρες ως παράγοντας διαταραχής</b> .....	7
<b>1.2 Η προσαρμογή του οργανισμού στο στρες και ο ρόλος των ορμονών του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA axis)</b> .....	8
<b>1.3 Γενετική</b> .....	12
1.3.1 Κλασική και Σύγχρονη Γενετική .....	12
1.3.2 Πολυμορφισμοί του DNA.....	13
1.3.3 Πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs).....	15
<b>1.4 Επιγενετική</b> .....	16
1.4.1 Επιγενετική Ρύθμιση.....	16
1.4.2 Μηχανισμοί Επιγενετικής Ρύθμισης.....	16
1.4.3 Μεθυλίωση του DNA .....	18
1.4.4 Οι Μεθυλοτρανσφεράσες.....	18
1.4.5 Μεθυλίωση και Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης .....	19
<b>1.5 Το Ενδομήτριο Στρες</b> .....	21
1.5.1 Θεωρία σύμφωνα με την οποία τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια καθορίζουν την υγεία ή την εμφάνιση νοσημάτων (Developmental Origin of Health and Disease hypothesis- DOHaD) .....	22
<b>1.6 Μικρό βάρος γέννησης και Προωρότητα</b> .....	26
<b>1.7 Νεογνικές Λοιμώξεις</b> .....	28
<b>1.8 Η Επιλόχειος Κατάθλιψη ως μεταγεννητικό στρεσογόνο ερέθισμα</b> .....	30
1.8.1 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της Επιλόχειου Κατάθλιψης .....	30
1.8.2 Επιπτώσεις της Επιλόχειου Κατάθλιψης .....	33
<b>1.9 Γενετικοί και Επιγενετικοί παράγοντες που μελετήθηκαν</b> .....	34
1.9.1 Το γονίδιο MBL2 (Mannose Binding Lectin 2).....	35
1.9.2 Το γονίδιο FKBP5 (FK506 Binding Protein 5) .....	38
1.9.3 Το γονίδιο SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 Member 4) .....	42
1.9.4 Το γονίδιο HLA-G (Human Leukocyte Antigen-G) .....	44
<b>2. Σκοπός της Μελέτης</b> .....	46

<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	47
<b>3.1 Πληθυσμός Έρευνας</b> .....	47
3.1.1 Πληθυσμός Έρευνας Νεογνών που γεννήθηκαν πρόωρα ή/και με μικρό βάρος γέννησης.....	47
3.1.2 Πληθυσμός Έρευνας Γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη .....	48
<b>3.2 Κριτήρια Καθορισμού των Ομάδων Έρευνας</b> .....	49
3.2.1 Πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της Προωρότητας και του Μικρού Βάρους Γέννησης .....	49
3.2.2 Πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της Επιλόχειου Κατάθλιψης.....	50
<b>3.3 Συλλογή και Προετοιμασία των δειγμάτων</b> .....	53
3.3.1 Δείγματα Νεογνών .....	53
3.3.2 Δείγματα Γυναικών .....	53
<b>3.4 Ανάλυση DNA</b> .....	54
3.4.1 Απομόνωση DNA .....	54
3.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ( <i>Polymerase Chain Reaction-PCR</i> ).....	54
3.4.3 Πέψη με Περιοριστική Ενδονουκλεάση.....	55
3.4.4 Γονοτύπιση πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου με τη χρήση της μεθόδου <i>TaqMan</i> ( <i>TaqMan SNP genotyping</i> ).....	56
3.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	57
3.4.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	58
<b>3.5 Ανάλυση Μεθυλίωσης του DNA</b> .....	59
3.5.1 Χημική τροποποίηση του γενωμικού DNA με $\text{NaHSO}_3$ .....	59
3.5.2 <i>Pyrosequencing</i> : ειδική μέθοδος ανάλυσης της μεθυλίωσης .....	60
<b>3.6 Μεταβολομική</b> .....	62
3.6.1 Μεταβολομική ανάλυση .....	63
<b>3.7 Ανάλυση Πρωτεϊνών</b> .....	65
3.7.1 Λήψη πρωτεϊνικού δείγματος.....	65
3.7.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος.....	65
3.7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική δωδεκυλθειϊκής πολυακρυλαμίδης ( <i>SDS-PAGE</i> ) .....	67
3.7.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	67
3.7.5 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης ( <i>Blocking</i> ) – Επώσεις με αντισώματα.....	68
3.7.6 Ανοσοαποτύπωση κατά <i>Western</i> ( <i>Western blotting</i> ).....	68
3.7.7 Αντισώματα.....	69

<b>3.8 Μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity - TAC)</b> .....	70
<b>3.9 Βιοπληροφορική ανάλυση</b> .....	72
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	73
<b>4.1 Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού</b> .....	73
4.1.1 <i>Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού των νεογνών που συμμετείχε στην έρευνα</i> .....	73
4.1.2 <i>Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού που συμμετείχε στη μεταβολομική ανάλυση για την επιλόχειο κατάθλιψη και του συμπληρωματικού πληθυσμού επιβεβαίωσης</i> .....	75
<b>4.2 Μοριακά αποτελέσματα ανάλυσης των πολυμορφισμών</b> .....	80
4.2.1 <i>Το γονίδιο MBL2</i> .....	80
4.2.2 <i>Το γονίδιο FKBP5</i> .....	84
4.2.3 <i>Το γονίδιο SLC6A4</i> .....	86
<b>4.3 Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης</b> .....	91
4.3.1 <i>Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου FKBP5</i> .....	91
4.3.2 <i>Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου HLA-G</i> .....	92
<b>4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων και των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν</b> .....	94
<b>4.5 Επίπεδα μεταβολιτών στον ορό του αίματος γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη</b> .....	96
<b>4.6 Μελέτη του Οξειδωτικού Στρες σε συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης</b> .....	99
4.6.1 <i>Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την εκτίμηση των επιπέδων της Prdx3</i> ...	99
4.6.2 <i>Η αντιοξειδωτική ικανότητα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης</i> .....	102
<b>5. Συζήτηση</b> .....	104
<b>5.1 Μελέτη πρόωρων νεογνών και νεογνών με μικρό βάρος γέννησης</b> .....	104
5.1.1 <i>Συσχέτιση της προωρότητας, του βάρους γέννησης και της εμφάνισης πρώιμης λοίμωξης με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου MBL2</i> .....	104
5.1.2 <i>Συσχέτιση της προωρότητας, του βάρους γέννησης και της εμφάνισης πρώιμης λοίμωξης με τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου HLA-G</i> .....	105
5.1.3 <i>Το στρες και ο ρόλος των γονιδίων FKBP5 και SLC6A4</i> .....	106
5.1.4 <i>Εξατομικευμένη απόκριση στο στρες</i> .....	109

<b>5.2 Μελέτη γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη</b> .....	110
5.2.1 <i>Μελέτη της επίδρασης της Επιλόχειου Κατάθλιψης στο μεταβολομικό προφίλ των γυναικών</i> .....	110
5.2.2 <i>Επιβεβαίωση της επίδρασης της Επιλόχειου Κατάθλιψης σε έναν συμπληρωματικό πληθυσμό μελέτης</i> .....	111
5.2.3 <i>Διερεύνηση του μηχανισμού της Επιλόχειου Κατάθλιψης</i> .....	112
<b>5.3 Μελλοντικοί Στόχοι</b> .....	115
5.3.1 <i>Μελέτη πρόωρων νεογνών και νεογνών με μικρό βάρος γέννησης</i> .....	115
5.3.2 <i>Μελέτη γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη</i> .....	115
5.3.3 <i>Συνδυαστική μελέτη σε μητέρες και νεογνά</i> .....	115
<b>6. Περίληψη</b> .....	117
<b>7. Abstract</b> .....	119
<b>8. Βιβλιογραφία</b> .....	121

# Εισαγωγή

## 1.1 Το στρες ως παράγοντας διαταραχής

Ως *στρες* ορίζουμε οποιαδήποτε αλλαγή επηρεάζει τη δυναμική ισορροπία ενός οργανισμού. Οι αλλαγές αυτές χαρακτηρίζονται ως *στρεσογόνα ερεθίσματα*. Ουσιαστικά, το στρες είναι το αποτέλεσμα της διατάραξης της ομοιόστασης του οργανισμού και ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την τάση να προσπαθεί να αποτρέψει οποιαδήποτε αλλαγή συμβαίνει σε αυτόν και μπορεί να προκαλέσει διαταραχή στην ισορροπία του (1).

Παρ' όλο που πολλές φορές στην καθημερινή τους χρήση οι όροι στρες και άγχος συγχέονται μεταξύ τους, στην πραγματικότητα διαφέρουν (2). Το άγχος είναι το αίσθημα του απροσδιόριστου φόβου και της ανησυχίας για επικείμενο κακό, που πολλές φορές εκδηλώνεται χωρίς να υπάρχει εντοπισμένη και συγκεκριμένη αιτία και όταν είναι χρόνιο, μπορεί να αποτελεί σύμπτωμα ψυχικής διαταραχής. Το στρες υποχωρεί όταν υποχωρήσει το ερέθισμα, αντίθετα το άγχος επιμένει ακόμα και όταν το ερέθισμα που το προκάλεσε υποχωρεί (3). Το βασικό χαρακτηριστικό των διαταραχών του *στρες* είναι μία δυσάρεστη συναισθηματική κατάσταση, αυξημένος φόβος, ανησυχία, εγρήγορση, αυξημένος καρδιακός ρυθμός, μεταβολές στην αναπνοή και απότομες μη-στοχοκατευθυνόμενες αντιδράσεις. Πολλές φορές το άγχος είναι αποτέλεσμα του στρες, ενώ παράλληλα το έντονο και χρόνιο στρες έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση κατάθλιψης (3, 4). Έχει διαπιστωθεί πως το στρες ενοχοποιείται για διάφορες νευροψυχιατρικές διαταραχές, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως κατανοητοί οι υπεύθυνοι μοριακοί μηχανισμοί.

## 1.2 Η προσαρμογή του οργανισμού στο στρες και ο ρόλος των ορμονών του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA axis)

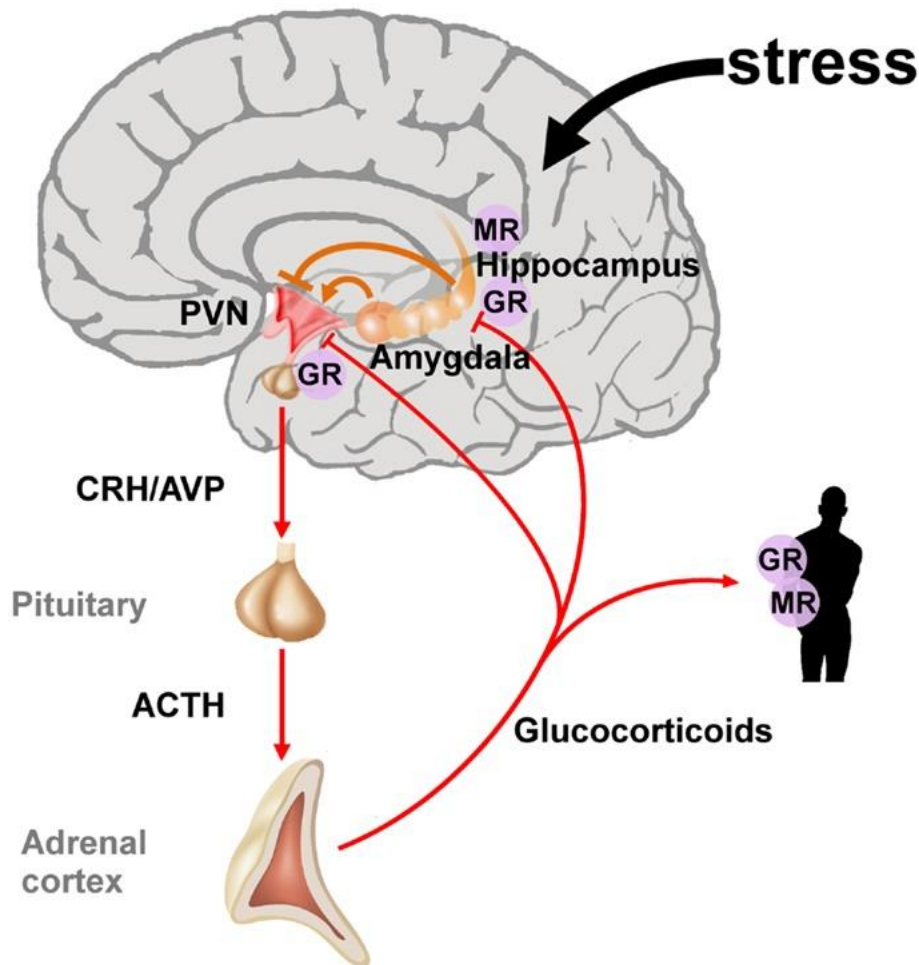
Τα στρεσογόνα ερεθίσματα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην διατήρηση της ομοιόστασης, δηλαδή να επηρεάσουν τα συστήματα που συντηρούν τη δυναμική ισορροπία του ανθρώπινου οργανισμού. Ο κάθε οργανισμός αντιδρά με διαφορετικό τρόπο στην αλλαγή αυτή προκειμένου να επιτευχθεί η επαναφορά στην ομοιόσταση. Η ικανότητα του κάθε οργανισμού να επανέλθει ονομάζεται *προσαρμοστική απόκριση (adaptive response)* και πρόκειται για λειτουργίες που λειτουργούν αντισταθμιστικά στις αλλαγές που προκάλεσε το στρες με σκοπό να επανέλθει η ομοιόσταση στο φυσιολογικό της επίπεδο (5).

Στον άνθρωπο, η προσαρμοστική απόκριση εξυπηρετείται από ένα εξειδικευμένο σύστημα στον εγκέφαλο, το σύστημα απόκρισης στο στρες. Ο ανθρώπινος οργανισμός, όπως και οι περισσότεροι οργανισμοί, έχει αναπτύξει αυτό το περίπλοκο ρυθμιστικό σύστημα στο οποίο συμμετέχουν νευροδιαβιβαστές και ορμόνες προκειμένου να διατηρήσει τη λειτουργία του ομοιοστατικού του μηχανισμού με φυσιολογικές διεργασίες (6). Στις διεργασίες αυτές συμμετέχουν πολλά όργανα, αλλά πρωταγωνιστικό ρόλο έχει ο εγκέφαλος και κατ' επέκτασιν, ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-HPA axis) σε συνεργασία με το αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Αναλυτικότερα, όταν αναφερόμαστε στον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων εννοούμε τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και τα επινεφρίδια. Η υπόφυση συνδέεται με τον υποθάλαμο μέσω του χοανοειδούς δακτυλίου που περιέχει νευρικές ίνες και αιμοφόρα αγγεία και αποτελείται από δύο λοβούς, την πρόσθια και την οπίσθια υπόφυση, ή αλλιώς αδενούποφυση και νευροϋπόφυση αντίστοιχα. Οι εκλυτικές ορμόνες του υποθαλάμου μεταφέρονται στην πρόσθια υπόφυση, και κατ' αυτόν τον τρόπο ελέγχουν την έκκριση μιας ορμόνης της πρόσθιας υπόφυσης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την έκκριση μιας άλλης ορμόνης από κάποιον ενδοκρινή αδένα (7).

Πιο συγκεκριμένα, ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου συνθέτει και εκκρίνει κορτικοεκλυτίνη (corticotropin-releasing hormone-CRH) και αργινίνη-βασοπρεσσίνη (arginine vasopressin-AVP), ορμόνες που απελευθερώνονται και καταλήγουν στην πρόσθια υπόφυση ως απόκριση στο στρες. Στην πρόσθια υπόφυση προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς και επάγουν τη μεταγραφή της προοπιωμελανοκορτίνης (pro-opiomelanocortin-POMC),

η οποία διασπάται ενζυμικά σε κορτικοτροπίνη (adrenocorticotropin -ACTH) και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία (7). Τα κύτταρα στόχοι της κορτικοτροπίνης βρίσκονται στα επινεφρίδια, και όταν προσδεθεί σε αυτά επάγεται η σύνθεση και η έκφραση των γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 1.2.1).



Εικόνα 1.2.1.: Σχηματική αναπαράσταση του άξονα HPA. CRH–corticotropin-releasing hormone (κορτικοεκλυτίνη); AVP–arginine vasopressin (αργινίνη-βασοπρεσσίνη); ACTH–adrenocorticotropin hormone (κορτικοτροπίνη); GR–glucocorticoid receptor (υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών), MR–mineralocorticoid receptor (υποδοχέας αλατικορτικοειδών).

Πηγή: Raabe and Spengler (2013). Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Frontiers in Psychiatry*.doi 10.3389/fpsyt.2013.00080

Τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid, GC), δηλαδή η κορτιζόλη στον άνθρωπο και η κορτικοστερόνη στα τρωκτικά, είναι τα τελικά προϊόντα του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή φτάσουν στα όργανα μέσω της

κυκλοφορίας του αίματος προσδένονται στους υποδοχείς τους, GR (υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, glucocorticoid receptor) και MR (υποδοχέας αλατοκορτικοειδών, mineralcorticoid receptor), και τους ενεργοποιούν έτσι ώστε να μπορούν να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Με τον τρόπο αυτό ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων ρυθμίζεται μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (8). Οι υποδοχείς GR και MR εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό συγγένειας, με τον υποδοχέα MR να έχει σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή σε σύγκριση με τον GR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι υποδοχείς MR να είναι κορεσμένοι σε μικρότερες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών (9). Τα αλατοκορτικοειδή, όπως η αλδοστερόνη, έχουν παρόμοια συγγένεια για τον υποδοχέα MR με τα γλυκοκορτικοειδή, όμως τα γλυκοκορτικοειδή βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κύτταρα. Τα αλατοκορτικοειδή συνδέονται με τον υποδοχέα τους στο κυτταρόπλασμα και τον ενεργοποιούν και έτσι είναι ικανά να διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα του κυττάρου (10). Τα αλατοκορτικοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των νεφρών καθώς είναι ρυθμιστές της έκκρισης οξέων και του όγκου υγρών που βρίσκονται μέσα σε αυτά (11).

Όταν στον οργανισμό επιδράσει ένα στρεσογόνο ερέθισμα, τότε από τα επινεφρίδια εκκρίνεται ο νευροδιαβιβαστής επινεφρίνη, που είναι γνωστός και ως αδρεναλίνη. Η επινεφρίνη, δίνει σήμα στον υποθάλαμο για την απελευθέρωση κορτικοεκλυτίνης που διεγείρει την υπόφυση και επάγει την έκφραση της κορτιζόλης στα επινεφρίδια και την απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος. Η ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος καθορίζει την παραγωγή της κορτικοεκλυτίνης στον εγκέφαλο και της κορτιζόλης στα επινεφρίδια. Όταν παρατηρηθούν αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης, ο υποθάλαμος μειώνει την παραγωγή της κορτικοεκλυτίνης και έτσι είναι δυνατή η ελεγχόμενη έκκρισή της από τα επινεφρίδια. Με αυτόν τον μηχανισμό ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης καθιστά τον οργανισμό ικανό να αντιμετωπίζει τα διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα (5).

Η κορτιζόλη είναι το κύριο φυσικό γλυκοκορτικοειδές που συντίθεται από τον φλοιό των επινεφριδίων και ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Η κορτιζόλη προσδένεται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και έτσι μπορεί να ρυθμίσει μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης την έκκριση ορμονών στον υποθάλαμο. Σε κατάσταση ηρεμίας, οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση. Όταν στο περιβάλλον τους βρεθούν μόρια κορτιζόλης, προσδένεται πάνω τους και έτσι δημιουργούνται σύμπλοκα GR-GC. Μόλις δημιουργηθούν τα σύμπλοκα αυτά, το κύτταρο επιτρέπει τη μεταφορά τους μέσα στον πυρήνα. Στον πυρήνα καθίσταται δυνατή η



πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA και λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας. Τα γλυκοκορτικοειδή μαζί με τους υποδοχείς τους διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στους διάφορους κυτταρικούς τύπους παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη μεταγραφή γονιδίων (12). Στον εγκέφαλο, όταν τα σύμπλοκα αυτά δημιουργούνται σε κύτταρα του ιππόκαμπου καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου της κορτικοεκλυτίνης και έτσι μειώνεται η παραγωγή της ορμόνης στον υποθάλαμο (13, 14).

## 1.3 Γενετική

### 1.3.1 Κλασική και Σύγχρονη Γενετική

Η προσπάθεια κατανόησης της γονοτυπικής βάσης της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας είναι πολύ σημαντική. Το γονιδίωμα των ανθρώπων εμφανίζει 99.9% ομοιότητα, ενώ οι ατομικές διαφορές φαίνεται να οφείλονται στο 0.1% που διαφέρει στα άτομα ενός πληθυσμού και συσχετίζεται με την ποικιλομορφία στο φαινότυπο. Η έννοια της ατομικότητας αναφέρεται σε ένα σύνολο κληρονομικών χαρακτηριστικών που είναι μοναδικά για κάθε άτομο σε έναν πληθυσμό. Τα κληρονομικά αυτά χαρακτηριστικά μπορεί να σχετίζονται με παθολογία ή με άλλους χαρακτήρες ενός ατόμου. Οι διάφορες παραλλαγές των γονιδίων δεν έχουν απαραίτητα επιβλαβή επίδραση αλλά μπορεί να συμβάλλουν στην εξέλιξη και στην ποικιλομορφία του πληθυσμού (15, 16).

Ο φαινότυπος είναι τα παρατηρήσιμα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού. Κάθε γονίδιο παρέχει τη δυνατότητα εκδήλωσης ενός ή περισσότερων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Όμως, ο φαινότυπος δεν καθορίζεται μόνο από την έκφραση ενός γονιδίου, επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις του γονιδίου με άλλα γονίδια και, σε πολλές περιπτώσεις, από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος ή από τυχαία γεγονότα που μπορεί να συμβούν κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (17, 18). Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις αποτυπώνονται στο επιγενετικό προφίλ του κάθε ατόμου και σε συνδυασμό με το γενετικό του υπόβαθρο επηρεάζουν την έκφραση, και κατ' επέκταση επιδρούν και στο φαινότυπο. Έτσι, επηρεάζεται η εμφάνιση ή μη ενός χαρακτήρα, καθώς και η βαρύτητα ή η έναρξη των συμπτωμάτων, αν πρόκειται για κάποια νόσο (19, 20) (Εικόνα 1.3.1).



Εικόνα 1.3.1: Η επίδραση στην έκφραση ενός γονιδίου άλλων γονιδίων αλλά και του περιβάλλοντος.

Πηγή: iGenetics Μια Μεντελική Προσέγγιση, Peter J. Russell, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Κεφάλαιο 2: Μεντελική Γενετική

### 1.3.2 Πολυμορφισμοί του DNA

Το ανθρώπινο DNA διαφέρει σε συγκεκριμένες θέσεις μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Η διαφορά στην αλληλουχία του DNA μεταξύ ατόμων, ομάδων ή πληθυσμών που εμφανίζεται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1% ονομάζεται *γενετικός πολυμορφισμός*. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να συμβούν αυθόρμητα, λόγω σφάλματος κατά την αντιγραφή του DNA ή λόγω της επίδρασης ακτινοβολίας, χημικών ουσιών, ή μετά από έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες.

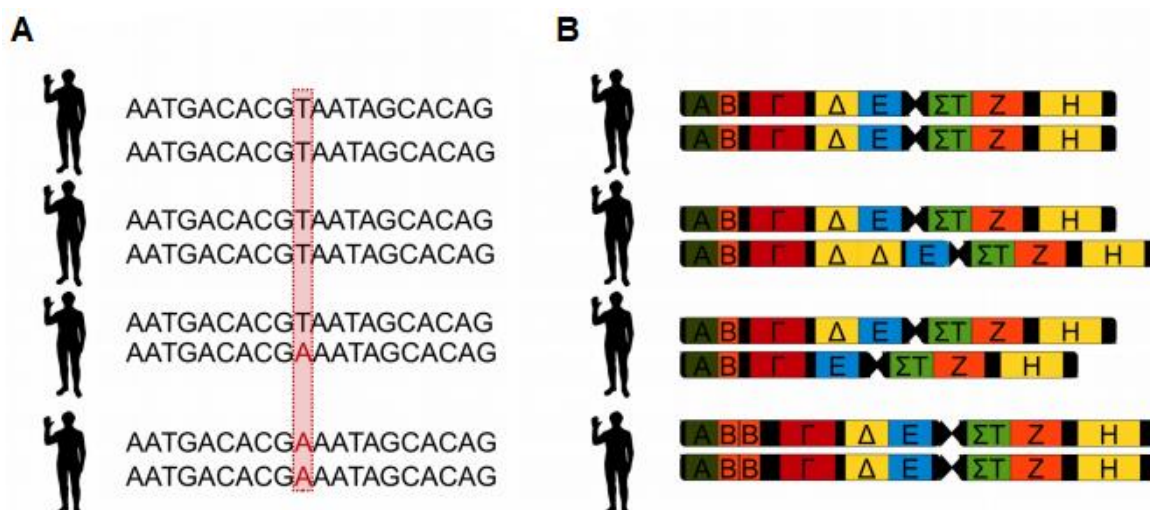
Οι επιδράσεις των πολυμορφισμών στον πληθυσμό δεν είναι απαραίτητα επιβλαβείς. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου μια παραλλαγή ενός γονιδίου μπορεί να προσδώσει στον πληθυσμό εξελικτικό πλεονέκτημα και τελικά ενσωματώνεται στο DNA. Στην περίπτωση όμως, που μια αλλαγή στην αλληλουχία του DNA μεταξύ ατόμων έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με κάποια ασθένεια ονομάζεται *γενετική μετάλλαξη*. Μόλις σχηματιστεί ένας πολυμορφισμός μπορεί να κληρονομηθεί όπως οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία DNA, επιτρέποντας την μεταβίβασή του από γενιά σε γενιά. Σε πολλές περιπτώσεις, τόσο οι αρχικές μορφές ενός γονιδίου όσο και οι παραλλαγές του συνυπάρχουν σε έναν πληθυσμό και η συνύπαρξη αυτή, των πολλαπλών μορφών γενετικής αλληλουχίας, δημιουργεί γενετική ποικιλομορφία.

Οι πολυμορφισμοί διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms-SNPs), ποικιλομορφία στον αριθμό των αντιγράφων (copy number variations-CNVs), ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (variable number of tandem repeats-VNTRs) και βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (short tandem repeats-STRs) (21) (Πίνακας 1.3.1).

Οι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου είναι οι πολυμορφισμοί που συναντώνται στον πληθυσμό με μεγαλύτερη συχνότητα, πρόκειται για μια υποκατάσταση ενός μόνο νουκλεοτιδίου που εμφανίζεται σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα (Εικ. 1.3.2 Α). Έχουν χαρτογραφηθεί περίπου 3 εκατομμύρια SNPs που εμφανίζονται με αρκετά μεγάλη συχνότητα στον ανθρώπινο πληθυσμό, εκ των οποίων περίπου το 1 εκατομμύριο έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο διαβήτης ή η υψηλή αρτηριακή πίεση (21).

Πίνακας 1.3.1: Πολυμορφισμοί που συναντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα

<i>Πολυμορφισμός</i>	<i>Συντομογραφία</i>	<i>Είδος Πολυμορφισμού</i>	<i>Συχνότητα</i>
<i>Πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου</i>	SNPs	Υποκατάσταση βάσης	1 ανά 350 ζεύγη βάσεων
<i>Ποικιλομορφία στον αριθμό των αντιγράφων</i>	CNVs	Επανάληψη τμήματος του γονιδιώματος	12% του γονιδιώματος
<i>Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις</i>	STRs	Επανάληψη αλληλουχίας DNA (2-6 βάσεις)	1 ανά 10.000 ζεύγη βάσεων
<i>Ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις</i>	VNTRs	Επανάληψη αλληλουχίας DNA (6-100βάσεις)	3% του γονιδιώματος



Εικόνα 1.3.2: Οι δύο βασικές κατηγορίες γενετικών πολυμορφισμών. Α) Πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs). Β) Ποικιλομορφία στον αριθμό των αντιγράφων (CNVs)

### 1.3.3 Πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs)

Οι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου είναι αντικαταστάσεις μιας αζωτούχας βάσης σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδιώματος με μια άλλη βάση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρόκειται για τους πολυμορφισμούς που συναντώνται συχνότερα σε ένα πληθυσμό, εμφανίζονται με συχνότητα 1 στα 350 ζεύγη βάσεων (22).

Επειδή μόνο ένα μικρό ποσοστό του γονιδιώματος αντιστοιχεί σε περιοχές που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη, τα περισσότερα SNPs βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος. Τα SNPs που βρίσκονται σε μια κωδική αλληλουχία έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς είναι πιο πιθανό να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης. Όμως, επίδραση στη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης μπορεί να έχει ένας πολυμορφισμός που βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή ή σε άλλες λειτουργικές περιοχές του γονιδίου (23). Αξίζει να αναφερθούν σαν παράδειγμα τα γονίδια που κωδικοποιούν τον παράγοντα TNF-α και την IL-1β, στους υποκινητές των οποίων εντοπίζονται SNPs που ενισχύουν την έκφρασή τους, ενισχύοντας την ανοσολογική απόκριση έναντι ορισμένων λοιμώξεων (24).

Κωδικά και μη κωδικά SNPs έχουν συνδεθεί με πολυπαραγοντικά νοσήματα. Τα SNPs αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιολογικοί δείκτες καθώς εντοπίζονται σε ένα ή και περισσότερα γονίδια τα οποία έχουν συνδεθεί με μία συγκεκριμένη ασθένεια. Έτσι, η παρουσία ή η απουσία του εκάστοτε SNP μπορεί να αποτελεί ένδειξη αυξημένης προδιάθεσης για την εμφάνιση μιας ασθένειας. Δεδομένου ότι τα SNPs εμφανίζονται συχνά σε όλο το γονιδίωμα και είναι σχετικά σταθερά, χρησιμεύουν ως εξαιρετικοί βιολογικοί δείκτες (25, 26).

## 1.4 Επιγενετική

### 1.4.1 Επιγενετική Ρύθμιση

Η γενετική από μόνη της δεν μπορεί να δικαιολογήσει πλήρως το βαθμό της ποικιλομορφίας σε διάφορους χαρακτήρες ή την εμφάνιση και τη βαρύτητα διαταραχών, κυρίως πολυπαραγοντικών, στον άνθρωπο. Υπάρχουν περιπτώσεις ανθρώπων που φέρουν την ίδια γενετική πληροφορία ως προς έναν χαρακτήρα αλλά ο φαινότυπος τους διαφέρει. Σε αυτό το σημείο εισάγεται ο όρος *Επιγενετική* για να περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις των γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες, ένας όρος που χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1942 από τον C.H. Waddington (27). Ο όρος επιγενετική όμως, πλέον χρησιμοποιείται για να περιγράψει αλλαγές που επιδρούν στο γονιδίωμα χωρίς αυτές να επηρεάζουν την αλληλουχία του (28). Ουσιαστικά, η επιγενετική συνδέει το γονιδίωμα με τις περιβαλλοντικές επιδράσεις σε αυτό, επηρεάζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση, με δυναμικό τρόπο, οπότε και τον φαινότυπο (29).

### 1.4.2 Μηχανισμοί Επιγενετικής Ρύθμισης

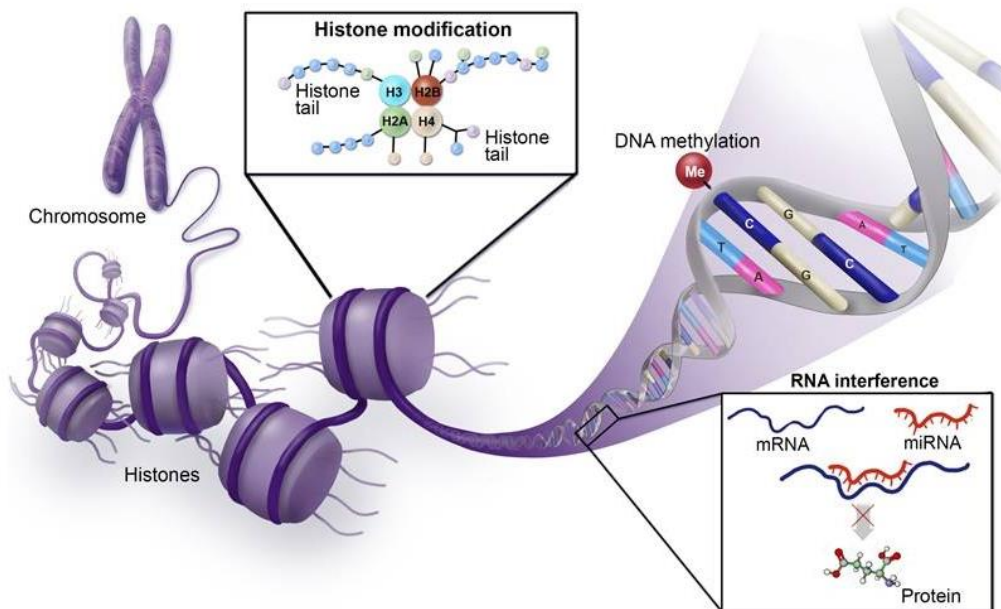
Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι ομοιοπολικές τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται είτε σε επίπεδο γονιδιώματος, στην αλληλουχία του DNA (μεθυλίωση του DNA), είτε σε επίπεδο πρωτεϊνών, σε πρωτεΐνες που είναι στενά συνδεδεμένες με αυτό (μετα-μεταφραστική τροποποίηση ιστονών). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε υπερέκφραση ή αποσιώπηση της έκφρασης ενός γονιδίου.

Ο μηχανισμός που έχει περιγραφεί καλύτερα είναι η μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση του DNA είναι μια διαδικασία κατά την οποία μία μεθυλομάδα προστίθεται σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια της αλυσίδας του DNA με αποτέλεσμα να μη μπορεί να πραγματοποιηθεί φυσιολογικά η μεταγραφή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται σε περιοχές με αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης να αποσιωπείται, και αντίθετα, τα γονίδια σε υπομεθυλωμένες περιοχές να υπερεκφράζονται (30, 31).

Εκτός όμως από τη μεθυλίωση του DNA, υπάρχει και η μεθυλίωση των ιστονών που μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων με έμμεσο τρόπο (32, 33). Οι ιστόνες εκτός από μεθυλίωση συχνά υφίστανται και ακετυλίωση, μια διαδικασία κατά την οποία προσδένεται στις ιστόνες μία ακετυλομάδα που τροποποιεί τη δομή τους και αυτό έχει επίδραση στην

έκφραση των γονιδίων. Η ακετυλίωση με τη μεθυλίωση έχουν αντίθετη επίδραση στην έκφραση των γονιδίων (34). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών ελέγχουν τη δομική διαμόρφωση της χρωματίνης ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση μέσω αλληλεπιδράσεων γειτονικών νουκλεοσωμάτων (35). Οι τροποποιήσεις των ιστονών, μετά την εδραίωσή τους σε ένα σημείο, μπορούν να εξαπλωθούν σε μεγάλες περιοχές του γονιδιώματος. Το πρότυπο αυτό κληρονομείται στους απογόνους, υποστηρίζοντας τη θεωρία της κληρονόμησης του επιγενετικού προτύπου (36-38). Έχουν παρατηρηθεί πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί τροποποίησης ιστονών. Αξίζει να αναφερθούν η ακετυλίωση της λυσίνης, η μεθυλίωση της λυσίνης και αργινίνης, η φωσφορυλίωση της σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης, η ουβικιτινυλίωση της λυσίνης και η κιτρουλίνωση (αντικατάσταση αργινίνης με κιτρουλίνη) (39).

Τέλος, ένας ακόμα μηχανισμός επιγενετικής ρύθμισης είναι η μετα-μεταγραφική δράση μορίων RNA (μικρά μη κωδικά RNA -miRNA- και παρεμβατικά RNA -RNAi-) τα οποία φαίνεται πως επηρεάζουν την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και οδηγούν σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων (40-42).



Εικόνα 1.4.1: Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης.

Πηγή: American Society of Hematology. Epigenetic Mechanisms: Emerging Therapeutic Targets for Blood Disorders.

### **1.4.3 Μεθυλίωση του DNA**

Η μεθυλίωση του DNA είναι ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός επιγενετικής ρύθμισης, μια διαδικασία κατά την οποία μια μεθυλομάδα (-CH<sub>3</sub>) προστίθεται στην αλυσίδα του DNA με αποτέλεσμα το μεθυλιωμένο τμήμα της να καθίσταται μη προσβάσιμο στα απαραίτητα ένζυμα που κανονικά θα εκκινούσαν τη διαδικασία της μεταγραφής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην εκφράζεται το γονίδιο. Από την άλλη μεριά, περιοχές του DNA που δεν είναι μεθυλιωμένες ή είναι αλλά σε μικρό ποσοστό, επιτρέπουν την μεταγραφή του γονιδίου με αποτέλεσμα πολλές φορές να οδηγείται στην υπερέκφρασή του (31). Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ σημαντικός καθώς επιδρά καταλυτικά στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη γήρανση (43-45), ενώ επηρεάζει πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, τη γονιδιακή αποτύπωση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την αποσιώπηση DNA (46, 47).

Πιο συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του DNA αφορά την προσθήκη μεθυλομάδων στον 5' άνθρακα (C) του δακτυλίου των κυτοσινών και μπορεί να συμβεί σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (θηλαστικά, φυτά και βακτήρια) (48). Αυτή η κατηγορία μεθυλίωσης συναντάται κυρίως στα θηλαστικά, και οι περιοχές του γονιδιώματος που περιέχουν μεθυλιωμένες κυτοσίνες ονομάζονται νησίδες CpG (CpG islands) (49). Εκτός όμως από τη μεθυλίωση των κυτοσινών υπάρχει και η μεθυλίωση της αδενίνης στο 6' άζωτο (N) του δακτυλίου της που συναντάται κυρίως σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και βακτήρια (50, 51).

Όταν χαρακτηρίζουμε μια περιοχή του DNA ως υπερμεθυλιωμένη εννοούμε ότι πολλές βάσεις κυτοσίνης είναι μεθυλιωμένες. Στον άνθρωπο το 70-80% των CpG νησίδων είναι μεθυλιωμένες (49). Εάν οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος τότε παρεμποδίζεται η έκφραση του γονιδίου (52). Η μεθυλίωση πάνω στο γονιδίωμα μπορεί να είναι τυχαία, αποτέλεσμα μετάλλαξης ή αποτέλεσμα περιβαλλοντικών επιδράσεων (53-55).

### **1.4.4 Οι Μεθυλοτρανσφεράσες**

Η μεθυλίωση των κυτοσινών καταλύεται από τα ένζυμα που είναι γνωστά ως DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs-DNA methyltransferase (DNA μεθυλοτρανσφεράσες). Στα θηλαστικά έχουν αναφερθεί πέντε είδη DNMTs. Η DNMT1 είναι υπεύθυνη για την αποκατάσταση του προτύπου μεθυλίωσης στην θυγατρική αλυσίδα που προκύπτει από την αντιγραφή του DNA. Η DNMT2 έχει μειωμένη δραστηριότητα και δρα ως tRNA



μεθυλοτρανσφεράση. Οι DNMT3a και DNMT3b εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα και συναντώνται στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ο ρόλος τους είναι η εγκαθίδρυση νέου προτύπου μεθυλίωσης (de novo μεθυλοτρανσφεράσες) (56). Μετά την ολική απομεθυλίωση που συμβαίνει σε προεμφυτευτικό επίπεδο αυτές οι δύο DNMTs είναι υπεύθυνες για την έναρξη της μεθυλίωσης κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επίσης, οι DNMT3a και DNMT3b θεωρείται ότι συνεργάζονται με την DNMT1 για τη σταθερότητα του προτύπου μεθυλίωσης και της δομής των χρωμοσωμάτων. Τέλος, η DNMT3L φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των DNMT3a και DNMT3b (57).

#### **1.4.5 Μεθυλίωση και Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης**

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή του DNA είτε άμεσα εμποδίζοντας τη σύνδεση των παραγόντων της μεταγραφής στους υποκινητές των γονιδίων, είτε έμμεσα προκαλώντας δομικές αλλαγές στη χρωματίνη. Η δομή της χρωματίνης στην περιοχή ενός γονιδίου μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ενεργότητά του (58). Η χρωματίνη διακρίνεται σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη είναι η περιοχή της χρωματίνης με υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και σε αυτή την περιοχή καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων, οι νησίδες CpG είναι μεθυλιωμένες και οι ιστόνες υποακετυλιωμένες. Αντίθετα, η ευχρωματίνη που είναι η ενεργή μορφή της χρωματίνης, δεν είναι συμπυκνωμένη, οι CpG νησίδες είναι αμεθυλίωτες και οι ιστόνες ακετυλιωμένες (59).

Τα περισσότερα δινουκλεοτίδια CGs είναι διασκορπισμένα σε όλο γονιδίωμα, όμως υπάρχουν περιοχές με υψηλή συγκέντρωση που ονομάζονται νησίδες CpG (CpG islands). Οι νησίδες CpG έχουν συνήθως 1-2kb μέγεθος και εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό σε υποκινητές γονιδίων. Οι περισσότερες CpG νησίδες δεν είναι μεθυλιωμένες ωστόσο ένα ποσοστό τους φαίνεται να εμφανίζει ιστοειδική μεθυλίωση. Επίσης, εξαίρεση αποτελούν οι μεθυλιωμένες CpG νησίδες στους υποκινητές των γονιδίων κατά το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης και κατά την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (60).

Η μεθυλίωση των CpG νησίδων στις περιοχές των υποκινητών γονιδίων δρα ως σήμα αποσιώπησης των γονιδίων αυτών. Στη διεργασία αυτή συμμετέχουν πρωτεΐνες (MBP-methyl binding CpG proteins) οι οποίες αναγνωρίζουν τις μεθυλιωμένες CpG νησίδες και προσδέονται σε αυτές. Μετά την πρόσδεσή τους στο μεθυλιωμένο DNA, οι πρωτεΐνες

αυτές στρατολογούν κάποιον παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως είναι οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDAC-Histone Deacetylases) και με αυτό τον τρόπο δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (28, 61). Η αποακετυλίωση των ιστονών είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης και στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Μετά την αποακετυλίωση των ιστονών ακολουθεί η μεθυλίωσή τους (62).

## 1.5 Το Ενδομήτριο Στρες

Οι περιβαλλοντικές αντιξοότητες που συμβαίνουν στη ζωή της μητέρας, λειτουργούν ως στρεσογόνα ερεθίσματα που φτάνουν μέχρι το έμβρυο και μπορούν να το προκαθορίσουν, καθώς έχουν μεγάλη επίδραση στη διαμόρφωση του επιγενετικού του προφίλ (63-65). Τα κρίσιμα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης χαρακτηρίζονται από αυξημένη πλαστικότητα του εγκεφάλου που επηρεάζεται αρνητικά από την έκθεση σε περιβαλλοντικές αντίξοες συνθήκες (66, 67). Οι αλληλεπιδράσεις, όμως, του γενετικού και επιγενετικού προφίλ κατά τη διάρκεια των κρίσιμων αναπτυξιακών περιόδων μπορεί να έχουν διαρκή επίδραση στην ψυχοπαθολογία των ενηλίκων (67-69). Η έκθεση στο στρες, στο άγχος και στην κατάθλιψη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης θεωρούνται μη φυσιολογικές και ανεπιθύμητες καταστάσεις και έχουν συσχετιστεί με το μικρό βάρος κατά τη γέννηση και μελλοντικά προβλήματα υγείας κατά την ενήλικη ζωή (64, 70-82). Η σχέση του εμβρύου με τη μητέρα είναι πολύ σημαντική καθώς όλα τα σήματα που δέχεται μέσω του πλακούντα είναι καθοριστικά και οι στρεσογόνες καταστάσεις που μπορεί να βιώσει μία έγκυος γυναίκα πιθανόν επηρεάζουν τη νευροανάπτυξη του εμβρύου (67, 83).

Η έκθεση σε στρεσογόνα γεγονότα κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί το σύστημα ορμονών του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων. Τα γονίδια του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων και οι υποδοχείς τους είναι οι κύριοι στόχοι των επιγενετικών τροποποιήσεων. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που έχουν μελετηθεί κυρίως είναι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών (84-87). Τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων και την ανάπτυξη του εγκεφάλου, γι' αυτό το λόγο, τα άτομα που έχουν βιώσει χρόνιο στρες κατά την πρώιμη ανάπτυξη τους ή/και την παιδική ηλικία διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών και ασθενειών κατά την ενήλικη ζωή (67, 88-90). Ακόμα, διαφορετικά στρεσογόνα ερεθίσματα μπορεί να έχουν διαφορετική επίδραση στον επιγενετικό προγραμματισμό με αποτέλεσμα και διαφορετικές επιδράσεις στην συμπεριφορά ή την παθολογία (91).

Το προγεννητικό άγχος της μητέρας έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για προβλήματα υγείας στους απογόνους, άμεσα ή μελλοντικά στην ενήλικη ζωή τους, τα οποία μπορεί να είναι πρόωρος τοκετός, μικρό βάρος γέννησης, παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο, καρδιακά και νευροψυχιατρικά προβλήματα κ.ά. (67, 80, 92-96). Σύμφωνα με την «Αναπτυξιακή Προέλευση Υγείας και Νόσου» (Developmental Origin of Health and Disease -DOHaD-hypothesis) οι περιβαλλοντικές επιδράσεις κατά την προγεννητική περίοδο είναι σημαντικές

και μπορεί να προδιαθέσουν σε εμφάνιση ασθενειών κατά τη νεογνική, παιδική ή και ενήλικη ζωή ενός ατόμου (97). Η διατήρηση της υγείας είναι μια δυναμική διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από γεγονότα που συμβαίνουν από τη σύλληψη ακόμα και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου (94).

### **1.5.1 Θεωρία σύμφωνα με την οποία τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια καθορίζουν την υγεία ή την εμφάνιση νοσημάτων (*Developmental Origin of Health and Disease hypothesis- DOHaD*)**

Η υπόθεση της Αναπτυξιακής Προέλευσης Υγείας και Νόσου (DOHaD) βασίστηκε σε επιδημιολογικές μελέτες νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ενήλικες οι οποίοι είχαν γεννηθεί με πρόωρο τοκετό. Αρχικά, δημοσιεύτηκαν τρία σημαντικά άρθρα που οδήγησαν στη διατύπωση της υπόθεσης Barker (Barker hypothesis) (80-82).

Σύμφωνα με τον Barker και τους συνεργάτες του (81) στην Αγγλία και την Ουαλία βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού θνησιμότητας εξαιτίας ισχαιμικού καρδιακού επεισοδίου και της προωρότητας. Το υπό μελέτη δείγμα ήταν ενήλικος πληθυσμός που πέθανε στις περιοχές αυτές τη δεκαετία 1968-78. Οι θετικές συσχετίσεις που βρέθηκαν μεταξύ της θνησιμότητας των ισχαιμικών καρδιοπαθών και της νεογνικής προωρότητας είναι ίδιες και στα δύο φύλα, σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές (αστικές και αγροτικές) Εκτός όμως από τα ισχαιμικά επεισόδια, ανάλογη συσχέτιση με την προωρότητα βρέθηκε και σε περιπτώσεις ατόμων με βρογχίτιδα, καρκίνο του στομάχου και με χρόνιες ρευματικές και καρδιακές παθήσεις. Συμπερασματικά, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι οι εμπειρίες και οι επιδράσεις από τα πρώιμα στάδια της ζωής ενός ανθρώπου επηρεάζουν την ενήλικη ζωή του (80-82, 98).

Εκτός όμως από την υπόθεση Barker, το 1992 διατυπώθηκε η υπόθεση φαινοτύπου μεταβολικής οικονομίας («Trifly Phenotype») (99). Σύμφωνα με τη θεωρία υπάρχει επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ της καθυστερημένης ενδομήτριας και βρεφικής ανάπτυξης και της επακόλουθης ανάπτυξης του διαβήτη τύπου 2 και του μεταβολικού συνδρόμου στην ενήλικη ζωή. Για την εμφάνιση αυτών των νοσημάτων ενοχοποιείται η φτωχή σε θρεπτικά διατροφή στα πρώιμα στάδια της ζωής του οργανισμού, η οποία προκαλεί μόνιμες βλάβες στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών, το έμβρυο προσπαθεί να προσαρμοστεί για να επιβιώσει σε αυτό το μη-ευνοϊκό ενδομήτριο περιβάλλον. Η προσαρμογή επιτυγχάνεται με μείωση του μεταβολισμού, με μειωμένη κυτταρική διαφοροποίηση και με τροποποίηση της λειτουργίας των συστημάτων (100). Όμως, η

προσαρμογή αυτή, πέρα από την ενδομήτρια επιβίωση, δεν είναι πάντα ευνοϊκή για τον οργανισμό (Match/Mismatch hypothesis). Οι αλλαγές που προκαλούνται στον οργανισμό μπορεί να είναι ευεργετικές, σε περιπτώσεις που το εξωτερικό περιβάλλον προσομοιάζει το ενδομήτριο περιβάλλον (match) ή καταστροφικές, σε περιπτώσεις που το εξωτερικό περιβάλλον διαφέρει από το ενδομήτριο (mismatch) (101).

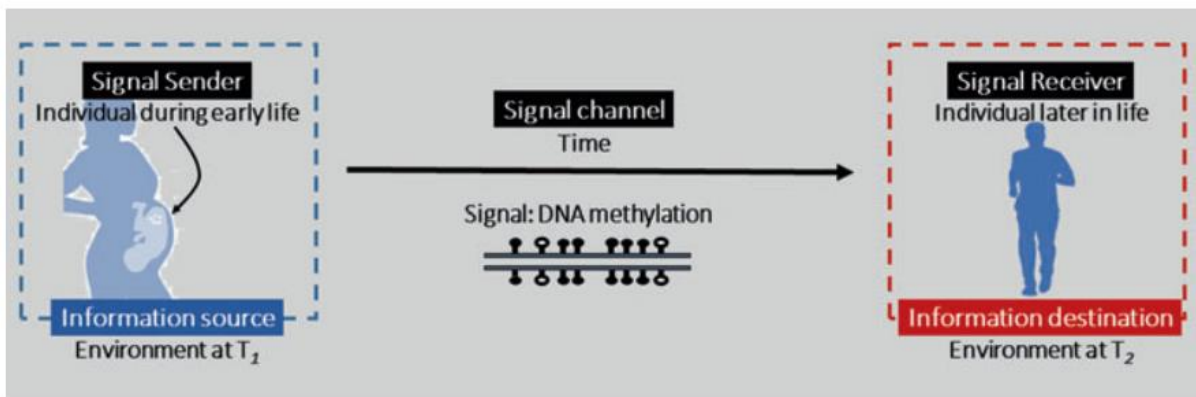
Η υπόθεση για την Αναπτυξιακή Προέλευση Υγείας και Νόσου είναι μια προσέγγιση που εστιάζει στο ρόλο της έκθεσης σε στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά τα κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια, και στον προσδιορισμό του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών κατά την ενήλικη ζωή. Αυτή η προσέγγιση συσχετίζεται απόλυτα με το ρόλο των περιβαλλοντικών (επιγενετικών) επιδράσεων που διαμορφώνουν το επιγενετικό προφίλ του ατόμου και ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο που έδρασαν σχετίζονται με την εμφάνιση χρόνιων παθήσεων κατά την ενήλικη ζωή (94, 102-104).

Επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έδειξαν συσχέτιση μεταξύ των στρεσογόνων ερεθισμάτων που δέχεται ένα έμβρυο ενδομήτρια και της ανάπτυξης ασθενειών κατά την ενήλικη ζωή (104). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται μετά από δυσμενείς ενδομήτριες εκθέσεις του εμβρύου επηρεάζουν την ανάπτυξή του αλλά και την αντίδρασή του στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα σε όλη τη διάρκεια της ζωής του (94) (Εικόνα 1.5.1).

Η βιολογική βάση για τη συσχέτιση του στρες της μητέρας και της επίδρασης στην ανάπτυξη του εμβρύου στηρίζεται στο φαινόμενο της «αναπτυξιακής πλαστικότητας» (developmental plasticity). Ο όρος «αναπτυξιακή πλαστικότητα» αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία καταστάσεις που σχετίζονται με την υγεία του ατόμου κατά την ενήλικη ζωή του διαμορφώνονται από το πρώιμο αναπτυξιακό του περιβάλλον. Ο οργανισμός προσαρμόζεται έτσι ώστε να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Έτσι, άτομα με τον ίδιο γονότυπο έχουν διαφορετικό φαινότυπο, ο οποίος καθορίζεται από το περιβάλλον που αναπτύσσεται ο οργανισμός και από τα ερεθίσματα που δέχεται (79).

Το μητρικό στρες επηρεάζει την νευροαναπτυξιακή πορεία του νεογνού, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητό το είδος του στρες που έχει την μεγαλύτερη βαρύτητα. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την καθυστέρηση στην ενδομήτρια ανάπτυξη λόγω πρώιμου μητρικού στρες με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων κατά την ενήλικη ζωή (υπέρτασης, εγκεφαλικού επεισοδίου, κατάθλιψης, σχιζοφρένειας, παχυσαρκίας, διαβήτη καθώς και άλλων (105-111). Ο πλακούντας είναι το κοινό όργανο της μητέρας και του εμβρύου, πρόκειται για ένα σημαντικό ενδοκρινικό όργανο που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά

θρεπτικών συστατικών. Παράλληλα, πρόκειται και για το όργανο που συνδέει το έμβρυο με το περιβάλλον και τα ερεθίσματά του. Επομένως, έχει προταθεί ότι οι περιβαλλοντικές αντιξοότητες αποτυπώνονται στον πλακούντα μέσω των επιγενετικών τροποποιήσεων και ανάλογα να επηρεάζεται το έμβρυο. Οι ορμόνες του πλακούντα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη (112). Οι αλλαγές στην έκκριση των ορμονών από τον πλακούντα ενεργοποιούν μηχανισμούς που με τη σειρά τους πυροδοτούν μια σειρά καταστάσεων που προκαλούν περιορισμό στην ανάπτυξη του εμβρύου (104, 113).



Εικόνα 1.5.1: Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται μετά από αντίξοες ενδομήτριες συνθήκες επηρεάζουν την ανάπτυξη του εμβρύου αλλά και την ενήλικη ζωή του ατόμου, μέσω των επιγενετικών τροποποιήσεων.

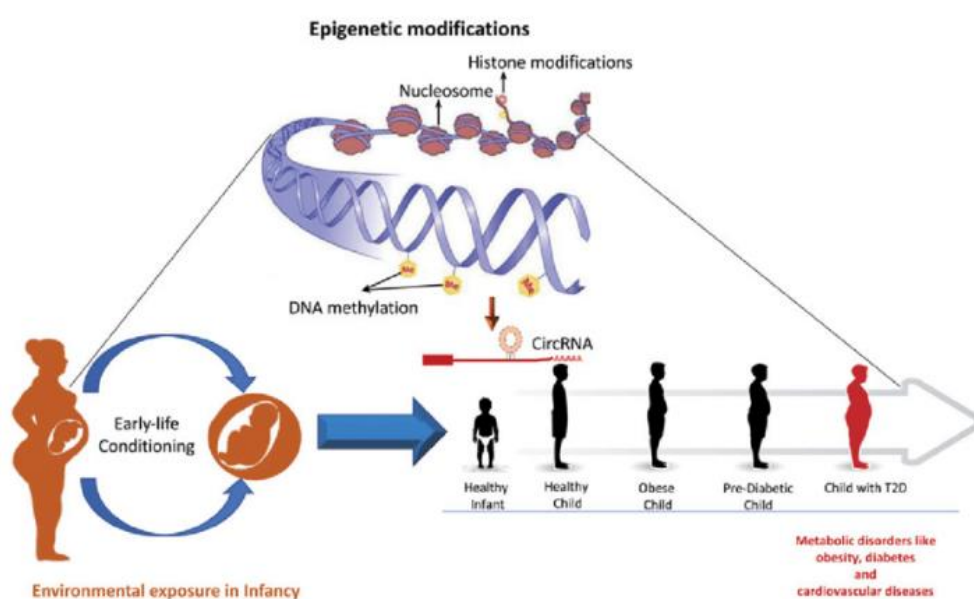
Πηγή: Laubach, Z. M., Faulk, C. D., Cardenas, A., & Perng, W. (2017). *Nutrition, DNA Methylation, and Developmental Origins of Cardiometabolic Disease: A Signal Systems Approach. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*, 1–18. doi:10.1007/978-3-319-31143-2\_107-1

Είναι σημαντικό να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί του ενδομήτριου προγραμματισμού που καθορίζουν ή/και επηρεάζουν την εμφάνιση των ασθενειών στην ενήλικη ζωή. Όπως γνωρίζουμε, τα γαμετικά κύτταρα μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία από τη μία γενιά στην επόμενη (114). Ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο αποτελούν οι επιπτώσεις του περιβάλλοντος, δηλαδή οι επιγενετικές τροποποιήσεις, που επιδρούν στα γαμετικά κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές δεν κληρονομούνται στους απογόνους αλλά μεταφέρονται στα θυγατρικά κύτταρα κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις που πραγματοποιούνται (115, 116).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που αποκτώνται κατά τη διάρκεια την κύησης ή αργότερα στη ζωή ενός ατόμου μπορούν να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο ένα άτομο ανταποκρίνεται στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την εξατομικευμένη μεταβολή της κληρονομικότητας ενός συνόλου χαρακτηριστικών που δεν εξηγείται από την

αλληλουχία του DNA (117). Εκτός όμως από τα στάδια της πρώιμης ανάπτυξης, επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να συμβούν σε όλα τα στάδια της ζωής ενός ανθρώπου ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται από το περιβάλλον του (Εικόνα 1.5.2).

Από όλους τους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο πλέον μελετημένος είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της μεθυλίωσης νουκλεοτιδίων κυτοσίνης στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων ή σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων.



Εικόνα 1.5.2: Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής, οι περιβαλλοντικές επιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν στην εγκαθίδρυση επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις ιστονών και τα μη κωδικά μόρια RNA. Αυτές οι τροποποιήσεις κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης αυξάνουν τον κίνδυνο κατά την ενήλικη ζωή το άτομο να αναπτύξει μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2 και οι καρδιαγγειακές παθήσεις.

Πηγή: Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Doucette, C. A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(2), 71–101. doi:10.1080/10408363.2017.1422109

## 1.6 Μικρό βάρος γέννησης και Προωρότητα

Το μικρό βάρος γέννησης και η προωρότητα, εκτός του γεγονότος ότι αποτελούν παράγοντες κινδύνου για νεογνική νοσηρότητα και θνησιμότητα, έχουν προταθεί και ως δείκτες πρώιμων αντίξων εμπειριών (81, 118, 119). Το μητρικό στρες, το άγχος ή η κατάθλιψη που πιθανά βιώνει η μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης θεωρούνται δυσμενείς ενδομήτριο περιβάλλον για το έμβρυο και έχουν συσχετιστεί με το μικρό βάρος γέννησης και την προωρότητα (120, 121). Βέβαια, εκτός από το μητρικό στρες, το έμβρυο μπορεί να δεχτεί στρεσογόνα ερεθίσματα και από άλλους εμβρυϊκούς, συνήθως παθολογικούς, παράγοντες που πιθανόν να επηρεάσουν την ανάπτυξή του. Μία τέτοια κατάσταση είναι η πλακουντιακή ανεπάρκεια (placenta insufficiency), κατά την οποία δεν υπάρχει η απαραίτητη συγκέντρωση οξυγόνου και ποσότητα θρεπτικών συστατικών στο ενδομήτριο περιβάλλον (122). Το βάρος γέννησης ενός νεογνού αποτελεί σημαντικό δείκτη της φυσιολογικής ή μη ενδομήτριας ανάπτυξης (123).

Το βάρος γέννησης είναι το βάρος του νεογνού που μετριέται κατά τη στιγμή της γέννησής του μέχρι μια ώρα μετά (WHO, 2004). Νεογνά με βάρος γέννησης < 2.500g χαρακτηρίζονται ως νεογνά με μικρό βάρος γέννησης (low birth weight-LBW), ενώ με βάρος < 1.500g νεογνά με πολύ μικρό βάρος γέννησης (very low birth weight-VLBW). Τέλος, νεογνά με βάρος γέννησης <1.000g χαρακτηρίζονται εξαιρετικά μικρού βάρους γέννησης (extremely low birth weight-ELBW) (121, 124) (Πίνακας 1.6.1).

Η ηλικία κύησης αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα (σε εβδομάδες) που πέρασε από την ημερομηνία έναρξης της τελευταίας εμμήνου ρύσεως μέχρι τη γέννηση του νεογνού (125). Τα νεογνά που γεννήθηκαν πριν την 37<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης χαρακτηρίζονται πρόωρα, ενώ φυσιολογική διάρκεια θεωρείται αυτή μεταξύ 37 και 41 εβδομάδων κύησης (τελειόμηνα νεογνά). Νεογνά που γεννιούνται μετά την ολοκλήρωση της 41<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης χαρακτηρίζονται παρατασιακά (124) (Πίνακας 1.6.1).

Ωστόσο, για να κατηγοριοποιήσουμε και να χαρακτηρίσουμε τα νεογνά πλήρως, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας το βάρος γέννησης τους σε σχέση πάντα με την ηλικία κύησης. Η ομάδα των νεογνών που γεννήθηκαν πρόωρα μπορεί να διαιρεθεί σε δύο υποκατηγορίες, στα νεογνά που για τη δεδομένη ηλικία κύησης έχουν κανονικό βάρος (AGA-appropriate for gestational age) και σε αυτά που έχουν μικρό βάρος γέννησης για την ηλικία κύησης (SGA-small for gestational age). Η κατηγοριοποίηση αυτή γίνεται με τη βοήθεια μιας καμπύλης συσχέτισης του βάρους γέννησης με την ηλικία κύησης, όπως θα αναλυθεί παρακάτω (βλ. Υλικά και Μέθοδοι παράγρ. 3.2.1).



Πίνακας 1.6.1: Κατηγοριοποίηση νεογνών με βάση το βάρος γέννησής του και την ηλικία κύησης [LBW:low birth weight, VLBW: very low birth weight, ELBW: extremely low birth weight].

Βάρος Γέννησης		Ηλικία Κύησης	
<b>LBW</b>	< 2.500g	<b>&lt; 37<sup>η</sup> εβδομάδα</b>	Πρόωρα
<b>VLBW</b>	< 1.500g	<b>37<sup>η</sup> – 41<sup>η</sup> εβδομάδα</b>	Τελειόμηνα
<b>ELBW</b>	< 1.000g	<b>&gt;41<sup>η</sup> εβδομάδα</b>	Παρατασιακά

Πηγή: Gill, S.V., May-Benson, T.A., Teasdale, A., and Munsell, E.G. (2013). Birth and developmental correlates of birth weight in a sample of children with potential sensory processing disorder. *BMC Pediatr* 13, 29.

## 1.7 Νεογνικές Λοιμώξεις

Οι λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσουν επιπλοκές στο έμβρυο ή στο νεογέννητο μετά από κάθετη μετάδοση του λοιμογόνου παράγοντα. Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε ιούς, πρωτόζωα και παθογόνα βακτήρια μπορούν να μεταδοθούν μέσω του πλακούντα ή κατά τον τοκετό και να προκαλέσουν εμβρυοπάθειες ή νεογνικές λοιμώξεις, αντίστοιχα. Ανάλογα με τον υπεύθυνο μικροοργανισμό ποικίλουν οι συνέπειες, τόσο για την πορεία της εγκυμοσύνης όσο και για την υγεία του νεογνού (126). Τα νεογνά, και ειδικά τα πρόωρα, αποτελούν μία εξαιρετικά ευάλωτη ομάδα πληθυσμού και εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων. Κατά τη γέννηση, το ανοσοποιητικό σύστημα ενός νεογνού είναι ανώριμο και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις. Δεδομένου ότι οι μεταγεννητικές ιογενείς λοιμώξεις μπορούν να έχουν μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία ενός παιδιού, πρέπει να χρησιμοποιηθούν όλες οι αποτελεσματικές προληπτικές και θεραπευτικές παρεμβάσεις (127). Οι νεογνικές λοιμώξεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες, αυτές που αποκτήθηκαν προγεννητικά, περιγεννητικά και ενδονοσοκομειακά (128).

Η νεογνική λοίμωξη είναι μία σοβαρή παθολογική κατάσταση, που αντιμετωπίζεται ευκολότερα και αποτελεσματικότερα εάν ανιχνευθεί έγκαιρα. Η προσπάθεια εύρεσης γενετικών δεικτών που θα ανιχνεύουν τη νεογνική λοίμωξη σε πρώιμα στάδια ή θα εντοπίζουν τα νεογνά υψηλού κινδύνου θα μπορούσε να συμβάλλει στην πρόγνωση και τη θεραπεία (129, 130).

Η φυσική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή. Τόσο το έμβρυο όσο και το νεογνό αντιμετωπίζουν ένα σύνθετο σύνολο ανοσολογικών συνθηκών, ωστόσο, κάθε φάση ανάπτυξης έχει τις δικές της ξεχωριστές απαιτήσεις (131-133). Ενώ το στάδιο του εμβρύου απαιτεί αυξημένες αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις έναντι οποιασδήποτε αντίδρασης στη μητέρα που το φιλοξενεί, η καθιέρωση μιας ισχυρής ανοσολογικής ισορροπίας είναι κρίσιμη και απαραίτητη για τη μετάβαση από το αποστειρωμένο και προστατευμένο ενδομήτριο περιβάλλον σε έναν εχθρικό και άγνωστο για το ανοσοποιητικό κόσμο ξένων αντιγόνων (132, 134). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η νεογνική ανοσία είναι ένα «σύνθετο σύστημα επαγρύπνησης» και όχι μια σιωπηλή και ανώριμη γραμμή άμυνας, που έχει την ικανότητα να προκαλέσει μια ταχεία αλλά έξυπνη και επιλεκτική απάντηση σε διαφορετικές συνθήκες.

Η ανοσολογική ικανότητα του νεογνού εξελίσσεται ταχέως τους πρώτους τρεις μήνες της ζωής του καθώς τα κύτταρα που εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία, ωριμάζουν και κερδίζουν αντιγονική εμπειρία (131, 135). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η νεογνική ανοσία εξαρτάται κυρίως από συστατικά της φυσικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένων

φαγοκυττάρων, κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers-NK), αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen-presenting cells-APCs), χυμικών μεσολαβητών φλεγμονής και το συμπλήρωμα (136-138). Το βρέφος που θηλάζει λαμβάνει επίσης αντιμικροβιακά συστατικά από το μητρικό γάλα, τα οποία βοηθούν στην πρόληψη ορισμένων λοιμώξεων (139).

Η απόκριση όμως, του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη νεογνική περίοδο υστερεί σε πολλά σημαντικά σημεία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, πολύ μικρά βρέφη (πρόωρα ή με μικρό βάρος γέννησης) να είναι πιο ευαίσθητα από τα μεγαλύτερα βρέφη σε σοβαρές βακτηριακές, καθώς και ορισμένες ιογενείς και μυκητιασικές λοιμώξεις. Πιο συγκεκριμένα, οι οργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν σημαντική νοσηρότητα στα νεογνά είναι οι εξής: στρεπτόκοκκος ομάδας B, *Escherichia coli*, ιός του απλού έρπητα (HSV), κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ιός έρπητα ζωστήρα (VZV), αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) και είδη *Candida*. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί έχουν ειδικούς καθοριστικούς παράγοντες μολυσματικότητας που είναι μοναδικοί, οπότε προκαλούν νεογνικές λοιμώξεις συχνότερα από άλλους (136).

Η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου αρχίζει στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια και συνεχίζεται και στην παιδική ηλικία. Το εμβρυϊκό ήπαρ και τα προγονικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSC) είναι ικανά να παρέχουν μακροχρόνια αιμοποίηση (138). Τα HSC μεταφέρονται από το ήπαρ στο μυελό των οστών περίπου την 20η εβδομάδα της κύησης, και εκεί παράγονται τα λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα παράγονται από κύτταρα του μυελού των οστών που δεσμεύονται νωρίς για διαφοροποίηση προς την λεμφική σειρά και εξειδικεύονται για τις διάφορες λειτουργίες τους στο μυελό των οστών, το θύμο αδέν, τους λεμφαδένες, το σπλήνα και άλλους λεμφικούς ιστούς (138, 140). Πιο συγκεκριμένα, τα προγονικά T λεμφοκύτταρα (CD34) μεταναστεύουν στο θύμο αδέν και εκεί πραγματοποιείται η διαφοροποίησή τους σε υποσύνολα με υποδοχείς CD4 και CD8 (141). Η διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται στο μυελό των οστών, όπου σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με ανθρώπινο αίμα ομφάλιου λώρου τα πλειοδύναμα προγονικά κύτταρα (multipotent progenitors) διαφοροποιούνται ώστε να γίνουν B κύτταρα (Sanz et al., 2010). Η ωρίμανση και η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών B κυττάρων περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων και τον ανασυνδυασμό των εξωνίων V, D, J και H των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που οδηγούν στην έκφραση μορίων IgD και IgM στην επιφάνεια των κυττάρων B (Haddad et al., 2004). Μετά τη γέννηση, υπάρχει μια σταθερή εισροή κυττάρων B και T των κυττάρων στον λεμφοειδή ιστό καθώς το παιδί ωριμάζει και εκτίθεται σε νέα αντιγόνα (138).

## 1.8 Η Επιλόχειος Κατάθλιψη ως μεταγεννητικό στρεσογόνο ερέθισμα

Η κατάθλιψη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα της σύγχρονης κοινωνίας καθώς επηρεάζει μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού (WHO, 2019). Πρόκειται για μία ψυχική ασθένεια που βασανίζει τους ανθρώπους και έχει αρνητικές συνέπειες στην καθημερινότητά τους, καθώς επηρεάζει σημαντικά τη διάθεσή τους και τη γενικότερη συμπεριφορά τους (142) (143).

Η περίοδος μετά τη γέννηση ενός παιδιού είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη για τη γυναίκα και την καθιστά πιο ευάλωτη στην εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων δυσφορίας (maternity blues) που μπορούν να καταλήξουν σε επιλόχειο κατάθλιψη (144, 145). Η *Επιλόχειος Κατάθλιψη* είναι μια ψυχική ασθένεια που βασανίζει περίπου το 15% των γυναικών (146, 147), και πιο συγκεκριμένα είναι η συναισθηματική δυσφορία που βιώνει η γυναίκα για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετά τον τοκετό. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα, η γυναίκα κατακλύζεται από αρνητικά συναισθήματα (148). Η επιλόχειος κατάθλιψη μπορεί να επηρεάσει τόσο τη μητέρα όσο και το νεογνό και ενδέχεται να οδηγήσει σε ακραίες καταστάσεις όπως είναι οι έμμονες ιδέες, η ψύχωση ακόμα και η αυτοχειρία (149).

Η έναρξη των συμπτωμάτων συνήθως γίνεται μέσα στον πρώτο μήνα μετά τον τοκετό ωστόσο ο κίνδυνος εμφάνισής τους είναι αυξημένος μέχρι και τον πρώτο χρόνο μετά τον τοκετό (147). Η ένταση και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων ποικίλει σε κάθε περίπτωση και κάθε γυναίκα βιώνει με διαφορετικό τρόπο αυτή την περίοδο. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα συμπτώματα είναι ήπια και έχουν ισχύ μόνο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και ύστερα σταδιακά εξαφανίζονται. Υπάρχει όμως και ένα ποσοστό γυναικών που εμφανίζει βαρύτερα συμπτώματα (βαριάς μορφής επιλόχειος κατάθλιψη) τα οποία χρήζουν ειδικής μεταχείρισης και αντιμετώπισης (150).

### 1.8.1 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της Επιλόχειου Κατάθλιψης

Από την περίοδο ακόμη της κύησης, κατά προσέγγιση περίπου το 80% των γυναικών ταλαιπωρούνται από συναισθηματικά προβλήματα όπως το έντονο άγχος για την υγεία και την ανατροφή του παιδιού, ο φόβος και η ανασφάλεια για το άγνωστο. Αυτές οι σκέψεις είναι αρκετές για να δημιουργήσουν ένα επιβαρυσμένο ψυχολογικό προφίλ και να κάνουν τη γυναίκα πιο επιρρεπή στην επιλόχειο κατάθλιψη, καθώς υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του άγχους κατά τη διάρκεια της κύησης και της έντασης των συμπτωμάτων της επιλόχειου κατάθλιψης (151-154).

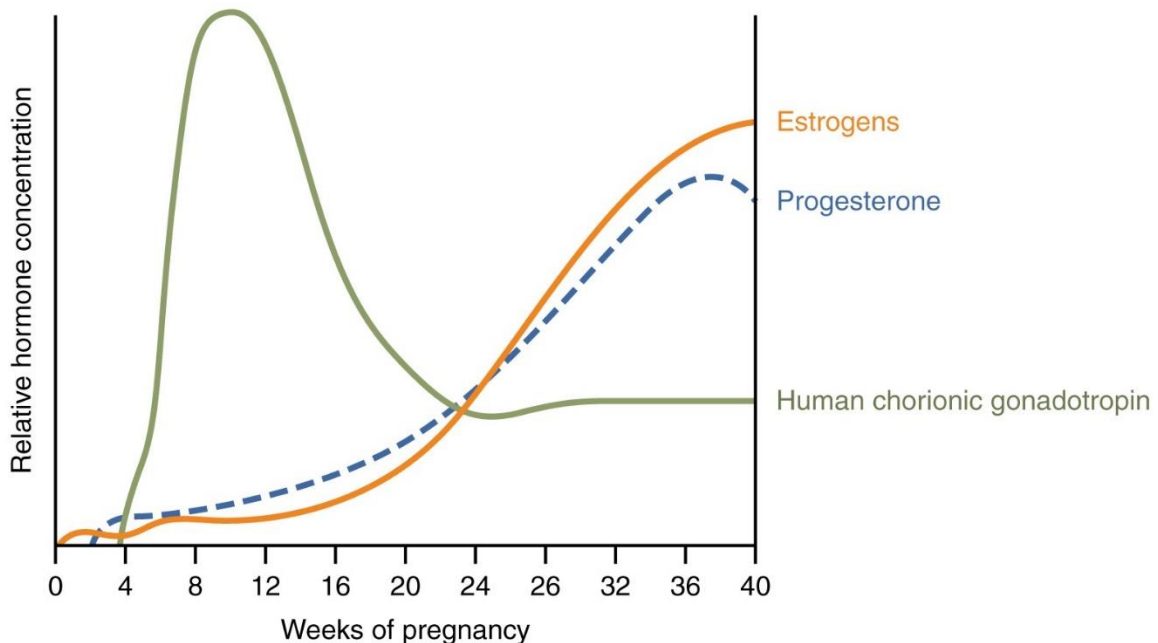
Ο τρόπος τοκετού είναι ένας παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την ψυχολογία των γυναικών. Ο τοκετός με καισαρική τομή έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση συμπτωμάτων επιλόχειου κατάθλιψης (155). Η καισαρική τομή, αν και γίνεται προκειμένου να έρθει στον κόσμο μια νέα ζωή δεν παύει να είναι μια χειρουργική επέμβαση, που μπορεί να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως μια λοίμωξη, μια αιμορραγία και άλλες δυσμενείς συνέπειες (156, 157). Η πιθανότητα εμφάνισης αυτών των δυσμενών συνθηκών είναι αιτία άγχους και στρες για τη γυναίκα και πιθανότατα επηρεάζει την ψυχολογία (158, 159). Ενισχύοντας την παραπάνω άποψη, έρευνα που έχει γίνει σε περίπου 4000 γυναίκες, έδειξε συσχέτιση μεταξύ της καισαρικής τομής και της εμφάνισης επιλόχειου κατάθλιψης γύρω στις 6 εβδομάδες μετά τον τοκετό (160). Επίσης, γυναίκες οι οποίες οδηγήθηκαν σε καισαρική τομή λόγω προεκλαμψίας, έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης συμπτωμάτων επιλόχειου κατάθλιψης καθώς είναι μια στρεσογόνα διαδικασία και υποβάλλει την υποψήφια μητέρα σε αρνητικές σκέψεις για την έκβαση του τοκετού και την υγεία του παιδιού της (161).

Ο πρόωρος τοκετός είναι ένας ακόμα επιβαρυντικός παράγοντας για την ψυχολογία της γυναίκας και αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης συμπτωμάτων επιλόχειου κατάθλιψης. Οι μητέρες που βίωσαν έναν πρόωρο τοκετό και το μωρό τους νοσηλεύτηκε σε μονάδα πρόωρων νεογνών έχουν βιώσει επιπλέον πίεση και άγχος σε μια ήδη ευάλωτη περίοδο. Γι' αυτό το λόγο έχει παρατηρηθεί αυξημένο ποσοστό εμφάνισης επιλόχειου κατάθλιψης σε τέτοιες περιπτώσεις (162, 163).

Εκτός από τις επιπλοκές γύρω από την εγκυμοσύνη και τον τοκετό, άλλα οικογενειακά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα μπορεί να επηρεάζουν τη γυναίκα. Πιθανό οικογενειακό ιστορικό κατάθλιψης, ο αγχώδης χαρακτήρας μιας γυναίκας, γεγονότα που έχουν συμβεί στη ζωή της και την έχουν επηρεάσει (π.χ. θάνατος, διαζύγιο, απόλυση), βίαιες συμπεριφορές που μπορεί να έχει αντιμετωπίσει, δυσκολίες στη σχέση της με το σύζυγό/σύντροφό της, μη προγραμματισμένη ή ανεπιθύμητη εγκυμοσύνη είναι μερικοί από τους παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης επιλόχειου κατάθλιψης (151). Παράλληλα, η νεαρή ηλικία της μητέρας, η πιθανότητα η γυναίκα την περίοδο που έμεινε έγκυος να αντιμετωπίζε και άλλες αλλαγές στη ζωή της, η χαμηλή αυτοεκτίμησή της, η έλλειψη υποστήριξης, χρόνια προβλήματα υγείας, γυναικολογικές επιπλοκές, προβλήματα υπογονιμότητας, υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθώς και χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο επηρεάζουν ακόμα περισσότερο την ψυχολογία μιας γυναίκας κατά την εγκυμοσύνη. Η επίδραση αυτή είναι πολύ έντονη και μετά τον τοκετό και έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες να εμφανίσει συμπτώματα επιλόχειου κατάθλιψης (164-170).

Οι επιβαρυντικοί παράγοντες για την εμφάνιση επιλόχειου κατάθλιψης μπορεί να είναι πολλοί και διαφορετικοί σε κάθε περίπτωση. Εκτός από τους ψυχολογικούς και κοινωνικούς παράγοντες, για την εμφάνιση της επιλόχειου κατάθλιψης, ενοχοποιούνται και οι βιολογικοί.

Θα πρέπει να αναφερθούν και οι ορμονικές αλλαγές που συμβαίνουν τις πρώτες ημέρες μετά τον τοκετό, όπου τα επίπεδα της προγεστερόνης και των οιστρογόνων μειώνονται αισθητά σε ποσοστό περίπου 90-95%, σε σχέση με αυτά κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης (Εικόνα 1.8.1) (171-173). Οι επιδράσεις των ορμονών αυτών στην εξέλιξη της επιλόχειου κατάθλιψης δεν είναι ξεκάθαρες και πρέπει να λάβουμε υπόψιν μας τρεις παραμέτρους. Πρώτον, η επιλόχειος κατάθλιψη εμφανίζει μεγάλη μεταβλητότητα και ποικιλομορφία. Ένα επεισόδιο κατάθλιψης μετά τον τοκετό μπορεί να πληροί τα διαγνωστικά κριτήρια για επιλόχειο κατάθλιψη, οπότε γυναίκες με ίδια συμπτώματα αλλά διαφορετικές ορμονικές συνθήκες να λαμβάνουν την ίδια διάγνωση. Η επιλόχειος κατάθλιψη αντιπροσωπεύει έναν αριθμό συμπτωμάτων τα οποία δε συνδέονται απαραίτητα με την ίδια ορμονική διαταραχή, αλλά αποτελεί το κεντρικό στοιχείο της διαταραχής. Δεύτερον, οι ορμονικές αλλαγές από μόνες τους δεν επαρκούν για την εμφάνιση επιλόχειου κατάθλιψης αλλά αυτό που παίζει σημαντικό ρόλο είναι η αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες κινδύνου. Τρίτον, είναι δύσκολο να βρούμε ακριβώς την επίδραση των ορμονών επειδή είναι δύσκολο να οργανώσουμε τις ομάδες έρευνας, ποιόν πληθυσμό ακριβώς θα χρησιμοποιήσουμε, ποιες ορμόνες, σε ποιο στάδιο, με ή χωρίς θεραπεία (174).



Εικόνα 1.8.1: Οι αλλαγές στη συγκέντρωση των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και της χοριακής γοναδοτροπίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παρατηρούμε ότι στο τέλος της εγκυμοσύνης τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι ιδιαίτερα υψηλά, αλλά μειώνονται απότομα αμέσως μετά τον τοκετό.

Πηγή: Anatomy & Physiology, OpenStax, Rice University

### **1.8.2 Επιπτώσεις της Επιλόχειου Κατάθλιψης**

Οι επιπτώσεις της επιλόχειου κατάθλιψης είναι πιο έντονες και επίπονες για τη γυναίκα, σε σύγκριση με τις επιπτώσεις ενός καταθλιπτικού επεισοδίου κάποια άλλη χρονική στιγμή στη ζωή της. Αυτό συμβαίνει επειδή σε αυτήν τη φάση η γυναίκα δεν έχει να φροντίσει μόνο τον εαυτό της, αλλά πρέπει να νοιαστεί και για το νεογνό. Οι επιπτώσεις όμως, δεν περιορίζονται μόνο στη μητέρα καθώς μπορεί να επηρεάσουν το νεογνό, και σε κάποιες περιπτώσεις και το ευρύτερο οικογενειακό περιβάλλον (173).

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι καταθλιπτικές μητέρες έχουν μειωμένη αλληλεπίδραση με τα βρέφη τους και δε μπορούν να αφιερωθούν στη φροντίδα των μωρών τους. Οι μητέρες που υποφέρουν από επιλόχειο κατάθλιψη είναι στοργικές ανά διαστήματα, ενώ μπορεί να αντιδράσουν και αρνητικά. Αυτή η αλλαγή συμπεριφοράς και η έλλειψη ευθύνης και συνέπειας απέναντί στα μωρά, προκαλεί σύγχυση και επηρεάζει τη φυσιολογική διαδικασία ανάπτυξης δεσίματος μεταξύ τους (σχέση προσκόλλησης). Η σχέση προσκόλλησης που αναπτύσσεται μεταξύ του βρέφους και της μητέρας είναι πολύ σημαντική, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο και στη μετέπειτα ζωή του παιδιού, κυρίως στην παιδική αλλά και στην εφηβική ηλικία (175). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μια ασφαλής σχέση προσκόλλησης δημιουργείται στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες η μητέρα ανταποκρίνεται θετικά και με όρεξη τόσο στις φυσικές, όσο και στις συναισθηματικές ανάγκες του παιδιού της. Ουσιαστικά, η μητέρα και το βρέφος πρέπει να βρίσκονται σε συγχρονισμό και αλληλεπίδραση καθώς αναγνωρίζουν αλλά και ανταποκρίνονται ο ένας στα μηνύματα του άλλου. Μια μητέρα η οποία βιώνει την κατάθλιψη, είναι λιγότερο πιθανό να απαντήσει άμεσα στα μηνύματα ή/και ερεθίσματα που της δίνει το παιδί της, κάτι το οποίο έχει ως φυσική απόρροια τη δημιουργία ενός ανασφαλούς περιβάλλοντος για το παιδί και ελλοχεύει ο κίνδυνος το παιδί να υποστεί πολλαπλές αναπτυξιακές δυσκολίες καθώς και συναισθηματικά και κοινωνικά προβλήματα στο μέλλον (176).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι όταν το μωρό αναστατώνεται και κλαίει για κάποιο λόγο, τότε η μητέρα ζορίζεται και καταβάλλει προσπάθειες για να το ηρεμήσει. Αντίθετα, όταν το μωρό έχει χαρούμενη διάθεση, η μητέρα ανταποκρίνεται με ανάλογο τρόπο (177). Ταυτόχρονα, παρατηρείται έντονα και το φαινόμενο αδυναμίας τους να τα θηλάσουν, καθώς ο θηλασμός είναι μια επίπονη για αυτές διαδικασία και απαιτεί χρόνο (178).

## 1.9 Γενετικοί και Επιγενετικοί παράγοντες που μελετήθηκαν

Το βάρος γέννησης του νεογνού σχετίζεται με την αλληλεπίδραση γενετικών παραγόντων (μητρικών και εμβρυικών), τη λειτουργία του πλακούντα, αλλά και επιγενετικών παραγόντων (τον τρόπο ζωής και τις συνθήκες της μητέρας -διατροφή, κάπνισμα, στρες κλπ.) (179).

Οι δυσμενείς ενδομήτριες συνθήκες επηρεάζουν το βάρος γέννησης του νεογνού, και πιο συγκεκριμένα, το στρες που μπορεί να βιώνει η μητέρα κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης έχει ενοχοποιηθεί ως μία από τις αιτίες μικρού βάρους γέννησης ή/και πρόωρου τοκετού (175, 179-182). Τα στρεσογόνα αυτά βιώματα, παράλληλα, μπορεί να επηρεάσουν και να καθορίσουν τον τρόπο απόκρισης των νεογνών στο στρες αλλά και σε πιθανές λοιμώξεις (94, 183, 184).

Το μικρό βάρος γέννησης αλλά και ο πρόωρος τοκετός σε συνδυασμό με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα αποτελούν παράγοντες κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα του νεογνού. Το ανοσοποιητικό σύστημα των νεογνών βασίζεται στη λειτουργία της φυσικής ανοσίας. Η πρόληψη των λοιμώξεων γίνεται κυρίως λόγω της λειτουργίας των κυττάρων του ανοσοποιητικού (μονοκύτταρα, φυσικοί φονείς κ.ά.) καθώς επίσης και λόγω της λειτουργίας των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και των πρωτεϊνών οξείας φάσης (183).

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με το μικρό βάρος γέννησης, τον πρόωρο τοκετό, την εμφάνιση πρώιμης λοίμωξης και τον τρόπο απόκρισης στα εκλαμβανόμενα στρεσογόνα ερεθίσματα.

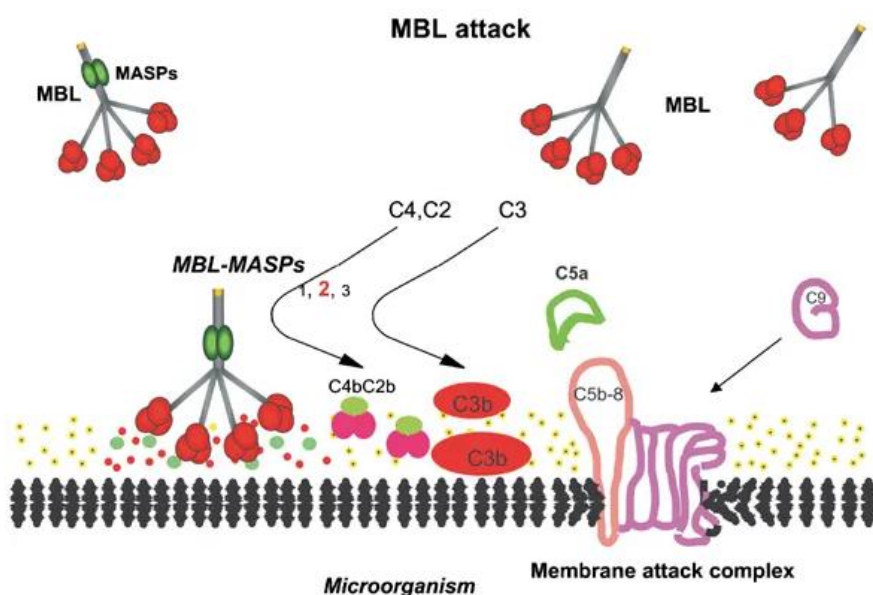
Αρχικά, μελετήθηκαν πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2* (mannose-binding lectin 2), το οποίο έχει συσχετιστεί με το μικρό βάρος γέννησης των νεογνών, τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού και την εμφάνιση νεογνικών λοιμώξεων, διότι αποτελεί σημαντικό συστατικό της φυσικής ανοσίας και είναι σημαντικός ρυθμιστής της φλεγμονώδους απόκρισης (119, 185). Εκτός από αυτό όμως, μελετήθηκαν και τα επίπεδα μεθυλίωσης του *HLA-G* (Human Leukocyte Antigen-G) που είναι βασικό συστατικό του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας I και η έκφρασή του επηρεάζεται σε παθολογικές καταστάσεις (186). Παράλληλα, δόθηκε έμφαση σε έναν πολυμορφισμό του γονιδίου *FKBP5* (FK506 Binding Protein 5) ο οποίος έχει συσχετιστεί με νευροψυχιατρικές ασθένειες και επηρεάζει τον τρόπο απόκρισης στα στρεσογόνα ερεθίσματα και την επαναφορά στην κατάσταση ισορροπίας (187-190). Επίσης, μελετήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου αυτού καθώς η υπομεθυλίωσή του οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου και αυτό μπορεί να επηρεάσει τη δομή και τη λειτουργία περιοχών του εγκεφάλου οπότε και τη συμπτωματολογία ψυχικών



ασθενειών (191, 192). Επιπλέον, το γονίδιο SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 Member 4) που ελέγχει την έκφραση του μεταφορέα της σεροτονίνης και μπορεί να επηρεάσει την εμφάνιση και την εξέλιξη νευροψυχιατρικών διαταραχών (193, 194).

### 1.9.1 Το γονίδιο *MBL2* (*Mannose Binding Lectin 2*)

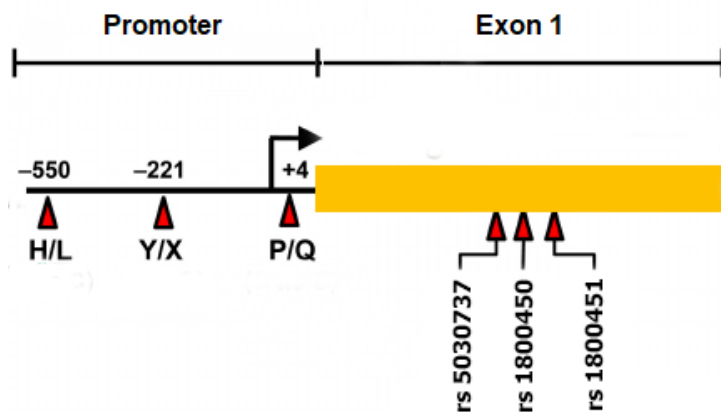
Το γονίδιο *MBL2* (mannose-binding lectin 2) εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 (10q21.1) και περιλαμβάνει 4 εξόνια και 3 ιντρόνια. Το γονίδιο *MBL2* κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη, την πρωτεΐνη λεκτίνη (πρωτεΐνη τύπου C). Η λεκτίνη είναι μια ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους που παράγεται στο ήπαρ (195). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη δέσμησης υδατανθράκων, με ιδιαίτερη εξειδίκευση στις ομάδες σακχάρων άλλων μορίων και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο (196). Η λεκτίνη δεσμεύει μικροβιακούς επιφανειακούς υδατάνθρακες που παρουσιάζονται από βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα και προκαλεί ενεργοποίηση των παραγόντων του συμπληρώματος (Εικόνα 1.9.1). Η λεκτίνη συνδέεται με πρωτεάσες σερίνης, MASP-1 και MASP-2 και έτσι ενεργοποιείται ο καταρράκτης του συμπληρώματος για την οψωνοποίηση και καταστροφή των μικροοργανισμών (197).



Εικόνα 1.9.1: Δράση των παραγόντων του συμπληρώματος (C) με τη βοήθεια της πρωτεΐνης MBL η οποία συνδέεται με MASP πρωτεΐνες. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη MBL συνδέεται με τις πρωτεΐνες MASPs και ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος. Η MASP-2 είναι αυτή που δίνει το αναγκητήριο σήμα για να ενεργοποιηθεί ο καταρράκτης του συμπληρώματος και να αντιμετωπιστεί ο ξενιστής.

Πηγή: Garred et. al. (2006) Mannose-binding lectin and its genetic variants, *Genes & Immunity* volume 7, pages85–94

Το γονίδιο *MBL2* αποτελεί έναν καλό δείκτη πρόγνωσης για την διερεύνηση της γενετικής προδιάθεσης του πρόωρου τοκετού και της πιθανότητας εμφάνισης μελλοντικών λοιμώξεων (198). Το γονίδιο αυτό έχει συσχετιστεί με το μικρό βάρος γέννησης των νεογνών, τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού και την εμφάνιση νεογνικών λοιμώξεων, διότι αποτελεί σημαντικό συστατικό της φυσικής ανοσίας και είναι σημαντικός ρυθμιστής της φλεγμονώδους απόκρισης (119, 185).



Εικόνα 1.9.2: Σχηματική απεικόνιση του υποκινητή και του πρώτου εξωνίου του γονιδίου.

Πηγή: Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Clin Microbiol Rev. 2010 Oct;23(4):740-80. doi: 10.1128/CMR.00048-09.

Όσον αφορά τους γενετικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου *MBL2* είναι πολλοί και σημαντικοί, καθώς η ύπαρξή τους επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η λειτουργική ανεπάρκεια της λεκτίνης έχει εντοπιστεί σε ποικίλες πληθυσμιακές ομάδες και οφείλεται σε επιμέρους πολυμορφισμούς του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) του εξωνίου 1. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως αλληλόμορφο D για το κωδικόνιο 52 (rs 5030737), B για το κωδικόνιο 54 (rs1800450) και C για το κωδικόνιο 57 (rs1800451), ενώ ως αλληλόμορφο A ονομάζεται το φυσιολογικό αλληλόμορφο (wild type) (Εικόνα 1.9.2) (199, 200). Η ύπαρξη ενός από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (B, C, D) έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδά της στον ορό (201).

Πίνακας 1.9.1: Πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2*.

Πολυμορφισμός	Αλληλόμορφα	Αποτέλεσμα	Συχνότητα εμφάνισης στην Ευρώπη	Συνολική συχνότητα εμφάνισης
<i>rs1800450</i>	C>T	Gly54Asp	14%	12%
<i>rs1800451</i>	G>A	Gly57Glu	1%	8%
<i>rs5030737</i>	C>T	Arg52Cys	6%	3%
<i>rs11003125</i>	G>C	-	39%	31%
<i>rs7096206</i>	C>G/A/T	-	22%	20%
<i>rs7095891</i>	G>A	-	20%	28%

Πηγή: <https://www.ensembl.org/index.html>

Ο πολυμορφισμός με *rs1800450* (C>T) έχει σαν αποτέλεσμα διαφορετική αμινοξική αλληλουχία (Gly54Asp) στην πρωτεΐνη. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο εμφανίζεται με συχνότητα περίπου 15% σε πληθυσμούς της Ευρώπης και της Ασίας, ενώ στην Αμερική σε ποσοστό 22%. Αντίθετα, στην Αφρική ο πολυμορφισμός εμφανίζεται σε ποσοστό μόλις 1% (Πίνακας 1.9.1). Ο πολυμορφισμός με *rs1800451* (G>A) έχει επίσης σαν αποτέλεσμα διαφορετικό αμινοξύ στην πρωτεϊνική αλληλουχία (Gly57Glu). Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού αυτού σε Αμερική, Ασία και Ευρώπη είναι 1-2%, ενώ στον αμερικάνικο πληθυσμό εμφανίζεται σε ποσοστό 26% (Πίνακας 1.9.1). Ο πολυμορφισμός με *rs5030737* (C>T) έχει και αυτός σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέως στην πρωτεΐνη (Arg52Cys). Η συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού σε όλους τους πληθυσμούς είναι <6% (Πίνακας 1.9.1) (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Εκτός από τους πολυμορφισμούς του εξωνίου 1, υπάρχουν και τρεις πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου, οι οποίοι επίσης επηρεάζουν την έκφραση της λεκτίνης (Εικόνα 1.8.2). Οι πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή βρίσκονται στις θέσεις -550, -221 και +4 και είναι γνωστοί ως H/L (*rs11003125*, G>C), Y/X (*rs7096206*, C>G/A/T) και P/Q (*rs7095891*, G>A) αντίστοιχα (Πίνακας 1.9.1).

Ο πολυμορφισμός με *rs11003125* εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 40% σε Ευρώπη, Αμερική και Ασία, ενώ στην Αφρική εμφανίζεται μόλις στο 9% του πληθυσμού. Ο πολυμορφισμός με *rs7096206* παρουσιάζει ομοιομορφία σε όλους τους πληθυσμούς,

καθώς εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 20%. Ο πολυμορφισμός με rs7095891 εμφανίζεται στον αφρικανικό πληθυσμό σε ποσοστό 54%, ενώ στους υπόλοιπους πληθυσμούς κυμαίνεται μεταξύ 17-25% (<https://www.ensembl.org/index.html>) (Πίνακας 1.9.1).

Λαμβάνοντας υπόψιν τη σημασία του ρόλου της πρωτεΐνης MBL στην άμυνα των νεογνών, οι γονοτυπικές αλλαγές που επηρεάζουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό είναι πολύ σημαντικές καθώς καθορίζουν τον τρόπο απόκρισής τους έναντι των λοιμώξεων. Η έλλειψη της πρωτεΐνης λεκτίνης ή τα μειωμένα επίπεδά της επηρεάζουν τη διαδικασία της οψωνοποίησης των μικροοργανισμών και αυξάνεται η ευαισθησία στις λοιμώξεις, κυρίως σε άτομα νεογνικής και παιδικής ηλικίας (118, 202-204).

Οι πολυμορφισμοί αυτοί παρουσιάζονται ως τέσσερις απλότυποι για την περιοχή του υποκινητή (LXP, LYP, LYQ, HYP) από τους οποίους ο HYP συσχετίζεται με φυσιολογικά ή υψηλά επίπεδα της λεκτίνης, ενώ από την άλλη ο απλότυπος LXP με χαμηλά επίπεδα της (200). Γενικότερα όμως, η ύπαρξη του X αλληλομόρφου έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα λεκτίνης στον ορό, χωρίς να έχει ιδιαίτερη σημασία ο συνδυασμός των υπόλοιπων πολυμορφισμών (201).

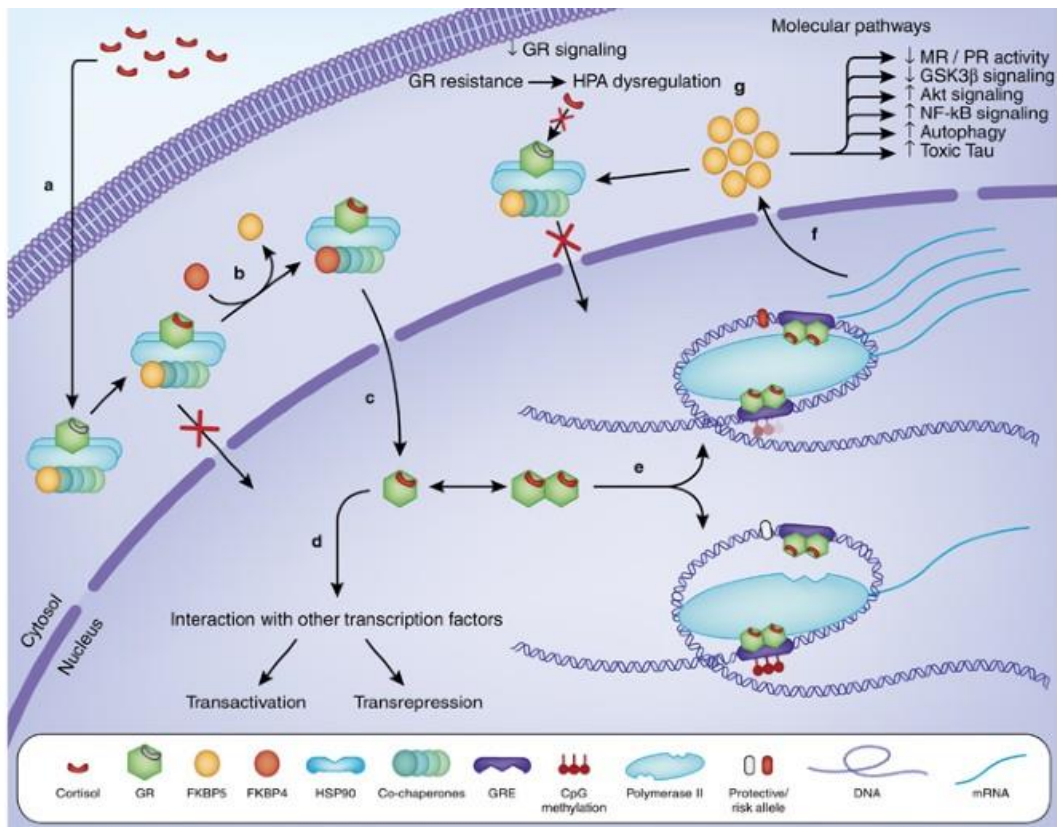
### **1.9.2 Το γονίδιο FKBP5 (FK506 Binding Protein 5)**

Το γονίδιο *FKBP5* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.31. Η πρωτεΐνη που παράγεται από αυτό το γονίδιο είναι γνωστή ως FK506 binding protein 51 ή FKBP51, έχει μέγεθος 51 kDa και ανήκει στην οικογένεια των ανοσοφιλινών (205, 206). Η πρωτεΐνη αυτή στο καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει ένα τετραπεπίδιο επαναλαμβανόμενων περιοχών (tetrapeptide repeat protein, TPR) και δρα σαν πρωτεΐνη-συνοδός της Hsp90 (Heat shock protein 90) (207).

Η πρωτεΐνη FKBP51 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας του υποδοχέα GR και δεσμεύεται με πρωτεΐνες συνοδούς μέσω της περιοχής TPR η οποία δρα ως θέση πρόσδεσης, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ενός συμπλόκου που έχει συγγένεια με την κορτιζόλη. Η πρωτεΐνη FKBP51 λειτουργώντας ως πρωτεΐνη συνοδός, συμμετέχει στο σύμπλοκο του υποδοχέα του GR, το οποίο συγκρατεί τον υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα. Το σύμπλοκο περιέχει ένα μόριο GR, ένα διμερές της πρωτεΐνης Hsp90 και άλλες πρωτεΐνες συνοδούς, όπως οι Hsp70, DnaJ/HSP40, p23, Hop.

Η FKBP51 μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν μεγαλύτερο βαθμό δέσμευσης με τον υποδοχέα του GR, οπότε και η μετατόπισή του στον πυρήνα αλλά και η μεταγραφή του πραγματοποιούνται ευκολότερα (208, 209). Όταν το σύμπλοκο διατηρείται στο κυτταρόπλασμα, η FKBP51 προσδένεται στην Hsp90 μέσω της περιοχής TPR, με αποτέλεσμα η διαμόρφωση που προκύπτει να έχει μικρότερη συγγένεια για την κορτιζόλη. Ωστόσο, μετά την πρόσδεση της κορτιζόλης στο σύμπλοκο, η FKBP51 αντικαθίσταται από την FKBP52, η οποία έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού (σε σύγκριση με την FKBP51), οπότε το σύμπλοκο GR-κορτιζόλης μετακινείται γρηγορότερα στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη FKBP51 αλληλεπιδρά σε μικρό βαθμό με τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού και γι' αυτό το λόγο η μετατόπιση του συμπλέγματος GR-FKBP51 γίνεται με μικρότερο ρυθμό σε σύγκριση με αυτού του συμπλέγματος GR-FKBP52 (208). Από εκεί ο GR, δρα ως μεταγραφικός παράγοντας διάφορων γονιδίων πάνω στα GREs τους (glucocorticoid response elements) (Binder 2009). Η έκφραση του *FKBP5* ρυθμίζεται από τα GREs, μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης από την κορτιζόλη (210, 211). Τα GREs είναι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA, πάνω στις οποίες οι υποδοχείς GR προσδένονται με υψηλή συγγένεια και προκαλούν την έκφραση ή την αποσιώπηση γονιδίων (212) (Εικόνα 1.9.3).

Η κορτιζόλη μέσω των GREs επάγει την έκφραση του FKBP5, έτσι αυξάνεται η συγκέντρωσή του και βγαίνει στο κυτταρόπλασμα όπου προσδένεται με το σύμπλοκο GR-κορτιζόλης και το κρατάει στο κυτταρόπλασμα, οπότε δεν μπορεί να προσδεθεί στα GREs και να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας (negative feedback) (213).



Εικόνα 1.9.3: Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών γεγονότων που εμπλέκονται στην επαγωγή του FKBP5 από γλυκοκορτικοειδή, τον ενδοκυτταρικό βρόγχο αρνητικής ανατροφοδότησης και την επίδραση ως μεταγραφικός παράγοντας στην έκφραση άλλων γονιδίων.

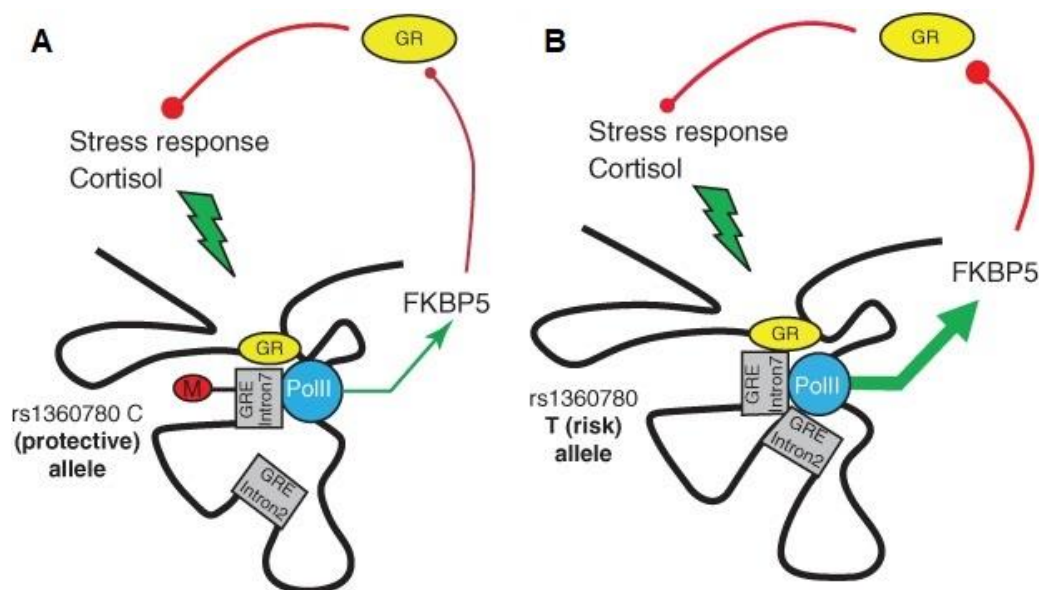
Πηγή: Zannas, A., Wiechmann, T., Gassen, N. et al. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacol* 41, 261-274 (2016). <https://doi.org/10.1038/npp.2015.235>

Στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου έχει βρεθεί ένας σημαντικός πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου (SNP) με rs1360780, οποίος βρίσκεται κοντά στην περιοχή των GREs (214). Δομικά, το αλληλόμορφο T το οποίο είναι το αλληλόμορφο κινδύνου, μεταβάλλει τη διαμόρφωση της χρωματίνης μετά τη δέσμευση του GR στα GREs, επάγοντας έτσι τη μεταγραφή του *FKBP5* και οδηγεί στην υπερέκφρασή του. Αντίθετα, παρουσία του C αλληλομόρφου, το οποίο είναι το φυσιολογικό, η μεταγραφή του *FKBP5* γίνεται σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 1.9.4) (210, 214). Σύμφωνα με τα πληθυσμιακά δεδομένα της βάσης *ensembl*, η συχνότητα εμφάνισης του «επικίνδυνου» αλληλόμορφου T είναι κατά μέσο όρο 30% σε όλους τους πληθυσμούς (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με πολλές νευροψυχιατρικές ασθένειες, όπως η κατάθλιψη, το άγχος, η ψύχωση, η επιθετική συμπεριφορά και το μετατραυματικό στρες (187-189). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη προδιάθεση για συμπτώματα

κατάθλιψης εγκαθιδρύεται σε μεγάλο βαθμό κατά το σχηματισμό των εμβρυικών εγκεφαλικών περιοχών (αμυγδαλή και ιππόκαμπος) κατά την ενδομήτρια ανάπτυξη, όταν η μητέρα έχει εμφανίσει συμπτώματα άγχους ή κατάθλιψης (215, 216). Ο πολυμορφισμός αυτός στα νεογνά, σε συνδυασμό με συμπτώματα κατάθλιψης της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, θα μπορούσε να αποτελέσει προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση κατάθλιψης στη μελλοντική ζωή των ατόμων αυτών, λόγω μόνιμων αλλαγών που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη περιοχών του εγκεφάλου (217).

Επιπλέον, ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση συμπτωμάτων διάφορων ψυχιατρικών παθήσεων, προσδίδοντας αυξημένη ευαισθησία στα στρεσογόνα ερεθίσματα και δυσκολία επαναφοράς στην κατάσταση ισορροπίας. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συμπτωμάτων ψύχωσης και της ύπαρξης του «επικίνδυνου» αλληλομόρφου T σε άτομα που βίωσαν αντίζοα γεγονότα σε πρώιμα στάδια της ζωής τους (190).



Εικόνα 1.9.4: Πολυμορφισμός rs1360780 του γονιδίου *FKBP5*. Οι διαφορές των αλληλομόρφων στην 3D διαμόρφωση του DNA και στις επιδράσεις τους στον άξονα του στρες. A) Η διαμόρφωση του DNA παρουσία του φυσιολογικού αλληλομόρφου C. B) Η διαμόρφωση του DNA παρουσία του αλληλομόρφου T επάγει την ισχυρή πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του FKBP5, που δρα ως αναστολέας του υποδοχέα GR.

Πηγή: Gene–environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. A.S. Zannas and E.B.Binder, *Genes, Brain and Behavior* (2014) 13:25-37

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι οι πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στις αλληλουχίες GREs, κάτι που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *FKBP5* και υπερέκφρασή του. Οι μεταβολές αυτές στην έκφραση του *FKBP5*, σε περιπτώσεις ύπαρξης του αλληλόμορφου T στον πολυμορφισμό με rs1360780 οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση κορτιζόλης μετά από έκθεση στο στρες. Μακροπρόθεσμα και σε συνδυασμό με απομεθυλίωση των GREs οι μεταβολές αυτές πιθανόν να έχουν επιπτώσεις σε μοριακό, κυτταρικό και ενδοκρινικό επίπεδο. Έτσι, επάγοντας αλλαγές στη δομή και στη λειτουργία περιοχών του εγκεφάλου, είναι πιθανό να συμβάλλουν στην εμφάνιση συμπτωμάτων ψυχολογικών και ψυχικών ασθενειών καθώς επίσης και να επηρεάσουν την έκφραση των συναισθημάτων (191, 192).

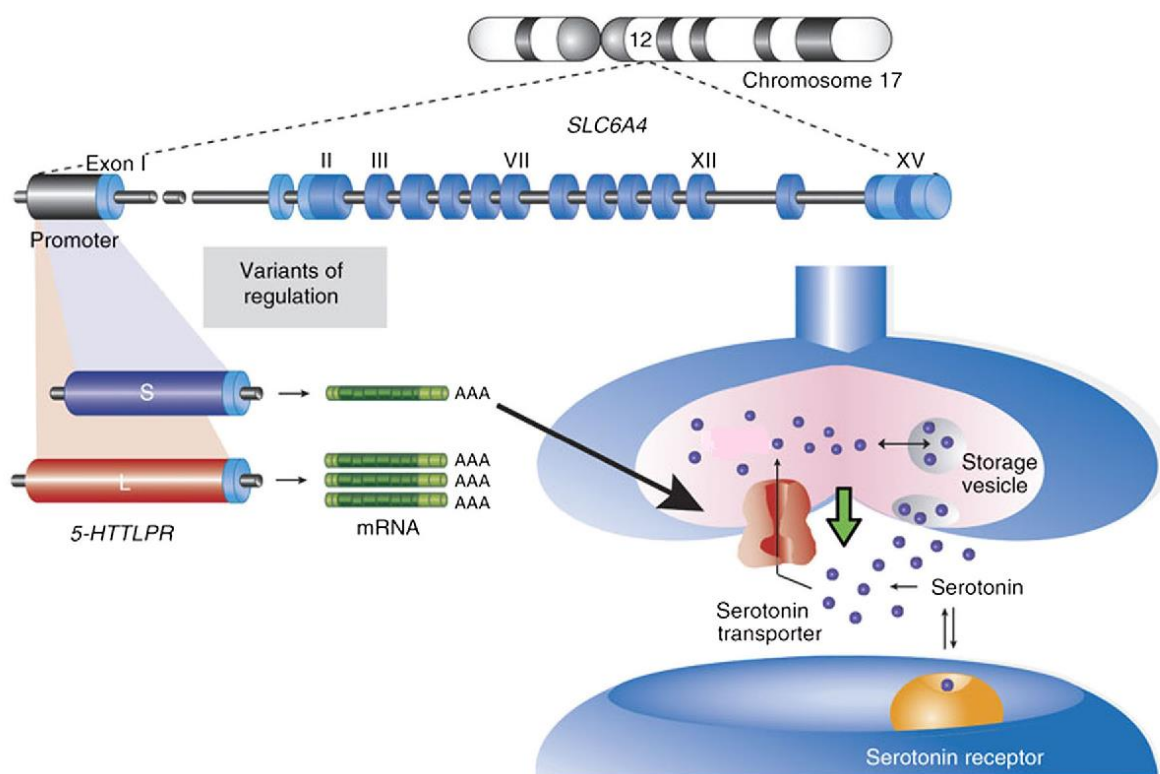
### **1.9.3 Το γονίδιο *SLC6A4* (Solute Carrier Family 6 Member 4)**

Το γονίδιο μεταφορέας της σεροτονίνης (*SLC6A4*) είναι ένα από τα γονίδια που μπορεί να επηρεάσουν την εμφάνιση και την εξέλιξη των νευροψυχιατρικών διαταραχών (218) και εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q11.1-q12. Το γονίδιο *SLC6A4* ελέγχει την έκφραση του μεταφορέα της σεροτονίνης (5-HT transporter, 5-HTT, SERT) και πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη στο άκρο του προσυναπτικού νευρώνα που είναι υπεύθυνος για την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης από τη συναπτική σχισμή.

Η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT) είναι ένας νευροδιαβιβαστής που παράγεται στους νευρώνες του εγκεφαλικού στελέχους και στα κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου από το αμινοξύ τρυπτοφάνη (L-τρυπτοφάνη) (193, 194). Η σύνθεση της σεροτονίνης εξαρτάται από την ποσότητα της τρυπτοφάνης που κυκλοφορεί στο αίμα και για τη σύνθεσή της απαραίτητα είναι δύο ένζυμα: η υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και αποκαρβοξυλάση των αρωματικών αμινοξέων (193). Μετά τη σύνθεσή της, η σεροτονίνη αποθηκεύεται σε κυστίδια του προσυναπτικού νευρώνα και απελευθερώνεται στη σύναψη, όπου παραμένει μέχρι να προσληφθεί από υποδοχείς σεροτονίνης του μετασυναπτικού νευρώνα ή επαναπροσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα. Η σεροτονίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής τα επίπεδα του οποίου επηρεάζουν την απόκριση στο στρες καθώς επίσης και τη ρύθμιση των συναισθημάτων, των αισθήσεων, της εγρήγορσης και της συγκέντρωσης ενός ατόμου (219). Τα χαμηλά επίπεδά του έχουν συσχετιστεί με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης κατάθλιψης. Όλα αυτά, βέβαια, συσχετίζονται και επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.



Στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου αυτού εντοπίζεται μια πολυμορφική περιοχή, γνωστή ως 5-HTTLPR (5-HTT linked polymorphic region), ο οποίος προκύπτει από την ένθεση ή έλλειψη 44 ζευγών βάσεων (bp) (Εικόνα 1.9.5). Η γενετική ποικιλομορφία της περιοχής αυτής οδηγεί σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης-μεταφορέα 5-HTT. Η ύπαρξη ενός μικρού (S, short allele) κι ενός μεγάλου αλληλομόρφου (L, long allele) επηρεάζει το μέγεθος της παραγόμενης πρωτεΐνης (220, 221). Το S αλληλόμορφο συνδέεται με χαμηλότερη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου, πράγμα που σημαίνει μειωμένη γονιδιακή έκφραση και μικρότερη παραγωγή πρωτεΐνης-μεταφορέα της σεροτονίνης (222). Υπάρχουν δεδομένα που έχουν δείξει πως ομοζυγώτες S/S οι οποίοι έχουν βιώσει στρεσογόνες εμπειρίες εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καταθλιπτικών συμπτωμάτων σε σύγκριση με άτομα S/L και L/L (223, 224).



Εικόνα 1.9.5: Ο πολυμορφισμός 5-HTTLPR. Το μήκος αυτού του αλληλομόρφου επηρεάζει τον ρυθμό πρόσληψης της σεροτονίνης. Το μικρό αλληλόμορφο (S) έχει συσχετιστεί με βραδύτερη πρόσληψη σεροτονίνης, σε σύγκριση με το μεγάλο αλληλόμορφο (L). Άτομα με γονότυπο L/L είναι λιγότερα ευαίσθητα σε συμπτώματα κατάθλιψης σε σχέση με αυτά που φέρουν έστω ένα S αλληλόμορφο.

Πηγή: De Neve, J. Functional polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene is associated with subjective well-being: evidence from a US nationally representative sample. *J Hum Genet* **56**, 456–459 (2011).

Επίσης, εσωτερικά στην περιοχή του 5-HTTLPR υπάρχει και ένας πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου με rs25531 (A>G), που έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη συγκεκριμένη περιοχή σε μεταγραφικό επίπεδο (225). Ο πολυμορφισμός αυτός εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 10% στον ευρωπαϊκό και ασιατικό πληθυσμό, ενώ στην Αφρική σε ποσοστό 22% και στην Αμερική σε ποσοστό μόλις 5% (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Ο συνδυασμός αυτών των δύο πολυμορφισμών μελετάται συχνά με αποτέλεσμα υψηλή μεταγραφική ικανότητα ( $L_A/L_A$ ), μεσαία μεταγραφική ικανότητα ( $L_A/L_G$ ,  $S_A/L_G$ ) και χαμηλή μεταγραφική ικανότητα ( $S_A/S_A$ ,  $L_G/S_A$ ) (226). Έχει δειχθεί ότι τα αλληλόμορφα  $S_A$ ,  $S_G$  και  $L_G$  δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην έκφραση, σε αντίθεση με το αλληλόμορφο  $L_A$  που παρουσιάζει αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα (227).

Ένα βασικό μέρος της έρευνας για τις αιτίες και τη θεραπεία ψυχιατρικών διαταραχών όπως η κατάθλιψη και το άγχος έχει επικεντρωθεί σε αναστολείς της επαναπρόσληψης σεροτονίνης (228).

#### **1.9.4 Το γονίδιο HLA-G (Human Leukocyte Antigen-G)**

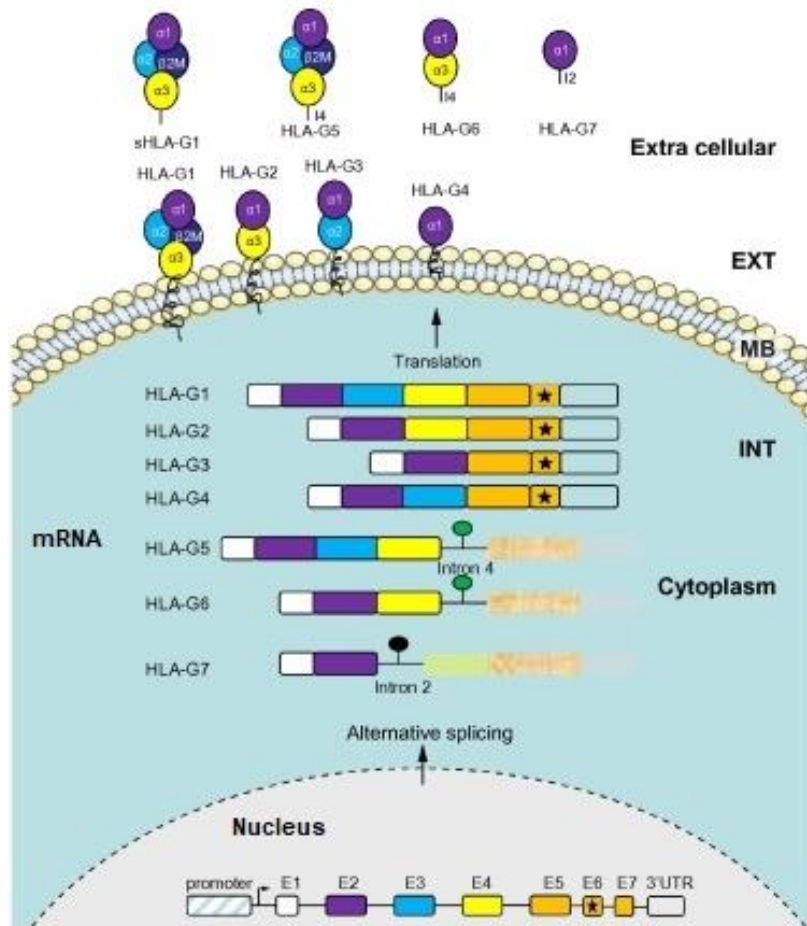
Το αντιγόνο G των ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLA-G) είναι βασικό συστατικό του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας I που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.1-21.3, και αποτελείται από 8 εξώνια και 7 ιντρόνια. Το HLA-G είναι ένα μόριο με σχεδόν αποκλειστική έκφραση στον πλακούντα. Όταν το γονίδιο *HLA-G* εκφράζεται, μπορεί να παράγει επτά διαφορετικές ισομορφές που ασκούν ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες. Από τις επτά διαφορετικές ισομορφές HLA-G που παράγονται, οι τέσσερις είναι διαμεμβρανικές (HLA G1–G4) και οι τρεις διαλυτές (HLA G5–G7) (Εικόνα 1.8.6). Ωστόσο, υπάρχουν μερικές βασικές έννοιες στη βιοχημεία του που δεν έχουν ακόμη εξηγηθεί πλήρως. Μεταξύ αυτών είναι η ρύθμιση της έκφρασής του που επηρεάζεται σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. προεκλαμψία) (186).

Ο ρόλος του *HLA-G* διαφέρει από αυτόν των υπόλοιπων μορίων του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας I λόγω των περιορισμένων ιστών που εκφράζεται (229). Το γονίδιο *HLA-G* φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στον τρόπο που αντιμετωπίζεται το έμβρυο από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, καθώς δρα προστατευτικά (230).

Σε φυσιολογικές καταστάσεις εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα και στον θύμο αδένα αλλά και σε ιστούς όπως ο κερατοειδής, τα ερυθροειδή και τα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης στον ορό και στο πλάσμα αίματος (231-234). Υπάρχουν μελέτες σε πλακούντες στις οποίες

αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του *HLA-G* σε επίπεδο mRNA αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης, σε παθολογικές καταστάσεις όπως η προεκλαμψία και οι καθ' ἑξιν αποβολές σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς πλακούντες (235, 236).

Η έκφραση του HLA-G επηρεάζεται από πολυμορφισμούς που βρίσκονται στον υποκινητή του καθώς και στην 3'-αμετάφραστη περιοχή που τροποποιούν τη συγγένεια μεταξύ των ρυθμιστικών αλληλουχιών και των μεταγραφικών παραγόντων (237). Στον υποκινητή του γονιδίου έχουν ταυτοποιηθεί 29 διαφορετικά SNPs που επηρεάζουν την έκφρασή του (186). Η ρυθμιστική περιοχή που βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδίου είναι μοναδική για κάθε γονίδιο HLA και δεν επηρεάζεται από τον NF-κB και την IFN-γ, εξαιτίας της παρουσίας ενός ενισχυτή (*enhA*) και της έλλειψης ενός ρυθμιστικού στοιχείου (238, 239).



Εικόνα 1.9.6: Το γονίδιο HLA-G αποτελείται από 8 εξώνια και 7 ιντρόνια. Κατά τη μεταγραφή, το γονίδιο υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα και δημιουργούνται τέσσερις διαφορετικές ισομορφές με διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4) και τρεις διαφορετικές διαλυτές ισομορφές (sHLA G1 ή HLA-G5, HLA-G6 και HLA-G7).

Πηγή: Amiot, L., Vu, N., & Samson, M. (2015). *Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases*. *Journal of Hepatology*, 62(6), 1430–1437. doi:10.1016/j.jhep.2015.03.007

## 2. Σκοπός της Μελέτης

Το μικρό βάρος γέννησης και η προωρότητα, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα του νεογνού. Είναι γνωστό ότι τα πρόωρα νεογνά διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο λοιμώξεων, ενώ το μικρό βάρος γέννησης έχει θεωρηθεί στοιχείο έκθεσης σε ενδομήτριες αντιξοότητες. Σήμερα υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία από μελέτες σε ανθρώπους αλλά και σε ζωικά μοντέλα ότι ενδομήτριες στρεσογόνες καταστάσεις (μητρικό στρες, άγχος, κατάθλιψη) έχουν μακροπρόθεσμες επιδράσεις στην υγεία ή την παθολογία του απογόνου και σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για νοσήματα των ενηλίκων. Ακόμα το ενδομήτριο στρες είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του εμβρύου και την διαμόρφωση της μελλοντικής του απόκρισής στο στρες. Πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες. Επιπλέον, γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με αυξημένη προδιάθεση για πρόωρο τοκετό και εμφάνιση πρώιμης λοίμωξης. Πολυμορφισμοί γονιδίων, καθώς επίσης και τα επίπεδα μεθυλίωσης γονιδίων, που έχουν συσχετιστεί με το στρες μελετώνται για να κατανοήσουμε πως ο οργανισμός αντιδρά στα διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Η κατανόηση της σχέσης του μικρού βάρους γέννησης με τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τον αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας/προδιάθεση θα βοηθήσει στον σχεδιασμό παρεμβάσεων.

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο:

- τη διερεύνηση γενετικών παραγόντων (πολυμορφισμών) που συσχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για πρόωρο τοκετό ή νεογνό με μικρό βάρος γέννησης και πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με την απόκριση στο στρες.
- τη διερεύνηση επιγενετικών αλλαγών, και συγκεκριμένα τον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης γονιδίων που συνδέονται με την απόκριση του οργανισμού στα εκλαμβανόμενα στρεσογόνα ερεθίσματα και γονιδίων που συσχετίζονται με την πρώιμη λοίμωξη.
- τη μελέτη του μεταβολομικού προφίλ γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη για τον εντοπισμό μεταβολιτών που επηρεάζονται από την ύπαρξη ή μη της επιλόχειου κατάθλιψης.

Συνολικά η μελέτη εστιάζει στη διερεύνηση της σχέσης και της επίδρασης των ενδομήτριων αντιξοοτήτων με το βάρος γέννησης του νεογνού, την εμφάνιση πρώιμων λοιμώξεων και την απόκρισή του στο στρες.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Πληθυσμός Έρευνας

#### 3.1.1 Πληθυσμός Έρευνας Νεογνών που γεννήθηκαν πρόωρα ή/και με μικρό βάρος γέννησης

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρόωρων νεογνών από το Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «Ιπποκράτειο» και το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα». Ο πληθυσμός περιελάμβανε πρόωρα νεογνά που γεννήθηκαν κατά το χρονικό διάστημα Ιούλιος 2014-Ιούλιος 2018. Η λήψη αίματος από τα νεογνά έγινε στα πλαίσια των απαραίτητων εξετάσεων που πραγματοποιούνται στη μονάδα πρόωρων (Α' Νεογνολογική Κλινική, Γ.Ν. Θεσσαλονίκης «Ιπποκράτειο» και τμήμα Γενετικής του Γ.Ν. Αθηνών «Έλενα Βενιζέλου-Αλεξάνδρα») όπου νοσηλεύονταν. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει εγκριθεί από Διοικητικό Συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου «Έλενα Βενιζέλου-Αλεξάνδρα» (Αριθμ. Πρωτ. 257/29-03-2019). Από κάθε νεογνό ελήφθη ατομικό, οικογενειακό και ιατρικό ιστορικό. Τα στοιχεία των νεογνών που συμμετέχουν στη μελέτη καθώς και το ιστορικό τους είναι ανώνυμα. Στη μελέτη συμμετέχουν συνολικά 51 πρόωρα νεογνά ή/και με μικρό βάρος γέννησης και 32 τελειόμηνα νεογνά ως ομάδα ελέγχου (controls), για τα οποία συμπληρώθηκε το ερωτηματολόγιο που παρατίθεται παρακάτω.

#### Νεογνό:

- Ημερ/νία γέννησης:
- Εβδομάδα κύησης:
- Φύλο:
- Βάρος:
- Εμφάνιση λοίμωξης:

#### Μητέρα:

- Ηλικία:
- Διατροφή:
- Σακχαρώδης διαβήτης:
- Κάπνισμα:
- Στρες, κατάθλιψη κτλ:

#### Τοκετός:

- Τρόπος τοκετού: Φ ή Κ
  - Καισαρική: προγραμματισμένη ή έκτακτη;
- Τρόπος σύλληψης:
  - προεμφυτευτικός έλεγχος;

### **3.1.2 Πληθυσμός Έρευνας Γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη**

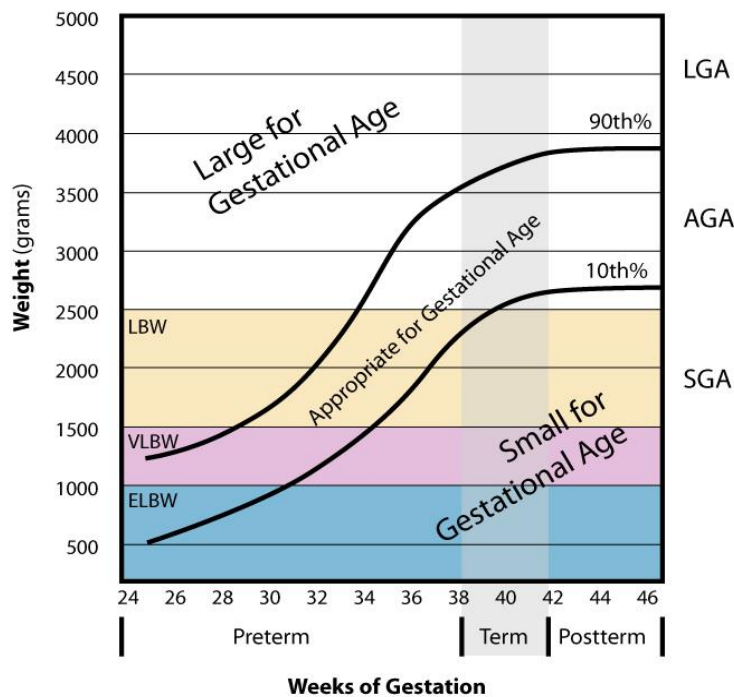
Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γυναικών που εμφάνισαν συμπτώματα επιλόχειου κατάθλιψης και συμμετείχαν στη μελέτη «Rhea» (<http://www.rhea.gr/>) (240). Ο πληθυσμός μας περιελάμβανε εγκυμονούσες γυναίκες που ζούσαν στο Ηράκλειο Κρήτης και η εγκυμοσύνη προέκυψε κατά το διάστημα Φεβρουάριος 2007-Φεβρουάριος 2008. Οι γυναίκες είχαν έρθει σε επικοινωνία με τους υπεύθυνους της έρευνας συνολικά τέσσερις φορές, στο πρώτο και τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, κατά τον τοκετό και 8 εβδομάδες μετά τον τοκετό. Κατά τις συναντήσεις αυτές υπήρχε άμεση επαφή με τις γυναίκες και συζήτηση η οποία συμπεριελάμβανε ψυχολογικά τεστ, συμπλήρωση ερωτηματολογίων και ιατρικές εξετάσεις. Για τη διάγνωση της επιλόχειου κατάθλιψης χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα EPDS (Edinburgh Postnatal Depression Scale) όπου EPDS σκορ  $\geq 13$  σημαίνει ότι η γυναίκα πάσχει από επιλόχειο κατάθλιψη και EPDS σκορ  $< 13$  ότι δεν πάσχει. Αρχικά, για τη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε 10 δείγματα γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και 10 δείγματα χωρίς κατάθλιψη ως ομάδα μαρτύρων, ωστόσο μετά τα πρώτα πειράματα συνεχίσαμε με έναν συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης της μελέτης (validation cohort) που αποτελούνταν από 8 γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη και 7 στην ομάδα των μαρτύρων. Όλες οι γυναίκες (με και χωρίς επιλόχειο κατάθλιψη) είναι 20-35 ετών, μη καπνίστριες και φυσιολογικού βάρους (BMI $<35$ ). Από την έρευνα έχουν εξαιρεθεί δίδυμες κυήσεις, εγκυμοσύνες που προέκυψαν μετά από τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, εγκυμοσύνες με διαβήτη ή προεκλαμψία καθώς και γυναίκες που είχαν ήδη εμφανίσει ψυχολογικές διαταραχές πριν την εγκυμοσύνη (241).

## 3.2 Κριτήρια Καθορισμού των Ομάδων Έρευνας

### 3.2.1 Πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της Προωρότητας και του Μικρού Βάρους Γέννησης

Η ταξινόμηση των νεογνών στην ομάδα των πρόωρων ή των τελειόμηνων νεογνών έγινε σύμφωνα με την ηλικία κύησης που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός. Ως ηλικία κύησης ορίζουμε το χρονικό διάστημα (σε εβδομάδες) που πέρασε από την ημερομηνία έναρξης της τελευταίας εμμήνου ρύσεως μέχρι τον τοκετό (125). Πρόωρα νεογνά χαρακτηρίζονται αυτά που γεννήθηκαν πριν την 37<sup>η</sup> εβδομάδα, και τελειόμηνα αυτά που γεννήθηκαν μεταξύ 37<sup>ης</sup> και 41<sup>ης</sup>. Νεογνά που γεννήθηκαν μετά την 41<sup>η</sup> εβδομάδα χαρακτηρίζονται ως παρατασιακά (124).

Το βάρος γέννησης ενός νεογνού αποτελεί σημαντικό δείκτη της ενδομήτριας ανάπτυξης και αύξησης (123). Το βάρος γέννησης ενός νεογέννητου είναι το βάρος του τη στιγμή της γέννησης ή μέσα σε μία ώρα. Νεογνά με βάρος γέννησης < 2.500g χαρακτηρίζονται ως νεογνά με μικρό βάρος γέννησης, ενώ < 1.500g νεογνά με πολύ μικρό βάρος γέννησης (124). Για να μπορούμε να χαρακτηρίσουμε όμως πλήρως ένα νεογνό θα πρέπει να συνυπολογίσουμε το βάρος γέννησής του με την ηλικία κύησης. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια της καμπύλης ανάπτυξης (Εικόνα 3.2.1). Στην ομάδα των νεογνών με μικρό βάρος γέννησης συμπεριλαμβάνονται δύο διαφορετικές ομάδες, τα νεογνά που είναι μικρά για την ηλικία κύησης και τα νεογνά που έχουν ικανοποιητικό βάρος για την ηλικία κύησης. Επίσης, στην ομάδα των τελειόμηνων νεογνών υπάρχουν νεογνά με κανονικό βάρος γέννησης και νεογνά με μικρό βάρος γέννησης για την ηλικία κύησης.



Εικόνα 3.2.1: **Καμπύλη ανάπτυξης βάρους γέννησης-ηλικίας κύησης.** [Large for Gestational Age (LGA) μεγάλο βάρος για την ηλικία κύησης, Appropriate for gestational Age (AGA) κανονικό βάρος για την ηλικία κύησης, Small for Gestational Age (SGA) μικρό βάρος για την ηλικία κύησης, LBW (low birth weight) μικρό βάρος γέννησης, VLBW (very low birth weight) πολύ μικρό βάρος γέννησης, ELBW (extremely low birth weight) πάρα πολύ μικρό βάρος γέννησης, preterm πρόωρο νεογνό, term: τελειόμηνο νεογνό, postterm: παρατασιακό νεογνό]

Πηγή: By Yehudamalul-Own work, CC BY-SA 3.0

### 3.2.2 Πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της Επιλόχειου Κατάθλιψης

Τα συμπτώματα κατάθλιψης της μητέρας ελέγχθηκαν και αξιολογήθηκαν δύο φορές, η πρώτη ήταν προγεννητικά μεταξύ 28-32 εβδομάδων της κύησης και η δεύτερη μεταγεννητικά την 8η εβδομάδα μετά τον τοκετό, χρησιμοποιώντας την κλίμακα EPDS. Η αξιολόγηση των συμπτωμάτων της επιλόχειου κατάθλιψης πραγματοποιήθηκε από τους υπεύθυνους της μελέτης «Rhea». Η κλίμακα EPDS είναι μία από τις πιο διαδεδομένες για την ανίχνευση και αξιολόγηση της επιλόχειου κατάθλιψης και περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1987 από τον Cox και τους συνεργάτες του (242). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ένα ερωτηματολόγιο 10 ερωτήσεων που παρέχει ένδειξη για τη διάθεση της μητέρας την τελευταία εβδομάδα. Τα αντικείμενα βαθμολογούνται σε μια κλίμακα από το 0-3 και αναφέρονται σε αισθήματα φόβου, άγχους, θλίψης, στεναχώριας, ενοχής και τάσεις αυτοκτονίας. Το σκορ  $\geq 13$  έχει συνδεθεί με επιλόχειο κατάθλιψη, ενώ το σκορ  $< 13$  όχι. Η κλίμακα EPDS μεταφράστηκε και επικυρώθηκε στα ελληνικά (243).



Το ερωτηματολόγιο στο οποίο κλήθηκαν να απαντήσουν οι γυναίκες παρατίθεται παρακάτω:

*Μετά από την πρόσφατη γέννηση του παιδιού σας, θα θέλαμε να μάθουμε πώς αισθάνεστε τώρα. Παρακαλώ υπογραμμίστε την απάντηση που αντιστοιχεί πλησιέστερα στο πώς αισθανόσαστε τις περασμένες 7 ημέρες, όχι μόνο στο πως αισθάνεστε σήμερα. Ένα παράδειγμα που είναι ήδη συμπληρωμένο: Αισθανόμουν χαρούμενη:*

*Ναι, το περισσότερο χρονικό διάστημα*

*Ναι, μερικό χρονικό διάστημα*

*Όχι, όχι τόσο πολύ*

*Όχι, καθόλου*

*Αυτό θα εννοούσε: «Αισθάνθηκα χαρούμενη για μερικό χρονικό διάστημα κατά την περασμένη εβδομάδα».*

*Σας παρακαλούμε να συμπληρώσετε τις υπόλοιπες ερωτήσεις κατά τον ίδιο τρόπο.*

*Τις τελευταίες 7 ημέρες*

1. *Μπορούσα να γελώ και να βλέπω την αστεία πλευρά της ζωής:*  
*Όπως πριν*  
*Λιγότερο από πριν*  
*Πολύ λιγότερο από πριν*  
*Καθόλου*
2. *Έβλεπα το αύριο με ενθουσιασμό:*  
*Όπως και πριν*  
*Μάλλον λιγότερο από πριν*  
*Πολύ λιγότερο από πριν*  
*Σχεδόν καθόλου*
3. *Κατηγορούσα άδικα τον εαυτό μου για πράγματα που πήγαν στραβά:*  
*Ναι, όλη την ώρα*  
*Ναι, αρκετά συχνά*  
*Όχι πολύ συχνά*  
*Ποτέ*
4. *Ένιωθα άγχος ή ανησυχία χωρίς σοβαρό λόγο:*  
*Όχι, καθόλου*  
*Σχεδόν ποτέ*  
*Ναι, μερικές φορές*  
*Ναι, πολύ συχνά*

5. Ένιωθα φόβο ή πανικό, χωρίς σοβαρό λόγο:  
Ναι, πολύ συχνά  
Ναι, μερικές φορές  
Όχι, όχι συχνά  
Όχι, καθόλου
6. Ένιωθα πολύ πεσμένη:  
Ναι, τις περισσότερες φορές δεν ήμουν σε θέση να τα βγάλω πέρα καθόλου  
Ναι, μερικές φορές δεν τα βγάζω πέρα τόσο καλά όσο συνήθως  
Όχι, τις περισσότερες φορές τα έβγαλα πέρα αρκετά καλά  
Όχι, τα βγάζω πέρα καλά, όπως πάντα
7. Ήμουν τόσο στεναχωρημένη που δεν μπορούσα να κοιμηθώ:  
Ναι, σχεδόν συνέχεια  
Ναι, αρκετά συχνά  
Σπάνια  
Όχι, καθόλου
8. Ένιωθα θλιμμένη ή λυπημένη:  
Ναι, σχεδόν συνέχεια  
Ναι, αρκετά συχνά  
Σπάνια  
Όχι, καθόλου
9. Ένιωθα τόσο στεναχωρημένη που έκλαιγα:  
Ναι, όλη την ώρα  
Ναι, αρκετά συχνά  
Κάπου-κάπου  
Όχι, ποτέ
10. Ήθελα να βλάψω τον εαυτό μου:  
Ναι, αρκετά συχνά  
Μερικές φορές  
Σχεδόν ποτέ  
Ποτέ

### **3.3 Συλλογή και Προετοιμασία των δειγμάτων**

#### **3.3.1 Δείγματα Νεογνών**

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από τους υπεύθυνους των μονάδων προώρων κατά τη διάρκεια νοσηλείας τους εκεί. Η λήψη αίματος από τα νεογνά πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των απαραίτητων εξετάσεων που τους γίνονται κατά τη διάρκεια νοσηλείας τους στη μονάδα προώρων. Η συλλογή έγινε σε σωληνάρια Vacutainer με EDTA (BD 367525). Τα δείγματα φυλάσσονταν στους - 20 °C και αποστέλλονταν στο εργαστήριο.

#### **3.3.2 Δείγματα Γυναικών**

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από τους υπεύθυνους της μελέτης «Rhea», από τις εγκυμονούσες γυναίκες κατά μέσο όρο την 14<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Η συλλογή έγινε σε σωληνάρια Vacutainer (BD 367958). Για την απομόνωση του ορού, αμέσως μετά τη συλλογή τους τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 2500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα ορού αποθηκεύτηκαν στους - 80 °C για περαιτέρω επεξεργασία (241).

Η απομόνωση των μεταβολιτών από τον ορό του αίματος έγινε με τετραπλάσιο όγκο ορού προς 100% παγωμένη μεθανόλη, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (244). Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση (vortex) για περίπου 2 λεπτά και επώαση σε ξηρό πάγο για 2 ώρες. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (2053 g, 100 λεπτά, 4 °C) και το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε σε σωληνάρια υπερδιήθησης SpinX 0,22mm (Corning, NY United States). Τα δείγματα λυοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους - 80 °C για τη μεταβολομική ανάλυση.

## 3.4 Ανάλυση DNA

### 3.4.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα νεογνών έγινε με τη χρήση του πακέτου QIAamp DNA MINI Kit (Qiagen cat. No. 51304). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που προτείνουν από την εταιρία, τα βήματα πραγματοποιήθηκαν ακριβώς όπως αναγράφεται στο χαρτί οδηγιών. Σε όλα τα δείγματα, η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε από 400μl περιφερικού αίματος. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C. Μετά την απομόνωση, ακολούθησε ποσοτικοποίηση του γενωμικού DNA σε φωτόμετρο τύπου Nanodrop (Quawell Q5000) όπου ελέγχθηκε η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του.

### 3.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αποτελεί μία μέθοδο για την εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών κύκλων *in vitro* διπλασιασμού με τη βοήθεια μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, καθώς και δύο αντιπαράλληλων εκκινητών (primers) που οριοθετούν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει. Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι μεγέθους 18-25 nt, συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες με τις αλληλουχίες που οριοθετούν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει να ενισχυθεί.

Σε κάθε αντίδραση PCR προηγείται ένα αρχικό στάδιο στους 95°C για 5 λεπτά κατά το οποίο συμβαίνει η αρχική αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια, οι εκκινητές βρίσκουν την αλληλουχία-στόχο που είναι συμπληρωματική με αυτούς και υβριδοποιούνται σε κατάλληλη θερμοκρασία (θερμοκρασία υβριδοποίησης-T annealing). Η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι διαφορετική και ειδική για κάθε ζευγάρι εκκινητών και καθορίζεται από την αλληλουχία τους. Με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης πραγματοποιείται η επιμήκυνση των εκκινητών χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γενωμικό DNA. Η Taq (*Thermus aquaticus*) πολυμεράση εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και πολυμερίζει νουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5→3, επιμηκώνοντας έτσι τους ήδη υβριδοποιημένους εκκινητές. Αυτή η διαδικασία γίνεται για περίπου 30 κύκλους και κάθε φορά ο αριθμός των αντιγράφων αυξάνεται εκθετικά. Τέλος, το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης των εκκινητών πραγματοποιείται στους 72°C για 10 λεπτά. Για την ενίσχυση των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αλληλουχίες εκκινητών και το συγκεκριμένο θερμικό προφίλ (Πίνακας 3.4.1). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε GeneAmp PCR System 9700.

Για την πραγματοποίηση της PCR απαιτείται ένα 10X ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPS (ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια), 20 μM εκκινητές, 5u/μl Taq πολυμεράση, DNA και H<sub>2</sub>O.

Πίνακας 3.4.1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και το θερμικό προφίλ της κάθε PCR αντίδρασης.

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητών	Θερμικό Προφίλ	Κύκλοι	Μέγεθος Προϊόντος
<i>MBL2</i>	F: 5' GGACAGAGGGCATGCTCGGTAAAT 3' R: 5' CAGAACAGCCCAACACGTACCTGG 3'	94°C/30sec 60°C/30sec 72°C/1min	30	289bp
<i>SLC6A4</i>	F: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3' R: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'	94°C/30sec 60°C/30sec 72°C/1min	32	486bp/529bp

### 3.4.3 Πέψη με Περιοριστική Ενδονουκλεάση

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction endonuclease) είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA και το τέμνουν σε συγκεκριμένη θέση (θέση περιορισμού). Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να προστατεύουν το βακτήριο από παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτηριοφάγους) διασπώντας το DNA τους, μετά τη μόλυνση του ξενιστή. Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών επέτρεψε την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών in vitro χειρισμού του DNA.

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs-single nucleotide polymorphisms). Αρχικά, έγινε αντίδραση PCR προκειμένου να απομονωθεί και να ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου που φέρει τον πολυμορφισμό που μας ενδιαφέρει και στη συνέχεια το τμήμα αυτό κόπηκε με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Το γονίδιο *MBL2* φέρει δύο SNPs τα οποία ανιχνεύθηκαν με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλεάση το καθένα. Ο πρώτος πολυμορφισμός (rs1800450) που χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή του φυσιολογικού κωδικονίου **GGC** σε **GAC** (Gly→Asp) ανιχνεύθηκε με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BanI*. Ο δεύτερος πολυμορφισμός (rs1800451) που χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή του φυσιολογικού κωδικονίου **GGA** σε **GAA** (Gly→Glu) ανιχνεύθηκε με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MbolI*. Το γονίδιο *SLC6A4* φέρει έναν ιντρονιακό πολυμορφισμό του ενός νουκλεοτιδίου, στον οποίο το φυσιολογικό αλληλόμορφο **A** μετατρέπεται σε **G**, και αυτός ο πολυμορφισμός ανιχνεύθηκε με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MspI*. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι αλληλουχίες αναγνώρισης, οι χρόνοι επώασης και οι κατάλληλες θερμοκρασίες για τη δράση της εκάστοτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης (Πίνακας 3.4.2).

Πίνακας 3.4.2: Περιοριστικές ενδονουκλεάσεις.

Ένζυμο	Προέλευση	Αλληλουχία αναγνώρισης	Συνθήκες
<i>BanI</i>	<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	5'...G↓GYRCC...3' 3'...CCRYG↑G...5'	37°C/60min
<i>MbolI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	5'...GAAGA(N) <sub>8</sub> ↓...3' 3'...CTTCT(N) <sub>7</sub> ↑...5'	37°C/15min
<i>MspI</i>	<i>Moraxella species</i>	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	37°C/60min

#### **3.4.4 Γονοτύπιση πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου με τη χρήση της μεθόδου *TaqMan* (*TaqMan* SNP genotyping)**

Η γονοτύπιση πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου είναι μία μέθοδος που παρέχει υψηλότερη ευκρίνεια από τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης σημειακών πολυμορφισμών και παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου ολόκληρου του γονιδιώματος χωρίς απαγορευτικό κόστος. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με αλληλεπίδραση της real-time PCR (*TaqMan* assay) και της allele-specific PCR και εκμεταλλεύεται της δραστηριότητα 5' νουκλεάσης που έχει η *Taq* πολυμεράση.

Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιεί δύο σημασμένους TaqMan ανιχνευτές, οι οποίοι διαφέρουν σε δύο σημεία, το ένα είναι στην αλληλουχία (μόνο στο σημείο που υπάρχει το εκάστοτε SNP) και στο φθοριόχρωμα που είναι σημασμένοι (συνήθως ο ένας είναι με πράσινο και ο άλλος με κόκκινο). Όταν οι ανιχνευτές δεν είναι προσδεδεμένοι στο DNA δεν φθορίζουν. Κατά την αντίδραση PCR όμως, όταν προσδένονται στη συμπληρωματική τους αλληλουχία και στη συνέχεια επεκτείνονται, εκπέμπουν το ανάλογο φθοριόχρωμα με το οποίο είναι σημασμένοι. Η δραστικότητα νουκλεάσης επιτυγχάνεται μόνο στην περίπτωση που οι ανιχνευτές είναι απόλυτα υβριδοποιημένοι, αν υπάρχει έστω και μία λανθασμένη βάση δεν εκπέμπεται το φθοριόχρωμα. Στο τέλος της αντίδρασης, μετράται το φθορίζον σήμα και για τις δύο χρωστικές. Η αναλογία των σημάτων είναι η ένδειξη για το γονότυπο του κάθε δείγματος.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μέθοδος TaqMan χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του πολυμορφισμού με rs1360780 που βρίσκεται στο γονίδιο *FKBP5*. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το TaqMan Genotyping MasterMix (Applied Biosystems, cat No. 4371353) και το TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, cat No. 4351379). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με 10ng DNA ως υπόστρωμα και ο τελικός όγκος ήταν 10μl. Σε όλα τα δείγματα έγιναν δύο τεχνικές επαναλήψεις (duplicates). Η ανάλυση έγινε σε μηχανήμα Real-Time PCR Biorad CFX96 Step One.

#### **3.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού των νουκλεϊκών οξέων (και πρωτεϊνών) ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος και το φορτίο τους. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μετακίνηση του ηλεκτρικά φορτισμένου DNA στο ημι-στερεό πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 1,5% - 2,5% (w/v) με προσθήκη 0,5 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και καθιστά δυνατή την παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Ως φορέας ηλεκτρονίων για τη δημιουργία της τάσης και ως διαλύτης για την αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X [89mM Tris, 89mM βορικό οξύ, 2mM EDTA]. Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε τάση 50-80 Volt για 30-60 min.

### **3.4.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για περιπτώσεις που υπάρχει ανάγκη για μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, σε σχέση με αυτή της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης. Η ακρυλαμίδα είναι μια μονομερής χημική ένωση που χρησιμοποιείται για την παρασκευή πηκτωμάτων για την ηλεκτροφόρηση μικρών μορίων DNA ή πρωτεϊνών. Η διακριτική ικανότητα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του πηκτώματος και από την αναλογία ακρυλαμίδης προς δις-ακρυλαμίδα. Για τον σχηματισμό του πηκτώματος χρησιμοποιούνται η ακρυλαμίδα και η N,N-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδα. Η ακρυλαμίδα όταν πολυμερίζεται σχηματίζει μακριές αλυσίδες, ενώ η δις-ακρυλαμίδα συνδέει τις μακριές αυτές αλυσίδες για να σχηματιστεί το πήκτωμα. Η μη πολυμερισμένη μορφή ακρυλαμίδης είναι νευροτοξική και πρέπει να αποφεύγεται η εισπνοή της ή η δερματική επαφή.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8% (w/v). Για την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης πρέπει να πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα, γι' αυτό το λόγο χρειάζεται η προσθήκη υπερθειϊκού αμμωνίου (Ammonium persulfate, APS,  $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ ) που είναι πηγή των ελεύθερων ριζών και η τετρα-μεθυλαιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) που καταλύει την παραγωγή ελεύθερων ριζών από το APS και επιταχύνει τον πολυμερισμό. Ως φορέας ηλεκτρονίων για τη δημιουργία της τάσης και ως διαλύτης για την ακρυλαμίδα χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X [89mM Tris, 89mM βορικό οξύ, 2mM EDTA]. Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε τάση 160 Volt για ~4h. Τέλος, τα gel ακρυλαμίδης επωάζονται για ~15min σε  $\text{AgNO}_3$  οποίος βάφει το DNA και στη συνέχεια σε εμφανιστικό διάλυμα [1 κόκκος εμφανιστικού, 4g  $\text{NO}_2$ , 2ml φορμαλδεΰδη] για να εμφανιστούν οι ζώνες στο gel, οι οποίες είναι ορατές με γυμνό οφθαλμό.



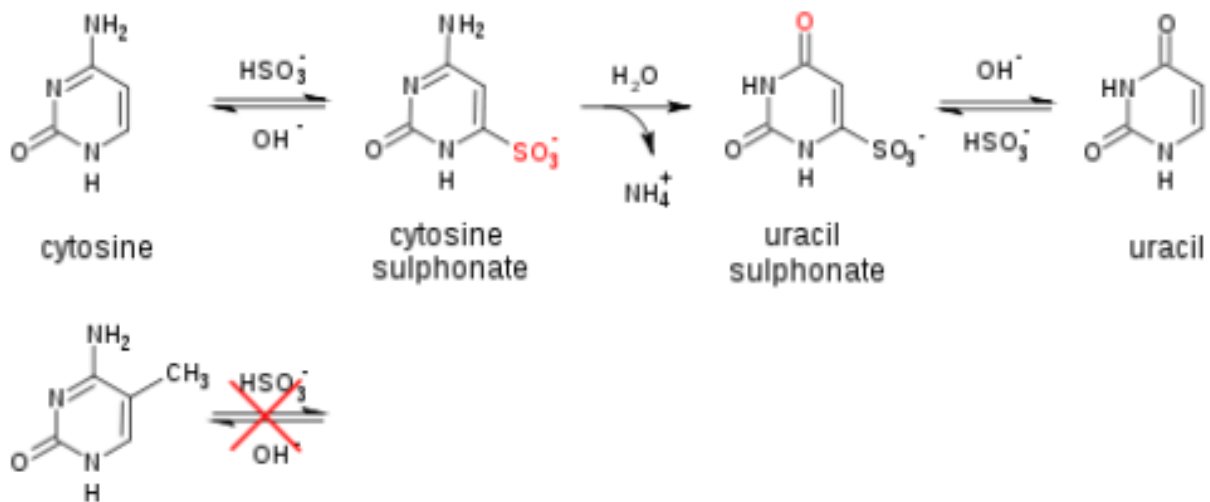
## 3.5 Ανάλυση Μεθυλίωσης του DNA

### 3.5.1 Χημική τροποποίηση του γενωμικού DNA με $\text{NaHSO}_3$

Η δυνατότητα χημικής τροποποίησης των αζωτούχων βάσεων του DNA με  $\text{NaHSO}_3$  είναι γνωστή από τη δεκαετία του '70 (245, 246), όμως εφαρμόστηκε ευρέως από τις αρχές της δεκαετίας του '90 και αποτέλεσε μια καινοτόμα τεχνική για τη μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CpG islands) του γονιδιώματος (247). Οι μέχρι τότε χρησιμοποιούμενες τεχνικές ήταν λίγες και οι περισσότερες από αυτές απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες DNA (~10μg).

Με την τεχνική αυτή επιδρούμε με  $\text{NaHSO}_3$  στις κυτοσίνες των μορίων DNA που έχουν προηγουμένως υποστεί αποδιάταξη. Ακολουθούν διαδοχικές αντιδράσεις σουλφονυλίωσης, απαμίνωσης και αποσουλφονυλίωσης που οδηγούν στη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, ενώ οι 5-μεθυλοκυτοσίνες (5-mC) παραμένουν ως έχουν (Εικόνα 3.5.1). Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιείται προσθήκη  $\text{HSO}^{-3}$  στον 5,6-διπλό δεσμό του δακτυλίου κυτοσίνης (σουλφονυλίωση), ακολουθεί απελευθέρωση  $\text{NH}_4$  με υδρόλυση (υδρολυτική απαμίνωση) και, τέλος, απελευθέρωση  $\text{HSO}^{-3}$  (αλκαλική αποσουλφονυλίωση). Αποτέλεσμα αυτής της σειράς αντιδράσεων είναι η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη. Στις 5-mC, η μεθυλομάδα δυσχεραίνει την προσθήκη του  $\text{HSO}^{-3}$  στον διπλό δεσμό, αφενός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης και, αφετέρου, μέσω επαγωγικού φαινομένου. Επιπλέον, η υδρολυτική απαμίνωση πραγματοποιείται πιο αργά (η αντίδραση αυτή έχει υποδιπλάσια απόδοση). Επομένως, μετά από την επίδραση με  $\text{NaHSO}_3$  οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες δεν υφίστανται τροποποίηση.

Η χημική τροποποίηση του DNA που πρόκειται να αναλυθεί με τη μέθοδο ανάλυσης μεθυλίωσης pyrosequencing γίνεται με το πακέτο EpiTect Bisulfite (Qiagen cat. No. 59104). Για την επιτυχή εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου απαιτούνται μόλις 2μg γενωμικού DNA το οποίο επωάζεται σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος δισουλφιδίου με υψηλή θερμοκρασία και υψηλό pH. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που προτείνουν από την εταιρία, τα βήματα πραγματοποιήθηκαν ακριβώς όπως αναγράφεται στο χαρτί οδηγιών.



Εικόνα 3.5.1: Χημική τροποποίηση των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών με το άλας δισουλφιδίου.

### 3.5.2 Pyrosequencing: ειδική μέθοδος ανάλυσης της μεθυλίωσης

Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών για τη λεπτομερή αναγνώριση των σημειακών αλλαγών που πραγματοποιείται με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τα πακέτα της Qiagen (PyroMark Q24 MDx cat. No. 9001513 και PyroMark PCR cat. No. 978703). Η τεχνική αυτή απαιτεί την πραγματοποίηση διπλών αντιδράσεων ανά δείγμα για την εξασφάλιση την επαναληψιμότητας και επιτυχίας των αντιδράσεων. Αρχικά, πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιείται ένας βιοτινυλιωμένος εκκινητής στο 5' άκρο ώστε να γίνει σήμανση βιοτίνης στη μία εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Έπειτα, οι βιοτινυλιωμένες μονόκλωνες αλυσίδες του DNA κατακρατούνται και διαχωρίζονται για να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για τις αντιδράσεις pyrosequencing με ειδικούς εκκινητές ανίχνευσης της μεθυλίωσης (που σχεδιάζονται κατάλληλα για κάθε περιοχή που μας ενδιαφέρει με ειδικό λογισμικό της εταιρίας Qiagen-PyroMark Assay Design Software). Η ανάλυση γίνεται ακολουθώντας τα βήματα του πρωτοκόλλου που προτείνει η εταιρία με ταυτόχρονη χρήση θετικών δειγμάτων ελέγχου (μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα, χημικά τροποποιημένα και φυσιολογικά μη μεθυλιωμένα ανθρώπινα δείγματα DNA) που προτείνονται από την εταιρία για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (EpiTect Control DNAs-Qiagen cat. No. 59695). Τα αποτελέσματα παρατίθενται αριθμητικά για τις σημειακές μετρήσεις που γίνονται και αξιολογούνται συνήθως με διάγραμμα μέσων όρων. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι περιοχές ανάλυσης και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3.5.1).

Πίνακας 3.5.1: Περιοχή ανάλυσης και εκκινητές για την ανάλυση της μεθυλίωσης του γονιδίου *FKBP5*.

Γονίδιο	Περιοχή	Αλληλουχίες Εκκινητών	Πληροφορίες
FKBP5 CpG 165	chr6:35,573,585- 35,728,583	5'GGAGGGGTAGTGTTTTTAGAGA 3'	F
		5'CCCTTACCCCTACTCCCCTAACCCCTCAA 3'	R: 5' βιοτινυλιωμένος
		5'GGGGAGGGGTTTTATTTG 3'	Pyro
HLA-G CpG 96	chr6: 29,826,967- 29,831,125	5' GGGAGGTAGGGAGTTTAGTTTA 3'	F
		5' CCATAACCACCATCCTTAAC 3'	R:5' βιοτινυλιωμένος
		5' GGTTAGGGAGAAGTTTTA 3'	Pyro

### 3.6 Μεταβολομική

Η μεταβολομική (metabolomics) είναι μία από τις νέες τεχνολογίες, γνωστές ως «-omics», όπως είναι και η γονιδιωματική (genomics), η μεταγραφωμική (transcriptomics) και η πρωτεωμική (proteomics). Η μεταβολομική είναι μία υψηλής απόδοσης τεχνική ανάλυσης, η οποία έχει αναπτυχθεί προκειμένου να ανιχνεύει ή/και να ποσοτικοποιεί τα επίπεδα των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα (248-250). Μεταβολίτες ονομάζουμε τα τελικά και τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού (251).

Η ανάλυση αυτή είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί καθώς οι διακυμάνσεις των μεταβολιτών μπορούν να ανιχνευθούν στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να αναλυθεί ένα μεγάλο εύρος μεταβολιτών του οργανισμού προκειμένου να εξαχθούν βιοχημικά αποτελέσματα τα οποία συνδέονται με τις λειτουργίες του οργανισμού. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα να υπολογιστεί η ποικιλία και τα επίπεδα των μεταβολιτών που μπορεί να δρουν επιβαρυντικά στη λειτουργία του οργανισμού (250). Επιπλέον, η ανάλυση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποσαφηνιστεί η εξατομικευμένη απόκριση σε φάρμακα συλλογίζοντας τους γενετικούς παράγοντες και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις (252).

Όταν ένα συγκεκριμένο παθοφυσιολογικό ερέθισμα επηρεάζει τα επίπεδα ενός μεταβολίτη, είτε αυτός αυξάνεται είτε μειώνεται, τότε μπορούμε να συνδέσουμε το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει με μια κατάσταση, καθώς επίσης και να εντοπίσουμε τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό (250).

Οι μεταβολομικές αναλύσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στις στοχευμένες (targeted) και στις μη στοχευμένες (untargeted) (253). Η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση περιλαμβάνει τη συνολική ανάλυση όλων των μετρήσιμων μεταβολιτών σε ένα δείγμα, ακόμα και των άγνωστων. Πρόκειται δηλαδή για μια προσπάθεια προσδιορισμού όσο περισσότερων μεταβολιτών υπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα (ποιοτικός προσδιορισμός). Από την άλλη μεριά, στη στοχευμένη ανάλυση στόχος είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των μεταβολιτών που έχουν ανιχνευθεί (254).

Τόσο στη στοχευμένη όσο και στη μη στοχευμένη ανάλυση αρχικά θα πρέπει να τεθεί το βιολογικό ερώτημα στο οποίο θέλουμε να απαντήσουμε, και στη συνέχεια να σχεδιαστεί το κατάλληλο πείραμα (βιολογικό δείγμα, συνθήκες, πλατφόρμα ανάλυσης). Έπειτα, θα πρέπει να γίνει η συλλογή των δειγμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε οι ομάδες να είναι αντιπροσωπευτικές και τα δείγματα καλά χαρακτηρισμένα (255, 256). Το επόμενο βήμα

είναι η ανάλυση από την οποία θα προκύψουν οι μετρήσεις για τα επίπεδα των μεταβολιτών. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να επεξεργαστούν για να καταλήξουμε στην εξαγωγή των βιολογικών πληροφοριών και στην ερμηνεία αυτών (256, 257). Συνήθως για να γίνει αυτό χρειάζονται κατάλληλα βιοπληροφορικά προγράμματα (π.χ. MetaboAnalyst) για να γίνει εφικτή η διαχείριση του μεγάλου όγκου δεδομένων (258). Ανάλογα με τα συμπεράσματα που θα προκύψουν θα πρέπει να οργανωθούν τα περαιτέρω πειράματα βασισμένα σε κάποιους μεταβολίτες οι οποίοι αποδείχθηκαν πιο πληροφοριακοί σε σχέση με το βιολογικό ερώτημα που θέσαμε στην αρχή.

### **3.6.1 Μεταβολομική ανάλυση**

Η μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από τον ορό των δειγμάτων (100μl από κάθε δείγμα) στο Metabolomics Core, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School (John Asara) σε συνεργασία με το Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany (Chris W. Turck και Φίλιου Μιχαέλα) με SRM (selected reaction monitoring) πλατφόρμα χρησιμοποιώντας τετραπολικό αναλυτή μάζας (5500 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer) συζευγμένο με σύστημα LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry) (241). Η συγκεκριμένη πλατφόρμα έχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιεί τα επίπεδα έως και 300 μεταβολιτών που εμπλέκονται σε κύριες μεταβολικές οδούς (259).

Η SRM πλατφόρμα είναι μια πλατφόρμα στοχευμένης ανάλυσης που ποσοτικοποιεί διάφορους μεταβολίτες σε μία μόνο πορεία με τη χρήση της τεχνικής αραίωσης ισωτόπων, όπου ένα σταθερό ισότοπο χρησιμοποιείται ως εσωτερικό control στην MS ανάλυση. Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της συσχέτισης της αναλογίας των σημάτων που ανιχνεύονται με την SRM πλατφόρμα και απεικονίζονται σε καμπύλες.

Τα σημαντικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πλατφόρμας που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυσή μας είναι ότι (i) πρόκειται για μια υγρή χρωματογραφία (LC), (ii) ο χρόνος που χρειάστηκε για τη φασματομετρία μάζας (MS) ανά δείγμα είναι μικρός (~ 15 λεπτά) και (iii) στοχεύει πάνω από 250 μεταβολίτες (259).

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης επεξεργάστηκαν από το MetaboAnalyst (v4.0) (258). Οι μεταβολίτες μετρήθηκαν τόσο σε θετική όσο και σε αρνητική λειτουργία ιόντων, ωστόσο συμπεριλήφθηκε μόνο η μέτρηση με τις υψηλότερες εντάσεις μεταξύ των δειγμάτων. Συνολικά, εξετάστηκαν 285 μεταβολίτες. Από αυτούς τους μεταβολίτες,

εξαιρέθηκαν μεταβολίτες με ελλείπουσες τιμές σε ποσοστό άνω του 50%. Για τους υπόλοιπους μεταβολίτες με μικρότερο ποσοστό, οι ελλείπουσες τιμές αντικαταστάθηκαν από προεπιλεγμένες μικρές τιμές στο πρόγραμμα MetaboAnalyst. Τα δεδομένα των μεταβολιτών ήταν κανονικοποιημένα, και λογαριθμικά μετασχηματισμένα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το MetaboAnalyst χρησιμοποιώντας το πακέτο R. Το FDR (False Discovery Rate) χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση πολλαπλών συγκρίσεων και το cut-off για την τιμή p-value που ορίστηκε στο 0.1. Για να αξιολογηθούν τα διακριτικά χαρακτηριστικά μεταξύ της ομάδας των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και της ομάδας των μαρτύρων (controls) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) στο MetaboAnalyst. Η ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τη Μιχαέλα Φίλιου.

Στη συνέχεια, μετά τα πρώτα αποτελέσματα, ακολούθησε συσχέτιση της δισουλφιδικής γλουταθειόνης με το EPDS σκορ του πληθυσμού της μεταβολομικής ανάλυσης πραγματοποιώντας τεστ συσχέτισης Pearson (Pearson correlation), που πραγματοποιήθηκε από την κ. Ντανιέλα Θεοδωρίδου.

### **3.7 Ανάλυση Πρωτεϊνών**

Η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων. Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει μπορεί να ανιχνευτεί σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων ή ιστών, δίνοντας πληροφορίες για το μέγεθός της καθώς επίσης και για τα επίπεδα έκφρασής της. Ο βαθμός ειδικότητας και η ποιότητα των αντισωμάτων είναι καθοριστικές παράμετροι για την επιτυχία της μεθόδου. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων από την Δρ. Αγγελική-Μαρία Βλάικου. Τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν για την πραγματοποίηση της μεθόδου αναφέρονται παρακάτω.

#### **3.7.1 Λήψη πρωτεϊνικού δείγματος**

Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να αναλυθούν με Western blotting βρίσκονται στον ορό του αίματος, ο οποίος έχει αραιωθεί με lysis buffer RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο, 0.1% (w/v) SDS] παρουσία αναστολέων πρωτεασών (1 mM PMSF, 1 μg/ml πεψιστατίνης και 1 μg/ml λευπεπτίνης) σε αναλογία 1:2 (v/v). Ακολουθεί επώαση του εναιωρήματος σε πάγο για 15 λεπτά, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά με τη χρήση Vortex (30 sec στη μέγιστη περιδίνηση). Κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων και η εκχύλιση των περισσότερων διαλυτών πρωτεϊνών τους. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 12000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αφήνεται προς συντήρηση στους -80°C. Μέρος του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

#### **3.7.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού δείγματος**

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την τεχνική Bradford. Η τεχνική βασίζεται στη χρωστική ουσία Coomassie brilliant blue-G 250 που αυξάνει το μέγιστο απορρόφησης της από τα 460nm στα 595nm, αφού δεσμευτεί σε πρωτεΐνη. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Ετοιμάζονται

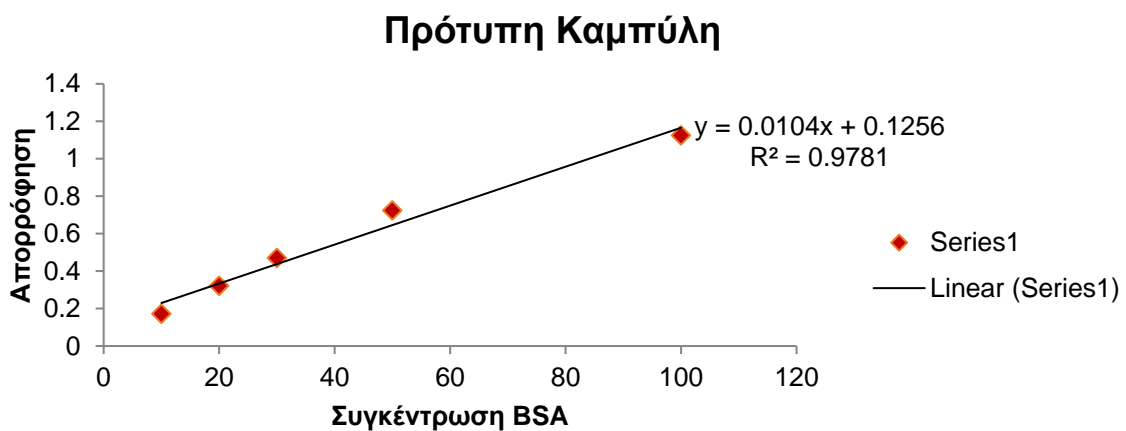
διαλύματα διαβαθμιζόμενων αραιώσεων από πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης  $\mu\text{g/ml}$  σε τελικό όγκο 1ml (Πίνακας 3.7.1). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικές κυψελίδες και φωτομετρούνται σε φασματοφωτόμετρο με μήκος κύματος 595nm.

Πίνακας 3.7.1: Καμπύλη Bradford: Όγκοι διαλυμάτων για τη φωτομέτρηση.

Διαλύματα	Όγκος (μl) BSA					Τυφλό
BSA stock solution (100mg/ml)	10	20	30	50	100	100 μl BSA
ddH <sub>2</sub> O	90	80	70	50	0	0
Bradford Solution	900	900	900	900	900	900

Με ανάλογο τρόπο προετοιμάζονται και φωτομετρούνται και τα δείγματα. Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκε 10μl RIPA, 90μl ddH<sub>2</sub>O και 900μl Bradford solution, ενώ για τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε 10μl δείγματος, 90μl ddH<sub>2</sub>O και 900μl Bradford solution.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος υπολογίζεται βάσει της οπτικής πυκνότητας (αφαιρώντας την οπτική πυκνότητα του μάρτυρα) κάθε δείγματος και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης αλβουμίνης βοός (Bovine Serum Albumin-BSA, New England Biolabs).





### **3.7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειϊκής πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες μέσω ηλεκτροφόρησης μιας διάστασης σε πηκτή δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με το μέγεθός τους. Πρωτεΐνες μεγάλων μοριακών βαρών διαχωρίζονται σε πηκτές χαμηλής συγκεντρώσεως ακρυλαμίδιου, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, για τις οποίες χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμίδης που διακρίνονται σε δύο μέρη: 1) την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης 5% [5% μείγμα ακρυλαμίδης, 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] και μεγάλο μέγεθος πόρων και 2) την πηκτή διαχωρισμού (separating gel), με τελική συγκέντρωση ακρυλαμίδης 15% [15% μείγμα ακρυλαμίδης, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.04% (v/v) TEMED ] και μικρό μέγεθος πόρων.

Τα μείγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (Sigma). Ο πολυμερισμός της πηκτής πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης] και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100 °C. Το διάλυμα φόρτωσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και εξουδετερώνει το ολικό φορτίο τους, ώστε να προκύψει ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μόνο βάσει του μεγέθους. Ακολούθως, τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή και η πραγματοποιείται κάθετη ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτροφορητική συσκευή υπό τάση 120 Volt για περίπου 3 ώρες σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25mM Tris-HCl, 192mM γλυκίνη, 0.1% (v/v) SDS].

### **3.7.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η διαδικασία ημί-υγρής μεταφοράς (semi-dry transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς [25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη]. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και τα κομμάτια απορροφητικού χαρτιού χρωματογραφίας (3 MM Chr, Whatman), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής. Ακολούθως, τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς

κομμάτια τοποθετούνται στην συσκευή μεταφοράς (κασέτα) με την εξής σειρά: (θετικός πόλος) - 4 χαρτιά Whatman - 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης - 1 πηκτή - 4 χαρτιά Whatman - (αρνητικός πόλος). Τα κομμάτια τοποθετούνται προσεκτικά απομακρύνοντας τις τυχόν φυσαλίδες, που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ τους και στη συνέχεια η συσκευή πληρώνεται με το διάλυμα μεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται 45 min σε σταθερή τάση 25 Volt και ένταση 1.0 A στους 4°C. Οι μεμβράνες βάφονται με διάλυμα Ponceau για να γίνει έλεγχος ισοφόρτωσης και μεταφοράς. Αντίστοιχα, τα gel βάφονται με διάλυμα Coomassie για τον ίδιο λόγο.

### **3.7.5 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking) – Επώσεις με αντισώματα**

Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα μη λιπαρού γάλακτος 5% (w/v) σε 1X TBS-Tween 0.1%, για τουλάχιστον 3 ώρες, με σκοπό να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης της μεμβράνης. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με ειδικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, αραιωμένο σε διάλυμα TBS-T, παρουσία 5% (w/v) μη λιπαρού γάλακτος, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Η χρησιμοποιούμενη αραιώση του αντισώματος στο διάλυμα και το χρονικό διάστημα της επώασης εξαρτώνται από την ικανότητα πρόσδεσης του στην προς εξέταση πρωτεΐνη, την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κύτταρο καθώς επίσης και από την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο εκχύλισμα και υπολογίζεται εμπειρικά. Με το πέρας της επώασης ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS-T, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μια, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπεται επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-mouse), για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Το δευτεροταγές αντίσωμα αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος και προσδένεται σε αυτό. Επιπλέον φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραφάνου (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιούνται 2 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T όπως προηγουμένως.

### **3.7.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)**

Το τελευταίο βήμα είναι η ανίχνευση των προς εξέταση πρωτεϊνών με βάση το λογισμικό ChemiDoc XRS, Biorad. Αρχικά η μεμβράνη αφήνεται να αντιδράσει για 5-6 λεπτά με τα ειδικά αντιδραστήρια (ECL Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore

WBKLS0050) της τεχνικής ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Ακολούθως η μεμβράνη τοποθετείται σε πλάκα εμφάνισης, και έπειτα από την πραγματοποίηση κατάλληλων ρυθμίσεων εκτίθεται σε φως για την ανίχνευση του σήματος χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος έκθεσης είναι ανάλογος με την ποσότητα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη.

### **3.7.7 Αντισώματα**

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το πρωτογενές Prdx3 (Abcam ab16751, mouse monoclonal) και το δευτερογενές anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Τα αντισώματα αραιώθηκαν 1:2000 και 1:5000 αντίστοιχα, σε 5% milk/TBS-Tween 0.1%.

### 3.8 Μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity - TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity - TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και είναι δείκτης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. Όλα τα συστατικά έχουν αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (260).

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι που μπορεί κανείς να υπολογίσει την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός οργανισμού. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά και είναι ο πιο δύσκολος τρόπος και τα αποτελέσματα δεν είναι ακριβή επειδή τα μόρια πολλά που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος είναι πολλά. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο, δηλαδή ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των συστατικών συνολικά (261).

Η μέθοδος αυτή λειτουργεί ως εξής: Αφού προκληθεί λύση των κυττάρων, γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, οι πρωτεϊνικές θειόλες και άλλες κύριες αντιοξειδωτικές ουσίες στο δείγμα αντιδρούν με ένα ειδικό χρωμογόνο οξειδοαναγωγής (2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη) και προκαλούν αλλαγή στο χρώμα του αντιδραστήριου, το οποίο προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 630 nm. Με αυτόν τον τρόπο, ανάλογα με τη μείωση του χρωμογόνου, ποσοτικοποιείται η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Η TAC στα δείγματα ορού μετρήθηκε σε UT2100C microplate reader (MRC, Holon, Israel) με ανάμιξη του δείγματος και του αντιδραστήριου σε αναλογία 1:5 (v/v). Το αντιδραστήριο παρασκευάστηκε διαλύοντας 0,08 mmol 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλης, 177 ml αιθανόλης, 75 mmol φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 8.8, 3 ml THESIT και 5 mmol Na<sub>2</sub> EDTA σε 500 ml ddH<sub>2</sub>O. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση, προστέθηκε νερό σε τελικό όγκο 1000 ml. Η γλουταθειόνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Το ακόλουθο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως βαθμονομητής για τον προσδιορισμό: 2 mM γλουταθειόνη, 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6.5, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA παρουσία ενός σταθεροποιητή βιοκτόνου (241).

Οι μετρήσεις απορρόφησης σε μήκος κύματος 630 nm έγιναν σε t<sub>0</sub>, t<sub>1</sub> (20sec) και t<sub>2</sub> (120sec) από την ανάμιξη του δείγματος με το αντιδραστήριο.

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται σε mmol / l ανηγμένης γλουταθειόνης:

$GSH [mmol/L] = (ABS_{t2} - ABS_{t1})_{\text{δείγματος}} / (ABS_{t2} - ABS_{t1})_{\text{μάρτυρα}} * \text{Συγκέντρωση μάρτυρα}$   
[mmol/L] (262).

Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων από τη Δρ. Χρυσούλα Κομίνη.

### 3.9 Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση των γενετικών και επιγενετικών παραγόντων που μελετήθηκαν έγινε με τη χρήση του UCSC Table Browser, μια βάση δεδομένων που περιέχει βιολογικά δεδομένα σχετικά με τις γενωμικές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων από το ENCODE project (263), τις γενωμικές θέσεις των γονιδίων και τα SNPs, σύμφωνα με τη dbSNP151. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμφανίζονται με τη βοήθεια του UCSC Genome Browser (264).

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού

#### *4.1.1 Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού των νεογνών που συμμετείχε στην έρευνα*

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατηγοριοποιημένα σε δύο ομάδες, στα νεογνά που γεννήθηκαν πρόωρα και με μικρό βάρος γέννησης και σε τελειόμηνα νεογνά με κανονικό βάρος γέννησης (ομάδα μαρτύρων-controls). Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 51 πρόωρα νεογνά και 32 τελειόμηνα νεογνά ως ομάδα μαρτύρων (Πίνακας 4.1.1). Οι κατηγορίες παρουσιάζονται ως N (%) ενώ οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$ SD. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα χαρακτηριστικά μεταξύ πρόωρων νεογνών και control νεογνών χρησιμοποιώντας τα στατιστικά τεστ Fisher's ( $\chi^2$ ) test και Student's t-test. Η μέση (SD) ηλικία κύησης των νεογνών ήταν 38 ( $\pm$ 2.9) εβδομάδες χρόνια και το μέσο (SD) βάρος τους ήταν 2200 ( $\pm$ 787) γραμμάρια (Πίνακας 4.1.1).

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των πολυμορφισμών επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με Fisher's ( $\chi^2$ ) test. Ακολούθως, μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων ανάλυσης των προτύπων μεθυσίωσης έγιναν Student's t-test ή Mann-Whitney test (στις περιπτώσεις όπου δεν πέρασε το τεστ κανονικότητας ο πληθυσμός).

Πίνακας 4.1.1: Χαρακτηριστικά του πληθυσμού έρευνας των νεογνών (IVF: in vitro fertilization, AGA: appropriate for gestational age. SGA: small for gestational age)

	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρωρότητα			p- value*
	Συνολικά N=83	Ναι N=51	Όχι N=32	
	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	
Ηλικία κύησης (σε εβδομάδες)	38 ± 2.9	34 ± 1.9	38 ± 0.8	<0.0001
Βάρος Γέννησης (g)	2200 ± 787	1880 ± 436	3255 ± 352	<0.0001
Φύλο				
Άρρεν	36 (43.0)	25 (49.0)	11 (34.0)	
Θήλυ	47 (57.0)	26 (51.0)	21 (66.0)	
				0.256
Τρόπος Σύλληψης				
Φυσιολογικός	72 (87.0)	40 (78.0)	32 (100.0)	
IVF	11 (13.7.7.0)	11 (22.0)	0 (0.0)	
				<0.0001
Τρόπος Τοκετού				
Φυσιολογικός	20 (24.0)	7 (14.0)	13 (41.0)	
Καισαρική	63 (76.0)	44 (86.0)	19 (59.0)	
				0.008
Προγραμματισμένη	33 (52.0)	19 (43.0)	14 (74.0)	
Έκτακτη	30 (48.0)	25 (57.0)	5 (26.0)	
				0.031
Ενδομήτρια Ανάπτυξη				
AGA	67 (81.0)	35 (69.0)	32 (100.0)	
SGA	16 (19.0)	16 (31.0)	0 (0.0)	
				<0.0001
Εμφάνιση Λοίμωξης				
Ναι	7 (8.0)	7 (14.0)	0 (0.0)	
Όχι	76 (92.0)	44 (86.0)	32 (100.0)	
				0.039

\* $\chi^2$  test (Fisher's test) για τις κατηγορίες των μεταβλητών και t-test για τις συνεχείς μεταβλητές



#### **4.1.2 Δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού που συμμετείχε στη μεταβολομική ανάλυση για την επιλόχειο κατάθλιψη και του συμπληρωματικού πληθυσμού επιβεβαίωσης**

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατηγοριοποιημένα σε δύο ομάδες, σε γυναίκες που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη (PPD) και σε γυναίκες που δεν εμφάνισαν (ομάδα μαρτύρων - controls). Ταυτόχρονα, υπάρχουν δύο πληθυσμοί που πραγματοποιήθηκαν πειράματα, ο πληθυσμός της μεταβολομικής ανάλυσης και ο συμπληρωματικός πληθυσμός επιβεβαίωσης της μελέτης. Αρχικά, για τη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε 10 δείγματα γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και 10 δείγματα χωρίς επιλόχειο κατάθλιψη ως ομάδα μαρτύρων (Πίνακας 4.1.2), ωστόσο μετά τα πρώτα πειράματα συνεχίσαμε με τον συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης της μελέτης που αποτελούνταν από 8 γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη και 7 στην ομάδα των μαρτύρων (για το Western Blotting και τη δοκιμασία TAC) (Πίνακας 4.1.3). Οι κατηγορίες (PPD, controls) παρουσιάζονται ως N (%) ενώ οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$ SD. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα χαρακτηριστικά μεταξύ γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και γυναικών χωρίς (controls) και μεταξύ των ομάδων, μεταβολομικής ανάλυσης και επιβεβαίωσης, χρησιμοποιώντας τα στατιστικά τεστ Fisher's ( $\chi^2$ ) test και Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

Η μέση (Mean $\pm$ SD) ηλικία των συμμετεχουσών γυναικών ήταν 29,1 ( $\pm$ 3,8) χρόνια και ο μέσος όρος (Mean $\pm$ SD) BMI (Δείκτης Μάζας Σώματος) ήταν 23,2 ( $\pm$ 3,5) kg/m<sup>2</sup> (Πίνακας 4.1.2). Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού επιβεβαίωσης ήταν παρόμοια (Πίνακας 4.1.3). Για να αποφευχθεί η δημογραφική διάθρωση των ομάδων μεταβολομικής ανάλυσης και επιβεβαίωσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων που δεν έδειξε διαφορές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά (όλες οι τιμές p-value ήταν  $p > 0,05$ ).

Τέλος, για τους μεταβολίτες που παρουσίασαν μεταβολές στα επίπεδά τους μεταξύ των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και αυτών χωρίς πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης από τους συνεργάτες του προγράμματος Rhea για περαιτέρω αξιολόγηση των παρατηρούμενων διαφορών λαμβάνοντας υπόψη και άλλους παράγοντες (ηλικία της γυναίκας, εάν εργαζόταν κατά την εγκυμοσύνη, το μορφωτικό της επίπεδο, το BMI πριν την εγκυμοσύνη και το ιστορικό υποθυρεοειδισμού και δυσλιπιδαιμίας).

Πίνακας 4.1.2: Χαρακτηριστικά του πληθυσμού έρευνας για τη μεταβολομική ανάλυση σύμφωνα με τα δεδομένα για την επιλογή κατάθλιψη της μελέτη «Rhea» της Κρήτης

	<i>Επιλόχειος Κατάθλιψη</i>			p-value*
	Συνολικά N=20	Όχι N=10	Ναι N=10	
	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	
Ηλικία μητέρας (σε χρόνια)	29.1 ± 3.8	30.7 ± 3.5	27.6 ± 3.7	0.067
BMI πριν την εγκυμοσύνη (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 3.5	22.8 ± 2.6	23.5 ± 4.3	0.695
BMI στη συνέντευξη (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 ± 3.4	22.7 ± 2.5	23.1 ± 4.3	0.798
<b>Οικογενειακή Κατάσταση</b>				0.474
Παντρεμένη	16 (80.0)	8 (80.0)	8 (80.0)	
Αρραβωνιασμένη	2 (10.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	
Άγαμη	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	
Μη διαθέσιμα	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	
<b>Εργαζόμενη κατά την εγκυμοσύνη</b>				0.179
Όχι	10 (50.0)	3 (30.0)	7 (70.0)	
Ναι	10 (50.0)	7 (70.0)	3 (30.0)	
<b>Βαθμίδα Εκπαίδευσης Μητέρας</b>				0.809
Χαμηλή	2 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	
Μεσαία	10 (50.0)	4 (40.0)	6 (60.0)	
Υψηλή	8 (40.0)	5 (50.0)	3 (30.0)	
<b>Βαθμίδα Εκπαίδευσης Πατέρα</b>				0.820
Χαμηλή	4 (20.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	
Μεσαία	11 (55.0)	5 (50.0)	6 (60.0)	
Υψηλή	4 (20.0)	3 (30.0)	1 (10.0)	
Μη διαθέσιμα	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	
<b>Προγραμματισμένη εγκυμοσύνη</b>				0.020
Ναι	12 (60.0)	9 (90.0)	3 (30.0)	
Όχι	8 (40.0)	1 (10.0)	7 (70.0)	
<b>Προγεννητικός έλεγχος</b>				0.474
Όχι	2 (10.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	
Ναι	18 (90.0)	10 (100.0)	8 (80.0)	
				1.000

Νοσηλεία κατά την εγκυμοσύνη				
Όχι	17 (85.0)	8 (80.0)	9 (90.0)	
Ναι	1 (5.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	
Μη διαθέσιμα	2 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	
				0.656
Προηγούμενη εγκυμοσύνη				
Όχι	10 (50.0)	4 (40.0)	6 (60.0)	
Ναι	10 (50.0)	6 (60.0)	4 (40.0)	
				1.000
Επιλόχειος Κατάθλιψη σε προηγούμενη εγκυμοσύνη				
Όχι	6 (30.0)	3 (30.0)	3 (30.0)	
Ναι	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	
Μη διαθέσιμα	3 (15.0)	3 (30.0)	0 (0.0)	
Δε γνωρίζω/Δεν απαντώ	10 (50.0)	4 (40.0)	6 (60.0)	
				0.474
Ιστορικό Δυσλιπιδαιμίας				
Όχι	18 (90.0)	10 (100.0)	8 (80.0)	
Ναι	2 (10.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	
				0.211
Ιστορικό Θυρεοειδοπάθειας				
Όχι	17 (85.0)	7 (70.0)	10 (100.0)	
Ναι	3 (15.0)	3 (30.0)	0 (0.0)	
				0.370
Παθητικό κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης				
Όχι	11 (55.0)	7 (70.0)	4 (40.0)	
Ναι	9 (45.0)	3 (30.0)	6 (60.0)	

\* $\chi^2$  test (Fisher's test) για τις κατηγορίες των μεταβλητών και Student t-test για τις συνεχείς μεταβλητές

Πίνακας 4.1.3: Χαρακτηριστικά του συμπληρωματικού πληθυσμού έρευνας σύμφωνα με τα δεδομένα για την επιλογή κατάθλιψη της μελέτη «Rhea» της Κρήτης

	<i>Επιλόχειος Κατάθλιψη</i>			p-value*
	Συνολικά N=15	Όχι N=7	Ναι N=8	
	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	N (%) ή Mean ± SD	
Ηλικία μητέρας (σε χρόνια)	26.6 ±4.5	24.9 ±4.8	28.1 ±4.0	0.172
BMI πριν την εγκυμοσύνη (kg/m <sup>2</sup> )	24.1 ±3.9	22.7 ±4.1	25.4 ±3.5	0.204
BMI στη συνέντευξη (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 ±3.7	23.9 ±4.1	25.6 ±3.5	0.379
				1.000
<b>Οικογενειακή Κατάσταση</b>				
Παντρεμένη	12 (80.0)	6 (85.7)	6 (75.0)	
Αρραβωνιασμένη	3 (20.0)	1 (14.3)	2 (25.0)	
				0.608
<b>Εργαζόμενη κατά την εγκυμοσύνη</b>				
Όχι	9 (60.0)	5 (71.4)	4 (50.0)	
Ναι	6 (40.0)	2 (28.6)	4 (50.0)	
				0.491
<b>Βαθμίδα Εκπαίδευσης Μητέρας</b>				
Χαμηλή	4 (26.7)	3 (42.9)	1 (12.5)	
Μεσαία	9 (60.0)	3 (42.9)	6 (75.0)	
Υψηλή	2 (13.3)	1 (14.3)	1 (12.5)	
				0.510
<b>Βαθμίδα Εκπαίδευσης Πατέρα</b>				
Χαμηλή	6 (40.0)	4 (57.1)	2 (25.0)	
Μεσαία	7 (46.7)	2 (28.6)	5 (62.5)	
Υψηλή	2 (13.3)	1 (14.3)	1 (12.5)	
				0.103
<b>Προγραμματισμένη εγκυμοσύνη</b>				
Ναι	7 (46.7)	5 (71.4)	2 (25.0)	
Όχι	7 (46.7)	1 (14.3)	6 (75.0)	
Μη διαθέσιμα	1 (6.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	
				1.000
<b>Προγεννητικός έλεγχος</b>				
Όχι	5 (33.3)	2 (28.6)	3 (37.5)	
Ναι	9 (60.0)	4 (57.1)	5 (62.5)	
Μη διαθέσιμα	1 (6.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	
				1.000

Νοσηλεία κατά την εγκυμοσύνη				
Όχι	12 (80.0)	6 (85.7)	6 (75.0)	
Ναι	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (12.5)	
Μη διαθέσιμα	2 (13.3)	1 (14.3)	1 (12.5)	0.619
Προηγούμενη εγκυμοσύνη				
Όχι	8 (53.3)	3 (42.9)	5 (62.5)	
Ναι	7 (46.7)	4 (57.1)	3 (37.5)	0.619
Επιλόχειος Κατάθλιψη σε προηγούμενη εγκυμοσύνη				
Όχι	7 (46.7)	4 (57.1)	3 (37.5)	
Δε γνωρίζω/Δεν απαντώ	8 (53.3)	3 (42.9)	5 (62.5)	0.467
Ιστορικό Δυσλιπιδαιμίας				
Όχι	14 (93.3)	6 (85.7)	8 (100.0)	
Ναι	1 (6.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	0.200
Ιστορικό Θυρεοειδοπάθειας				
Όχι	12 (80.0)	7 (100.0)	5 (62.5)	
Ναι	3 (20.0)	0 (0.0)	3 (37.5)	0.315
Παθητικό κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης				
Όχι	8 (53.3)	5 (71.4)	3 (37.5)	
Ναι	7 (46.7)	2 (28.6)	5 (62.5)	

\* $\chi^2$  test (Fisher's test) για τις κατηγορίες των μεταβλητών και Student t-test για τις συνεχείς μεταβλητές

## 4.2 Μοριακά αποτελέσματα ανάλυσης των πολυμορφισμών

### 4.2.1 Το γονίδιο *MBL2*

Για τη διερεύνηση των πολυμορφισμών του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) πρέπει να γίνει η απομόνωση και η ενίσχυση του γονιδίου *MBL2*, και πιο συγκεκριμένα το εξώνιο 1 του γονιδίου αυτού, με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Η PCR για την ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα (πρώωρα και τελειόμηνα νεογνά). Ενδεικτικά παρουσιάζεται μία αντιπροσωπευτική εικόνα του αποτελέσματος της συγκεκριμένης αντίδρασης (Εικόνα 4.2.1). Το μοριακό βάρος του προϊόντος της αντίδρασης είναι 289bp.

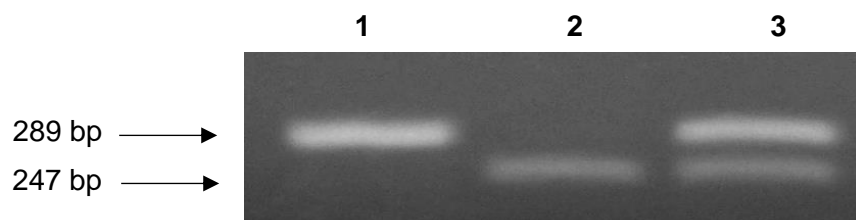


Εικόνα 4.2.1: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο *MBL2*, το γονιδιακό προϊόν έχει μέγεθος 289bp. Η ανίχνευση του γονιδιακού προϊόντος έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ο δείκτης μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε είναι 100bp.

Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκε για πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη ή μη των πολυμορφισμών ενδιαφέροντος.

Αρχικά, έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BanI* (*Bacillus aneurinolyticus*) για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs1800450 που χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή του φυσιολογικού κωδικονίου **GGC** σε **GAC** (Gly→Asp) (Εικόνα 4.2.2). Με **A** χαρακτηρίζεται το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wild type) και με **B** το αλληλόμορφο που φέρει τη μεταλλαγή. Με την πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο τα μοριακά βάρη που μπορεί να πάρουμε είναι τα εξής: για το φυσιολογικό αλληλόμορφο **A** είναι 242bp και 47bp, ενώ για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο **B** είναι 289b στο οποίο δεν υπάρχει η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα

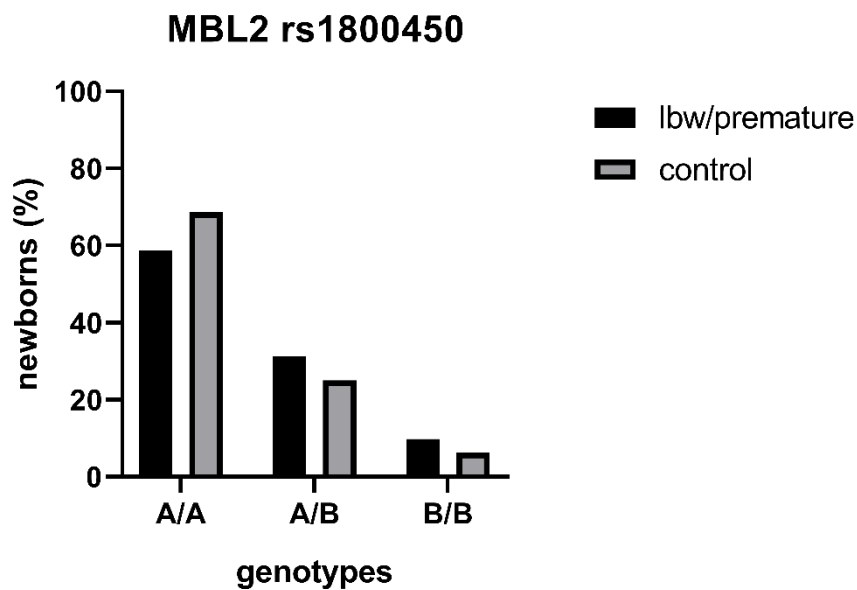
GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, United States). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε Fisher's ( $\chi^2$ ) test για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 4.2.1) μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, αυτή των πρόωρων και μικρού βάρους γέννησης νεογνών και της ομάδας των τελειόμηνων νεογνών (Εικόνα 4.2.3).



Εικόνα 4.2.2: Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BanI* για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs1800450. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. [1]: Ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο B (B/B), [2]: Ομόζυγο για το αλληλόμορφο A (A/A), [3]: Ετερόζυγο άτομο (A/B). Στο πήκτωμα η ζώνη των 47bp δεν απεικονίζεται, είναι μικρού μοριακού βάρους και δεν απεικονίστηκε.

Πίνακας 4.2.1: Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό με rs1800450 συνολικά και για τις δύο ομάδες μελέτης

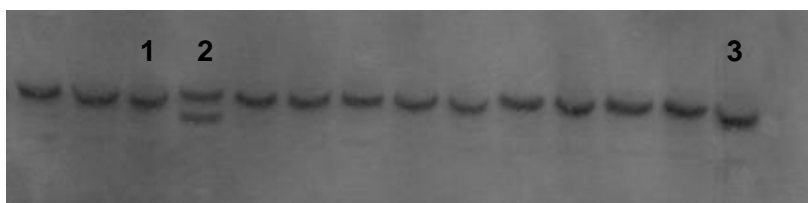
<b>MBL2 rs1800450</b>		
	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρόωρα N=51	Τελειόμηνα (controls) N=32
<b>A/A</b>	30 (58.8%)	22 (68.7%)
<b>A/B</b>	16 (31.3%)	8 (25%)
<b>B/B</b>	5 (9.8%)	2 (6.3%)



Εικόνα 4.2.3: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό με rs1800450 μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value=0.6441). Ο γονότυπος A/A αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ο γονότυπος B/B αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για τη μεταλλαγή, και τέλος ο γονότυπος A/B αναφέρεται σε ετερόζυγο άτομο.

Στη συνέχεια, έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση MbolI (*Moraxella bovis*) για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs1800451 που χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή του φυσιολογικού κωδικονίου GGA σε GAA (Gly→Glu) (Εικόνα 4.2.4). Με A χαρακτηρίζεται το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wild type) και με C το αλληλόμορφο που φέρει τη μεταλλαγή. Με την πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο τα μοριακά βάρη που μπορεί να πάρουμε είναι τα εξής: για το φυσιολογικό αλληλόμορφο A είναι 289bp στο οποίο δεν υπάρχει η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση, ενώ στο αλληλόμορφο C είναι 263bp και 26bp. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και για αυτόν τον πολυμορφισμό ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 4.2.2) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, United States). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε Fisher's ( $\chi^2$ ) test για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης και για τους τρεις πιθανούς γονότυπους (A/A, A/C, C/C) (Εικόνα 4.2.5). Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστική σημαντικότητα με p-value 0.004. Επίσης, στατιστική σημαντικότητα (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value 0.0012) έδειξε η ύπαρξη του μεταλλαγμένου C αλληλομόρφου (γονότυποι A/C και C/C) σε σύγκριση με τον γονότυπο αγρίου τύπου (A/A).

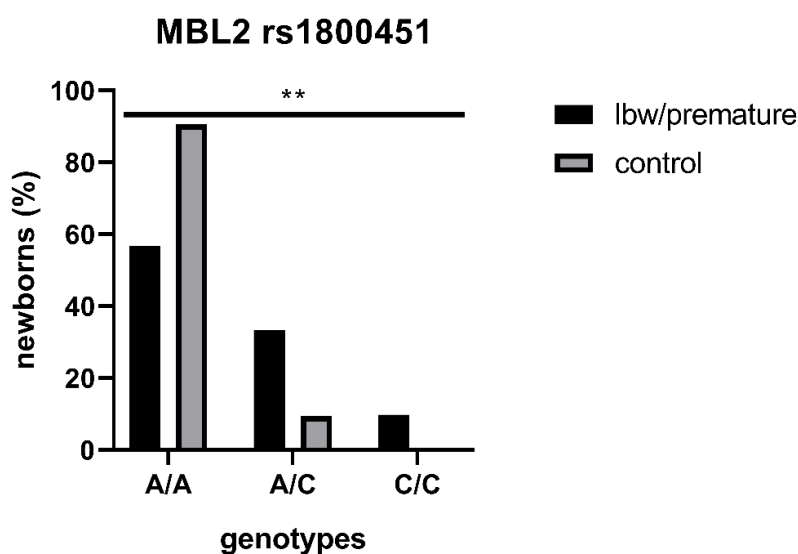




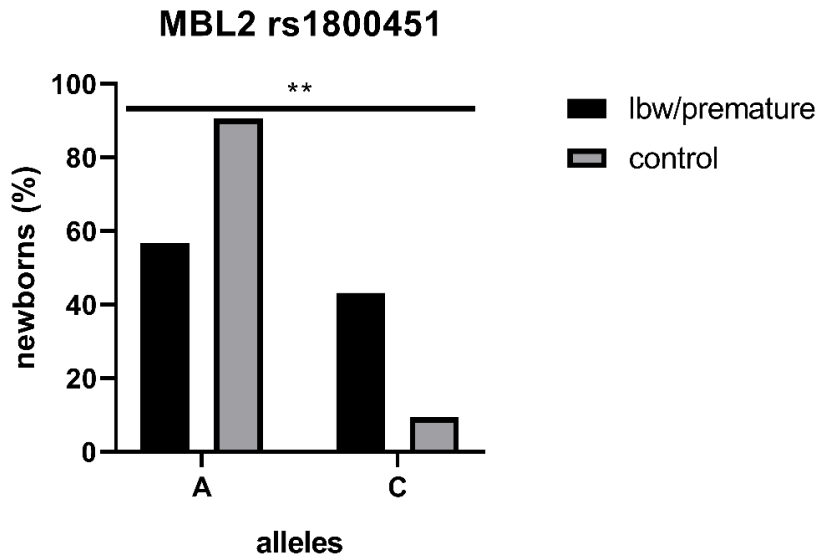
Εικόνα 4.2.4: Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση MbolI για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs1800451. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού έγινε σε gel ακρυλαμίδης 8%. [1]: Ομόζυγο για το αλληλόμορφο A (A/A) [289bp], [2]: Ετερόζυγο άτομο (A/C) [289 bp και 263bp], [3]: Ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C (C/C) [263bp].

Πίνακας 4.2.2: Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό με rs1800451 συνολικά και για τις δύο ομάδες μελέτης

MBL2 rs1800451		
	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρόωρα N=51	Τελειόμηνα (controls) N=32
<b>A/A</b>	29 (56.8%)	29 (90.6%)
<b>A/C</b>	17 (3.4%)	3 (9.4%)
<b>C/C</b>	5 (9.8%)	0 (0)



Εικόνα 4.2.5: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό με rs1800451 μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value=0.004). Ο γονότυπος A/A αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ο γονότυπος C/C αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για τη μεταλλαγή, και τέλος ο γονότυπος A/C αναφέρεται σε ετερόζυγο άτομο.

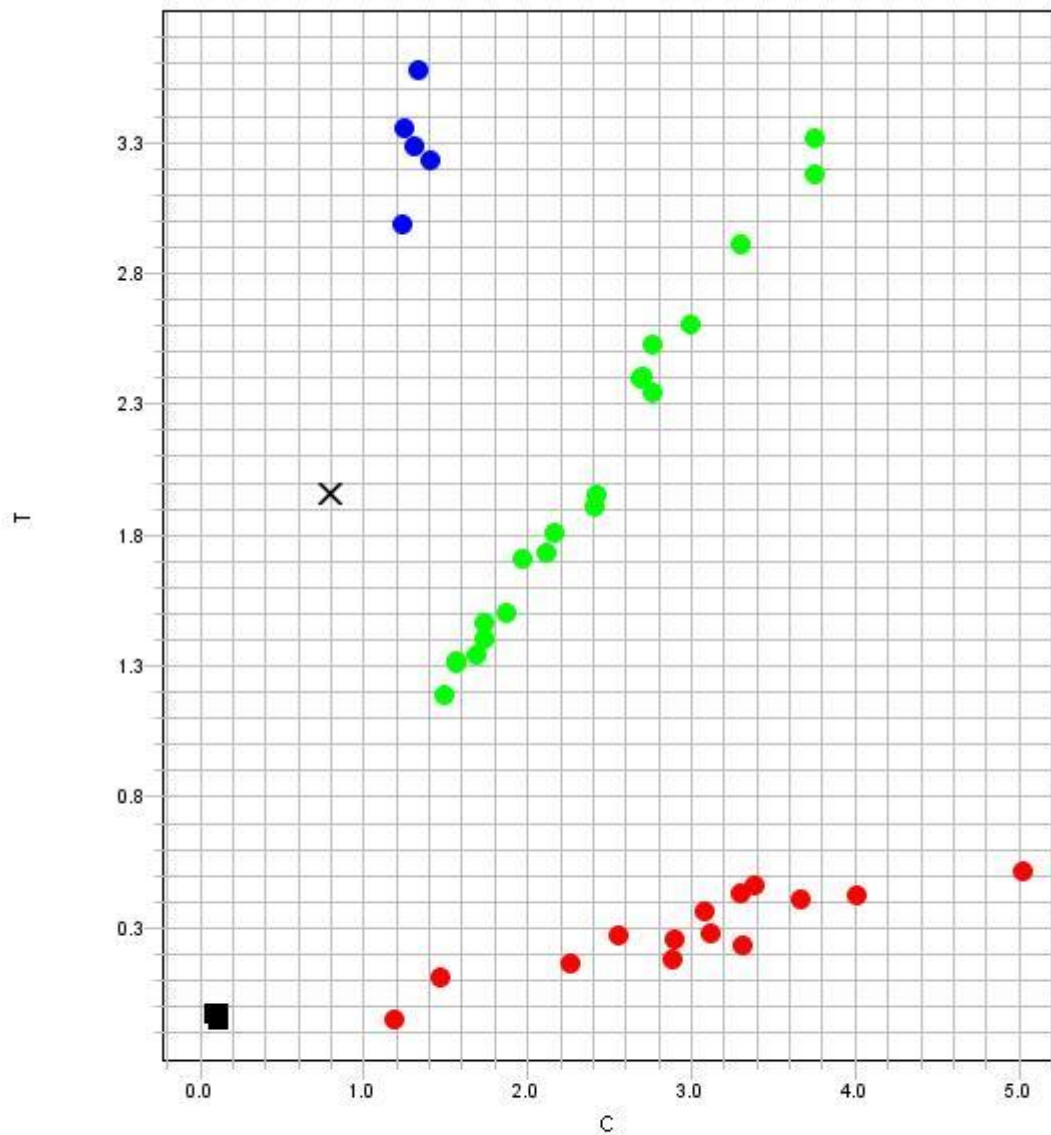


Εικόνα 4.2.6: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό με rs1800451 μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value=0.0012) για την ύπαρξη του μεταλλαγμένου C αλληλομόρφου.

#### 4.2.2 Το γονίδιο *FKBP5*

Αντίστοιχα με το προαναφερθέν γονίδιο και το γονίδιο *FKBP5* έχει έναν πολυμορφισμό ενδιαφέροντος, πρόκειται για τον πολυμορφισμό με rs1360780, ο οποίος βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου. Η γονοτύπηση του πολυμορφισμού αυτού έγινε με τη χρήση της μεθόδου TaqMan (Εικόνα 4.2.7). Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα για αυτόν τον πολυμορφισμό ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, United States). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε Fisher's ( $\chi^2$ ) test για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 4.2.3) μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, αυτή των πρόωρων και μικρού βάρους γέννησης νεογνών και της ομάδας των τελειόμηνων νεογνών (Εικόνα 4.2.8).

### Allelic Discrimination Plot



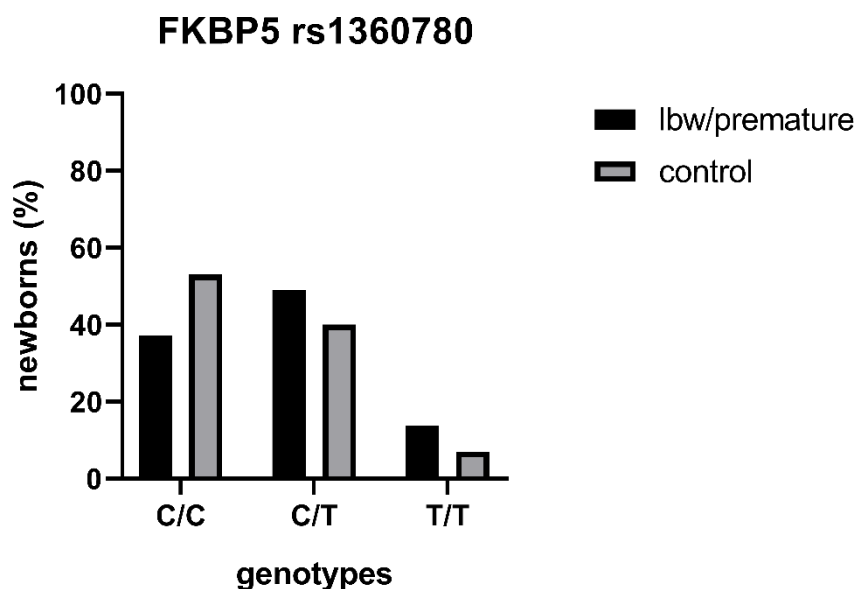
#### Legend

- Homozygous C/C
- Homozygous T/T
- Heterozygous C/T
- × Undetermined

Εικόνα 4.2.7: Αποτελέσματα από την γονοτύπηση TaqMan. Στο διάγραμμα διασποράς φαίνεται ο καταμερισμός των δειγμάτων σε κάθε γονότυπο. Με κόκκινο είναι τα δείγματα που είχαν γονότυπο C/C (wt), με πράσινο τα ετερόζυγα δείγματα (C/T) και με μπλε τα δείγματα που είχαν γονότυπο T/T. Με ■ είναι τα αρχικά control που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση και με X είναι ένα δείγμα στο οποίο η αντίδραση δε δούλεψε.

Πίνακας 4.2.3: Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό με rs1360780 συνολικά και για τις δύο ομάδες μελέτης

FKBP5 rs1360780		
	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρόωρα N=51	Τελειόμηνα (controls) N=32
<b>C/C</b>	19 (37.2%)	17 (53%)
<b>C/T</b>	25 (49%)	13 (40%)
<b>T/T</b>	7 (13.8%)	2 (7%)

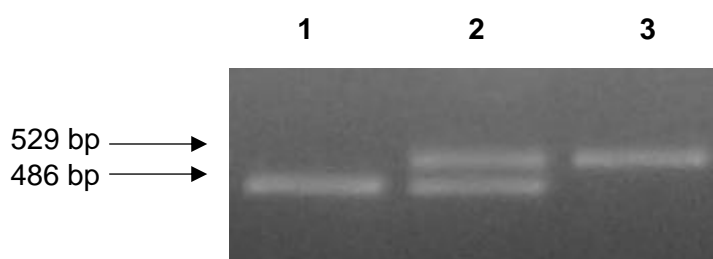


Εικόνα 4.2.8: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό με rs1800451 μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, P value=0.2926). Ο γονότυπος C/C αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ο γονότυπος T/T αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για τη μεταλλαγή, και τέλος ο γονότυπος C/T αναφέρεται σε ετερόζυγο άτομο.

#### 4.2.3 Το γονίδιο *SLC6A4*

Για τη διερεύνηση του πολυμορφισμού 5-HTTLPR του γονιδίου *SLC6A4* έγινε αντίδραση PCR, με την αντίδραση ενισχύθηκε η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου στον οποίο εδράζεται η περιοχή του πολυμορφισμού. Πρόκειται για μια πολυμορφική περιοχή που χαρακτηρίζεται από την έλλειψη ή ένθεση την ενός τμήματος 44bp, οπότε τα δύο

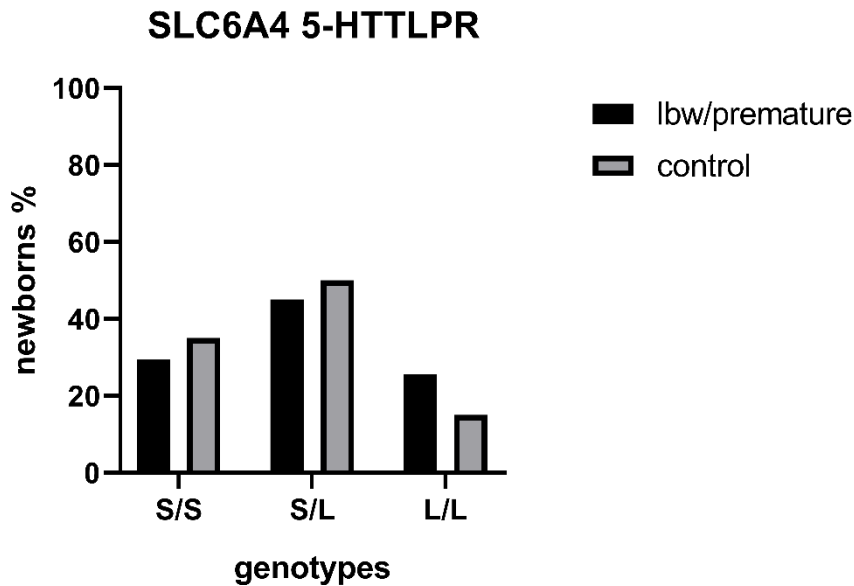
αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται ως μικρό (S, short allele) και μεγάλο (L, long allele), αντίστοιχα. Η PCR για την ενίσχυση του τμήματος αυτού πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα (πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά). Ενδεικτικά παρουσιάζεται μία αντιπροσωπευτική εικόνα του αποτελέσματος της συγκεκριμένης αντίδρασης (Εικόνα 4.2.9). Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και για αυτόν τον πολυμορφισμό ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, United States). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε Fisher's ( $\chi^2$ ) test για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, αυτή των πρόωρων και μικρού βάρους γέννησης νεογνών και της ομάδας των τελειόμηνων νεογνών (Εικόνα 4.2.10).



Εικόνα 4.2.9: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR του γονιδίου *FKBP5*. Το μικρό αλληλόμορφο έχει μοριακό βάρος 486bp και το μεγάλο αλληλόμορφο 529bp. Η ανίχνευση του γονιδιακού προϊόντος έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. [1]: Ομόζυγο για το μικρό αλληλόμορφο (S/S), [2]: Ετερόζυγο άτομο (S/L), [3]: Ομόζυγο για το μεγάλο αλληλόμορφο (L/L).

Πίνακας 4.2.4: Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό με rs1360780 συνολικά και για τις δύο ομάδες μελέτης

SLC6A4 5-HTTLPR		
	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρόωρα N=51	Τελειόμηνα (controls) N=32
<b>S/S</b>	15 (29.4%)	11 (35%)
<b>S/L</b>	23 (45%)	16 (50%)
<b>L/L</b>	13 (25.6%)	5 (15%)

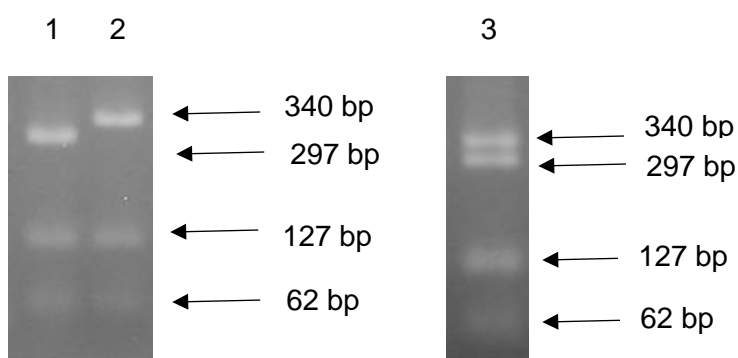


Εικόνα 4.2.10: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value=0.5662). Ο γονότυπος S/S αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το μικρό αλληλόμορφο, ο γονότυπος L/L αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το μεγάλο αλληλόμορφο, και τέλος ο γονότυπος S/L αναφέρεται σε ετερόζυγο άτομο.

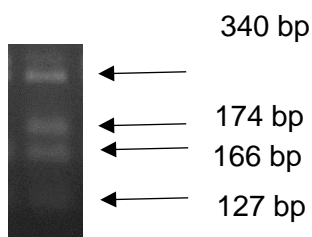
Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκε για πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη ενός ακόμα πολυμορφισμού (rs25531) εσωτερικά της περιοχής του προαναφερθέντος πολυμορφισμού. Η πέψη έγινε με την περιοριστική ενδονουκλεάση MspI. Μετά την επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης αναμένουμε να δούμε διαφορετικές ζώνες μοριακών βαρών στο πήκτωμα, ανάλογα και με το αλληλόμορφο του 5-HTTLPR (Πίνακας 4.2.5). Η πέψη έγινε για όλα τα δείγματα, ενδεικτικά παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά κάποια δείγματα (Εικόνα 4.2.11 & Εικόνα 4.2.12). Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και για αυτόν τον πολυμορφισμό ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, United States). Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε Fisher's ( $\chi^2$ ) test για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, αυτή των πρόωρων και μικρού βάρους γέννησης νεογνών και της ομάδας των τελειόμηνων νεογνών (Εικόνα 4.2.13).

Πίνακας 4.2.5: Πιθανά μοριακά βάρη για τον συνδυασμό των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου *SLC6A4*.

Αναμενόμενα αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου <i>SLC6A4</i>			
L <sub>A</sub>	S <sub>A</sub>	L <sub>G</sub>	S <sub>G</sub>
340 bp	297 bp	174 bp	166 bp
127 bp	127 bp	166 bp	131 bp
62 bp	62 bp	127 bp	127 bp
		62 bp	62 bp



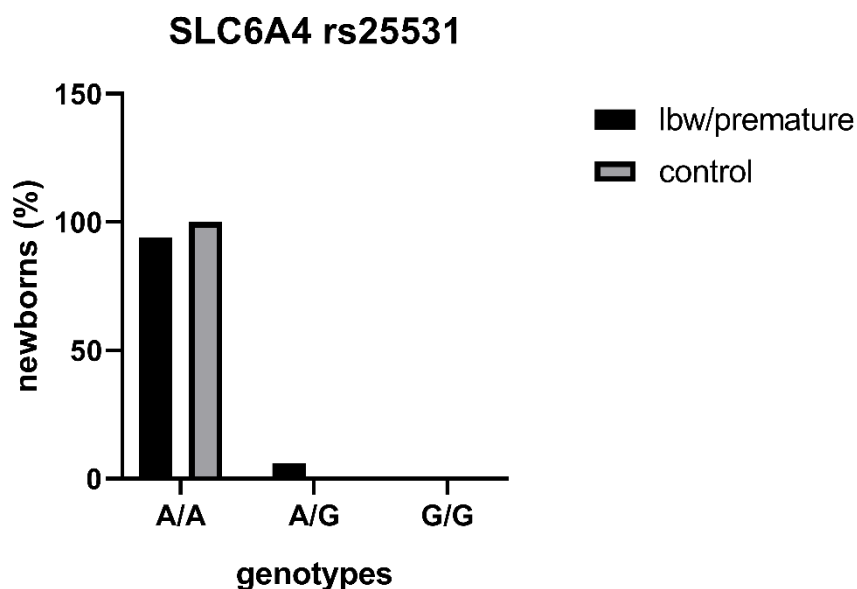
Εικόνα 4.2.11: Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msp*II για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs25531. Στην εικόνα απεικονίζονται οι ζώνες που προκύπτουν μετά την πέψη για το γονότυπο αγρίου τύπου ως προς το συγκεκριμένο πολυμορφισμό rs25531. Ανάλογα με τα αποτελέσματα για τον 5-HTTLPR πολυμορφισμού ποικίλουν οι ζώνες μοριακών βαρών. [1]: Γονότυπος S<sub>A</sub>/S<sub>A</sub>, [2]: Γονότυπος L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>, [3]: Γονότυπος S<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>.



Εικόνα 4.2.12: Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msp*II για την ανίχνευση του πολυμορφισμού με rs25531. Στην εικόνα απεικονίζονται οι ζώνες που προκύπτουν μετά την πέψη για το γονότυπο L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>. Αυτός ο γονότυπος είναι η μοναδική περίπτωση που εμφανίζεται το μεταλλαγμένο G αλληλόμορφο.

Πίνακας 4.2.6: Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό με rs 25531 συνολικά και για τις δύο ομάδες μελέτης

SLC6A4 rs25531		
	Μικρό Βάρος Γέννησης/Πρόωρα N=51	Τελειόμηνα (controls) N=32
<b>A/A</b>	48 (94.1%)	32 (100%)
<b>A/G</b>	3 (5.9%)	0 (0.0%)
<b>G/G</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)



Εικόνα 4.2.13: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό 5-HTTLPR μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (Fisher's ( $\chi^2$ ) test, p-value=0.1623). Ο γονότυπος A/A αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ο γονότυπος G/G αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (που όμως δεν εμφανίζεται καθόλου στον δικό μας πληθυσμό), και τέλος ο γονότυπος A/G αναφέρεται σε ετερόζυγο άτομο.

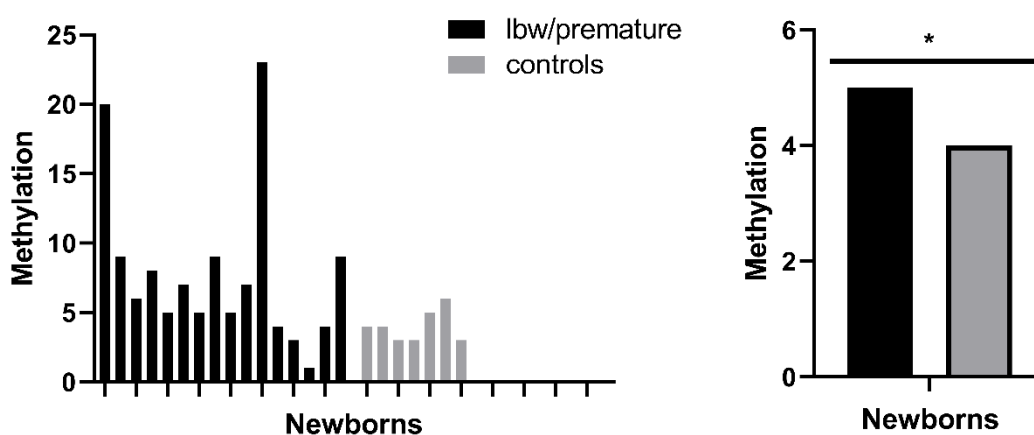


### 4.3 Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης

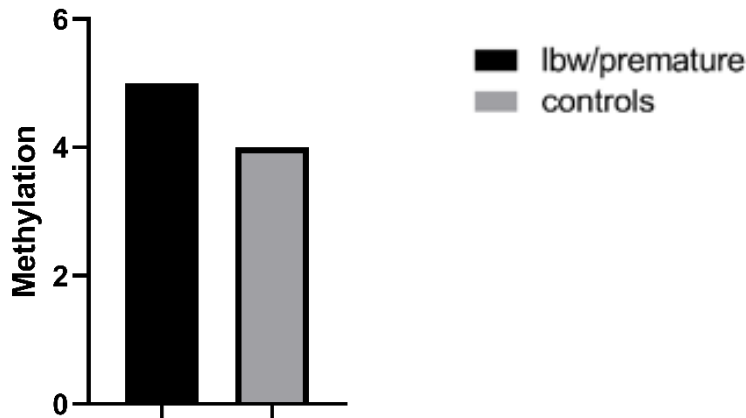
Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης περιοχών των γονιδίων *FKBP5* (CpG 165) και *HLA-G* (CpG 96), αποκάλυψε ότι ο περιβαλλοντικός παράγοντας του στρες επηρέασε σε ένα βαθμό το επιγενετικό προφίλ των γονιδίων.

#### 4.3.1 Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου *FKBP5*

Στο γονίδιο *FKBP5* αναλύθηκαν 18 θέσεις του CpG165. Από τις 18 θέσεις, μόνο μία έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στο επίπεδο μεθυλίωσης στην ομάδα των πρόωρων νεογνών σε σύγκριση με αυτή των τελειόμηνων νεογνών (ομάδα μαρτύρων) (Εικόνα 4.3.1). Συνολικά, το CpG 165 του γονιδίου δεν έδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των δύο ομάδων των νεογνών (Εικόνα 4.3.2).



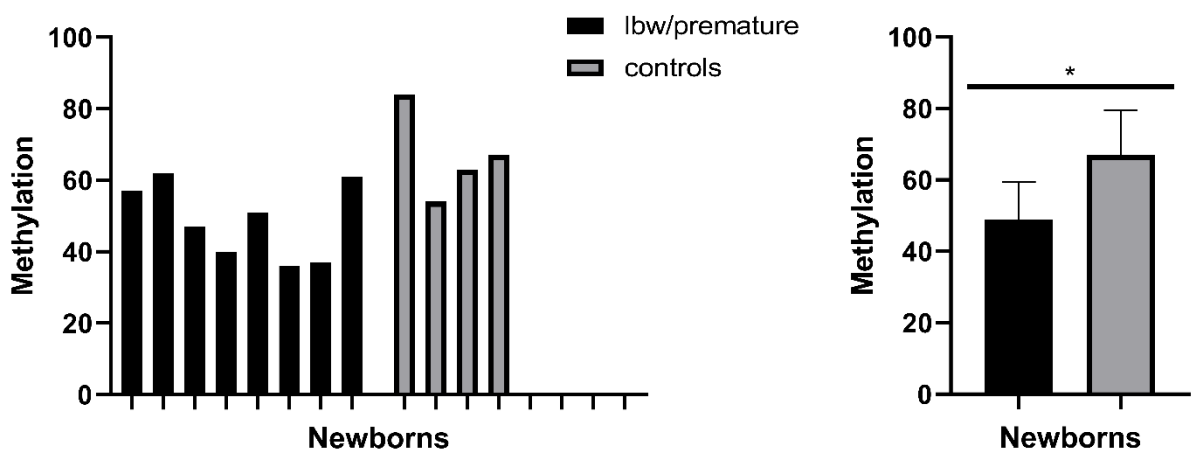
Εικόνα 4.3.1: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μεθυλίωσης της CpG περιοχής 8 του CpG 165 του γονιδίου *FKBP5*. Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται οι τιμές μεθυλίωσης για κάθε νεογνό ξεχωριστά, ενώ στο δεύτερο ο μέσος όρος της κάθε ομάδας νεογνών (Mann-Whitney, p-value=0.0276).



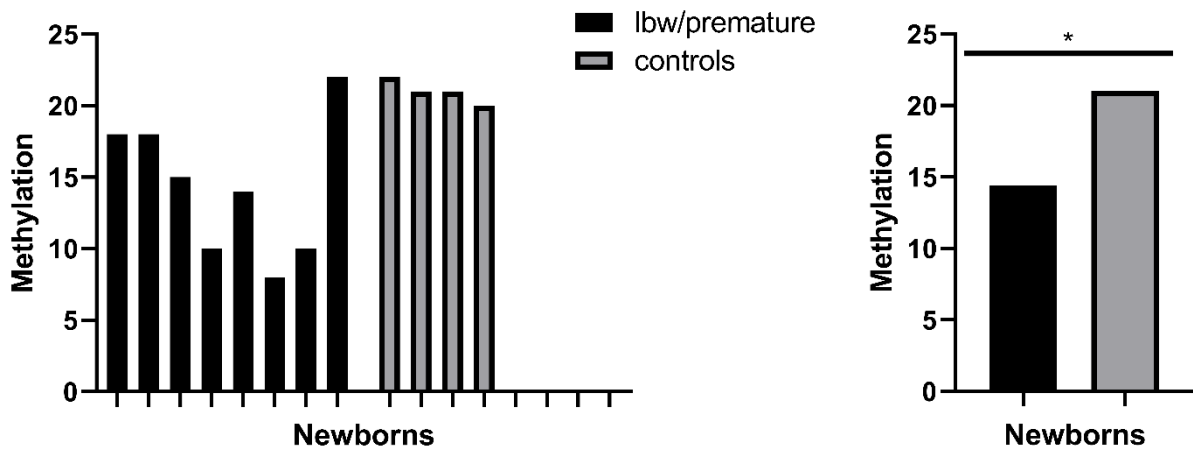
Εικόνα 4.3.2: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μεθυλίωσης του CpG 165 του γονιδίου *FKBP5*.

#### 4.3.2 Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου *HLA-G*

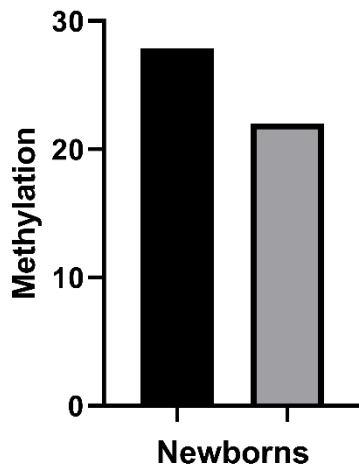
Στο γονίδιο *HLA-G* αναλύθηκαν 7 θέσεις του CpG96. Από τις 7 θέσεις, μόνο δύο (CpG περιοχές 1 και 3) έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στο επίπεδο μεθυλίωσης στην ομάδα των πρόωρων νεογνών σε σύγκριση με αυτή των τελειόμηνων νεογνών (ομάδα μαρτύρων) (Εικόνα 4.3.3 και Εικόνα 4.3.4). Συνολικά, το CpG 96 του γονιδίου δεν έδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των δύο ομάδων των νεογνών (Εικόνα 4.3.5).



Εικόνα 4.3.3: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μεθυλίωσης της CpG περιοχής 1 του CpG 96 του γονιδίου *HLA-G*. Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται οι τιμές μεθυλίωσης για κάθε νεογνό ξεχωριστά, ενώ στο δεύτερο ο μέσος όρος της κάθε ομάδας νεογνών (passed normality test, t test, p-value=0.0246).



Εικόνα 4.3.4: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μεθυλίωσης της CpG περιοχής 3 του CpG 96 του γονιδίου *HLA-G*. Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται οι τιμές μεθυλίωσης για κάθε νεογνό ξεχωριστά, ενώ στο δεύτερο ο μέσος όρος της κάθε ομάδας νεογνών (passed normality test, t test, p-value=0.0241).

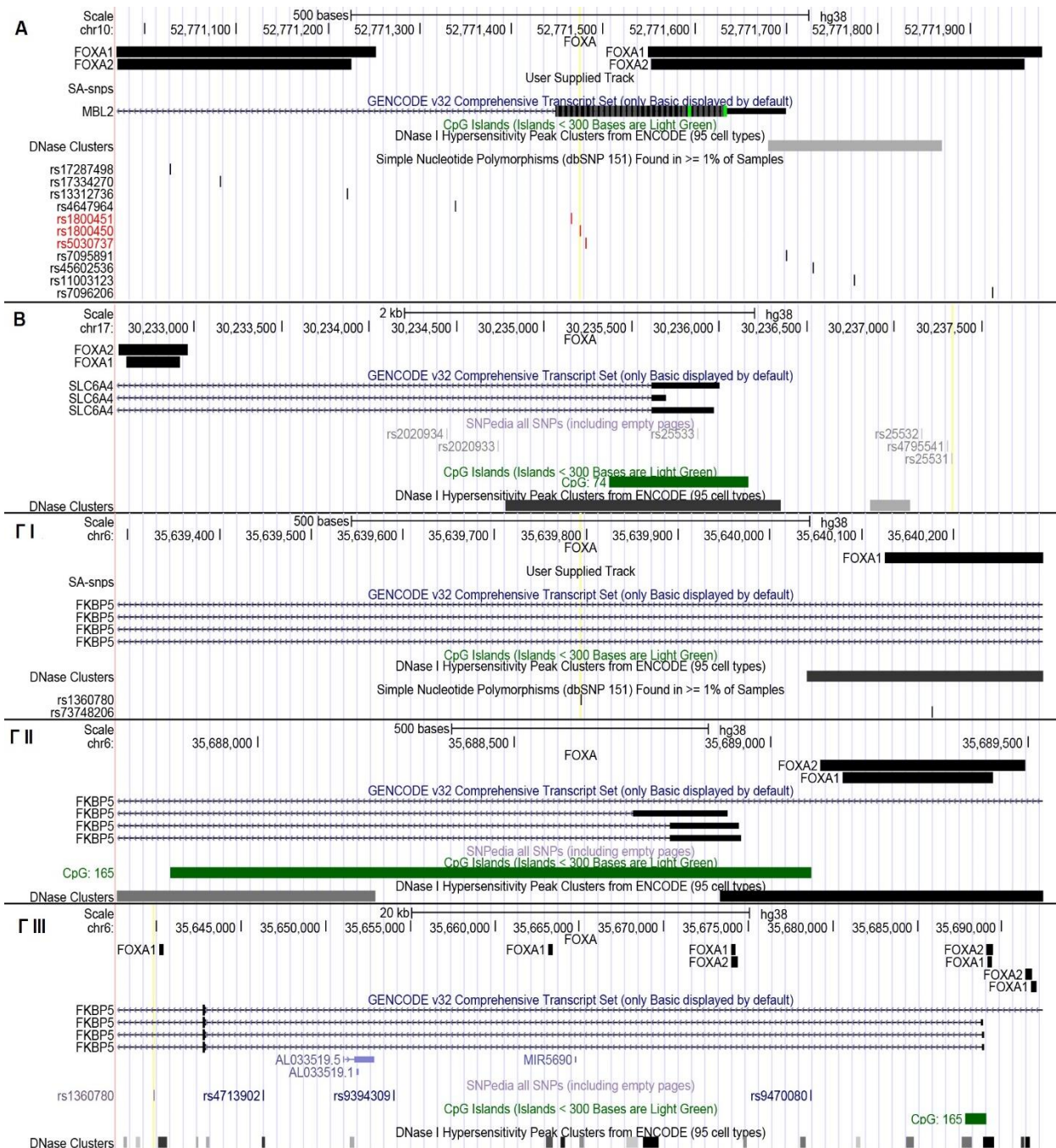


Εικόνα 4.3.5: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανάλυσης μεθυλίωσης του CpG 96 του γονιδίου *HLA-G*.

#### **4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων και των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν**

Προκειμένου να μελετηθεί ο πιθανός ρυθμιστικός ρόλος των SNPs στην παρούσα μελέτη έγινε συσχέτιση των γενωμικών τους θέσεων με θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίες προέκυψαν από πειραματικά δεδομένα διαθέσιμα από το ENCODE project (263).

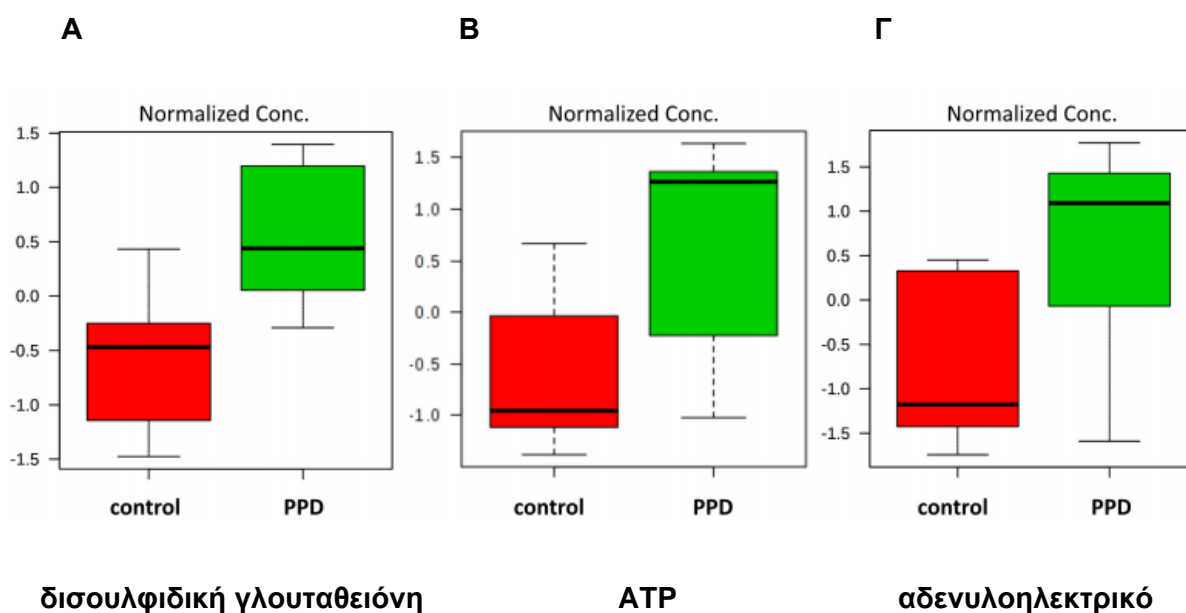
Βάσει της ανάλυσης αυτής (Εικόνα 4.4.1) παρακείμενα των αναλυθέντων θέσεων των SNPs της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκαν θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων FOXA1 και FOXA2. Αναλυτικότερα, υπάρχουν 4 θέσεις πρόσδεσης FOXA1/FOXA2 στο γονίδιο *MBL2*, 2 θέσεις στο γονίδιο *SLC6A4* και 8 θέσεις στο γονίδιο *FKBP5*.



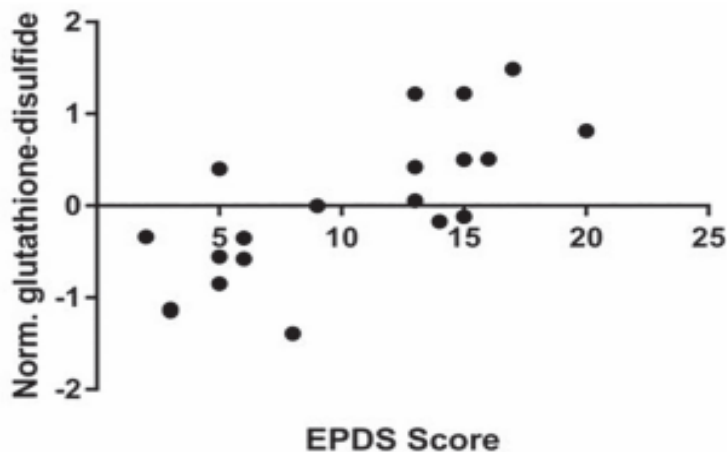
Εικόνα 4.4.1: Βιοπληροφορική ανάλυση των περιοχών που μελετήθηκαν. Σε οριζόντιες γραμμές εμφανίζεται η θέση στο χρωμόσωμα, η θέση του εκάστοτε γονιδίου, οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (FOXA1&FOXA2), η παρουσία νησίδων CpG, και οι θέσεις των SNPs με βάση τη dbSNP151. Στην εικ. A απεικονίζονται οι πληροφορίες για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *MBL2*, στην εικόνα B για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *SLC6A4*, στην εικ. Γ I οι πληροφορίες για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *FKBP5*, στην εικ. Γ II οι πληροφορίες για τη νησίδα CpG του γονιδίου *FKBP5* που αναλύθηκε, και τέλος στην εικ. Γ III φαίνεται πλήρως όλη η περιοχή του γονιδίου *FKBP5*.

## 4.5 Επίπεδα μεταβολιτών στον ορό του αίματος γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση στον ορό αίματος γυναικών που ανέπτυξαν επιλόχειο κατάθλιψη σε σύγκριση με την ομάδα γυναικών που δεν ανέπτυξαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι βρέθηκαν τρεις μεταβολίτες στον ορό του αίματος, οι οποίοι παρουσίασαν διαφορετικά επίπεδα μεταξύ των δύο ομάδων έρευνας, αυτοί οι μεταβολίτες είναι οι εξής: δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG), το αδενυλοηλεκτρικό και η ATP (Adenosine Triphosphate). Και οι τρεις αυτοί μεταβολίτες βρέθηκαν σε αυξημένα επίπεδα στην ομάδα με επιλόχειο κατάθλιψη σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (Εικόνα 4.4.1). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε από τη Μιχαέλα Φίλιου. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες, τη βιοσύνθεση αμινοξέων και την παραγωγή ενέργειας. Επίσης, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της δισουλφιδικής γλουταθειόνης και του EPDS σκορ των γυναικών (Pearson  $r = 0.7449$ ,  $p = 0.001$ ) (Εικόνα 4.4.2). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτωρ του εργαστηρίου Θεοδωρίδου Ντανιέλα.



Εικόνα 4.5.1: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής ανάλυσης. Και στους τρεις μεταβολίτες παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα στην ομάδα PPD σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (controls). Α) Δισουλφιδική Γλουταθειόνη –GSSG ( $d = 2.6504$ ,  $SD = 0.2543$  και  $q = 0.0567$ ), Β) ATP ( $d = 2.3833$ ,  $SD = 0.3788$  και  $q = 0.0567$ ), Γ) Αδενυλοηλεκτρικό ( $d = 2,2390$ ,  $SD = 0,4445$  και  $q = 0,0825$ ). PPD (Postpartum Depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.



Εικόνα 4.5.2: Συσχέτιση των επιπέδων δισουλφιδικής γλουταθειόνης και του EPDS σκορ του πληθυσμού στον οποίο έγινε η μεταβολομική ανάλυση (Pearson  $r = 0.7449$ ,  $p < 0.001$ ).

Για τους μεταβολίτες που παρουσίασαν μεταβολές στα επίπεδά τους μεταξύ των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και αυτών χωρίς πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για περαιτέρω αξιολόγηση των παρατηρούμενων διαφορών λαμβάνοντας υπόψη και άλλους παράγοντες. Με τη χρήση στατιστικών τεστ (Fisher's test, Student t-test, Pearson correlation) προσδιορίστηκαν οι μεταβλητές που συσχετίζονται με τους συγκεκριμένους μεταβολίτες (δισουλφιδική γλουταθειόνη, αδενυλοηλεκτρικό και ATP) ή με την επιλόχειο κατάθλιψη σε επίπεδο 10%, και αυτές οι μεταβλητές συμπεριλήφθηκαν στα γραμμικά μοντέλα. Οι μεταβλητές αυτές ήταν η ηλικία της γυναίκας όταν έγινε η λήψη του αίματος, εάν εργαζόταν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το μορφωτικό επίπεδο της γυναίκας και το BMI της πριν την εγκυμοσύνη (Μοντέλο 1). Σε ένα άλλο μοντέλο (Μοντέλο 2) χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα κλινικά χαρακτηριστικά, όπως το ιστορικό θυρεοειδισμού και δυσλιπιδαιμίας. Οι εκτιμήσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Stata και παρουσιάζονται με βάση το συντελεστή beta και εμπιστοσύνης 95% (265). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης απεικονίζονται στον Πίνακα 4.4.1. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε από τους συνεργάτες του προγράμματος Rhea.

Μετά την προσαρμογή των δημογραφικών χαρακτηριστικών, οι συσχετίσεις παρέμειναν σημαντικές. Η επιλόχειος κατάθλιψη συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα αδενυλοηλεκτρικού, γλουταθειόνης και ATP. Τα αποτελέσματα παρέμειναν παρόμοια μετά την προσαρμογή των κλινικών χαρακτηριστικών, με εξαίρεση το αδενυλοηλεκτρικό, όπου η σημαντικότητα δεν παρέμεινε ίδια.

Πίνακας 4.5.1: Συσχέτιση μεταξύ Επιλόχειου Κατάθλιψης και των μεταβολιών. Μοντέλο 1: ηλικία της γυναίκας κατά τη λήψη του αίματος, εργασία κατά την εγκυμοσύνη, μορφωτικό επίπεδο της γυναίκας, BMI πριν την εγκυμοσύνη & Μοντέλο 2: το Μοντέλο 1 με επιπλέον κλινικά χαρακτηριστικά (ιστορικό θυρεοειδισμού και δυσλιπιδαιμίας).

	Μοντέλο 1		Μοντέλο 2	
	Beta (95% CI)	p-value	Beta (95% CI)	p-value
<b>ΑΤΡ</b>	1.12 (0.44, 1.8)	0.004	1.78 (0.99, 2.56)	<0.001
<b>Δισουλφιδική Γλουταθειόνη</b>	0.94 (0.31, 1.57)	0.006	0.94 (0.00, 1.88)	0.051
<b>Αδενυλοηλεκτρικό</b>	1.34 (0.01, 2.68)	0.049	0.59 (-1.27, 2.44)	0.501



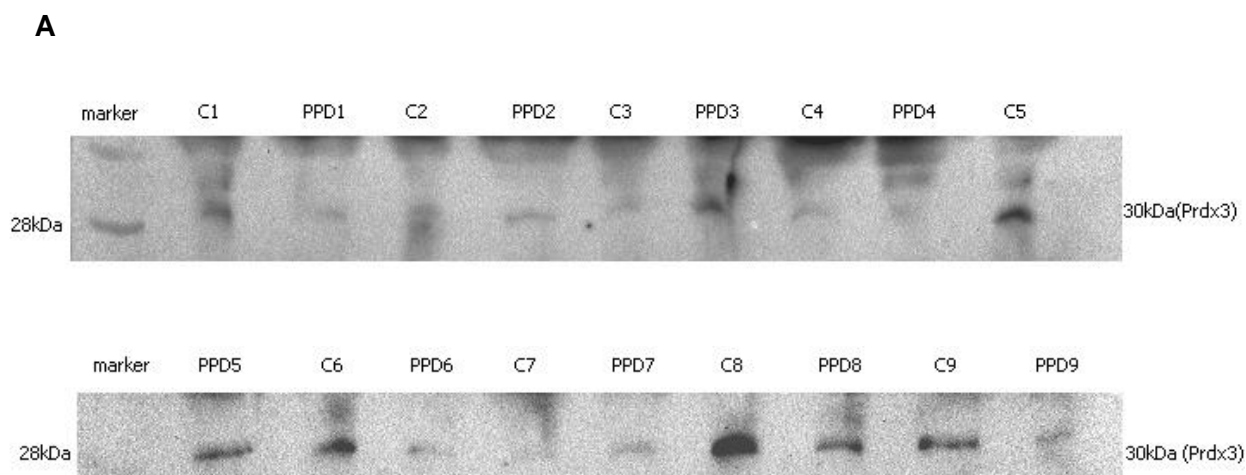
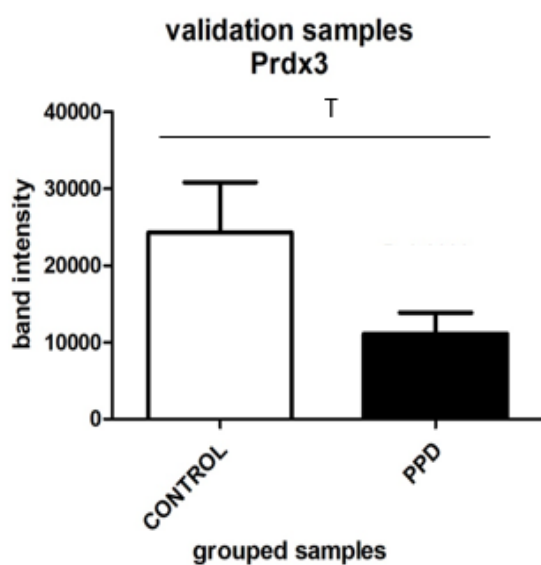
## 4.6 Μελέτη του Οξειδωτικού Στρες σε συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης

Έχοντας σαν βάση τα αποτελέσματα που αντλήθηκαν από τη μεταβολομική ανάλυση, και δεδομένης της θετικής συσχέτισης της δισουλφιδικής γλουταθειόνης με το EPDS σκορ έγινε περαιτέρω διερεύνηση των αλλαγών που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Η μελέτη αυτή έγινε σε δείγματα ορού ενός γυναικείου συμπληρωματικού πληθυσμού επιβεβαίωσης της μελέτης, όπου πάλι υπήρχαν δύο ομάδες, μία αυτή των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και μία αυτή των γυναικών χωρίς επιλόχειο κατάθλιψη ως μάρτυρες.

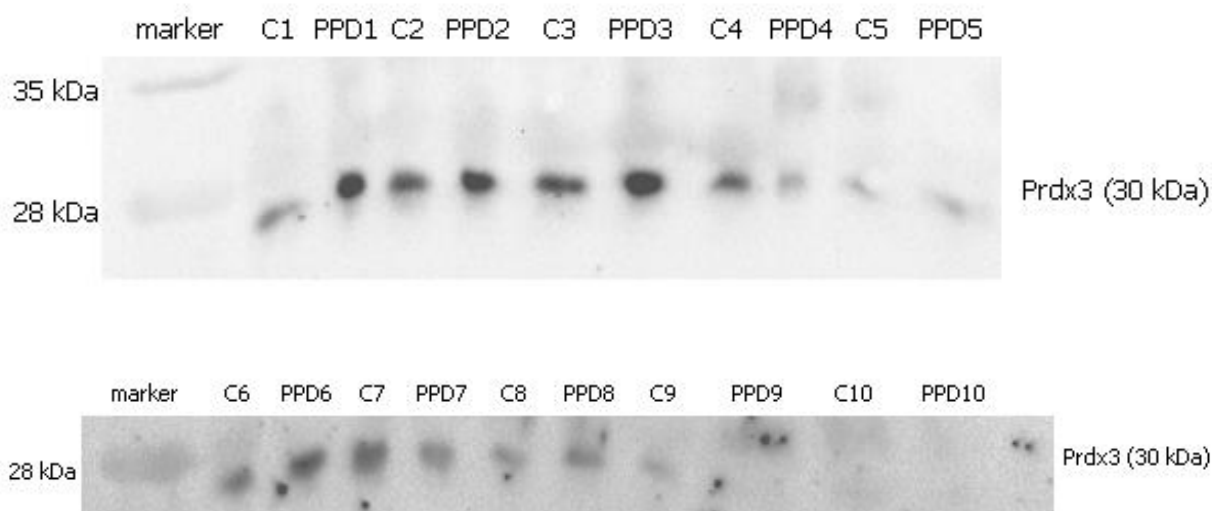
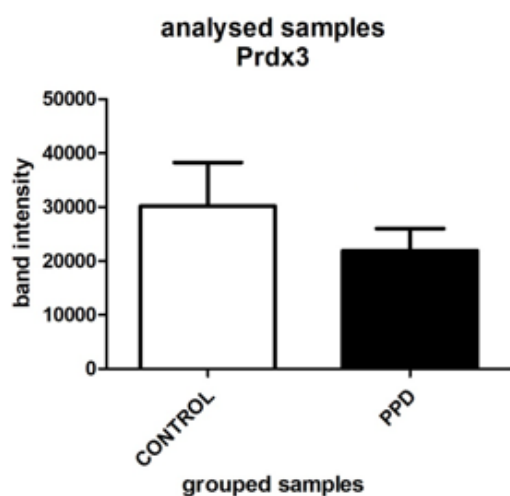
### 4.6.1 Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την εκτίμηση των επιπέδων της Prdx3

Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα της Prdx3 (Peroxiredoxin 3), μιας πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των θειορεδοξινών και έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδά της επηρεάζονται από το οξειδωτικό στρες (266) (267).

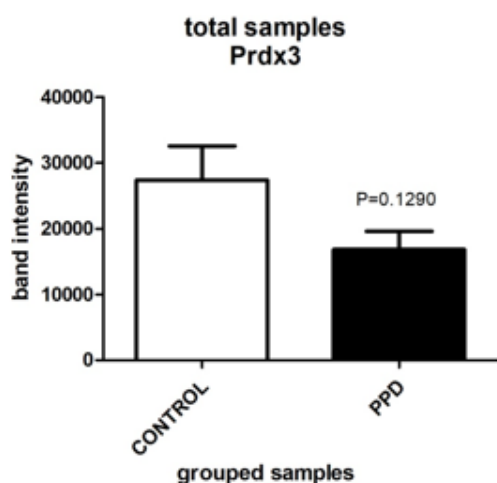
Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της Prx3 πραγματοποιήθηκε επειδή διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της δισουλφιδικής γλουταθειόνης που είναι αντιοξειδωτικός παράγοντας και της επιλόχειο κατάθλιψη. Το δείγμα που αναλύθηκε είναι ο ορός αίματος των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting) έδειξαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς επιλόχειο κατάθλιψη (μάρτυρες). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε στον συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης (Εικόνα 4.5.1) αλλά και στον πληθυσμό στον οποίο πραγματοποιήθηκε η μεταβολομική ανάλυση (Εικόνα 4.5.2). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα GraphPad Prism7 (GraphPad, San Diego, CA, United States) χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney non parametric test και τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος  $\pm$ SEM. Εκτός από τα διαγράμματα για τον κάθε πληθυσμό (Εικόνα 4.5.1B, 4.5.2B) παρουσιάστηκαν και συνολικά αποτελέσματα για τα επίπεδα έκφρασης της Prx3, και των δύο πληθυσμών μαζί (πληθυσμός μεταβολομικής ανάλυσης και συμπληρωματικός πληθυσμός επιβεβαίωσης) (Εικόνα 4.5.3).

**B**

Εικόνα 4.6.1: Α. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της Prx3. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της Prx3 στις δύο ομάδες του πληθυσμού επιβεβαίωσης (PPD, controls), στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα έκφρασης της Prx3. Β. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, στην οποία φαίνεται η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της Prx3 μεταξύ των δύο ομάδων ( $p$ -value = 0.0939, Mann-Whitney test). Τα επίπεδα έκφρασης της Prx3 είναι μειωμένα στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη. PPD (Postpartum Depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.

**A****B**

Εικόνα 4.6.2: Α. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της Prx3. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της Prx3 στις δύο ομάδες του πληθυσμού της μεταβολομικής ανάλυσης (PPD, controls), στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα έκφρασης της Prx3. Β. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, στην οποία φαίνεται η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της Prx3 μεταξύ των δύο ομάδων ( $p$ -value = 0.6842, Mann-Whitney test). Τα επίπεδα έκφρασης της Prx3 είναι μειωμένα στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη. PPD (Postpartum Depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.



Εικόνα 4.6.3: Συνολική διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, στην οποία φαίνεται η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της Prx3 μεταξύ των δύο ομάδων και των δύο πληθυσμών μελέτης (p-value = 0.1290, Mann-Whitney test). Τα επίπεδα έκφρασης της Prx3 είναι μειωμένα στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη. PPD (Postpartum Depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.

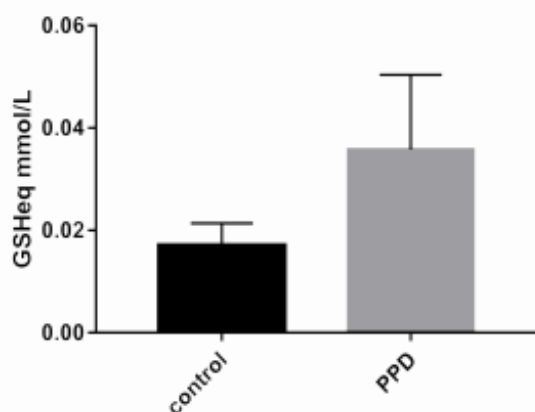
#### 4.6.2 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (GSH), γνωστή και ως γλουταθειό, είναι μία μη-πρωτεϊνική θειόλη που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική κυτταρική άμυνα. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο, και πιο συγκεκριμένα είναι γ-γλουταμινικό – κυστεΐνη – γλυκίνη (γ-Glu-Cys-Gly). Η ενεργός μορφή της GSH οφείλεται στη θειόλη (-SH) της κυστεΐνης. Η GSH είναι ένα μόριο που παράγεται σε όλα τα όργανα, κυρίως όμως στο ήπαρ, στον σπλήνα και στους νεφρούς (268). Η GSH δρα υπόστρωμα της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών, στην εξουδετέρωσή τους, ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (269).

Η μελέτη τις αντιοξειδωτικής ικανότητας της δισουλφιδικής γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε επειδή διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση με την επιλόχειο κατάθλιψη. Το δείγμα που αναλύθηκε είναι ο ορός αίματος των γυναικών που ανήκαν στον συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης της μελέτης αυτής. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.5.1) παρατίθενται οι μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και ένα συνολικό διάγραμμα των αποτελεσμάτων στις δύο ομάδες (PPD και controls) (Εικόνα 4.6.4). Μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης δυστυχώς δε βρέθηκε σημαντική διαφορά.

Πίνακας 4.6.1: Μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, που πραγματοποιήθηκαν στον ορό γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και χωρίς επιλόχειο κατάθλιψη. PPD (Postpartum Depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.

Δείγματα	GSHEq (mmol/L)
PPD	0.060655738
PPD	0.029508197
PPD	0.003278689
PPD	0.125490196
PPD	0.009836066
PPD	0.037704918
PPD	0.004918033
PPD	0.014754098
control	0.014754098
control	0.003278689
control	0.029508197
control	0.014754098
control	0.008196721
control	0.014754098
control	0.03442623



Εικόνα 4.6.4: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης ( $p$ -value=0.554). PPD (Postpartum depression) γυναίκες που πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη, C: μάρτυρες, γυναίκες που δεν πάσχουν από επιλόχειο κατάθλιψη.

## 5. Συζήτηση

### 5.1 Μελέτη πρόωρων νεογνών και νεογνών με μικρό βάρος γέννησης

#### 5.1.1 Συσχέτιση της προωρότητας, του βάρους γέννησης και της εμφάνισης πρώιμης λοίμωξης με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *MBL2*

Το μικρό βάρος γέννησης και η προωρότητα αποτελούν παράγοντες κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα του νεογνού (270-272), και μπορεί να είναι αποτέλεσμα των πρώιμων στρεσογόνων γεγονότων που έχει βιώσει ένα έμβρυο κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του (273, 274). Βέβαια, μία εγκυμοσύνη μπορεί να καταλήξει σε πρόωρο τοκετό ή σε γέννηση ελλιποβαρούς νεογνού εξαιτίας και άλλων παραγόντων, παθολογικών (π.χ. πλακουντιακή ανεπάρκεια) (275) ή ακόμα και περιβαλλοντικών (συνήθειες μητέρας, π.χ. κάπνισμα) (276).

Στον πληθυσμό μελέτης μας, παρατηρήσαμε ότι οι απλότυποι των πολυμορφισμών του γονιδίου *MBL2* συσχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για πρόωρο τοκετό ή γέννηση ελλιποβαρούς νεογνού. Πιο συγκεκριμένα, στον πληθυσμό βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός με rs1800451 εμφανίζεται με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στα πρόωρα ή/και με μικρό βάρος γέννησης νεογνά σε σύγκριση με τα τελειόμηνα νεογνά που αποτελούν την ομάδα των μαρτύρων ( $\chi^2$  test,  $p$ -value=0.004). Η ύπαρξη του μεταλλαγμένου C αλληλομόρφου, τόσο σε ετερόζυγη (A/C) όσο και σε ομόζυγη (C/C) κατάσταση είναι αυξημένη στην ομάδα ελλιποβαρών νεογνών σε σχέση με τα τελειόμηνα νεογνά όπου ο αγρίου τύπου γονότυπος (A/A) εμφανίζεται συχνότερα. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην ανάλυση συσχέτισης που έγινε, όπου βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (logistic regression,  $P=0.0009$ ) μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της προωρότητας ή/και του μικρού βάρους γέννησης των νεογνών. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός με rs1800450 δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών μελέτης μας, αν και παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα στην ομάδα ελλιποβαρών νεογνών. Εκτός όμως από την προωρότητα και το μικρό βάρος γέννησης, το γονίδιο *MBL2* έχει συσχετιστεί και με την ανοσολογική απόκριση των νεογνών καθώς και την αυξημένη προδιάθεσή τους να αναπτύξουν λοίμωξη στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Ωστόσο, στον πληθυσμό μελέτης μας δεν εμφανίστηκε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου και της εμφάνισης πρώιμης λοίμωξης.

Προηγούμενες μελέτες πάνω στο συγκεκριμένο γονίδιο, έχουν δείξει συσχέτιση των πολυμορφισμών rs1800450 και rs1800451 με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης (277), ο ρευματικός πυρετός και η ρευματική καρδιοπάθεια (278), η φυματίωση (279), η σήψη (119). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL στον ορό των νεογνών έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν την ανοσολογική τους απόκριση κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους. Αμέσως μετά τη γέννηση, ένα νεογνό έχει μειωμένα επίπεδα MBL, τα οποία βέβαια επηρεάζονται από την ηλικία κύησης στην οποία γεννήθηκε, και αυξάνονται κατά τις πρώτες εβδομάδες της ζωής του (198, 280-282). Μη φυσιολογικά επίπεδα MBL στον ορό των νεογνών έχουν συνδεθεί με περιγεννητική ασφυξία λόγω εμβρυϊκής δυσφορίας, πνευμονική υπέρταση και συγγενή πνευμονία (283, 284). Εκτός όμως από τις παθολογικές καταστάσεις στα νεογνά, που έχει ήδη αναφερθεί, η έλλειψη MBL έχει συνδεθεί με προβλήματα στην αναπνευστική λειτουργία και χρόνιες αναπνευστικές δυσκολίες στην ενήλικη ζωή (202). Ο μηχανισμός με τον οποίο η MBL προστατεύει τους πνεύμονες και διευκολύνει τη λειτουργία τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, ωστόσο θα μπορούσαν να προταθούν κάποιες αντιφλεγμονώδεις και αντιμολυσματικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει (285, 286). Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι σε ασθενή που έπασχε από κυστική ίνωση και είχε μειωμένα επίπεδα MBL και σοβαρή βρογχοπνευμονική λοίμωξη, χορηγήθηκε MBL και η λειτουργία των πνευμόνων του καθώς και η γενικότερη κλινική του εικόνα βελτιώθηκαν σημαντικά (286).

### **5.1.2 Συσχέτιση της προωρότητας, του βάρους γέννησης και της εμφάνισης πρώιμης λοίμωξης με τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου HLA-G**

Εκτός όπως από το γονίδιο *MBL2*, σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση κατά τα πρώιμα στάδια παίζει και το γονίδιο *HLA-G*. Το γονίδιο *HLA-G* εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα από κύτταρα τροφοβλάστης και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική ανοχή κατά την εγκυμοσύνη. Καθώς το *HLA-G* εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε δείγματα πλακούντα, πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει το ρόλο του στις διαταραχές που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, όπως η προεκλαμψία, IUGR ή οι καθ' ἑξιν αποβολές. Χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα *HLA-G* έχουν συσχετιστεί με επιπλοκές στην εγκυμοσύνη (229, 287). Εξαιτίας του εναλλακτικού ματίσματος, το *HLA-G* υφίσταται σε διαφορετικές διαλυτές μορφές και σε μορφές που συνδέονται σε μεμβράνες, τόσο οι δεσμευμένες στη μεμβράνη όσο και οι διαλυτές ισομορφές του εκφράζονται στον πλακούντα, όμως οι διαλυτές ισομορφές μπορεί να ανιχνευθούν και στη μητρική κυκλοφορία (288, 289).

Στη μελέτη μας αναλύθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου αυτού. Στην ομάδα των πρόωρων νεογνών παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης σε δύο περιοχές του υπό μελέτη CpG (t test, p-value=0.0246 και p-value=0.0241). Ωστόσο, συνολικά τα επίπεδα του CpG που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών μελέτης. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του *HLA-G* επηρεάζουν την έκφρασή του και αυτό έχει επιπτώσεις στην άμυνα του οργανισμού. Οι *HLA-G* ισομορφές συμβάλουν στην ανάπτυξη της ενδομήτριας ανοσολογικής ανοχής, στοχεύοντας και αδρανοποιώντας υποπληθυσμούς αιμοποιητικών κυττάρων με ανοσολογική λειτουργία. Οι διαλυτές ισομορφές *HLA-G* αδρανοποιούν τους ενδομήτριους φυσικούς φονείς (natural killer-NK) οδηγώντας τους σε μονοπάτια ανοσολογικής ανοχής, κάτι που μπορεί να γίνει και από την *HLA-E*. Επίσης, οι διαλυτές πρωτεϊνικές ισομορφές επηρεάζουν την παραγωγή κυτοκίνης από τα μονοκύτταρα αιμοποιητικά κύτταρα, οπότε επηρεάζονται και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, προκαλώντας θάνατο των T λεμφοκυττάρων υπό ορισμένες συνθήκες. Παράλληλα, και τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα προγραμματίζονται σε οδούς που σχετίζονται με την ανοσολογική ανοχή (290).

### **5.1.3 Το στρες και ο ρόλος των γονιδίων *FKBP5* και *SLC6A4***

Τα πρώιμα στρεσογόνα γεγονότα είναι πολύ κρίσιμα για την ανάπτυξη και την πλαστικότητα του εγκεφάλου των νεογνών, καθώς διαμορφώνουν την νευρο-ενδοκρινική τους απόκριση και επηρεάζουν τη μελλοντική τους υγεία (66, 84). Η ομοιόσταση του κάθε οργανισμού ρυθμίζει την προσαρμογή του στις περιβαλλοντικές αλλαγές και στα στρεσογόνα ερεθίσματα που δέχεται. Στρεσογόνα γεγονότα στη ζωή της μητέρας, ακόμα και πριν τη σύλληψη, έχουν συνδεθεί με τη διαμόρφωση του επιγενετικού του προφίλ και σε συνδυασμό με το γενετικό προφίλ διαμορφώνεται η απόκρισή του στο στρες, η ευαισθησία του ή η ανθεκτικότητά του. Γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων και την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα άτομα που έχουν βιώσει στρες κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους και της παιδικής τους ηλικίας να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορικών προβλημάτων που παραμένουν έως την ενηλικίωση (64, 88-90).

Ο πολυμορφισμός με rs1360780 του γονιδίου *FKBP5* είναι ένας σημαντικός και πληροφοριακός πολυμορφισμός καθώς η παρουσία του «επικίνδυνου» αλληλόμορφου T οδηγεί στην υπερέκφραση του γονιδίου, ενώ η παρουσία του φυσιολογικού C αλληλόμορφου μειώνει τα επίπεδα έκφρασής του. Η παρουσία του T αλληλόμορφου



γονιδίου σε συνδυασμό με στρεσογόνες πρώιμες εμπειρίες, όπως η προγεννητική μητρική κατάθλιψη, αυξάνει τις πιθανότητες ανάπτυξης καταθλιπτικών συμπτωμάτων στη μετέπειτα ζωή του ατόμου (291). Στον πληθυσμό μελέτης μας, αν και παρατηρήθηκε μια αυξημένη τάση εμφάνισης του T αλληλόμορφου στην ομάδα των πρόωρων νεογνών, στατιστικά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης (πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά).

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που έχουν συσχετίσει τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό με διάφορες παθολογικές ή στρεσογόνες καταστάσεις που έχει βιώσει κάποιος. Χαρακτηριστική είναι η συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την κατάθλιψη (292-294), με βιώματα μητρικής αποστέρησης (295) και γενικότερων αντίξωων συνθηκών κατά τη νεογνική και παιδική ηλικία (296-299), καθώς επίσης και με το μετατραυματικό στρες (Post-Traumatic Stress Disorder- PTSD) (300-303) (Πίνακας 5.1.1). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των γονοτύπων του *FKBP5* και του στρες. Η ύπαρξη του «επικίνδυνου» T αλληλόμορφου γονιδίου θα μπορούσε να αποτελέσει προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση διαταραχών ως αποτέλεσμα στρεσογόνων εμπειριών.

Πίνακας 5.1.1: Συσχέτιση του πολυμορφισμού με rs1360780 με στρεσογόνες καταστάσεις.

	Πληθυσμός Μελέτης	Αναφορές
Κατάθλιψη	Ενήλικες	(292-294)
Μητρική Αποστέρηση	Ενήλικες & Παιδιά	(295)
Τραύμα κατά την παιδική ηλικία	Ενήλικες & Παιδιά	(296-298)
Μετατραυματικό στρες	Ενήλικες	(300-302)
Παιδική Κακοποίηση	Παιδιά	(Grabe et al. 2016)

Μεγάλη σημασία, όμως, φαίνεται πως έχουν και τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου *FKBP5* στον τρόπο που αποκρίνεται ένας οργανισμός στα στρεσογόνα ερεθίσματα. Η μεθυλίωση του DNA του γονιδίου *FKBP5* μεταβάλλει την έκφραση του *FKBP5* και ως εκ τούτου τη σύνθεση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η μεθυλίωση του CpG 165 του *FKBP5* δεν μπορούσε να επικυρωθεί ως κλινικός βιοδείκτης για τον προσδιορισμό του στρες που έχει

βιώσει ένα νεογνό καθώς στον πληθυσμό μελέτης μας δεν έδωσε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων νεογνών. Πρέπει όμως να αναφερθεί και το γεγονός ότι, τα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του *FKBP5* που παρατηρήθηκαν σε πρόωρα νεογνά, δεν διατηρούνται χαμηλά μακροπρόθεσμα, καθώς σε ηλικία ενός έτους παρατηρήθηκε ότι είχαν επανέλθει στα φυσιολογικά τους επίπεδα, υποδεικνύοντας έτσι την προσαρμογή της μεθυλίωσης εντός του πρώτου έτους της ζωής (304).

Το γονίδιο *SLC6A4* είναι ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στην ανθεκτικότητα ή στην ευαισθησία που δείχνει ένας οργανισμός στα εκλαμβανόμενα στρεσογόνα ερεθίσματα, καθώς το σεροτονινεργικό σύστημα είναι ένα από τα σημαντικότερα συστήματα νευροδιαβίβασης που έχουν διερευνηθεί στον τομέα της ψυχιατρικής (305). Υπάρχουν εκτενείς έρευνες (306-309) που αποκαλύπτουν πώς οι αλλαγές αυτού του συστήματος, και ειδικά του γονιδίου *SLC6A4*, μπορεί να σχετίζονται με ψυχιατρικές διαταραχές.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα μελέτη έχουν διερευνηθεί οι πολυμορφισμοί 5' HTTLPR και rs25531 του γονιδίου αυτού, που έχουν συσχετιστεί με γνωρίσματα όπως το άγχος (305, 310) και διάφορες ψυχιατρικές διαταραχές (311).

Από προηγούμενες μελέτες είναι σαφές ότι το αλληλόμορφο S προκαλεί μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του *SLC6A4*, μειώνοντας έτσι την ικανότητα επαναπρόσληψης σεροτονίνης σε σύγκριση με τη μορφή L (310). Ο πολυμορφισμός rs25531 εντοπίζεται εσωτερικά του πρώτου πολυμορφισμού και έχει δειχθεί ότι η παρουσία του G αλληλόμορφου σε συνδυασμό με το αλληλόμορφο L του 5' HTTLPR ( $L_G$ ) οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης, παρόμοια με αυτά που έχουν τα άτομα με γονότυπο S/L για τον πολυμορφισμό 5' HTTLPR (305, 312).

Ο πολυμορφισμός 5' HTTLPR στη μελέτη των πρόωρων νεογνών δεν ήταν ιδιαίτερα πληροφοριακός καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων νεογνών. Ωστόσο, το αλληλόμορφο G του πολυμορφισμού rs25531 εμφανίζεται μόνο στα πρόωρα νεογνά, με μικρή συχνότητα, και καθόλου στην ομάδα των τελειόμηνων νεογνών. Το G αλληλόμορφο εμφανίζεται μόνο σε συνδυασμό με το L αλληλόμορφο ( $L_G$ ), βέβαια έχει δειχθεί ότι τα αλληλόμορφα  $S_A$ ,  $S_G$  και  $L_G$  δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην έκφραση, σε αντίθεση με το αλληλόμορφο  $L_A$  που παρουσιάζει αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα (227). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία του G αλληλόμορφου σε συνδυασμό με το L αλληλόμορφο ( $L_G$ ) οδηγεί σε επίπεδα έκφρασης παρόμοια με αυτά των φορέων του S αλληλόμορφου (312).

Σύμφωνα με την πλειοψηφία των μελετών, η μειωμένη έκφραση του υποδοχέα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ψυχιατρικών διαταραχών. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν και κάποιες αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *SLC6A4*. Υπάρχουν μελέτες που έδειξαν μια αντίθετη συσχέτιση, έδειξαν ότι ο κίνδυνος για την εμφάνιση ψυχιατρικών διαταραχών είναι μεγαλύτερος όταν η έκφραση του υποδοχέα βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα (305, 313-315).

#### **5.1.4 Εξατομικευμένη απόκριση στο στρες**

Συνοψίζοντας, έχουμε παρατηρήσει ότι η έκθεση ενός οργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής του, και ιδιαίτερα κατά την ενδομήτρια περίοδο, είναι καθοριστική και επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ενήλικη ζωή του καθώς μπορεί να οδηγήσει σε φαινοτυπικές διαφορές (316-318). Οι διάφοροι τύποι κυττάρων χαρακτηρίζονται από διαφορετικά πρότυπα έκφρασης του κάθε γονιδίου, και αυτό γιατί οι επιγενετικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν τη λειτουργία ενός γονιδίου είναι αποτέλεσμα διαφορετικών περιβαλλοντικών επιδράσεων (319).

Τα στρεσογόνα ερεθίσματα που δέχεται ένας οργανισμός ενεργοποιούν τις ορμόνες του άξονα του στρες (HPA axis) (317). Τα γλυκοκορτικοειδή, που είναι τα τελικά προϊόντα του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων, μαζί με τους υποδοχείς τους διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στους διάφορους κυτταρικούς τύπους επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων, μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της ακετυλίωσης των ιστονών (8, 32, 34). Καταλήγουμε λοιπόν, στο γεγονός ότι εκτός από τη γενετική (δηλαδή, η αρχιτεκτονική του γονιδιώματος και οι πολυμορφισμοί) σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση του φαινότυπου έχει και η επιγενετική, καθώς διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα επιδρούν στις επιγενετικές διεργασίες και οδηγούν σε διαφορετικό φαινότυπο (320). Η ηλικία, το φύλο, το γενετικό υπόβαθρο, καθώς, και η διάρκεια αλλά και η ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν και επηρεάζουν την απόκριση του κάθε οργανισμού στο στρες (321).

## 5.2 Μελέτη γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη

### 5.2.1 Μελέτη της επίδρασης της Επιλόχειου Κατάθλιψης στο μεταβολομικό προφίλ των γυναικών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο στόχος στην παρούσα μελέτη ήταν να μελετήσουμε και να εντοπίσουμε τις διαφορές στα μεταβολικά μονοπάτια μεταξύ των γυναικών που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη (ομάδα PPD) και αυτών που δεν εμφάνισαν (ομάδα μαρτύρων). Γενικότερα, οι προσεγγίσεις των -omics έχουν τη δυνατότητα να διαλευκάνουν στους μοριακούς μηχανισμούς των ψυχιατρικών διαταραχών με υψηλή απόδοση και ευαισθησία (322). Οι μεταβολικές αναλύσεις παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις νευροψυχιατρικές παθήσεις, καθώς ο μεταβολισμός συσχετίζεται άμεσα με τον φαινότυπο και είναι πολύ ευαίσθητος σε περιβαλλοντικές αλλαγές και στρεσογόνους παράγοντες (323, 324). Οι μεταβολίτες είναι τα τελικά προϊόντα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης, της πρωτεϊνικής λειτουργίας και των περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι, το μεταβολομικό προφίλ των ατόμων είναι πολλά υποσχόμενο για τον εντοπισμό μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στην αντικαταθλιπτική απόκριση και στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (325). Για τη μελέτη της κατάθλιψης έχουν ήδη εφαρμοστεί μεταβολικές προσεγγίσεις τόσο σε ομάδες ασθενών όσο και σε ζωικά μοντέλα (326, 327). Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι επηρεάζονται τα επίπεδα τριών μεταβολιτών στον ορό του αίματος των γυναικών, αυτοί οι μεταβολίτες είναι η δισουλφιδική γλουταθειόνη, το αδενυλοηλεκτρικό και το ATP.

Η *γλουταθειόνη* (GSH-ανηγμένη μορφή) είναι μια θειόλη μικρής μοριακής μάζας και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες μετατρέπεται σε δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG-οξειδωμένη μορφή) (328). Η οξειδοαναγωγή που συμβαίνει μεταξύ της γλουταθειόνης και της δισουλφιδικής γλουταθειόνης είναι ένα σημαντικό ρυθμιστικό στοιχείο για τους οργανισμούς και είναι υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική αποτοξίνωση (329). Η αναλογία GSSG/GSH θεωρείται προγνωστικός δείκτης για το οξειδωτικό στρες (328, 330). Τόσο τα επίπεδα της γλουταθειόνης όσο και ο λόγος GSSG/GSH στα πρόωρα νεογνά με σύνδρομο ιδιοπαθούς αναπνευστικής ανεπάρκειας αυξάνονται σε σύγκριση με τα τελειόμηνα υγιή νεογνά (331). Το οξειδωτικό στρες και οι δείκτες που σχετίζονται με αυτό παρατηρείται ότι αυξάνονται σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από καταθλιπτικές διαταραχές (332-334). Η γλουταθειόνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που προστατεύει τα κύτταρα από χημικούς στρεσογόνους παράγοντες (335). Ο μηχανισμός συσχέτισης μεταξύ του οξειδωτικού στρες

και της κατάθλιψης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, ωστόσο, αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην οξειδωτική βλάβη λόγω αυξημένων επιπέδων οξυγόνου και ελευθέρων ριζών (336). Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να επηρεάσουν τα πρότυπα μεθυλίωσης με την υδροξυλίωση των πυριμιδινών και των 5-μεθυλοκυτοσινών (337) και επηρεάζουν τις τροποποιήσεις των ιστονών μέσω ενδοκυτταρικών μεταβολιτών όπως το ακέτυλο-CoA και το NAD<sup>+</sup> (338).

Το *αδενυλοηλεκτρικό (S-AMP)* είναι ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων, που εμπλέκεται στη μετατροπή της μονοφωσφορικής ινοσίνης (IMP) σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP). Μεταβολές στην έκκριση του S-AMP έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην έκκριση της ινσουλίνης, και αυτός είναι ίσως και ο σημαντικότερος ρόλος του. Το S-AMP παίζει καταλυτικό ρόλο στη λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων ανθρώπων που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Οι μεταβολές που παρατηρούνται στα επίπεδα του S-AMP σχετίζονται και με την ενεργότητα των ενζύμων αδενυλοηλεκτρική συνθάση (ADSS) και αδενυλοηλεκτρική λύαση (ADSL). Η ADSS καταλύει τη μετατροπή του IMP σε S-AMP, ενώ η ADSL τη μετατροπή του S-AMP σε AMP (339).

Η *τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)* είναι ένας σημαντικός ενδιάμεσος μεταβολίτης που είναι πολύ σημαντικός για την εύρυθμη λειτουργία του μεταβολισμού και της σηματοδότησης σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς, καθώς επίσης και η κύρια πηγή ενέργειας για το κύτταρο. Υπάρχει μια σχέση αλληλεξάρτησης μεταξύ της δυναμικής της ATP και της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής φυσιολογίας (340). Επιπλέον, η ATP είναι ένας νευροδιαβιβαστής που δρα σε πουρινεργικούς υποδοχείς που υπάρχουν είτε στο προσυναπτικό κύτταρο είναι στο μετασυναπτικό. Σχεδόν όλοι οι τύποι εκκριτικών κυστιδίων από οποιοδήποτε είδος νευρώνα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ATP (341). Το ATP που προήλθε από αστροκύτταρα αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει καταθλιπτικές συμπεριφορές. Τα επίπεδα της ATP στον εγκέφαλο βρέθηκε ότι ήταν χαμηλότερα σε ποντίκια ευαίσθητα σε χρόνιο κοινωνικό στρες (265).

### **5.2.2 Επιβεβαίωση της επίδρασης της Επιλόχειου Κατάθλιψης σε έναν συμπληρωματικό πληθυσμό μελέτης**

Στη συνέχεια για να επιβεβαιώσουμε τις αλλαγές που παρατηρήσαμε στα επίπεδα της γλουταθειόνης που συσχετίστηκαν με την επιλόχειο κατάθλιψη των ασθενών, διερευνήσαμε περαιτέρω αλλαγές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες σε έναν συμπληρωματικό πληθυσμό επιβεβαίωσης ασθενών και μαρτύρων. Στον πληθυσμό αυτό παρατηρήθηκε

μειωμένη έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου Prdx3, ταυτόχρονα όμως παρατηρήσαμε ότι δεν μεταβλήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ασθενών με επιλόχειο κατάθλιψη σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η μειωμένη έκφραση του ενζύμου Prdx3 στην ομάδα με επιλόχειο κατάθλιψη ευθυγραμμίζεται με τη μειωμένη έκφραση της γλουταθειόνης, η οποία μπορεί να προκύψει από τα αυξημένα επίπεδα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης. Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι η πολύπλοκη αλληλεπίδραση διαφόρων αντιοξειδωτικών που εκτελούν συμπληρωματικές αντιοξειδωτικές λειτουργίες μπορεί να οδηγήσει σε μία συνολικά αμετάβλητη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Οι ανοσοχημικές και χρωματομετρικές βιοχημικές μέθοδοι δείχνουν σημαντικά χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη μεταβολομική ανάλυση που έχει ως βάση τη φασματομετρία μάζας. Η ικανότητα εντοπισμού μεταβολιτών, οι οποίοι δεν είναι ανιχνεύσιμοι με συμβατικές βιοχημικές μεθοδολογίες, υπογραμμίζει την ανάγκη χρήσης μεταβολικών προσεγγίσεων για τον εντοπισμό των μεταβολιτών σε χαμηλά επίπεδα. Αυτή η προσέγγιση έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για πολυπαραγοντικές διαταραχές όπως η επιλόχειος κατάθλιψη, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ήπιες αλλαγές σε πολλούς παράγοντες. Επιπλέον, η υψηλή ευαισθησία της μεταβολομικής που έχει ως βάση τη φασματομετρία μάζας είναι καταλληλότερη για τη διερεύνηση περιφερικού υλικού σε εγκεφαλικές διαταραχές, όπου δεν περιμένουμε να δούμε σημαντικές αλλαγές, καθώς οι μεταβολές της παθοφυσιολογίας που σχετίζονται με τον εγκέφαλο μειώνονται στην κυκλοφορία.

### **5.2.3 Διερεύνηση του μηχανισμού της Επιλόχειου Κατάθλιψης**

Μέχρι σήμερα, η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη μεταβολομικής σε ορό αίματος γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη. Γενικότερα, οι μεταβολομικές μελέτες για την επιλόχειο κατάθλιψη είναι περιορισμένες.

Στη βιβλιογραφία, υπάρχει μία εργασία μεταβολομικής ανάλυσης σε ούρα γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη, γυναικών που μετά τον τοκετό δεν εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη και σε ομάδα υγείων μαρτύρων. Σε αυτή τη μελέτη, εντοπίστηκαν συνολικά 68 μεταβολίτες και αναγνωρίστηκε μια ομάδα πέντε μεταβολιτών (μυρμηκικό, ηλεκτρικό, μεθυλοϊστιδίνη, γλυκόζη και διμεθυλαμίνη), τα επίπεδα των οποίων διαφέρουν μεταξύ της ομάδας των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι το ηλεκτρικό είναι μία πρόδρομη ένωση του αδενυλοηλεκτρικού (S-AMP), το οποίο βρέθηκε αυξημένο στον πληθυσμό των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη αυτής της μελέτης (342).

Υπάρχει και μια δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε επίσης σε ούρα γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη και έδειξε διαφορές στα μεταβολικά μονοπάτια μεταξύ των ασθενών και των υγείων γυναικών (343). Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στα ούρα των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη ήταν σημαντικά αυξημένη, κάτι που ταυτίζεται και με προηγούμενα ευρήματα σε ασθενείς με κατάθλιψη (344, 345). Επιπλέον, στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα του μεθυλομαλονικού οξέος, κάτι που έχει ήδη παρατηρηθεί σε ασθενείς με επιλόχειο κατάθλιψη (346, 347). Επίσης, στις γυναίκες με επιλόχειο κατάθλιψη παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της τυροσίνης, κάτι που παρατηρείται και σε ασθενείς με κατάθλιψη (348). Η τυροσίνη είναι μια πρόδρομη ένωση των κατεχολαμινών που δρουν στον εγκέφαλο.

Τέλος, υπάρχει ακόμα μία μελέτη στην οποία έγινε στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση σε δείγματα περιφερικού αίματος γυναικών που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη και έδειξε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στην τεστοστερόνη που προέρχεται από τη μητέρα και στα οιστρογόνα που προέρχονται από το έμβρυο και αυτό μπορεί να επηρεάσει τη διάθεση της μητέρας (349).

Πρέπει, βέβαια, να αναφερθεί ότι έχουν γίνει αρκετές μελέτες μεταβολομικής ανάλυσης σε ασθενείς (άντρες και γυναίκες) που πάσχουν από κατάθλιψη. Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μία έρευνα σε πλάσμα ασθενών που έπασχαν από κατάθλιψη και βρέθηκαν 23 μεταβολίτες που παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Μεταξύ αυτών των μεταβολιτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η φωσφοαιθανολαμίνη (PEA) που είναι απαραίτητη για την παραγωγή φωσφολιπιδίων (350). Επιπλέον, υπάρχει και άλλη μια μεταβολομική μελέτη σε πλάσμα ασθενών που πάσχουν από κατάθλιψη και βρέθηκε ότι επηρεάζονται τα επίπεδα 9 μεταβολιτών οι οποίοι συμμετέχουν στο GABAεργικό σύστημα, στο σεροτονινεργικό και στο κατεχολαμινεργικό σύστημα (326). Στο πλάσμα των ασθενών με κατάθλιψη βρέθηκε ότι επηρεάζονται τα επίπεδα της τρυπτοφάνης, μιας πρόδρομης ένωσης της σεροτονίνης (326). Υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι τα επίπεδα της σεροτονίνης παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της κατάθλιψης καθώς και στην εξέλιξη της νόσου (351, 352).

Αναμφίβολα, ο γυναικείος πληθυσμός εμφανίζει έως και δύο φορές μεγαλύτερη ευαισθησία στην εμφάνιση συμπτωμάτων κατάθλιψης (353). Η διαφορετική αντίδραση ξεκινά από τα πρώτα στάδια της ζωής και συνεχίζεται μέχρι και την ενήλικη ζωή. Τα χρόνια αναπαραγωγής έχουν χαρακτηριστεί από ορισμένους ως «παράθυρο ευπάθειας». Η ευαισθησία έχει αναφερθεί ότι είναι ιδιαίτερα υψηλή κατά τη μετάβαση στην εμμηνόπαυση, αλλά δεν έχει διευκρινιστεί αν υπάρχει άμεση σχέση με την αναπαραγωγική κατάσταση

(354). Η τεστοστερόνη έχειδειχθεί ότι έχει προστατευτικό ρόλο στους άντρες και οι γυναίκες με κατάθλιψη έχουν χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (355). Υπάρχουν δημοσιεύσεις στις οποίες παρατηρήθηκαν διαφορές στο ντοπαμινεργικό, νοραδρενεργικό και σεροτονινεργικό σύστημα μεταξύ των δύο φύλων (356), καθώς επίσης και διαφορές στον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (357). Επίσης, στις γυναίκες βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της CRP (C-reactive protein) και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων κατάθλιψης, κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε στον αντρικό πληθυσμό (358).

Όπως συμβαίνει με την κατάθλιψη γενικότερα σαν ασθένεια, έτσι και με την επιλόχειο κατάθλιψη οι βασικοί μηχανισμοί δεν είναι σαφείς. Αν και υπάρχουν μελέτες που έχουν εντοπίσει πιθανούς βιοδείκτες για την κατάθλιψη, οι ρόλοι τους δεν είναι σαφείς και δεν μπόρεσαν να βελτιώσουν την πρόγνωση, τη διάγνωση και τη θεραπεία και αυτό γιατί πρόκειται για μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια συμπτωμάτων (359). Υπάρχουν κάποια στοιχεία που δείχνουν ότι οι στεροειδείς ορμόνες μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου (360). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών μετά τον τοκετό διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα σε γυναίκες που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη, κάτι που έχει παρατηρηθεί επίσης σε ασθενείς που πάσχουν από κατάθλιψη, το οποίο μπορεί να δηλώνει έναν πιθανό υποκείμενο μηχανισμό της επιλόχειο κατάθλιψης (361). Έχει βρεθεί ότι η μειωμένη συγκέντρωση ωκυτοκίνης στο πλάσμα κατά το τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, είναι σημάδι αυξημένης προδιάθεσης για εμφάνιση επιλόχειο κατάθλιψης (362), γι' αυτό το λόγο η ωκυτοκίνη μελετήθηκε περαιτέρω για την επίδρασή της στην κατάθλιψη (363). Εκτός από αυτά τα ευρήματα όμως, υπάρχει και μία μελέτη σε ζωικά μοντέλα που έδειξε ότι υπήρχε διαταραχή στην ισορροπία των επιπέδων των μεταβολιτών στον εγκέφαλο του αρουραίου με επιλόχειο κατάθλιψη (364).



## **5.3 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

### ***5.3.1 Μελέτη πρόωρων νεογνών και νεογνών με μικρό βάρος γέννησης***

Μολονότι το δείγμα του πληθυσμού των νεογνών που μελετήθηκε δεν είναι πολύ μεγάλο, πρόκειται για έναν πολύ καλά χαρακτηρισμένο πληθυσμό. Όμως, μια μελέτη σε εκτενέστερο δείγμα νεογνών με μικρό βάρος γέννησης ή/και πρόωρο τοκετό θα μπορούσε να ενισχύσει τα συμπεράσματα που έχουν διεξαχθεί. Παράλληλα, μία μελέτη σε ζευγάρια (μητέρες-νεογνά) θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για να συσχετιστεί το στρες που έχει βιώσει η μητέρα κατά την εγκυμοσύνη, καθώς και το γενετικό και επιγενετικό της προφίλ με το βάρος γέννησης του νεογνού ή/και την προωρότητα. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, θα μπορούσαν να φτιαχτούν ομάδες γυναικών (π.χ. γυναίκες πρόσφυγες, γυναίκες που μεγαλώνουν μόνες τα παιδιά) για να συγκριθούν τα αποτελέσματα και να διεξαχθούν πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα.

### ***5.3.2 Μελέτη γυναικών με Επιλόχειο Κατάθλιψη***

Αν και το δείγμα του πληθυσμού των γυναικών με επιλόχειο κατάθλιψη που αναλύθηκε είναι μικρό, πρόκειται για μια καλά χαρακτηρισμένη ομάδα με ομοιογενή δημογραφικά χαρακτηριστικά (γυναίκες που ζουν στην ίδια περιοχή και ήταν εγκυμονούσες την ίδια περίοδο). Ωστόσο, απαιτούνται μελλοντικές μελέτες σε μεγαλύτερο δείγμα και άλλες ομάδες με επιλόχειο κατάθλιψη για την επικύρωση των αποτελεσμάτων μας. Η διερεύνηση πρόσθετων ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα και τις βιοσυνθετικές διεργασίες θα βοηθούσε να εξηγηθεί ο ρόλος αυτών των οδών στην παθογένεση της επιλόχειου κατάθλιψης. Επίσης, ένας μελλοντικός στόχος είναι ο συνδυασμός των μεταβολικών αποτελεσμάτων με γενετικά και επιγενετικά δεδομένα που μπορεί να αποκαλύψει προδιαθεσικούς δείκτες κινδύνου πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών.

### ***5.3.3 Συνδυαστική μελέτη σε μητέρες και νεογνά***

Μελετώντας την επίδραση του στρες σε δύο διαφορετικές ομάδες πληθυσμού, σε νεογνά που γεννήθηκαν πρόωρα ή/και με μικρό βάρος γέννησης και σε γυναίκες που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη, διαπιστώθηκε ότι το στρες και ο τρόπος που ο κάθε οργανισμός αποκρίνεται σε αυτό μπορεί να επηρεάσει τη ζωή του.

Μελλοντικά, η μελέτη θα μπορούσε να επεκταθεί σε ζεύγη μητέρων-νεογνών για να συσχετιστεί το στρες που έχει βιώσει η μητέρα πριν ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με το προφίλ της γυναίκας την περίοδο μετά τη γέννηση του παιδιού και την προδιάθεση να εμφανίσει επιλόχειο κατάθλιψη. Παράλληλα, θα μελετάται και το προφίλ των παιδιών τους, και η επίδραση της ψυχολογίας της μητέρας σε αυτά. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να εστιάσει στο μεταβολομικό προφίλ του πληθυσμού μελέτης και στο επιγενετικό προφίλ, το πρότυπο του οποίου επηρεάζεται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

## 6. Περίληψη

Το μητρικό στρες, το άγχος ή η κατάθλιψη που μπορεί να βιώνει η μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αποτελούν δυσμενές ενδομήτριο περιβάλλον για το έμβρυο και έχουν συσχετιστεί με το μικρό βάρος γέννησης και τον πρόωρο τοκετό. Το μικρό βάρος γέννησης και η προωρότητα, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα του νεογνού και μπορεί να είναι αποτέλεσμα των πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών που έχει βιώσει το έμβρυο επηρεάζοντας τη μετέπειτα ζωή του. Το ενδομήτριο στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου και διαμορφώνει την απόκρισή του στο στρες, η οποία ρυθμίζεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και τον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων. Το ενδομήτριο στρες διαμορφώνει το εμβρυϊκό επιγενετικό προφίλ, που σε συνδυασμό με το γενετικό προφίλ του κάθε ατόμου καθορίζει την ευαισθησία του ή την ανθεκτικότητά του στο στρες. Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στη γενετική και επιγενετική συγκεκριμένων γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με τον πρόωρο τοκετό, το μικρό βάρος του νεογνού και το στρες. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *MBL2* πιθανόν να αποτελούν δείκτη αυξημένης προδιάθεσης για πρόωρο τοκετό ή νεογνό με μικρό βάρος γέννησης καθώς επίσης και κίνδυνο εμφάνισης νεογνικών λοιμώξεων, ενώ οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *FKBP5* και *SLC6A4* έχουν συσχετιστεί με την απόκριση στο στρες. Επίσης, ανάλογα με τα επίπεδα στρες που δέχεται το κάθε άτομο αλλά και την διαχείρισή του, μπορεί να αλλάζει η κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA του γονιδίου *FKBP5*. Τέλος, το γονίδιο *HLA-G*, του οποίου μελετήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης εκφράζεται στον πλακούντα και επηρεάζει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

Εκτός από το στρες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, κάποιες μητέρες, μετά τον τοκετό έχουν πιθανότητα να εμφανίσουν επιλόχειο κατάθλιψη. Πρόκειται για μια σοβαρή ψυχική διαταραχή που επηρεάζει περίπου το 15% των γυναικών και συνήθως εμφανίζεται μέσα στον πρώτο χρόνο μετά τον τοκετό. Αυτή η μορφή κατάθλιψης επηρεάζει εκτός από τη μητέρα, και την ανάπτυξη του νεογνού, το οποίο εκλαμβάνει τα ερεθίσματα και διαμορφώνει ανάλογα τον τρόπο ανταπόκρισης. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί της επιλόχειου κατάθλιψης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί.

Τον πληθυσμό μελέτης αποτελούσαν 83 καλά χαρακτηρισμένα δείγματα νεογνών. Η ομάδα μικρού βάρους γέννησης/προωρότητας αποτελούνταν από 51 δείγματα, ενώ η ομάδα φυσιολογικού βάρους/τελειόμηνου τοκετού από 32 δείγματα (μάρτυρες). Πειραματικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση πολυμορφισμών των γονιδίων *MBL2*, *FKBP5* και *SLC6A4*, και ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης DNA των γονιδίων *FKBP5* και *HLA-G*.

Προκειμένου να διερευνήσουμε πιθανούς μηχανισμούς και αλλαγές που εμπλέκονται στην επιλόχειο κατάθλιψη, μελετήσαμε σε ορό αίματος δειγμάτων μίας καλά χαρακτηρισμένης ομάδας γυναικών που εμφάνισαν επιλόχειο κατάθλιψη (n=18) και μίας ομάδας γυναικών απουσία αυτής της διάγνωσης (μάρτυρες) (n=17). Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία πλατφόρμα στοχευμένης μεταβολομικής που βασίζεται στην τεχνολογία της φασματομετρίας μάζας και στην οποία μετρήθηκαν τα επίπεδα περίπου 300 μεταβολιτών.

Στη μελέτη των νεογνών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων για τον πολυμορφισμό rs1800451 του γονιδίου *MBL2*, κάτι που ενισχύεται μέσω της διερεύνησης συσχέτισης του πολυμορφισμού αυτού με τα στοιχεία προωρότητας ή/και μικρού βάρους γέννησης που χαρακτηρίζουν το δείγμα. Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνεται και σε άλλες μελέτες της πρόσφατης βιβλιογραφίας. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια αυξημένη τάση εμφάνισης του αλληλομόρφου «κινδύνου» T του γονιδίου *FKBP5* στην ομάδα των πρόωρων νεογνών. Επίσης, το G αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs25531 του γονιδίου *SLC6A4* εμφανίζεται μόνο στα πρόωρα νεογνά και καθόλου στην ομάδα μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι συμφωνούν με τη βιβλιογραφία καθώς τόσο το T αλληλόμορφο (rs1360780) όσο και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *SLC6A4* έχουν συσχετιστεί με στρεσογόνες καταστάσεις (κατάθλιψη, μητρική αποστέρηση κ.ά). Η ανάλυση μεθυλίωσης DNA του γονιδίου *HLA-G*, η έκφραση του οποίου έχει επιπτώσεις στην άμυνα του οργανισμού, έδειξε ότι δύο θέσεις της περιοχής ανάλυσης έχουν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης DNA στο δείγμα των πρόωρων νεογνών.

Στον πληθυσμό μελέτης της επιλόχειο κατάθλιψης παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα μεταβολιτών που σχετίζονται με μονοπάτια βιοσύνθεσης αμινοξέων, στερολών, καθώς και με το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης, της ATP και του αδενυλοηλεκτρικού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως οι αλλαγές στα επίπεδα των μεταβολιτών είναι ανιχνεύσιμες και σε περιφερικό υλικό, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί έτσι ώστε να έχουμε πιο έγκαιρη διάγνωση της νόσου.

Από τα παραπάνω ευρήματα, συμπεραίνουμε ότι η έκθεση ενός οργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής του, και ιδιαίτερα προγεννητικά, είναι καθοριστική. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται να συμφωνούν με αυτά μελετών σε αντίστοιχες ομάδες πληθυσμών που έχουν βιώσει στρεσογόνες καταστάσεις.

## 7. Abstract

Maternal stress, anxiety or depression during pregnancy are early life adverse experiences and have been associated with low birth weight and prematurity. These are considered to be risk factors for morbidity and mortality that may influence future health and disease susceptibility. Intrauterine stress affects the development of the fetus and modulates its response to stress, which is mediated by the autonomic nervous system and the HPA axis regulation. Intrauterine stress shapes the fetal epigenetic profile, which in combination with the genetic profile of each individual determines susceptibility or resistance to stress. This study is focused on genetics and epigenetics of specific genes related to low birth weight, prematurity and stress. *MBL2* gene polymorphisms may be indicative of an increased predisposition to preterm birth or low birth weight, as well as, risk for developing neonatal infections, while *FKBP5* and *SLC6A4* gene polymorphisms are related to each individual's response to stress. Additionally, depending on the stress exposure of each individual and the vulnerability to stress, the *FKBP5* DNA methylation status can also be affected. The *HLA-G* gene is expressed in the placenta and is implicated in the immune response mechanisms.

After giving birth, some mothers are more likely to experience postpartum depression. This serious mental disorder affects about 15% of women and usually occurs within the first year after giving birth. This disorder, apart from the mother, influences also the development of the newborn, which shapes the response to the environmental stimuli. The molecular mechanisms of postpartum depression need to be further elucidated.

83 well-characterized newborns were included in this study. 51 of them had low birth weight and/or prematurity, and the residual 32 were full-term with normal birth weight (controls). Genomic DNA was isolated from peripheral blood and *MBL2*, *FKBP5* and *SLC6A4* gene polymorphisms, as well as DNA methylation levels of *FKBP5* and *HLA-G* genes, were analyzed.

Aiming to further investigate postpartum depression related mechanisms, we explored the metabolomics profile in the blood sera of women with postpartum depression (n= 18) compared to matched controls (n= 17). A mass spectrometry- based targeted metabolic platform was used to evaluate the levels of approximately 300 metabolites.

In our study population, a statistically significant difference was found between the two groups of newborns for the rs1800451 polymorphism of the *MBL2* gene, which was enhanced by a correlational analysis between this polymorphism and prematurity and low birth weight. This correlation is confirmed in other studies of the recent literature. Furthermore, an increased tendency for the "risk" T allele of the *FKBP5* gene was observed in the preterm infants group. In addition, the G allele of the rs25531 polymorphism of the *SLC6A4* gene occurs only in the preterm compared to the full-term infants. These results seem to be consistent with the literature as both the risk T allele (rs1360780) and the polymorphisms of the *SLC6A4* gene have been associated with stressful experiences (depression, maternal sterility, etc.). The DNA methylation analysis of specific CpG regions in the *HLA-G* gene revealed lower levels in the preterm group compared to controls.

Alterations in metabolites of amino acids and sterols biosynthetic pathways and oxidative stress were detected in the analyzed sample (women with or without postpartum depression). More specifically, changes in glutathione disulfide, ATP and adenyly succinate levels were observed. These results indicate that metabolites levels alterations in the peripheral material can be used as diagnostic markers of the disease.

In conclusion, our findings suggest that the exposure of an organism to intrauterine and early- life stress, is decisive. The results of this study seem to be in line with those of studies in respective population groups that have experienced stressful life events.

## 8. Βιβλιογραφία

iGenetics Μια Μεντελική Προσέγγιση, Peter J. Russell, Reed College Ακαδημαϊκές Εκδόσεις

1. Pervanidou P, Makris G, Chrousos G, Agorastos A. Early Life Stress and Pediatric Posttraumatic Stress Disorder. *Brain Sci.* 2020;10(3).
2. Kalueff AV, Wheaton M, Murphy DL. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav Brain Res.* 2007;179(1):1-18.
3. Levine J, Cole DP, Chengappa KN, Gershon S. Anxiety disorders and major depression, together or apart. *Depress Anxiety.* 2001;14(2):94-104.
4. Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron.* 2000;28(2):335-41.
5. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(7):374-81.
6. Nicolaides NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation.* 2015;22(1-2):6-19.
7. Provencal N, Binder EB. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. *Exp Neurol.* 2015;268:10-20.
8. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 1984;5(1):1-24.
9. Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(6):853-66.
10. Omar HR, Komarova I, El-Ghonemi M, Fathy A, Rashad R, Abdelmalak HD, et al. Licorice abuse: time to send a warning message. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2012;3(4):125-38.
11. Dimitriadis K, Tsioufis C, Iliakis P, Kasiakogias A, Andrikou I, Leontsinis I, et al. Future Anti-aldosterone Agents. *Curr Pharm Des.* 2018;24(46):5548-54.
12. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S258-68.
13. Weaver IC, Diorio J, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:182-212.
14. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7(8):847-54.
15. Olson MV. Human genetic individuality. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:1-27.
16. Pena SD, Prado VF, Epplen JT. DNA diagnosis of human genetic individuality. *J Mol Med (Berl).* 1995;73(11):555-64.
17. Elston RC, Satagopan JM, Sun S. Genetic terminology. *Methods Mol Biol.* 2012;850:1-9.

18. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered.* 1971;21(6):523-42.
19. Koseki H. Epigenetics in development: Decorating the genome to show or hide? *Development, growth & differentiation.* 2010;52(6):481-.
20. Feil R. Epigenetics, an emerging discipline with broad implications. *Comptes rendus biologiques.* 2008;331(11):837-43.
21. Ismail S, Essawi M. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics.* 2012;1(2):57-63.
22. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:289-320.
23. Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gaceta medica de Mexico.* 2017;153(2):238-50.
24. El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000;404(6776):398-402.
25. Grover A, Sharma P. Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology.* 2016;36(2):290-302.
26. Igo Jr RP, Kinzy TG, Cooke Bailey JN. Genetic risk scores. *Current protocols in human genetics.* 2019;104(1):e95.
27. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10-3.
28. Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet.* 1994;15(6):453-7.
29. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007;447(7143):407-12.
30. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(3):266-72.
31. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* 1998;17(17):4905-8.
32. Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron.* 2011;70(5):813-29.
33. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron.* 2008;60(6):961-74.
34. Weaver IC. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. *Nature versus nurture: let's call the whole thing off. Epigenetics.* 2007;2(1):22-8.
35. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* 2002;108(4):475-87.
36. Cavalli G, Paro R. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science.* 1999;286(5441):955-8.



37. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 2001;292(5514):110-3.
38. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*. 2003;300(5616):131-5.
39. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
40. Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, et al. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet*. 2002;30(3):329-34.
41. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*. 2002;415(6873):810-3.
42. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):87-95.
43. Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat*. 2010;192(5):261-74.
44. Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K. Epigenome mapping in normal and disease States. *Circ Res*. 2010;107(3):327-39.
45. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15763-73.
46. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet*. 1997;31:493-525.
47. Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet*. 2007;39(3):391-6.
48. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol*. 2005;204(1):21-35.
49. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research*. 1982;10(8):2709-21.
50. Baniushin BF. [Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes]. *Mol Biol (Mosk)*. 2005;39(4):557-66.
51. Vanyushin BF. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(5):488-99.
52. Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010;5(12):e15367.
53. Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):395-401.

54. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci.* 2009;12(3):342-8.
55. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *J Neurosci.* 2012;32(44):15626-42.
56. Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(6):306-8.
57. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(4):495-501.
58. Weintraub H. Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell.* 1985;42(3):705-11.
59. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol.* 2001;195(1):97-110.
60. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-6.
61. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393(6683):386-9.
62. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4035-40.
63. King K, Murphy S, Hoyo C. Epigenetic regulation of Newborns' imprinted genes related to gestational growth: patterning by parental race/ethnicity and maternal socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health.* 2015;69(7):639-47.
64. Papadopoulou Z, Vlaikou AM, Theodoridou D, Markopoulos GS, Tsoni K, Agakidou E, et al. Stressful Newborn Memories: Pre-Conceptual, In Utero, and Postnatal Events. *Front Psychiatry.* 2019;10:220.
65. Skibieli A, Peñagaricano F, Amorín R, Ahmed B, Dahl G, Laporta J. In utero heat stress alters the offspring epigenome. *Scientific reports.* 2018;8(1):1-15.
66. Green BB, Kappil M, Lambertini L, Armstrong DA, Guerin DJ, Sharp AJ, et al. Expression of imprinted genes in placenta is associated with infant neurobehavioral development. *Epigenetics.* 2015;10(9):834-41.
67. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2015;48:70-91.
68. Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol Rev.* 2014;94(1):189-234.

69. Hartman S, Belsky J. Prenatal programming of postnatal plasticity revisited-And extended. *Development and psychopathology*. 2018;30(3):825-42.
70. Class QA, Lichtenstein P, Langstrom N, D'Onofrio BM. Timing of prenatal maternal exposure to severe life events and adverse pregnancy outcomes: a population study of 2.6 million pregnancies. *Psychosom Med*. 2011;73(3):234-41.
71. Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(2):237-58.
72. Slykerman RF, Thompson J, Waldie K, Murphy R, Wall C, Mitchell EA. Maternal stress during pregnancy is associated with moderate to severe depression in 11-year-old children. *Acta paediatrica*. 2015;104(1):68-74.
73. Rondo PH, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MC, Lobert H, Artes R. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(2):266-72.
74. Mansell T, Novakovic B, Meyer B, Rzehak P, Vuillermin P, Ponsonby AL, et al. The effects of maternal anxiety during pregnancy on IGF2/H19 methylation in cord blood. *Transl Psychiatry*. 2016;6:e765.
75. Janssen AB, Capron LE, O'Donnell K, Tunster SJ, Ramchandani PG, Heazell AE, et al. Maternal prenatal depression is associated with decreased placental expression of the imprinted gene PEG3. *Psychol Med*. 2016;46(14):2999-3011.
76. Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Meyer AH, Meinlschmidt G. Maternal psychosocial adversity during pregnancy is associated with length of gestation and offspring size at birth: evidence from a population-based cohort study. *Psychosom Med*. 2010;72(4):419-26.
77. Grote NK, Bridge JA, Gavin AR, Melville JL, Iyengar S, Katon WJ. A meta-analysis of depression during pregnancy and the risk of preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth restriction. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(10):1012-24.
78. Grigoriadis S, VonderPorten EH, Mamisashvili L, Tomlinson G, Dennis CL, Koren G, et al. The impact of maternal depression during pregnancy on perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. 2013;74(4):e321-41.
79. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311(6998):171-4.
80. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2(8663):577-80.
81. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986;1(8489):1077-81.
82. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341(8850):938-41.

83. Fatima M, Srivastav S, Mondal AC. Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2017;60:1-7.
84. Murgatroyd C, Spengler D. Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Curr Psychiatry Rep*. 2012;14(2):138-49.
85. Su X, Wellen KE, Rabinowitz JD. Metabolic control of methylation and acetylation. *Current opinion in chemical biology*. 2016;30:52-60.
86. Daskalaki MG, Tsatsanis C, Kampranis SC. Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6495-507.
87. Qadir MI, Anwer F. Epigenetic modification related to acetylation of histone and methylation of DNA as a key player in immunological disorders. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2019;29(1).
88. Binder EB. Dissecting the molecular mechanisms of gene x environment interactions: implications for diagnosis and treatment of stress-related psychiatric disorders. *Eur J Psychotraumatol*. 2017;8(sup5):1412745.
89. DePrince AP, Weinzierl KM, Combs MD. Executive function performance and trauma exposure in a community sample of children. *Child Abuse Negl*. 2009;33(6):353-61.
90. Pollak SD. Multilevel developmental approaches to understanding the effects of child maltreatment: Recent advances and future challenges. *Development and psychopathology*. 2015;27(4 Pt 2):1387-97.
91. Catale C, Bussone S, Iacono LL, Viscomi MT, Palacios D, Troisi A, et al. Exposure to different early-life stress experiences results in differentially altered DNA methylation in the brain and immune system. *Neurobiology of stress*. 2020;13:100249.
92. Waterland RA. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:337-55.
93. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(5):811-6.
94. Sutton EF, Gilmore LA, Dunger DB, Heijmans BT, Hivert MF, Ling C, et al. Developmental programming: State-of-the-science and future directions-Summary from a Pennington Biomedical symposium. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(5):1018-26.
95. Sun D, Chen K, Wang J, Zhou L, Zeng C. In-utero cold stress causes elevation of blood pressure via impaired vascular dopamine D1 receptor in offspring. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2020;42(2):99-104.
96. Wu Y, Kapse K, Jacobs M, Niforatos-Andescavage N, Donofrio MT, Krishnan A, et al. Association of Maternal Psychological Distress With In Utero Brain Development in Fetuses With Congenital Heart Disease. *JAMA pediatrics*. 2020;174(3):e195316-e.

97. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(2):179-97.
98. Rose G. Familial Patterns in Ischaemic Heart Disease. *Br J Prev Soc Med.* 1964;18:75-80.
99. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601.
100. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60:5-20.
101. Santarelli S, Lesuis SL, Wang XD, Wagner KV, Hartmann J, Labermaier C, et al. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(6):907-18.
102. Gillman MW. Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1848-50.
103. Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, et al. Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. *Endocrinology.* 2015;156(10):3416-21.
104. Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol.* 2019;242(1):T105-T19.
105. Susser E, Hoek H, Brown A. Neurodevelopmental disorders after prenatal famine: the story of the Dutch famine study. *American Journal of Epidemiology.* 1998;147:213-6.
106. Hoek H, Susser E, Buck K, Lumey L, Lin S, Gorman J. Schizoid personality disorder after prenatal exposure to famine. *American Journal of Psychiatry.* 1996;153:1637-9.
107. Vickers M, Breier B, Cutfield W, Hofman P, Gluckman P. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism.* 2000;279:E83-E7.
108. Vehaskari V, Aviles D, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney International.* 2001;59:238-45.
109. Goyal R, Longo L. Maternal protein deprivation: sexually dimorphic programming of hypertension in the mouse. *Hypertension Research.* 2013;36:29-35.
110. Goyal R, Goyal D, Leitzke A, Gheorghe C, Longo L. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reproductive sciences.* 2010;17:227-38.
111. Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L, et al. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatric research.* 2003;54:83-90.
112. Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Hormone and IGF Research.* 2003;13(Supplement A):S34-S7.
113. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental origins of chronic disease. *Physiological reviews.* 2016;96(4):1509-65.

114. Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reproduction, Fertility and Development*. 2005;18(2):63-9.
115. Wasserzug-Pash P, Klutstein M. Epigenetic changes in mammalian gametes throughout their lifetime: the four seasons metaphor. *Chromosoma*. 2019;128(3):423-41.
116. Wei Y, Schatten H, Sun Q-Y. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Human Reproduction Update*. 2014;21(2):194-208.
117. Agarwal P, Morriveau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(2):71-101.
118. Bodamer OA, Mitterer G, Maurer W, Pollak A, Mueller MW, Schmidt WM. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphisms and pre-term birth. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2006;8(8):518-24.
119. Koroglu OA, Onay H, Erdemir G, Yalaz M, Cakmak B, Akisu M, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants. *Neonatology*. 2010;98(4):305-12.
120. Lubchenco LO, Searls DT, Brazie JV. Neonatal mortality rate: relationship to birth weight and gestational age. *J Pediatr*. 1972;81(4):814-22.
121. Shin SM, Chang YP, Lee ES, Lee YA, Son DW, Kim MH, et al. Low birth weight, very low birth weight rates and gestational age-specific birth weight distribution of Korean newborn infants. *J Korean Med Sci*. 2005;20(2):182-7.
122. Lo JO, Roberts VHJ, Schabel MC, Wang X, Morgan TK, Liu Z, et al. Novel Detection of Placental Insufficiency by Magnetic Resonance Imaging in the Nonhuman Primate. *Reproductive sciences*. 2018;25(1):64-73.
123. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(4):e61627.
124. Gill SV, May-Benson TA, Teasdale A, Munsell EG. Birth and developmental correlates of birth weight in a sample of children with potential sensory processing disorder. *BMC Pediatr*. 2013;13:29.
125. Jeric M, Roje D, Medic N, Strinic T, Mestrovic Z, Vulic M. Maternal pre-pregnancy underweight and fetal growth in relation to institute of medicine recommendations for gestational weight gain. *Early Hum Dev*. 2013;89(5):277-81.
126. Egger M, Muhlemann K, Aebi C, Tauber MG. [Infections in pregnancy]. *Ther Umsch*. 1999;56(10):577-82.
127. Luoto R, Ruuskanen O, Holmberg K, Waris M, Peltola V, Lehtonen L. [Neonatal virus infections]. *Duodecim*. 2014;130(20):2071-7.
128. Tarlow MJ. Epidemiology of neonatal infections. *J Antimicrob Chemother*. 1994;34 Suppl A:43-52.

129. Mazzucchelli I, Garofoli F, Angelini M, Tinelli C, Tziella C, Decembrino L. Rapid detection of bacteria in bloodstream infections using a molecular method: a pilot study with a neonatal diagnostic kit. *Molecular biology reports*. 2020;47(1):363-8.
130. Zhang Y, Hu A, Andini N, Yang S. A 'culture'shift: Application of molecular techniques for diagnosing polymicrobial infections. *Biotechnology advances*. 2019;37(3):476-90.
131. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171-84.
132. Kumar SK, Bhat BV. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol Lett*. 2016;173:42-54.
133. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1821):20143085.
134. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. 2017;46(3):350-63.
135. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, Davidson B, Salles E, Bhatia J, et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Front Immunol*. 2018;9:1759.
136. Marodi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun*. 2006;74(4):1999-2006.
137. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, et al. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*. 2011;12(3):189-94.
138. Ygberg S, Nilsson A. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta paediatrica*. 2012;101(2):120-7.
139. Meek JY, Tompson M, Pugh LC, Stanton RW, Blankenship J. In support of breastfeeding. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(6):982.
140. Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J, Peault B. Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1061-5.
141. Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol Res*. 1998;18(2):61-78.
142. Rich JL, Byrne JM, Curryer C, Byles JE, Loxton D. Prevalence and correlates of depression among Australian women: a systematic literature review, January 1999- January 2010. *BMC Res Notes*. 2013;6:424.
143. Van de Velde S, Bracke P, Levecque K. Gender differences in depression in 23 European countries. Cross-national variation in the gender gap in depression. *Soc Sci Med*. 2010;71(2):305-13.
144. Bloch M, Rotenberg N, Koren D, Klein E. Risk factors associated with the development of postpartum mood disorders. *J Affect Disord*. 2005;88(1):9-18.
145. Henshaw C, Foreman D, Cox J. Postnatal blues: a risk factor for postnatal depression. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2004;25(3-4):267-72.

146. Miller LJ. Postpartum depression. *JAMA*. 2002;287(6):762-5.
147. Gaillard A, Le Strat Y, Mandelbrot L, Keita H, Dubertret C. Predictors of postpartum depression: prospective study of 264 women followed during pregnancy and postpartum. *Psychiatry Res*. 2014;215(2):341-6.
148. O'Hara MW, Schlechte JA, Lewis DA, Wright EJ. Prospective study of postpartum blues. Biologic and psychosocial factors. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;48(9):801-6.
149. Field T. Postpartum depression effects on early interactions, parenting, and safety practices: a review. *Infant Behav Dev*. 2010;33(1):1-6.
150. Leigh B, Milgrom J. Risk factors for antenatal depression, postnatal depression and parenting stress. *BMC Psychiatry*. 2008;8:24.
151. Verreault N, Da Costa D, Marchand A, Ireland K, Dritsa M, Khalife S. Rates and risk factors associated with depressive symptoms during pregnancy and with postpartum onset. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2014;35(3):84-91.
152. Robertson E, Grace S, Wallington T, Stewart DE. Antenatal risk factors for postpartum depression: a synthesis of recent literature. *Gen Hosp Psychiatry*. 2004;26(4):289-95.
153. Bridge LR, Little BC, Hayworth J, Dewhurst J, Priest RG. Psychometric ante-natal predictors of post-natal depressed mood. *J Psychosom Res*. 1985;29(3):325-31.
154. Sidebottom AC, Hellerstedt WL, Harrison PA, Hennrikus D. An examination of prenatal and postpartum depressive symptoms among women served by urban community health centers. *Arch Womens Ment Health*. 2014;17(1):27-40.
155. Xu H, Ding Y, Ma Y, Xin X, Zhang D. Cesarean section and risk of postpartum depression: A meta-analysis. *J Psychosom Res*. 2017;97:118-26.
156. Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Rosa e Silva JC. Cesarean section as a cause of chronic pelvic pain. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;79(2):101-4.
157. Murphy DJ, Liebling RE, Verity L, Swingler R, Patel R. Early maternal and neonatal morbidity associated with operative delivery in second stage of labour: a cohort study. *Lancet*. 2001;358(9289):1203-7.
158. Blom EA, Jansen PW, Verhulst FC, Hofman A, Raat H, Jaddoe VW, et al. Perinatal complications increase the risk of postpartum depression. The Generation R Study. *BJOG*. 2010;117(11):1390-8.
159. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth*. 2000;85(1):109-17.
160. Eckerdal P, Georgakis MK, Kollia N, Wikstrom AK, Hogberg U, Skalkidou A. Delineating the association between mode of delivery and postpartum depression symptoms: a longitudinal study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018;97(3):301-11.
161. Caropreso L, de Azevedo Cardoso T, Eltayebani M, Frey BN. Preeclampsia as a risk factor for postpartum depression and psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Womens Ment Health*. 2019.



162. Hall EM, Shahidullah JD, Lassen SR. Development of postpartum depression interventions for mothers of premature infants: a call to target low-SES NICU families. *J Perinatol*. 2020;40(1):1-9.
163. Hall RAS, Hoffenkamp HN, Braeken J, Tooten A, Vingerhoets A, van Bakel HJA. Maternal psychological distress after preterm birth: Disruptive or adaptive? *Infant Behav Dev*. 2017;49:272-80.
164. Melville JL, Gavin A, Guo Y, Fan MY, Katon WJ. Depressive disorders during pregnancy: prevalence and risk factors in a large urban sample. *Obstet Gynecol*. 2010;116(5):1064-70.
165. Andersson L, Sundstrom-Poromaa I, Wulff M, Astrom M, Bixo M. Depression and anxiety during pregnancy and six months postpartum: a follow-up study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(8):937-44.
166. Giardinelli L, Innocenti A, Benni L, Stefanini MC, Lino G, Lunardi C, et al. Depression and anxiety in perinatal period: prevalence and risk factors in an Italian sample. *Arch Womens Ment Health*. 2012;15(1):21-30.
167. Mora PA, Bennett IM, Elo IT, Mathew L, Coyne JC, Culhane JF. Distinct trajectories of perinatal depressive symptomatology: evidence from growth mixture modeling. *Am J Epidemiol*. 2009;169(1):24-32.
168. Kitamura T, Yoshida K, Okano T, Kinoshita K, Hayashi M, Toyoda N, et al. Multicentre prospective study of perinatal depression in Japan: incidence and correlates of antenatal and postnatal depression. *Arch Womens Ment Health*. 2006;9(3):121-30.
169. Thayer ZM, Rutherford J, Kuzawa CW. The Maternal Nutritional Buffering Model: an evolutionary framework for pregnancy nutritional intervention. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 2020;2020(1):14-27.
170. Pasch LA, Holley SR, Bleil ME, Shehab D, Katz PP, Adler NE. Addressing the needs of fertility treatment patients and their partners: are they informed of and do they receive mental health services? *Fertility and sterility*. 2016;106(1):209-15. e2.
171. Kumar P, Magon N. Hormones in pregnancy. *Niger Med J*. 2012;53(4):179-83.
172. O'Hara MW, Wisner KL. Perinatal mental illness: definition, description and aetiology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28(1):3-12.
173. Brummelte S, Galea LA. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(5):766-76.
174. Schiller CE, Meltzer-Brody S, Rubinow DR. The role of reproductive hormones in postpartum depression. *CNS Spectr*. 2015;20(1):48-59.
175. Lefkovic E, Baji I, Rigo J. Impact of maternal depression on pregnancies and on early attachment. *Infant mental health journal*. 2014;35(4):354-65.
176. Cardenas EF, Kujawa A, Humphreys KL. Neurobiological changes during the peripartum period: Implications for health and behavior. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2019.

177. Badr LK. Is the effect of postpartum depression on mother-infant bonding universal? *Infant Behav Dev.* 2018;51:15-23.
178. Letourneau NL, Dennis CL, Cosic N, Linder J. The effect of perinatal depression treatment for mothers on parenting and child development: A systematic review. *Depress Anxiety.* 2017;34(10):928-66.
179. Kitsiou-Tzeli S, Tzetzis M. Maternal epigenetics and fetal and neonatal growth. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity.* 2017;24(1):43-6.
180. Portha B, Fournier A, Kioon MD, Mezger V, Movassat J. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie.* 2014;97:1-15.
181. Schroeder JW, Smith AK, Brennan PA, Conneely KN, Kilaru V, Knight BT, et al. DNA methylation in neonates born to women receiving psychiatric care. *Epigenetics.* 2012;7(4):409-14.
182. Flensburg-Madsen T, Revsbech R, Sorensen HJ, Mortensen EL. An association of adult personality with prenatal and early postnatal growth: the EPQ lie-scale. *BMC psychology.* 2014;2(1):8.
183. Strunk T, Burgner D. Genetic susceptibility to neonatal infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(3):259-63.
184. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
185. Israëls J, Frakking F, Kremer L, Offringa M, Kuijpers T, Van De Wetering M. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition.* 2010;95(6):F452-F61.
186. Alegre E, Rizzo R, Bortolotti D, Fernandez-Landazuri S, Fainardi E, Gonzalez A. Some basic aspects of HLA-G biology. *J Immunol Res.* 2014;2014:657625.
187. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet.* 2004;36(12):1319-25.
188. Criado-Marrero M, Rein T, Binder EB, Porter JT, Koren J, 3rd, Blair LJ. Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2018;373(1738).
189. Voisey J, Young RM, Lawford BR, Morris CP. Progress towards understanding the genetics of posttraumatic stress disorder. *Journal of anxiety disorders.* 2014;28(8):873-83.
190. Alemany S, Moya J, Ibanez MI, Villa H, Mezquita L, Ortet G, et al. Research Letter: Childhood trauma and the rs1360780 SNP of FKBP5 gene in psychosis: a replication in two general population samples. *Psychol Med.* 2016;46(1):221-3.
191. Matosin N, Halldorsdottir T, Binder EB. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biol Psychiatry.* 2018;83(10):821-30.

192. Han KM, Won E, Sim Y, Kang J, Han C, Kim YK, et al. Influence of FKBP5 polymorphism and DNA methylation on structural changes of the brain in major depressive disorder. *Sci Rep*. 2017;7:42621.
193. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.
194. Mann JJ, McBride PA, Brown RP, Linnoila M, Leon AC, DeMeo M, et al. Relationship between central and peripheral serotonin indexes in depressed and suicidal psychiatric inpatients. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49(6):442-6.
195. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol*. 2003;40(2-4):73-84.
196. Brudner M, Karpel M, Lear C, Chen L, Yantosca LM, Scully C, et al. Lectin-dependent enhancement of Ebola virus infection via soluble and transmembrane C-type lectin receptors. *PLoS One*. 2013;8(4):e60838.
197. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*. 2003;40(7):423-9.
198. Frakking FN, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clinical & Experimental Immunology*. 2006;145(1):5-12.
199. Dzwonek AB, Neth OW, Thiebaut R, Gulczynska E, Chilton M, Hellwig T, et al. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatric research*. 2008;63(6):680-5.
200. Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Human immunology*. 2006;67(4-5):247-56.
201. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol*. 1995;155(6):3013-20.
202. Speletas M, Gounaris A, Sevdali E, Kompoti M, Konstantinidi K, Sokou R, et al. MBL2 genotypes and their associations with MBL levels and NICU morbidity in a cohort of Greek neonates. *J Immunol Res*. 2015;2015:478412.
203. Frakking FN, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):5-12.
204. Ahrens P, Kattner E, Kohler B, Hartel C, Seidenberg J, Segerer H, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatric research*. 2004;55(4):652-6.
205. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34 Suppl 1:S186-95.

206. Zannas AS, Binder EB. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes Brain Behav.* 2014;13(1):25-37.
207. Schiene-Fischer C, Yu C. Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):1-6.
208. Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4609-16.
209. Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4597-600.
210. Paakinaho V, Makkonen H, Jaaskelainen T, Palvimo JJ. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions. *Mol Endocrinol.* 2010;24(3):511-25.
211. Hubler TR, Scammell JG. Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9(3):243-52.
212. Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94(5):383-94.
213. Merkulov VM, Merkulova TI, Bondar NP. Mechanisms of Brain Glucocorticoid Resistance in Stress-Induced Psychopathologies. *Biochemistry (Mosc).* 2017;82(3):351-65.
214. Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM, et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci.* 2013;16(1):33-41.
215. Qiu A, Anh TT, Li Y, Chen H, Rifkin-Graboi A, Broekman BF, et al. Prenatal maternal depression alters amygdala functional connectivity in 6-month-old infants. *Translational psychiatry.* 2015;5:e508.
216. Qiu A, Rifkin-Graboi A, Chen H, Chong YS, Kwek K, Gluckman PD, et al. Maternal anxiety and infants' hippocampal development: timing matters. *Translational psychiatry.* 2013;3:e306.
217. Wang C, Shen M, Guillaume B, Chong YS, Chen H, Fortier MV, et al. FKBP5 Moderates the Association between Antenatal Maternal Depressive Symptoms and Neonatal Brain Morphology. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43(3):564-70.
218. Saul A, Taylor B, Simpson S, Jr., Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T, et al. Polymorphism in the serotonin transporter gene polymorphisms ( 5-HTTLPR) modifies the association between significant life events and depression in people with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2018:1352458518770021.
219. Maier SF, Watkins LR. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4-5):829-41.
220. Canli T, Lesch KP. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci.* 2007;10(9):1103-9.

221. Jasinska AJ, Lowry CA, Burmeister M. Serotonin transporter gene, stress and raphe-raphe interactions: a molecular mechanism of depression. *Trends Neurosci.* 2012;35(7):395-402.
222. Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and In Vitro Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants. *Mol Neurobiol.* 2016;53(8):5510-26.
223. Armbruster D, Moser DA, Strobel A, Hensch T, Kirschbaum C, Lesch KP, et al. Serotonin transporter gene variation and stressful life events impact processing of fear and anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12(3):393-401.
224. Zannas AS, McQuoid DR, Steffens DC, Chrousos GP, Taylor WD. Stressful life events, perceived stress, and 12-month course of geriatric depression: direct effects and moderation by the 5-HTTLPR and COMT Val158Met polymorphisms. *Stress.* 2012;15(4):425-34.
225. Kosek E, Jensen KB, Lonsdorf TB, Schalling M, Ingvar M. Genetic variation in the serotonin transporter gene (5-HTTLPR, rs25531) influences the analgesic response to the short acting opioid Remifentanyl in humans. *Mol Pain.* 2009;5:37.
226. Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry.* 2006;11(3):224-6.
227. Ehli EA, Hu Y, Lengyel-Nelson T, Hudziak JJ, Davies GE. Identification and functional characterization of three novel alleles for the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Mol Psychiatry.* 2012;17(2):185-92.
228. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003;301(5631):386-9.
229. Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5. 2". *American Journal of Reproductive Immunology.* 1996;36(6):349-58.
230. Verloes A, Spits C, Vercammen M, Geens M, LeMaout J, Sermon K, et al. The role of methylation, DNA polymorphisms and microRNAs on HLA-G expression in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2017;19:118-27.
231. Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais J-M, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Human immunology.* 2003;64(11):1039-44.
232. Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A, et al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83+ dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *International immunology.* 1999;11(6):889-98.
233. Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, et al. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *European journal of immunology.* 1997;27(12):3380-8.

234. Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH, et al. Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009;62(5):320-38.
235. Yie S-m, Li L-h, Li Y-m, Librach C. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(2):525-9.
236. Peng B, Zhang L, Xing A-Y, Hu M, Liu S. The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Sichuan University Medical science edition*. 2008;39(6):976-9.
237. Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchencq A, Le Bouteiller P. HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics*. 2001;53(8):617-25.
238. Gobin SJ, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class II genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Human immunology*. 2000;61(11):1102-7.
239. Gobin SJ, van Zutphen M, Woltman AM, van den Elsen PJ. Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *The Journal of Immunology*. 1999;163(3):1428-34.
240. Chatzi L, Leventakou V, Vafeiadi M, Koutra K, Roumeliotaki T, Chalkiadaki G, et al. Cohort Profile: The Mother-Child Cohort in Crete, Greece (Rhea Study). *Int J Epidemiol*. 2017;46(5):1392-3k.
241. Papadopoulou Z, Vlaikou AM, Theodoridou D, Komini C, Chalkiadaki G, Vafeiadi M, et al. Unraveling the Serum Metabolomic Profile of Post-partum Depression. *Front Neurosci*. 2019;13:833.
242. Cox JL, Holden JM, Sagovsky R. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *Br J Psychiatry*. 1987;150:782-6.
243. Vivilaki VG, Dafermos V, Kogevinas M, Bitsios P, Lionis C. The Edinburgh Postnatal Depression Scale: translation and validation for a Greek sample. *BMC Public Health*. 2009;9:329.
244. Filiou MD, Asara JM, Nussbaumer M, Teplytska L, Landgraf R, Turck CW. Behavioral extremes of trait anxiety in mice are characterized by distinct metabolic profiles. *J Psychiatr Res*. 2014;58:115-22.
245. Shapiro R, Weisgras JM. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1970;40(4):839-43.
246. Hayatsu H, Wataya Y, Kazushige K. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *J Am Chem Soc*. 1970;92(3):724-6.
247. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-31.

248. Ala-Korpela M, Kangas AJ, Inouye M. Genome-wide association studies and systems biology: together at last. *Trends Genet.* 2011;27(12):493-8.
249. Baraldi E, Carraro S, Giordano G, Reniero F, Perilongo G, Zacchello F. Metabolomics: moving towards personalized medicine. *Ital J Pediatr.* 2009;35(1):30.
250. Eckhart AD, Beebe K, Milburn M. Metabolomics as a key integrator for "omic" advancement of personalized medicine and future therapies. *Clin Transl Sci.* 2012;5(3):285-8.
251. Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;871(2):202-11.
252. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, et al. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature.* 2006;440(7087):1073-7.
253. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ressom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst.* 2012;8(2):470-81.
254. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 30:Unit 30 2 1-24.
255. Garcia-Canaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4825-34.
256. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(6):1523-48.
257. Zhang HY, Chen X, Hu P, Liang QL, Liang XP, Wang YM, et al. Metabolomic profiling of rat serum associated with isoproterenol-induced myocardial infarction using ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate analysis. *Talanta.* 2009;79(2):254-9.
258. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic acids research.* 2009;37(Web Server issue):W652-60.
259. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc.* 2012;7(5):872-81.
260. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993;84(4):407-12.
261. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1998;32(1):1-8.
262. Ciuti R, Liguri G. A Novel Assay for Measuring Total Antioxidant Capacity in Whole Blood and Other Biological Samples. *Journal of Biomedical Science and Engineering.* 2017;Vol.10No.02:17.

263. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 2004;306(5696):636-40.
264. Karolchik D, Baertsch R, Diekhans M, Furey TS, Hinrichs A, Lu YT, et al. The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic acids research*. 2003;31(1):51-4.
265. Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, Zhang M, et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med*. 2013;19(6):773-7.
266. Huh JY, Kim Y, Jeong J, Park J, Kim I, Huh KH, et al. Peroxiredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(3):229-43.
267. Kayashima Y, Yamakawa-Kobayashi K. Involvement of Prx3, a Drosophila ortholog of the thiol-dependent peroxidase PRDX3, in age-dependent oxidative stress resistance. *Biomed Res*. 2012;33(5):319-22.
268. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):19-39.
269. May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(4):543-51.
270. Teng R-J, KI TY, Lu C-P, Lee C-Y. The neonatal morbidity and mortality of low birth weight neonates. *Zhonghua Minguo Xiao er ke yi xue hui za zhi [Journal] Zhonghua Minguo Xiao er ke yi xue hui*. 1992;33(3):167-75.
271. Vilanova CS, Hirkata VN, de Souza Buriol VC, Nunes M, Goldani MZ, da Silva CH. The relationship between the different low birth weight strata of newborns with infant mortality and the influence of the main health determinants in the extreme south of Brazil. *Population health metrics*. 2019;17(1):1-12.
272. Gaiva MAM, Fujimori E, Sato APS. Neonatal mortality in infants with low birth weigh. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2014;48(5):778-86.
273. Gelaye B, Sanchez SE, Andrade A, Gómez O, Coker AL, Dole N, et al. Association of antepartum depression, generalized anxiety, and posttraumatic stress disorder with infant birth weight and gestational age at delivery. *Journal of affective disorders*. 2020;262:310-6.
274. Mah B, Pringle K, Weatherall L, Keogh L, Schumacher T, Eades S, et al. Pregnancy stress, healthy pregnancy and birth outcomes—the need for early preventative approaches in pregnant Australian Indigenous women: a prospective longitudinal cohort study. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2019;10(1):31-8.
275. Krishna U, Bhalerao S. Placental insufficiency and fetal growth restriction. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 2011;61(5):505-11.
276. Ko T-J, Tsai L-Y, Chu L-C, Yeh S-J, Leung C, Chen C-Y, et al. Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatrics & Neonatology*. 2014;55(1):20-7.



277. Baggenstoss R, Petzhold SV, Willemann IK, Pabis FS, Gimenes P, Souza BV, et al. [Study of polymorphism G54D of MBL2 gene in gestational diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(9):900-5.
278. Gomaa MH, Ali SS, Fattouh AM, Hamza HS, Badr MM. MBL2 gene polymorphism rs1800450 and rheumatic fever with and without rheumatic heart disease: an Egyptian pilot study. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2018;16(1):24.
279. Ceylan E, Karkucak M, Coban H, Karadag M, Yakut T. Evaluation of TNF-alpha gene (G308A) and MBL2 gene codon 54 polymorphisms in Turkish patients with tuberculosis. *J Infect Public Health.* 2017;10(6):774-7.
280. Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M, MacDonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, et al. Two factors of the lectin pathway of complement, I-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Molecular immunology.* 2009;46(4):551-8.
281. Sallenbach S, Thiel S, Aebi C, Otth M, Bigler S, Jensenius JC, et al. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatric Allergy and Immunology.* 2011;22(4):424-30.
282. Aittoniemi J, Miettinen A, Laippala P, Isolauri E, Viikari J, Ruuska T, et al. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta paediatrica.* 1996;85(8):906-9.
283. Chroneos Z, Sever-Chroneos Z, Shepherd V. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2010;25(1):13-26.
284. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants—2010 update. *Neonatology.* 2010;97(4):402-17.
285. Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Høiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation.* 1999;104(4):431-7.
286. Garred P, Pressler T, Lanng S, Madsen HO, Moser C, Laursen I, et al. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatric pulmonology.* 2002;33(3):201-7.
287. Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2012;50(2):286-91.
288. Dahl M, Hviid TVF. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Human reproduction update.* 2012;18(1):92-109.
289. Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG, et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Molecular human reproduction.* 2011;17(12):727-38.

290. Hunt JS, Langat DK, McIntire RH, Morales PJ. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4 Suppl 1:S10.
291. Wang C, Shen M, Guillaume B, Chong Y-S, Chen H, Fortier MV, et al. FKBP5 moderates the association between antenatal maternal depressive symptoms and neonatal brain morphology. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(3):564-70.
292. Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Narozna B, Rajewska-Rager A, Wilkosc M, et al. FKBP5 polymorphism is associated with major depression but not with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. 2014;164:33-7.
293. Menke A, Klengel T, Rubel J, Brückl T, Pfister H, Lucae S, et al. Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. *Genes, Brain and Behavior*. 2013;12(3):289-96.
294. Dam H, Buch JO, Nielsen AB, Weikop P, Werge T, Jørgensen MB. Clinical association to FKBP5 rs1360780 in patients with depression. *Psychiatric Genetics*. 2019;29(6):220-5.
295. Matsudaira I, Oba K, Takeuchi H, Sekiguchi A, Tomita H, Taki Y, et al. rs1360780 of the FKBP5 gene modulates the association between maternal acceptance and regional gray matter volume in the thalamus in children and adolescents. *PLoS one*. 2019;14(8):e0221768.
296. Buchmann AF, Holz N, Boecker R, Blomeyer D, Rietschel M, Witt SH, et al. Moderating role of FKBP5 genotype in the impact of childhood adversity on cortisol stress response during adulthood. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(6):837-45.
297. Koenig AM, Ramo-Fernández L, Boeck C, Umlauft M, Pauly M, Binder EB, et al. Intergenerational gene × environment interaction of FKBP5 and childhood maltreatment on hair steroids. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;92:103-12.
298. Terock J, Van der Auwera S, Hannemann A, Janowitz D, Homuth G, Teumer A, et al. Interaction of childhood trauma with rs1360780 of the FKBP5 gene on trait resilience in a general population sample. *Journal of psychiatric research*. 2019;116:104-11.
299. Grabe HJ, Wittfeld K, Van der Auwera S, Janowitz D, Hegenscheid K, Habes M, et al. Effect of the interaction between childhood abuse and rs1360780 of the FKBP5 gene on gray matter volume in a general population sample. *Human brain mapping*. 2016;37(4):1602-13.
300. Kang JI, Kim TY, Choi JH, So HS, Kim SJ. Allele-specific DNA methylation level of FKBP5 is associated with post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;103:1-7.
301. Fujii T, Ota M, Hori H, Hattori K, Teraishi T, Sasayama D, et al. Association between the common functional FKBP5 variant (rs1360780) and brain structure in a non-clinical population. *Journal of psychiatric research*. 2014;58:96-101.
302. Wang Q, Shelton RC, Dwivedi Y. Interaction between early-life stress and FKBP5 gene variants in major depressive disorder and post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2018;225:422-8.
303. Grasso DJ, Drury S, Briggs-Gowan M, Johnson A, Ford J, Lapidus G, et al. Adverse childhood experiences, posttraumatic stress, and FKBP5 methylation patterns in postpartum women and their newborn infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;114:104604.

304. Piyasena C, Cartier J, Provençal N, Wiechmann T, Khulan B, Sunderesan R, et al. Dynamic changes in DNA methylation occur during the first year of life in preterm infants. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:158.
305. Calabrò M, Mandelli L, Crisafulli C, Porcelli S, Albani D, Politis A, et al. Psychiatric disorders and SLC6A4 gene variants: possible effects on alcohol dependence and alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(1):191-200.
306. Dell'Osso L, Carmassi C, Mucci F, Marazziti D. Depression, serotonin and tryptophan. *Current pharmaceutical design*. 2016;22(8):949.
307. Mahmood T, Silverstone T. Serotonin and bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. 2001;66(1):1-11.
308. Cross AJ. Serotonin in Alzheimer-type dementia and other dementing illnesses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990.
309. Gorwood P, Lanfumey L, Hamon M. Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes. *Medecine Sciences: M/S*. 2004;20(12):1132-8.
310. Lesch K-P, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274(5292):1527-31.
311. Bevilacqua L, Goldman D. Genetics of emotion. *Trends in cognitive sciences*. 2011;15(9):401-8.
312. Shiroma PR, Drews MS, Geske JR, Mrazek DA. SLC6A4 polymorphisms and age of onset in late-life depression on treatment outcomes with citalopram: a Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\* D) report. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2014;22(11):1140-8.
313. Kenna GA, Roder-Hanna N, Leggio L, Zywiak WH, Clifford J, Edwards S, et al. Association of the 5-HTT gene-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with psychiatric disorders: review of psychopathology and pharmacotherapy. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2012;5:19.
314. Thompson MD, Kenna GA. Variation in the serotonin transporter gene and alcoholism: risk and response to pharmacotherapy. *Alcohol and Alcoholism*. 2016;51(2):164-71.
315. Stacey D, Cohen-Woods S, Toben C, Arolt V, Dannlowski U, Baune BT. Evidence of increased risk for major depressive disorder in individuals homozygous for the high-expressing 5-HTTLPR/rs25531 (LA) allele of the serotonin transporter promoter. *Psychiatric genetics*. 2013;23(5):222-3.
316. Szyf M, Weaver I, Meaney M. Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reproductive toxicology*. 2007;24(1):9-19.
317. Taylor SE. Mechanisms linking early life stress to adult health outcomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(19):8507-12.

318. Maras PM, Baram TZ. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends in neurosciences*. 2012;35(5):315-24.
319. Johnstone SE, Baylin SB. Stress and the epigenetic landscape: a link to the pathobiology of human diseases? *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(11):806-12.
320. Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(9):1858-73.
321. Bale TL. The placenta and neurodevelopment: sex differences in prenatal vulnerability. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2016;18(4):459.
322. Filiou MD. Can proteomics-based diagnostics aid clinical psychiatry? *Proteomics Clin Appl*. 2015;9(9-10):885-8.
323. Quinones MP, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*. 2009;35(2):165-76.
324. Turck CW, Filiou MD. What Have Mass Spectrometry-Based Proteomics and Metabolomics (Not) Taught Us about Psychiatric Disorders? *Mol Neuropsychiatry*. 2015;1(2):69-75.
325. Gadad BS, Jha MK, Czysz A, Furman JL, Mayes TL, Emslie MP, et al. Peripheral biomarkers of major depression and antidepressant treatment response: Current knowledge and future outlooks. *J Affect Disord*. 2018;233:3-14.
326. Pan JX, Xia JJ, Deng FL, Liang WW, Wu J, Yin BM, et al. Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: a targeted metabolomics study. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):130.
327. Zhang Y, Yuan S, Pu J, Yang L, Zhou X, Liu L, et al. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis of Hippocampus in a Rat Model of Depression. *Neuroscience*. 2018;371:207-20.
328. Freed RD, Hollenhorst CN, Weiduschat N, Mao X, Kang G, Shungu DC, et al. A pilot study of cortical glutathione in youth with depression. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2017;270:54-60.
329. Klinkhammer C, Verlackt C, Kogelheide F, Bogaerts A, Metzler-Nolte N, Stapelmann K, et al. Elucidation of plasma-induced chemical modifications on glutathione and glutathione disulphide. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
330. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969;27(3):502-22.
331. Giustarini D, Tsikas D, Colombo G, Milzani A, Dalle-Donne I, Fanti P, et al. Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1019:21-8.
332. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5):446-57.

333. Lindqvist D, Dhabhar FS, James SJ, Hough CM, Jain FA, Bersani FS, et al. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;76:197-205.
334. Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;51:164-75.
335. Gould RL, Zhou Y, Yakaitis CL, Love K, Reeves J, Kong W, et al. Heritability of the aged glutathione phenotype is dependent on tissue of origin. *Mammalian Genome*. 2018;29(9-10):619-31.
336. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11(6):851-76.
337. Lewandowska J, Bartoszek A. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy--multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis*. 2011;26(4):475-87.
338. Simpson NE, Tryndyak VP, Pogribna M, Beland FA, Pogribny IP. Modifying metabolically sensitive histone marks by inhibiting glutamine metabolism affects gene expression and alters cancer cell phenotype. *Epigenetics*. 2012;7(12):1413-20.
339. Gooding JR, Jensen MV, Dai X, Wenner BR, Lu D, Arumugam R, et al. Adenylosuccinate Is an Insulin Secretagogue Derived from Glucose-Induced Purine Metabolism. *Cell Rep*. 2015;13(1):157-67.
340. Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *The Biological Bulletin*. 2016;231(1):73-84.
341. Majdi S, Larsson A, Najafinobar N, Borges R, Ewing AG. Extracellular ATP Regulates the Vesicular Pore Opening in Chromaffin Cells and Increases the Fraction Released During Individual Exocytosis Events. *ACS chemical neuroscience*. 2019;10(5):2459-66.
342. Lin L, Chen XM, Liu RH. Novel urinary metabolite signature for diagnosing postpartum depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:1263-70.
343. Zhang L, Zou W, Huang Y, Wen X, Huang J, Wang Y, et al. A Preliminary Study of Uric Metabolomic Alteration for Postpartum Depression Based on Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Dis Markers*. 2019;2019:4264803.
344. Henning Tiemeier, M.D. ,, H. Ruud van Tuijl, M.Sc. ,, Albert Hofman, M.D., Ph.D. ,, John Meijer, M.Sc. ,, Amanda J. Kiliaan, Ph.D. , and Monique M.B. Breteler, M.D., Ph.D. Vitamin B12, Folate, and Homocysteine in Depression: The Rotterdam Study. *American Journal of Psychiatry*. 2002;159(12):2099-101.
345. Tolmunen T, Hintikka J, Voutilainen S, Ruusunen A, Alfthan G, Nyssönen K, et al. Association between depressive symptoms and serum concentrations of homocysteine in men: a population study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(6):1574-8.

346. Lis A, McLaughlin I, Mpclaughlin R, Lis E, Stubbs E. Profiles of ultraviolet-absorbing components of urine from autistic children, as obtained by high-resolution ion-exchange chromatography. *Clinical Chemistry*. 1976;22(9):1528-32.
347. Noto A, Fanos V, Barberini L, Grapov D, Fattuoni C, Zaffanello M, et al. The urinary metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2014;27(sup2):46-52.
348. Benkert O, Renz A, Marano C, Matussek N. Altered tyrosine daytime plasma levels in endogenous depressive patients. *Archives of general psychiatry*. 1971;25(4):359-63.
349. Parizek A, Mikesova M, Jirak R, Hill M, Koucky M, Paskova A, et al. Steroid hormones in the development of postpartum depression. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 2:S277-82.
350. Kawamura N, Shinoda K, Sato H, Sasaki K, Suzuki M, Yamaki K, et al. Plasma metabolome analysis of patients with major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018;72(5):349-61.
351. Klempan TA, Sequeira A, Canetti L, Lalovic A, Ernst C, Turecki G. Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Molecular psychiatry*. 2009;14(2):175-89.
352. Fakhoury M. Revisiting the serotonin hypothesis: implications for major depressive disorders. *Molecular neurobiology*. 2016;53(5):2778-86.
353. Cavanagh A. Differences in the Expression of Symptoms in men versus Women with Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis [Study 1]. *Gender-specific symptomatology in depression: implications for assessment and treatment*. 2017:42.
354. Sassarini J. Depression in midlife women. *Maturitas*. 2016;94:149-54.
355. Kumsar Ş, Kumsar NA, Sağlam HS, Köse O, Budak S, Adsan Ö. Testosterone levels and sexual function disorders in depressive female patients: effects of antidepressant treatment. *The Journal of Sexual Medicine*. 2014;11(2):529-35.
356. Ngun TC, Ghahramani N, Sánchez FJ, Bocklandt S, Vilain E. The genetics of sex differences in brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2011;32(2):227-46.
357. Fernandez-Guasti A, Fiedler J, Herrera L, Handa RJ. Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Hormone and Metabolic Research*. 2012;44(08):607-18.
358. Köhler-Forsberg O, Buttenschøn HN, Tansey KE, Maier W, Hauser J, Dernovsek MZ, et al. Association between C-reactive protein (CRP) with depression symptom severity and specific depressive symptoms in major depression. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;62:344-50.
359. Gong Q, Hu X, Pettersson-Yeo W, Xu X, Lui S, Crossley N, et al. Network-Level Dysconnectivity in Drug-Naive First-Episode Psychosis: Dissociating Transdiagnostic and Diagnosis-Specific Alterations. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(4):933-40.
360. Brummelte S, Galea LA. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2010;34(5):766-76.

361. Glynn LM, Davis EP, Sandman CA. New insights into the role of perinatal HPA-axis dysregulation in postpartum depression. *Neuropeptides*. 2013;47(6):363-70.
362. Stuebe AM, Grewen K, Meltzer-Brody S. Association between maternal mood and oxytocin response to breastfeeding. *Journal of women's health*. 2013;22(4):352-61.
363. Kim S, Soeken TA, Cromer SJ, Martinez SR, Hardy LR, Strathearn L. Oxytocin and postpartum depression: delivering on what's known and what's not. *Brain research*. 2014;1580:219-32.
364. Hou X, Tang Q, Yang X, Li X, Zhang R, Wang X. Research of influence of shenqi jieyu prescription on changes of monoamine neurotransmitter and metabolite in rats with postpartum depression. *Beijing J Tradit Chin Med*. 2013;32(3):182-8.