



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛОВДИВ**  
**КАТЕДРА ПО ПСИХИАТРИЯ И МЕДИЦИНСКА ПСИХОЛОГИЯ**

---

**Д-Р АННА АЛЕКСАНДРОВА ТОДЕВА-РАДНЕВА**

**ТРАНСЛАЦИОННО КРОС-ВАЛИДИРАНЕ НА  
НЕВРОИЗОБРАЗИТЕЛНИ И МОЛЕКУЛНИ БИОМАРКЕРИ  
ПРИ ДИФЕРЕНЦИАЛНАТА ДИАГНОЗА НА  
УНИПОЛЯРНА И БИПОЛЯРНА ДЕПРЕСИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

*НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И  
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”*

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

ДОЦ. Д-Р СЕВДАЛИНА КАНДИЛАРОВА, ДМ

**КОНСУЛТАНТ:**

PRIV.-DOZ. RONALD SLADKY, PHD

---

*Дисертационният труд е написан на 122 страници и е онагледен с 11 таблици и 16 фигури. Цитирани са 246 литературни източника.*

*Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедра по психиатрия и медицинска психология към Медицински университет – Пловдив.*

*Публичната защита на дисертационния труд пред научното жури ще се състои на ..... от ..... в ..... Аудитория на Медицински университет – Пловдив, бул. „Васил Априлов” 15А, гр. Пловдив.*

*Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ – Пловдив, бул. „Васил Априлов” 15А и на интернет страницата на Медицински университет – Пловдив [www.meduniversity-plovdiv.bg](http://www.meduniversity-plovdiv.bg).*

## Съдържание

Използвани съкращения .....	4
Увод.....	5
Цел и задачи.....	7
1. Цел .....	7
2. Задачи .....	7
Материал и методи.....	8
1. Изследвани лица.....	8
2. Методи на проучването .....	10
2.1. Клинични методи за оценка състоянието на пациента.....	10
2.2. Функционално магнитно-резонансно изследване (фМРИ).....	10
2.3. Лабораторни методи на изследване .....	12
2.4. Статистически методи .....	14
Резултати.....	16
1. Демографски и клинични характеристики .....	16
2. Резултати от анализа на невроизобразителните данни на ретроспективната извадка .....	20
2.1. Функционална свързаност на предна цингулна кора .....	20
2.2. Функционална свързаност на лява и дясна предна инсула.....	24
3. Резултати от анализа на невроизобразителните данни на проспективната извадка .....	26
3.1. Резултати от контраст: неутрални дистрактори>липса на дистрактори .....	27
3.2. Резултати от контраст: негативни дистрактори>липса на дистрактори .....	31
3.3. Резултати от контраст: негативни дистрактори>неутрални дистрактори .....	36
4. Резултати от молекулно-биологични анализи.....	39
Обсъждане.....	42
Изводи .....	51
Приноси.....	52
Теоретично-методологични: .....	52
Научно-приложни .....	52
Представяне на темата на национални и международни конференции: .....	53
Публикации по темите.....	54

**Използвани съкращения**

БКК - бели кръвни клетки

БР – Биполярно разстройство

ГДР – Голямо депресивно разстройство

ГПЛ - горна париетална лобула

д- - десен

днкРНК - дълговерижни некодиращи РНКи

ЗК – здрави контроли

л- - ляв

МПП – мрежа по подразбиране

МФГ – медиален фронтален гирус

П – пациенти

ПИ – предна инсула

ПФК – префронтална кора

ПЦК – предна цингулна кора

ССК – соматосензорна кора

фМРИ – функционално магнитно-резонансно изобразяване

ФС – функционална свързаност

ХИП - хипокамп

НАМ-А - Hamilton Anxiety Rating Scale

IAPS - International Affective Picture System

MADRS - Montgomery–Åsberg Depression Rating Scale

YMRS - Young Mania Rating Scale

## Увод

### Увод

Според Световната здравна организация честотата на психичните заболявания нараства в световен мащаб (5.1% за тежките случаи и 17% при средно тежките и леките случаи). Тази тенденция се проявява в частност и при афективните разстройства - голямо депресивно разстройство (ГДР) и биполарно разстройство (БР), които са социално значими заболявания и засягат съответно около 300 млн и 45 млн души в световен мащаб. И въпреки че последните десетилетия са белязани с важни открития във фармакотерапията на тези разстройства, не се установява значима промяна в статистическите показатели, включително социалната тежест. Затова продължаващото проучване на етиопатогенезата и диагностично-терапевтичния процес при ГДР и БР остават актуална научна проблематика.

Доказано е влиянието на множество различни фактори върху етиопатогенезата на двете заболявания. Примери за такива фактори са: генетични, епигенетични, имунологични, оксидативен и нитрозативен стрес, невробиологични и др. Досега натрупаните данни обаче са изключително хетерогенни. Въпреки това повечето от откритията са свързани с промяна в активността и свързаността на структури, участващи в регулацията на няколко психични функции, а именно: когниция, възприемане и обработка на емоционални стимули, обработка на удоволствени стимули и взимане на решение.

Един от общите и често срещани симптоми при афективни разстройства е преходния когнитивен дефицит. С този симптом е асоциирана променената активност на префронталната кора (ПФК). Деактивирането на медиалната ПФК при здрави индивиди се свързва с по-добри езекутивни функции. И все пак, пациенти с ГДР и БР в ремисия демонстрират ниска успеваемост при задачи за работна памет, която се проявява със значително по-малко инхибиране на медиалната ПФК за разлика от здрави индивиди. В допълнение, както ГДР, така и БР са свързани със структурни и функционални промени във фронтално-лимбичната мрежа. Установен е намален обем на сивото мозъчно вещество в лявата предна цингуларна кора (л-ПЦК) и в десния хипокамп (д-ХИП) и при двете разстройства в сравнение със здрави контроли (ЗК). Освен това много открития предполагат наличието на структурни аномалии в мрежите, отговорни за емоционалния и когнитивния контрол не само при пациенти с ГДР и БР, но и при индивиди с повишен риск от развитие на афективни разстройства.

Друг общ симптом е инсомнията. Интересно е, че пациенти с първична инсомния също показват нарушена функционална свързаност (ФС) между ПЦК, инсула и лимбични структури за разлика от ЗК. Тези открития показват наличието на общи нарушения в свързаността, както в task-positive мрежата, така и в мрежата по подразбиране (МПП) при първична инсомния и ГДР и БР с наличен симптом инсомния. От тук бихме

могли да заключим, че част от общите аберации, установявани при двете афективни разстройства могат да се дължат на припокриващата се симптоматика.

Изследването на епигенетичните фактори при афективни разстройства също показва наличието на общи и специфични аберации. Например, множество проучвания показват промени в експресията на дълговерижни некодиращи РНКи и микроРНКи, които са асоциирани с процесите на невrorазвитие, невронна пластичност, невровъзпаление, променена невротрансмисия и т.н. Всички тези процеси са имплицирани в етиопатогенезата на ГДР и БР. Промени в експресията на микроРНК също са свързани с отговор на лечението към някои фармакотерапевтици, което предполага техния потенциал и като биомаркери за терапевтичен мониторинг. Затова е необходимо задълбочено изучаване на сложните етиопатофизиологични механизми чрез мултимодален и мултидисциплинарен подход, за да се постигне пълноценно крос-валидиране между научно-изследователския (невроизобразяващи, молекулни, генетични и т.н. данни) и клиничко-дедуктивния подход (постигането на трансляция на научните открития в клиничната практика).

Хипотези:

1. Чрез анализ на функционалната свързаност (ФС) на общомозъчно ниво (seed-to-voxel) на два основни региона на салиентната мрежа (ПЦК и ПИ), ще се потвърдят натрупаните литературни данни за нарушената им свързаност при разстройства на настроението. Предположихме, че променена свързаност между ПЦК и ПИ и структури от мрежата по подразбиране и езекутивната мрежа би могла да бъде диференциална сигнатура между ГДР и БР.

2. Могат да бъдат потвърдени различия в експресията на дълговерижни некодиращи РНКи (днкРНКи), част от които са валидирани в периферна кръв на пациенти с ГДР, а друга част в *post-mortem* тъкан от медиален фронтален гирус на пациенти с БР, в българска популация, което да докаже конкордантност на тези изменения между 2 различни раси.

3. При задача, която изследва когницията и обработката на емоции при афективни разстройства ще се наблюдават промени в активността на медиалния фронтален гирус както следва: хиперактивация на структурата при пациенти с БР спрямо ЗК и хипоактивация на медиалния фронтален гирус (МФГ) при пациенти с ГДР в сравнение със ЗК и БР.

4. Експресията микроРНКи, свързани с нарушенията на съня би могла да спомогне диференциацията на пациенти с ГДР и БР, тъй като инсомнията е още един от припокриващите се симптоми при афективни разстройства, чиито молекулни механизми остават неразкрити.

## Цел и задачи

### Цел и задачи

#### 1. Цел

Настоящата научна разработка има за цел изследването на диференциално диагностичния потенциал на невроизобразяващи и молекулни маркери при пациенти с униполярна и биполярна депресия.

#### 2. Задачи

- Оценка и сравнителен анализ на функционалната свързаност в покой при пациенти и здрави контроли.
- Установяване наличието или липсата на разлики при функционално невроизобразителните корелати на когнитивна задача под влияние на емоционален дистрактор при пациенти с униполярна и биполярна депресия (с оригинална новоизработена парадигма)
- Оценка на профилите на диференцираната експресия на предварително избрани днкРНКи и на микро-РНКи, свързани с нарушения на съня (в колаборация с Катедра „Патофизиология“) при ГДР и БР в сравнение със здрави контроли.

Проведеното проучване съдържа два компонента:

- Прилагане на нови статистически методи за обработка на вече събрани невроизобразителни данни.
- Имплементиране на новосъздадена парадигма за фМРИ в независима извадка.

## Материал и методи

### 1. Изследвани лица

Обект на изследването са пълнолетни лица отговарящи на критериите на DSM - V за голямо депресивно или биполярно разстройство с настоящ умерен или тежък депресивен епизод, с общ брой точки по скалата за оценка на депресия на Montgomery–Åsberg (MADRS)  $\geq 20$  и Young Mania Rating Scale (YMRS)  $\leq 3$  т. при включване в проучването. Изследваната група депресивно болни е съставена от случайна извадка от пациенти, насочвани за участие от психиатрични лечебни заведения, включително Клиника по Психиатрия при УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, ДПБ Пазарджик, ЦПЗ Пловдив, както и от амбулаторни психиатри. Здравите контроли (ЗК) са рекрутирани от общността. Скринингът и оценката на всяко изследвано лице е осъществена от лекар със специалност или специализиращ психитрия (Д.С., С.К., А.Т.).

Диагнозите се основават на покриване на диагностичните критерии на DSM-V и оценката е въз основа на: 1) приемната и работна диагноза и история на заболяването (болнична и амбулаторна документация); 2) интервю с лекуващия лекар на пациента; 3) структурирано клинично интервю M.I.N.I. 6.0.0.; 4) допълнителна информация от близките на пациента при необходимост.

Всички изследвани лица са информирани предварително за целите, задачите и методите на изследване в проучването, съгласно с Хелзинкската конвенция за правата на човека и са дали писмено информирано съгласие за участие в изследването. Проучването е одобрено от Комисията по научна етика при Медицински университет – Пловдив (ID: P-186/22.01.2021).

#### 1.1 Критерии за включване:

- възраст над 18 години и под 65 години;
- диагноза ГДР или БР по DSM-V;
- настоящ умерен или тежък депресивен епизод (MADRS  $\geq 20$ );
- липса на хипоманийна/манийна симптоматика (YMRS)  $\leq 3$  т.
- редовен прием на психофармакологична терапия поне 7 дни преди включване в проучването (за пациенти)
- липса на настоящо или минало психично заболяване, отговарящо на критериите на DSM – V (за ЗК)
- писмено информирано съгласие за участие в проучването (за всички участници).

#### 1.2 Критерии за изключване:

- възраст под 18 години и над 65 години;



## Материал и методи

- висок суициден риск – резултат по 10-ти компонент на скалата за депресия над 2;
- настояща или минала диагноза за разстройство по DSM V, различно от ГДР или БАР като зависимости, органични разстройства, психотично разстройство, психоорганично разстройство;
- Злокачествени новообразувания;
- Невродегенеративни заболявания;
- Травма на глава със загуба на съзнание или анамнеза за предходна такава;
- Деменция;
- Паркинсонова болест;
- Болест на Хънтингтън;
- Остър исхемичен или хеморагичен съдов инцидент;
- Инфекции;
- Бременност;
- Метални импланти, фиксатори, протези, пейсмекър, каротиден и/или коронарен стент и т.н., несъвместими с провеждането на МРИ.

Клиничната оценка, функционалното магнитно-резонансно изобразяване (фМРИ), пробовземането и анализът на невроизобразителните данни са осъществени в Комплекса по транслационна невронаука, а лабораторните изследвания са осъществени в Катедра „Медицинска биология“.

За осъществяването на първия компонент на проучването се анализираха налични данни (от две модалности: структурно и фМРИ в покой) на 115 участници, включващи здрави контроли (n=45) и пациенти с актуален депресивен епизод (n=70) в контекста на ГДР (n=35) и БР (n=35). След осъществяването на проверка на качеството на образите 12 лица бяха изключени от анализа, поради установени артефакти от прекомерно движение на главата, неподлежащо на корекция чрез използваните методи за обработка. Крайният обем на извадката се състои от 103 лица, разпределени в групи както следва: ЗК = 43 лица, ГДР = 35 лица, БР = 25 лица.

За целите на втория компонент на проучването са рекрутирани 96 лица, от които 50 здрави индивиди и 46 пациенти в депресивен епизод в контекста на ГДР или БР. От анализа на данните са изключени общо 18 лица, поради установена структурна патология (n=6) и поради прекомерни

артефакти от движение по време на изследването ( $n=12$ ). Крайната извадка се състои от 78 лица, разпределени в групи както следва: ЗК = 40 лица, ГДР = 23 лица, БР = 15 лица.

Поради отказ на част от изследваните лица да дадат информирано съгласие за вземане на кръвна проба и недостатъчно финансиране, извадката, в която са търсени различия в периферни молекулни маркери (микроРНКи, днкРНКи), съответно е 60 лица, от които 31 здрави контроли и 29 пациенти в депресивен епизод. Техническа неизправност на фризер за съхранение, доведе до загуба на пробите на 4 лица и крайната извадка, в която е изследвана експресията на днкРНКи се състои от 56 лица, разпределени в групи както следва: ЗК = 29 лица, ГДР = 11 и БР = 16. В извадката, в която е изследвана експресията на микроРНКи са включени 14 ЗК и същия брой пациенти от двете групи, поради наличие на ограничено количество реактиви.

## 2. Методи на проучването

### 2.1. Клинични методи за оценка състоянието на пациента

Всеки участник е оценен спрямо гореописаните критерии за включване и изключване. Диагностичното уточняване се осъществява на базата на анамнестични и клинични данни, както и на оценката чрез структурирано интервю M.I.N.I. Последният инструмент се използва, както за потвърждаване на настоящ депресивен епизод, така и за изключване на коморбидни психични разстройства, включително разстройства, дължащи се на употреба на психоактивни вещества, обесивно-компулсивно разстройство, хранителни разстройства, разстройства на невrorазвитието и т.н.

Тежестта на депресивния епизод се установява чрез широко използваната и за клинични, и за изследователски цели скала на Мотгомъри Осбърг (MADRS), като за минимално приемлив резултат за пациенти е избрана стойност от 20 т., която се отъждествява с умерена тежест, а за здрави контроли под 7 т. Допълнително за отхвърляне наличието на смесени черти на епизода (при пациенти), всяко лице се оценява чрез YMRS, като резултатът, необходим за отхвърляне наличието на хипоманийна или манийна симптоматика е под 3 т. за всички изследвани групи. За да бъде направена комплексна оценка на състоянието и наличието на тревожна симптоматика, на всеки участник е приложена и Hamilton Anxiety Rating Scale (HARS). Всички пациенти са приемали редовно назначената им психофармакотерапия поне 7 дни преди включване в изследването.

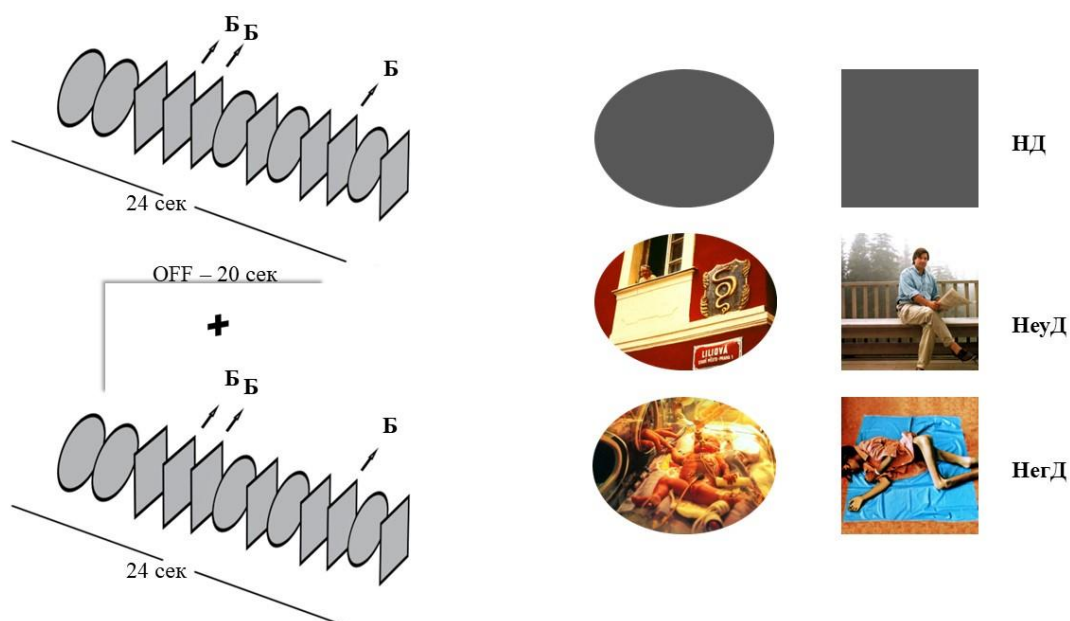
### 2.2. Функционално магнитно-резонансно изследване (фМРИ)

Участниците са изследвани на 3T MRI система (GE Discovery 750w) с 3 различни МРИ секвенции: структурно сканиране с висока разделителна способност (Sag 3D T1 FSPGR последователност), TR (relaxation time) 7.2

## Материал и методи

ms, TE (echo time) 2.3 и ъгъл на обръщане  $12^\circ$ , дебелина на среза 1 mm, матрица  $256 \times 256$ ; две функционални серии, resting-state (състояние на покой) (2D EPI последователност) със затворени очи – дебелина на среза 3 mm, 36 среза, матрица  $64 \times 64$ , TR 2000 ms, TE 30 ms, ъгъл на обръщане  $90^\circ$ , 192 обема и task-sequence (задача) с дебелина на среза 3 mm, матрица  $64 \times 64$ , TR 2000 ms, TE 30 ms и ъгъл на обръщане  $90^\circ$ , 352 обема. Функционалното сканиране започва с 5 фиктивни времеви серии, които са автоматично изключени.

По време на task-секвенцията пациентите изпълняват задача, която активира вниманието и краткосрочната памет при наличие или липса на емоционални дистрактори. Парадигмата се състои от 16 активни блока, всеки с продължителност 24 секунди и 16 off-блока (на покой, в които пациентът е инструктиран да се концентрира върху фиксационен кръст в средата на екрана) с продължителност 20 секунди. По време на активните блокове се презентират фигури с овална или квадратна форма (Фиг. 1), които са едноцветни (базисни блокове - без дистрактор) или съдържат картина с неутрален (неутрални блокове - неутрален дистрактор) или негативен емоционален заряд (негативни блокове - негативен дистрактор) (Фиг.1). Картините са подбрани от International Affective Picture System (IAPS), която представлява валидирана система от изображения за изследване на емоционалния отговор. Задачата на изследваното лице е да следи последователността на фигурите и да натиска бутон всеки път, когато види два или повече последователни квадрата (броя на отговорите е еднакъв във всички активни блокове). Допълнително условие за участника е да се абстрахира от съдържанието на фигурата.



**Фигура 1** Схема на последователността на стимулите в парадигмата. Използвани съкращения: Б – бутон; НД – няма дистрактор; НеуД – неутрален дистрактор; НегД – Негативен дистрактор

### 2.3 Лабораторни методи на изследване

#### 2.3.1. Пробовземане

От пациентите и здравите контроли са получени плазма, серум и бели кръвни клетки (БКК) при спазване на всички стандартни клинични изисквания. Лабораторните изследвания са осъществени в Катедра „Медицинска биология“.

От всички участници дали информирано съгласие е взета чрез венепункция по 4 мл венозна кръв в епруветки тип вакуум контейнер (BD Vacutainer®) с червен капак за изолиране на серум и с лилав капак за изолиране на плазма и БКК. След пробовземане, епруветките за изолиране на серум са оставени на стайна температура за 30 минути и впоследствие са центрофугирани при 3000 об/мин. в продължение на 10 минути (на стайна температура). Полученият серум се аликвотира (600µl) в епруветки тип епендорф и оставя за съхранение при -80°C. Епруветки с антикоагулант (лилав капак) са използвани за получаване на плазма и БКК за РНК анализ и се транспортират на лед до лабораторията в рамките на 15 минути след пробовземането. Кръвта се центрофугира при 3000 об/мин. за 10 мин. на 4°C, като изолираната плазма отново бива разпределена в епруветки тип епендорф и съхранена при температура -80°C за последващ анализ.

#### 2.3.2. Получаване на БКК и изолиране на тотална РНК от тях

БКК са изолирани от пациенти с ГДР, БР и ЗК чрез метода на студено лизиране на еритроцитите с помощта на лизиращ разтвор, съдържащ амониев хлорид, амониев карбонат и етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA). Получената след отделяне на плазмата клетъчната маса се добавя към лизиращ разтвор, след което се инкубира при 4°C за 10 мин и се центрофугира. Гореописаният цикъл се повтаря до пълното лизиране на еритроцитите. Полученият седимент от бели кръвни клетки се ресуспендира в PBS буфер и се центрофугира. След премахване на PBS буфера, към получената утайка от БКК се добавя 800 µl Trizol (Invitrogen, Burlington, ON), последвано от замразяване при -80°C или директно изолиране на РНК.

Третирането с Trizol води до лизиране на получената утайка от БКК. След това пробите се разделят чрез добавяне на хлороформ в отношение 1:5 на отделни фракции, съдържащи различните биологични молекули. Към получената течна фаза се добавя изопропилов алкохол, при което РНК молекулите преципитират. Следва промиване на тоталната РНК със 75% етилов алкохол, изсушаване и разтваряне във вода, свободна от нуклеази.

#### 2.3.3. Свободно циркулираща и екзозомна иРНК от плазма

## Материал и методи

Свободно циркулиращи и екзозомни РНКи са получени чрез NORGEN® Midi Kit за изолиране и концентриране на РНК от плазма. Техниката се осъществява с двукратно третиране с Lysis Buffer A (съдържащ гуанудинови соли) и последващо пречистване на РНК чрез двустепенна колонна хроматография. За промиването на колоните е използван Wash Solution A през отделните етапи. Последното елюиране на РНК от Mini Spin column е в Elution solution A. Чрез спектрофотометрия е измерена концентрацията на РНК в пробите (с помощта на Nano Drop 2000 при дължина на вълната 260/280 nm). Пробите са съхранени при -80°C.

### 2.3.4. Синтез на кДНК чрез RT-PCR

От получената тотална РНК се синтезира кДНК верига за последващо определяне нивото на генна експресия на подобрения панел от дълговерижни РНКи и микро РНК-и: let-7, miR-30c, miR-132, miR-212, miR-125b, miR-126, miR-138, miR146a, miR-182, miR-219. кДНК е получена чрез реакция на обратна транскрипция (RT-PCR). Използва се RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) и се следва протокол за синтез на първа верига кДНК. Приготвя се реакционна смес, съдържаща РНК матрица с вариращ обем и фиксирана концентрация от 2 µg/µl, неспецифични random hexamere праймери 0.5 µg/µl и вода, свободна от нуклеази. Към всяка индивидуална проба се добавя мастър микс, съдържащ 5x реакционен буфер – 4 µl, RiboLock™ рибонуклеазен инхибитор (20 U/ µl) – 1 µl, 10 mM dNTP mix – 2 µl и ензими обратна транскриптаза RevertAid™ H Minus M-MuLV (200 U/ µl) – 1 µl. Получената реакционна смес се инкубира за 60 мин. при 42°C, след което реакцията се спира чрез нагряване за 5 мин при 70°C. Синтезираната кДНК се разрежда с вода, свободна от нуклеази (1:7). Разредените проби се съхраняват при - 20°C.

### 2.3.5. Количествена полимеразна верижна реакция (qRT-PCR)

RT-qPCR анализ се осъществява, за да се определят нивата на генна експресия на селектираните дълговерижни РНК, включително TCONS\_00019174, ENST00000566208, ENST00000517573, RP1-269M15.3, STC-487M23.5, CTD-2647L4.4, RP11-453F18\_V.1, RP11-273G15.2, RP11-326I11.3, RP11-434C1.1, както и на избраните микро РНК-и let-7, miR-30c, miR-132, miR-212, miR-125b, miR-126, miR-138, miR146a, miR-182, miR-219. Като ендogenous контроли се използват Actin, Ubiquitin, hUBC, B2M и Gapdh. Използваният кит GreenMasterMix (2x) (Genaxxon bioscience GmbH, Germany) за RT-qPCR анализ съдържа SuperHotStart Taq DNA полимеразен ензим, PCR буфер, MgCl<sub>2</sub>, dNTP и Syber Green. PCR-реакционната смес съдържа: 1 µl кДНК, 2 µl прави и обратни праймери за съответните дълговерижни РНКи или за ендogenous контролите, 10 µl GreenMasterMix (2x) и 7 µl вода, свободна от нуклеази. Финалният обем на реакционната



смес е 20  $\mu$ l. Анализът се извършва чрез апарат за количествен qPCR – RotorGene Q 6000. Използваната работна програма е двустепенна: начална денатурация – 15 мин при 95°C, 40 цикъла - денатурация - 15 сек. при 95°C, амплификация - 60 сек. при 58°C, последно удължаване – 2 мин. при 72°C. Последващото изчисление на промяна в генната експресия се осъществява на базата на  $\Delta\Delta C_t$  метод (Schmittgen and Livak, 2008), най-напред чрез генериране на  $\Delta C_t$  стойност, представляваща  $C_t$  на съответната дълговерижна РНК от интерес минус  $C_t$  на осреднената стойност на използваните референтни гени; генериране на  $\Delta\Delta C_t$  стойност, чрез изваждане на  $\Delta C_t$  от пациентските проби от  $\Delta C_t$  на контролните проби; представяне на крайния резултат като пъти промяна в акумулирането на съответните дълговерижни РНК транскрипти при ГДР, БР и ЗК.

### 2.3.6. TaqMan анализ

С цел изследване експресионните нива на микро РНК-и, участващи в регулацията на експресията на YKL-40, се извърши специфичен TaqMan анализ. Използвани са търговски TaqMan праймери за съответните микро РНКи: let-7, miR-30c, miR-132, miR-212, miR-125b, miR-126, miR-138, miR146a, miR-182, miR-219, U6 (Thermo Fisher Scientific, USA) и TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), съдържащ AmpliTaq™ Fast DNA Polymerase, Uracil-N glycosylase, dUTP, ROX™ Passive Reference dye и TaqMan MGB сонда. Реакционната смес за анализа съдържа кДНК – 5  $\mu$ l, синтезирана чрез обратна транскрипция, TaqMan праймери 20x -0,47  $\mu$ l за съответната микро РНКа, TaqMan® Fast Advanced Master Mix – 5,03  $\mu$ l. Краен работен обем на реакцията е 10,5  $\mu$ l. Анализът е извършен с помощта на апарат за количествен q-PCR – RotorGene Q 6000. Използвана е следната работна програма – инкубация на Uracil-N glycosylase – 2 мин при 50°C, активация на полимеразата – 20 сек. при 95°C, 40 цикъла - денатурация – 1 сек. при 95°C, амплификация – 20 сек, при 60°C.

Изследванията са проведени със съдействието на доц.. Николай Мехтеров, дб.

### 2.4. Статистически методи

Статистическият анализ на демографските и клиничните характеристики на участниците е извършен посредством IBM SPSS 28.0 за Windows. Нивото на значимост е зададено на  $p < 0.05$  за всички тестове. За непрекъснати променливи е използван t-тест на Student, а за категориални-променливи - хи-квадрат тест. Използвани са следните методи: непараметричен анализ; дескриптивен анализ; графичен анализ; Independent-Samples Kruskal-Wallis тест; Chi-квадрат критерий; D'Agostino-

## Материал и методи

Pearson тест; Shapiro-Wilk тест; Kolmogorov Smirnov тест; Wilcoxon Signed Rank Test.

За целите на ретроспективния анализ бе използван CONN Toolbox върху платформа MATLAB с цел обследване на функционалната свързаност (в състояние на покой) между основните мозъчни региони, определени според атласа по подразбиране на използвания инструмент, който е комбинация от FSL Harvard-Oxford atlas cortical & subcortical areas и AAL atlas cerebellar areas. Всички данни бяха предварително обработени чрез следните стъпки: 1. Realignment and unwarp (пространствено преобразуване); 2. Slice-timing correction (времево синхронизиране); 3. Outlier detection (откриване на абнормни стойности); 4. Functional Direct Segmentation & Normalization (функционална директна сегментация и нормализация); 5. Structural Segmentation & Normalization (структурна сегментация и нормализация); 6. Functional Smoothing (функционално изравняване). След предварителната обработка се проведе т.нар. denoising, чрез който BOLD сигнала на общомозъчно ниво се „хомогенизира“. На базата на така обработените данни се осъществи seed-to-voxel анализ с избрани региони на интерес – предна цингуларна кора, лява и дясна инсула и създаден контраст между сигнала от лява и дясна инсула при следните междугрупови сравнения: пациенти (П) ≠ ЗК, ГДР ≠ ЗК, БР ≠ ЗК, ГДР ≠ БР.

Данните от имплементирането на новата парадигма бяха обработени чрез SPM12 върху платформа MATLAB. На индивидуално ниво данните на всеки участник бяха препроцесирани (предварително анализирани) чрез следните стъпки: Slice-timing correction; Realignment; Corregistration; Normalisation; Smoothing. След това данните на всяко лице бяха постпроцесирани на индивидуално ниво и включени в анализ ANOVA с цел изследване на вътрегрупови и междугрупови разлики в активациите на различни мозъчни региони при предварително дефинирани контрасти между трите активни условия: неутрални дистрактори > липса на дистрактори, липса на дистрактори > неутрални дистрактори, негативни дистрактори > неутрални дистрактори, неутрални дистрактори > негативни дистрактори, негативни дистрактори > липса на дистрактори и липса на дистрактори > негативни дистрактори.

Данните от молекулните изследвания са обработени с програма Microsoft Excel 2017 и GraphPad Prism, версия 8.1. За определяне на Гаусово разпределение на получените данни са използвани статистически тест за нормалност на D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk и Kolmogorov Smirnov. За сравнение на стойностите между отделните групи е приложен непараметричен тест на Mann-Whitney. При провеждане на вътрегупово съпоставяне на данните е използван непараметричен Wilcoxon Signed Rank Test.

## Резултати

### 1. Демографски и клинични характеристики

В ретроспективната извадка не се установиха статистически значими разлики в разпределението по пол и възраст. Установи се статистически значима разлика в степента на образование (измерена в години) между ЗК и пациентите от двете групи. Не се откри разлика между двете пациентски групи по отношение на клиничните показатели. Резултатите са представени в Таблица 1.

Таблица 1 Демографски и клинични характеристики на ретроспективната извадка

	Здрави контроли n=43	Пациенти с ГДР n=35	Пациенти с БР n=25	Ниво на значимост при сравнение ГДР/БР	Ниво на значимост при сравнение между ЗК/ГДР и БР
<b>Възраст (mean ± SD)</b>	40,25 (±10,73)	40,97 (±10,86)	41,72 (±9,62)	p = 1.000 <sup>c</sup>	p = 1.000 <sup>a/</sup> 1.000 <sup>a</sup>
<b>Пол (М/Ж)</b>	43 (14/29)	35 (14/21)	25 (9/16)	p = 0.753 <sup>b</sup>	p = 0.793 <sup>b</sup>
<b>Образование (години)</b>	15,93 (±3,26)	13,8 (±2,93)	13,88 (±2,71)	P=0.915 <sup>c</sup>	p = 0.012 <sup>a/</sup> p = 0.035 <sup>a</sup>
<b>MADRS</b>	2,28 (±2,25)	30,2 (±4,14)	29,76 (±6,17)	P=0.742 <sup>c</sup>	p < 0.001 <sup>a/</sup> 0.001 <sup>a</sup>
<b>Възраст в началото на заболяването</b>	-	30.24 (11.01)	29.72 (9.19)	p = 0.850 <sup>c</sup>	-
<b>Продължителност на заболяването</b>	-	130.97 (113.93)	148.6 (101.64)	p = 0.544 <sup>c</sup>	-
<b>Продължителност на епизода</b>	-	21 (36.65)	15.8 (14.99)	p = 0.508 <sup>c</sup>	-
<b>Брой предишни епизоди</b>	-	3.97 (3.56)	6.36 (4.72)	p = 0.035 <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup>- ANOVA; <sup>b</sup>-  $\chi^2$  test; <sup>c</sup>- Independent samples t-test.

В проспективната извадка, не се установиха статистически значими разлики в разпределението по пол, възраст и образование, макар че очаквано се наблюдава тенденция към статистически значима разлика в нивото на образование между ЗК и БР. При клиничните характеристики се откри



## Резултати

разлика в броя предишни епизоди между групите на ГДР и БР. Не се установи значима разлика и в процента верни отговори в задачата между трите групи. Резултатите са представени в Таблица 2.

*Таблица 2 Демографски и клинични характеристики на проспективната извадка*

	Здрави контрол и n=40	Пациент и с ГДР n=23	Пациенти с БР n=15	Ниво на значимос т при сравнение ГДР/БР	Ниво на значимос т при сравнение между ЗК/ ГДР и БР
<b>Възраст (mean ± SD)</b>	40,73 (±10,93)	40,70 (±11,47)	46,13(±10,58 )	p = 0,123 <sup>a</sup>	p = 0,220 <sup>a</sup>
<b>Пол (М/Ж)</b>	40 (15/25)	23 (9/14)	15 (5/10)	p = 0,131 <sup>b</sup>	p = 0,935 <sup>b</sup>
<b>Образование (години)</b>	16,1 (±3,57)	14,17 (±2,55)	13,80 (±2,81)	p = 0,744 <sup>a</sup>	p = 0,051 <sup>a</sup>
<b>MADRS</b>	2,51 (±1,64)	30,83 (±4,7)	29,67 (±5,07)	p = 0,749 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
<b>YMRS</b>	0,59 (±0,79)	1,14 (±0,85)	0,93 (±0,8)	p = 0,512 <sup>a</sup>	p < 0,036 <sup>a</sup>
<b>HAM-A</b>	4,54 (±3,63)	22,05 (±8,21)	19,21 (±6,57)	p = 647 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
<b>Възраст в началото на заболяването</b>	-	28,68 (±10,81)	31,20 (±10,58)	p = 0,345 <sup>a</sup>	-
<b>Продължителност на заболяването (месеци)</b>	-	150,91 (±126,97)	85,87 (±109,52)	p = 0,278 <sup>a</sup>	-
<b>Продължителност на епизода (седмци)</b>	-	24,32 (±34,57)	10,53 (±11,34)	p = 0,176 <sup>a</sup>	-
<b>Брой предишни епизоди</b>	-	21 (±4,62)	14 (±7,93)	p = 0,007 <sup>a</sup>	-

<b>Процент верни отговори</b>	96,47 (±7,97)	97,21 (±4,2)	93,95 (±9,01)	p = 0,456 <sup>a</sup>	p = 0,177 <sup>a</sup>
-------------------------------	------------------	-----------------	---------------	------------------------	------------------------

<sup>a</sup> – Independent Samples Kruskal-Wallis test; <sup>b</sup> -  $\chi^2$  test

В извадката, при която бе изследвана експресията на дълговерижните некодиращи РНКи не се установи статистически значима разлика в разпределението по пол и възраст между здравите индивиди и пациентите, но се установи такава за показател образование. При клиничните показатели не се установиха разлики между двете пациентски групи, освен при броя на предишните епизоди и очаквано има статистически значима разлика между ЗК и пациенти за резултатите от скали MADRS и HAM-A (Таблица 3).

*Таблица 3 Демографски и клинични характеристики на извадката, при която са изследвани днкРНК*

	<b>Здрави контроли</b> <b>n=29</b>	<b>Пациенти с ГДР</b> <b>n=15</b>	<b>Пациенти с БР</b> <b>n=12</b>	<b>Ниво на значимост при сравнение ГДР/БР</b>	<b>Ниво на значимост при сравнение между ЗК/ГДР и БР</b>
<b>Възраст (mean ± SD)</b>	41,66 (±11,43)	45,07 (±11,96)	46,82 (±11,25)	p = 0,715 <sup>a</sup>	p = 0,398 <sup>a</sup>
<b>Пол (М/Ж)</b>	29 (11/18)	15 (6/9)	10 (2/10)	p = 0,187 <sup>b</sup>	p = 0,359 <sup>b</sup>
<b>Образование (години)</b>	16,48 (±3,32)	13,8 (±2,60)	13,09 (±2,63)	p = 0,559 <sup>a</sup>	p = 0,004 <sup>a</sup>
<b>MADRS</b>	3,00 (±1,41)	31 (±4,14)	30,36 (±6,25)	p = 0,800 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
<b>YMRS</b>	0,71 (±0,81)	1,20 (±0,86)	1,18 (±0,87)	p = 0,937 <sup>a</sup>	p < 0,124 <sup>a</sup>
<b>HAM-A</b>	4,85 (±3,71)	22,93 (±8,18)	22,09 (±7,56)	p = 0,860 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
<b>Възраст в началото на заболяването</b>	-	31,47 (±12,73)	27,82 (±8,81)	p = 0,550 <sup>a</sup>	-

## Резултати

Продължителност на заболяването (месеци)	-	163,73 (±124,46)	237,82 (±106,5)	p = 0,096 <sup>a</sup>	-
Продължителност на епизода (седмци)	-	14,53 (±17,10)	10,27 (±4,88)	p = 0,619 <sup>a</sup>	-
Брой предишни епизоди	-	5,27 (±3,90)	8,09 (±2,81)	p = 0,048 <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup> – Independent Samples Kruskal-Wallis test; <sup>b</sup> -  $\chi^2$  test

Извадката, в която са изследвани експресионните нива на избрани микроРНК също показва статистическа хомогенност по отношение на пол и възраст при групите на ЗК и пациентите. Отново се установи статистически значима разлика в нивото на образование между здравите индивиди и пациентите, както и в резултатите от клиничните скали MADRS и HAM-A. Между групите на ГДР и БР не се наблюдават разлики в демографските и клинични характеристики, освен при показател брой предишни епизоди на заболяването (Таблица 4).

**Таблица 4 Демографски и клинични характеристики на извадката, при която са изследвани микроРНК**

	Здрави контроли n=14	Пациенти с ГДР n=15	Пациенти с БР n=12	Ниво на значимост при сравнение ГДР/БР	Ниво на значимост при сравнение между ЗК/ГДР и БР
Възраст (mean ± SD)	43,31 (±10,29)	45,07 (±11,96)	47,08 (±11,77)	p = 0,774 <sup>a</sup>	p = 0,635 <sup>a</sup>
Пол (М/Ж)	14 (5/9)	15 (6/9)	10 (2/10)	p = 0,187 <sup>b</sup>	p = 0,400 <sup>b</sup>
Образование (години)	16,77 (±3,96)	13,8 (±2,60)	13,00 (±2,52)	p = 0,537 <sup>a</sup>	p = 0,023 <sup>a</sup>
MADRS	3,00 (±1,41)	31 (±4,14)	30,33 (±5,96)	p = 0,733 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
YMRS	0,77 (±0,83)	1,20 (±0,86)	1,25 (±0,87)	p = 0,924 <sup>a</sup>	p < 0,535 <sup>a</sup>

НАМ-А	4,54 (±3,78)	22,93 (±8,18)	22.08 (±7,2)	p = 0,845 <sup>a</sup>	p < 0,001 <sup>a</sup>
Възраст в началото на заболяването	-	31,47 (±12,73)	27.42 (±8,51)	p = 0,550 <sup>a</sup>	-
Продължителност на заболяването (месеци)	-	163,73 (±124,46)	245.00 (±104.55)	p = 0,096 <sup>a</sup>	-
Продължителност на епизода (седмци)	-	14,53 (±17,10)	10,58 (±4.78)	p = 0,619 <sup>a</sup>	-
Брой предишни епизоди	-	5,27 (±3,90)	7,67 (±3.06)	p = 0,048 <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup> – Independent Samples Kruskal-Wallis test; <sup>b</sup> -  $\chi^2$  test

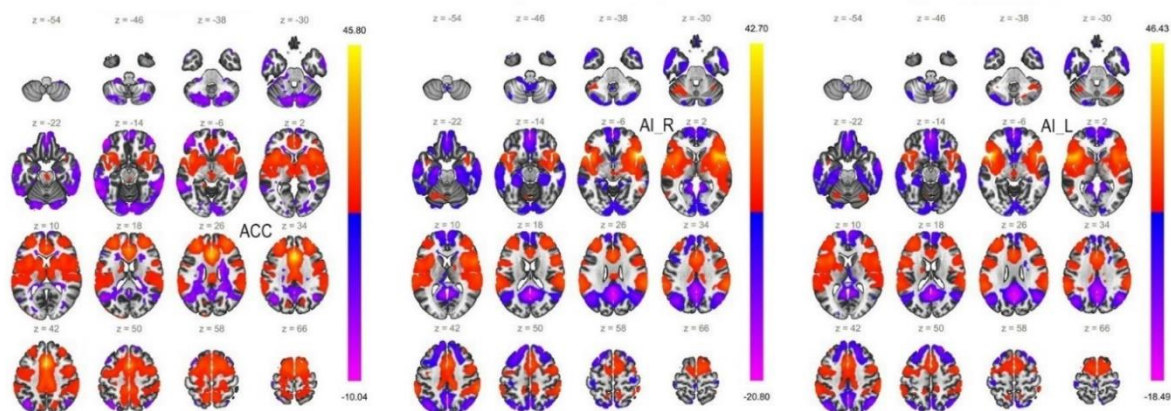
## 2. Резултати от анализа на невроизобразителните данни на ретроспективната извадка

Според налични литературни данни при пациенти с афективни разстройства се наблюдава аберантна свързаност в салиентната мрежа, поради което проведохме анализ (seed-to-voxel) на функционалната свързаност на 3 основни региона на съответната невронна мрежа на ниво цял мозък, а именно предна цингулна кора, лява и дясна предна инсула.

### 2.1. Функционална свързаност на предна цингулна кора

Първо, за да проверим достоверността на резултатите проведохме вътрегрупов анализ на функционалната свързаност, за да установим очаквани асоциации между региони на салиентната, фронто-париеталната мрежа и мрежата по подразбиране (Фиг. 2)

## Резултати



**Фигура 2** Профил на функционалната свързаност на всеки от избраните региони в цялата извадка при праг на статистическа значимост  $p < 0.05$  с корекция *Family-wise error (FWE)* на клъстърно ниво.

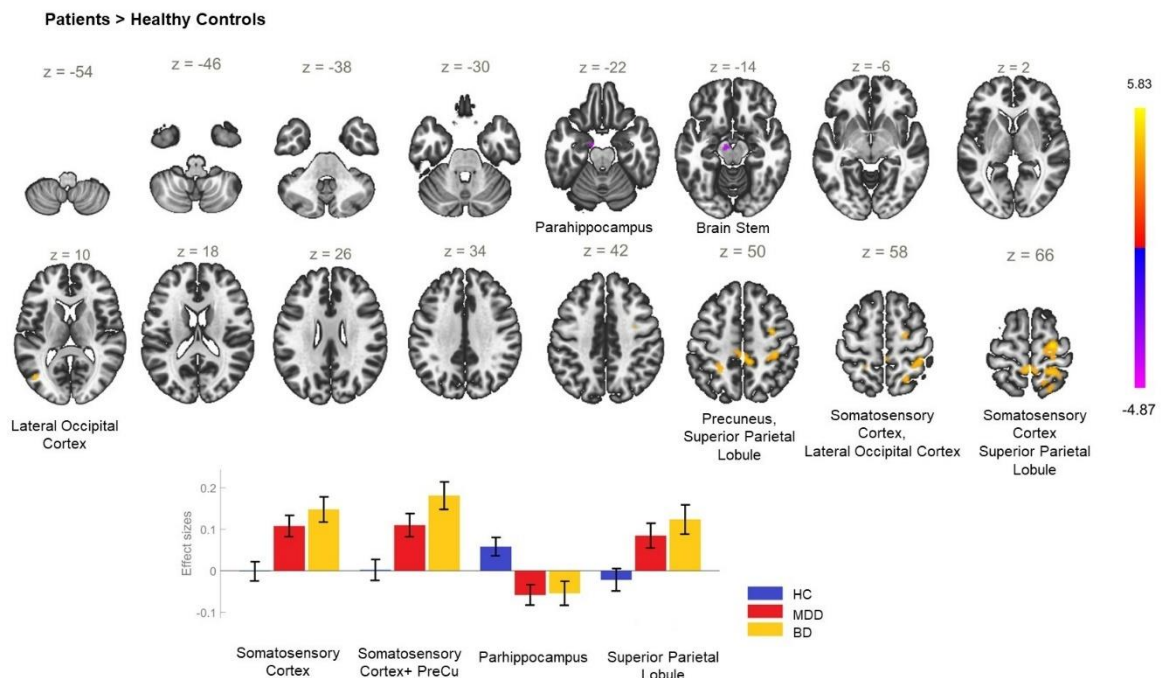
При изследване на функционалната свързаност на предната цингуларна кора се установи повишена ФС към лява и дясна прецентрална гънка, лява и дясна постцентрална гънка, горната париетална лобула двустранно и лявата латерална окципитална кора (долен дял) при пациенти в сравнение със ЗК (таблица 5, фиг. 3). Същевременно се наблюдава редуцирана ФС между ПЦК и парахипокампалия гирус в групата на депресивно болните за разлика от ЗК.

**Таблица 5** Статистически значими разлики във ФС на ПЦК при междугруповото сравнение

Междугрупо в контраст	MNI координати x,y,z	Размер на клъстър а	Ниво на значимост ( $p < 0.05$ , FWE)	Региони в клъстър
П>ЗК	+32 -4 +46	697	0.000	Десни: ПостЦГ, ПреЦГ, ГПЛ
	+2 -34 +52	526	0.000	Десни: ПостЦГ, ГПЛ, ПреКу, ЛОК, Ляв постЦГ
	-24 -48 +52	106	0.017	Л-ГПЛ
ЗК>П	-10 -10 -24	109	0.015	Л-ПХГ, мозъчен ствол

БР>ЗК	-02 -36 +66	1393	0.000	Десни: ПостЦГ, ГПЛ Л-ПостЦГ, ПреКу
	+24 -12 +66	120	0.009	Десни: ПреЦГ, ГФГ
	-2 -14 +44	105	0.018	ПЦК, ЗЦК, д-ДМК
	+18 -72 +40	86	0.047	Десни: ЛОК, КК ПреКу
ЗК>БР	+24 -92 -28	138	0.004	Десни: ЦК1, ЦК2
ГДР>ЗК	+22 -56 +56	112	0.013	Десни: ГПЛ, ЛОК
ГДР>БР	-46 -70 -32	191	0.000	Л-ЦК1

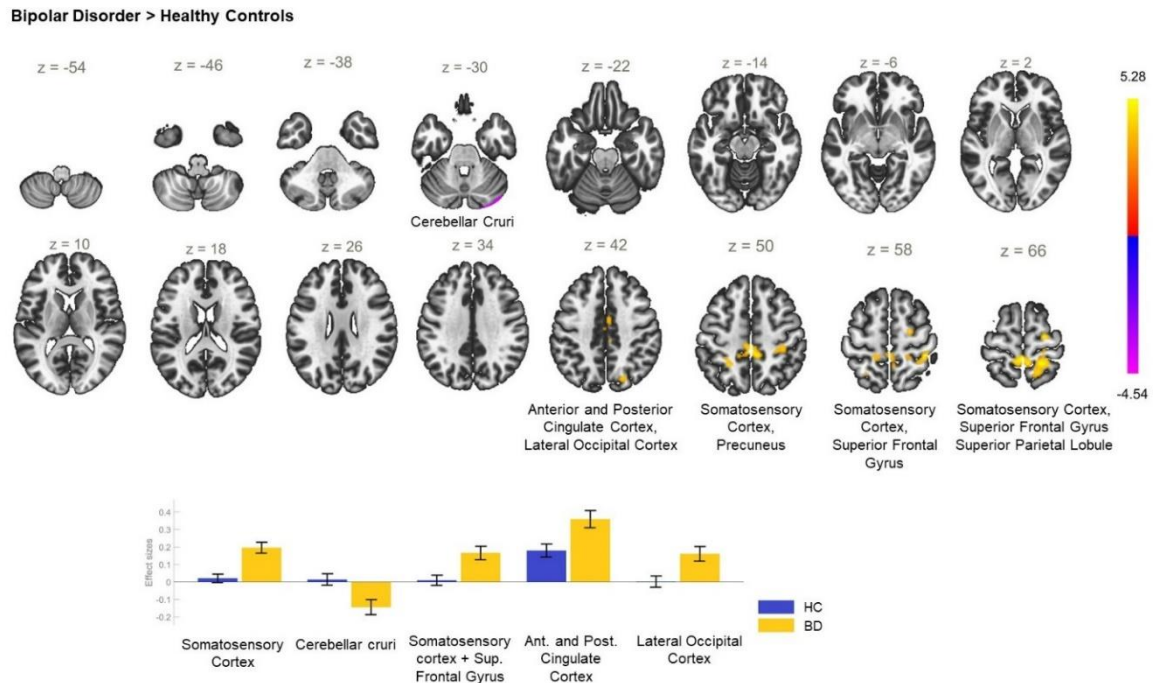
ПостЦГ - Постцентрален гирус; ПреЦГ - Прецентрален гирус; ГПЛ - Горна паритетална лобула; ЛОК - Латерална окципитална кора; ПХГ - Парахипокампаден гирус; ПреКу - Прекунеус; ЦК1 - Церебелум крус 1; ЦК2 - Церебелум крус 2; ГФГ - Горен фронтален гирус; ПЦК - Предна цингулна кора; ЗЦК - Задна цингулна кора; ДМК - Допълнителна моторна кора; КК - Кунеална кора



Фигура 3 ФС на ПЦК при всички пациенти сравнени със ЗК.

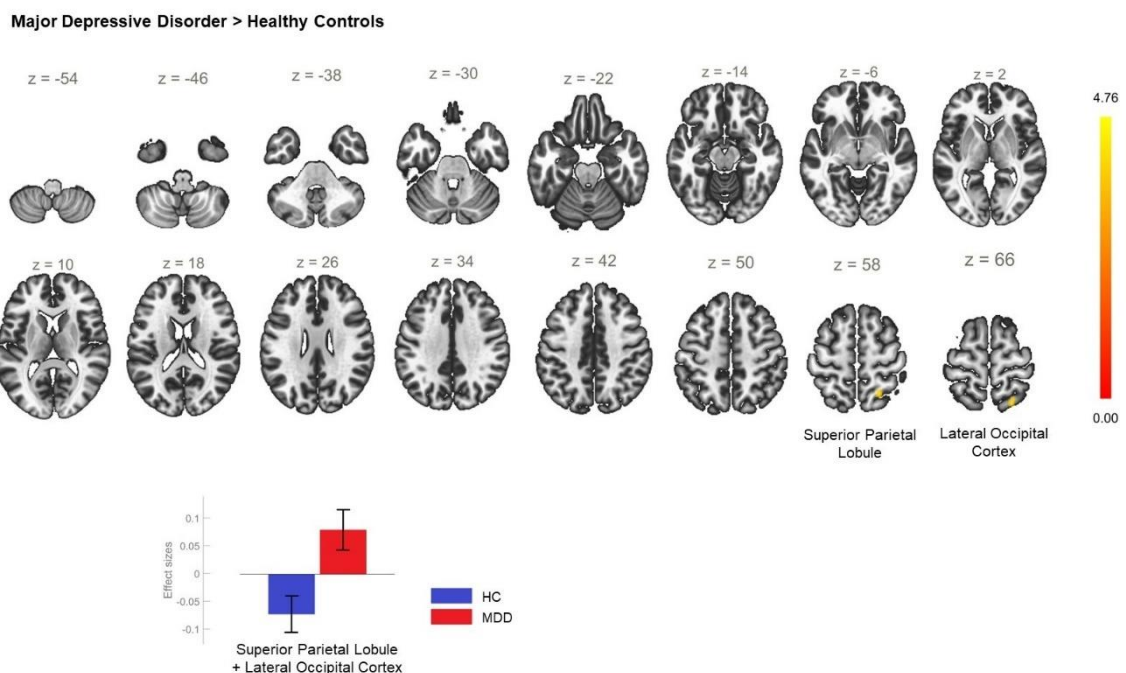
## Резултати

В групата на биполарна депресия се установи повишена ФС между ПЦК и соматосензорната кора, горен фронтален гирус, задна цингулна кора и латерална окципитална кора, както и намалена ФС между ПЦК и десните малкомозъчни крачета за разлика от ЗК (фиг. 4).



**Фигура 4** ФС на ПЦК при пациенти с биполарна депресия сравнени със ЗК

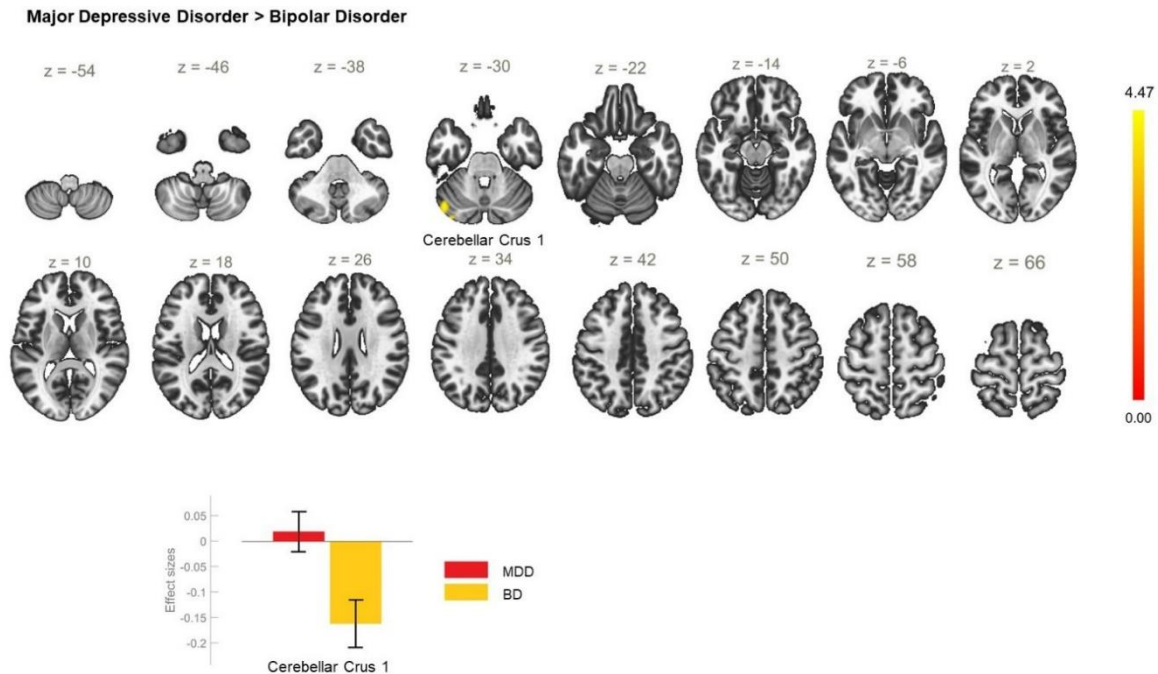
Повишена ФС се наблюдава между ПЦК и дясната горна париетална лобула, както и десния окципитален кортекс при ГДР за разлика от ЗК (фиг. 5).





**Фигура 5** ФС на ПЦК при ГДР в сравнение със ЗК.

Директното сравнение между ГДР и БР показва статистически значима хиперсвързаност на ПЦК с левите малкомозъчни крачета при ГДР, която не се наблюдава при биполярна депресия (Фиг. 6).



**Фигура 6** ФС на ПЦК при униполярна в сравнение с биполярна депресия.

## 2.2. Функционална свързаност на лява и дясна предна инсула

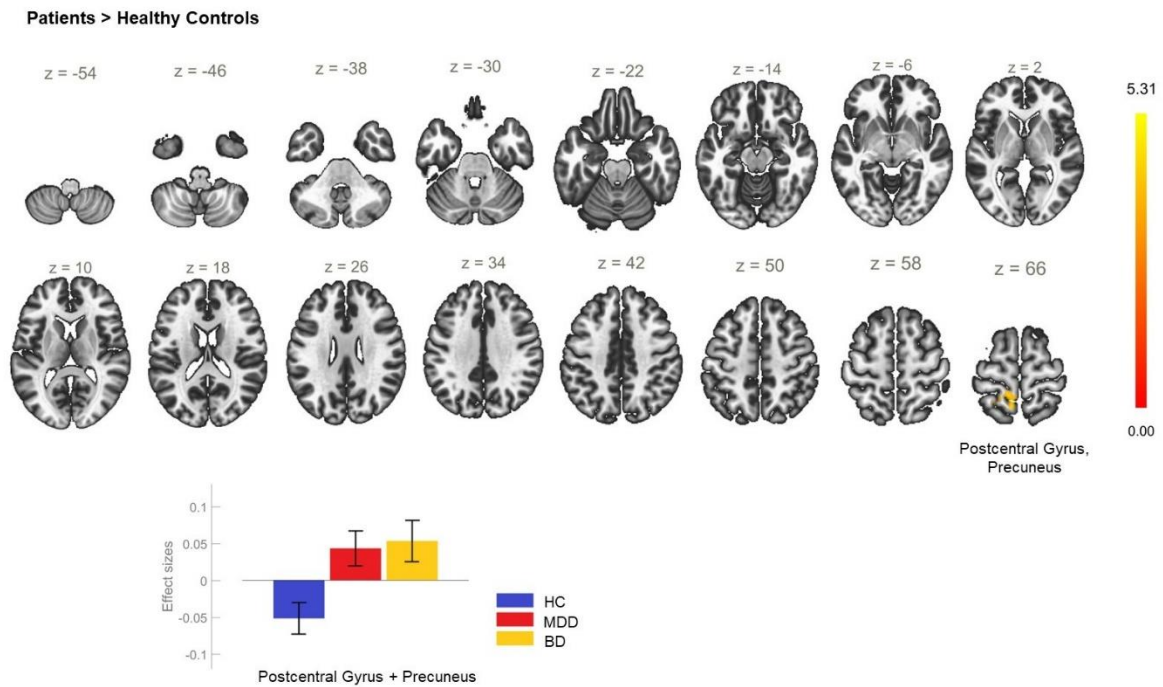
При сравняването на ФС на лПИ не се установиха статистически значими разлики на междугрупово ниво. Резултатите от сравнението на ФС на дПИ са представени в табл. 6.

**Таблица 6** Клъстър с статистически значими разлики във ФС на предна инсула при междугрупово сравнение

Междугру пов контраст	MNI координати x,y,z	Размер на кльстъра	Ниво на значимост ( $p < 0.05$ , FWE)	Региони в кльстърите
П>ЗК	-8 -52 +64	201	0.000	л-ПостЦГ, ПреКу
БР>ЗК	+54 -06 +18	108	0.017	десни: ПостЦГ, ПреЦГ
ГДР>БР	-4 +12 +58	80	0.068*	леви: ГФГ

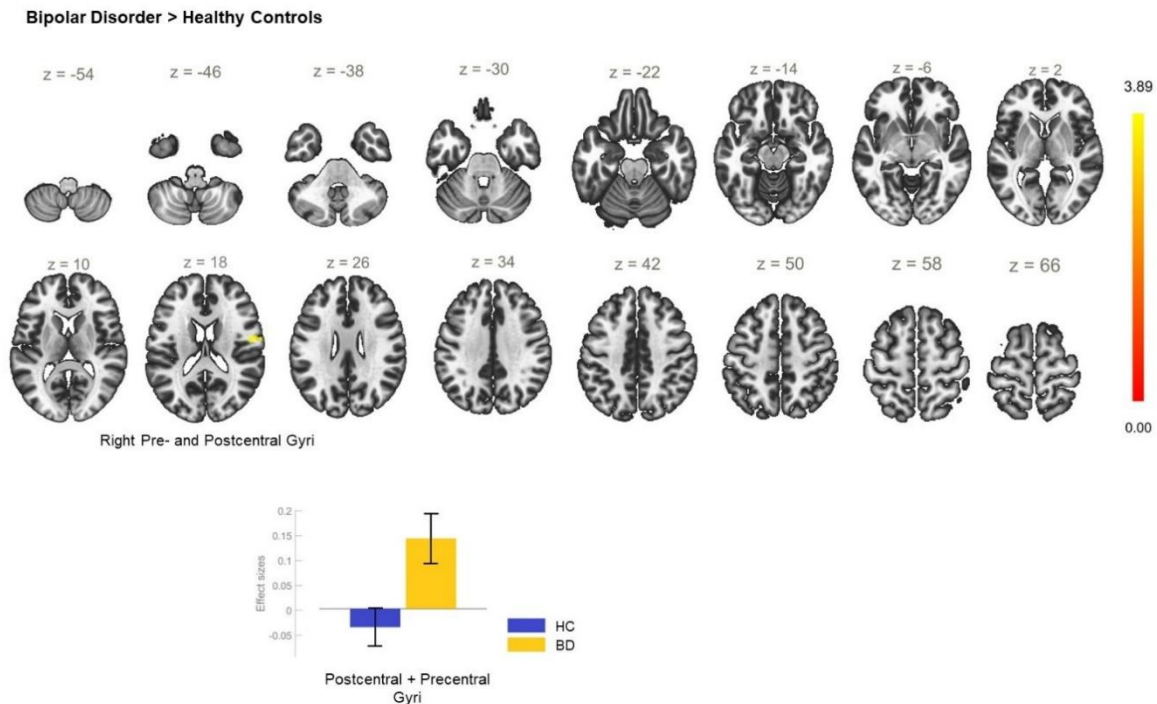


Пациентите като цяло показаха повишена ФС между дПИ и лявата постцентрална гънка, лявата горна париетална лобула и прекунеуса в сравнение със здравите лица (Фиг. 7).



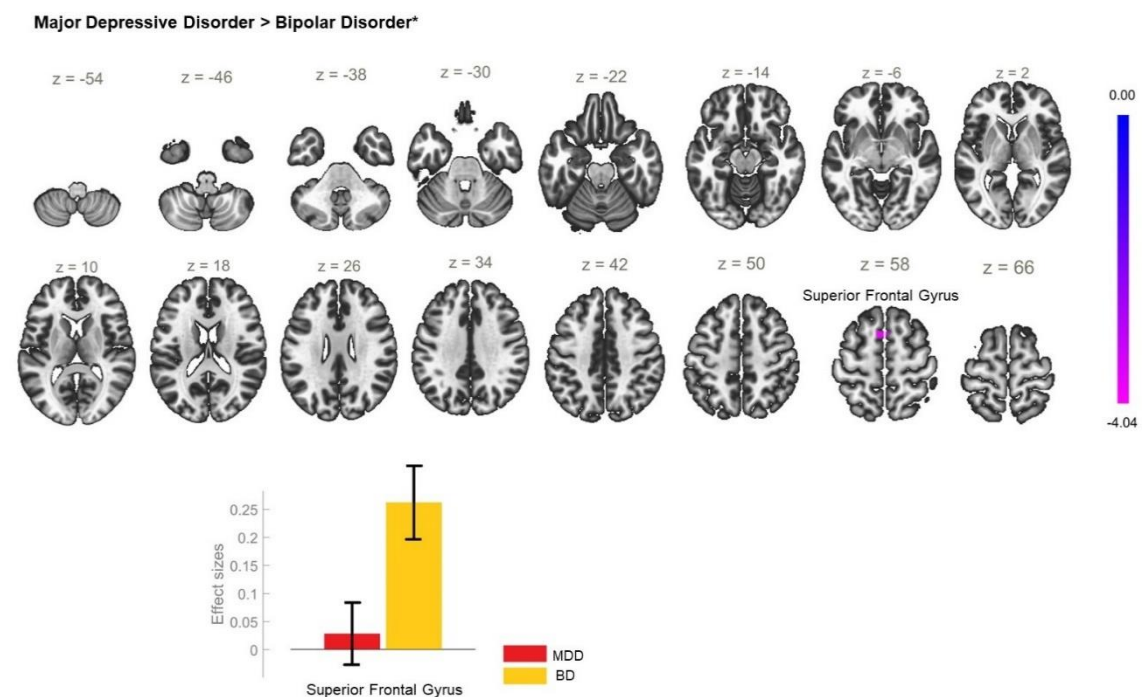
**Фигура 7** ФС на д-ПИ при сравнението между пациенти и ЗК.

При групата на БР се наблюдава хиперконективност между дПИ и десния прецентрален гирус и дПИ и десния постцентрален гирус за разлика от групата на здравите индивиди (Фиг. 8).



**Фигура 8** ФС на  $\delta$ -ПИ при БР, сравнени със ЗК

Не се установиха статистически значими разлики между ГДР и ЗК , но се установи тенденция към значимост ( $p=0.068$ ) при сравнението между ГДР и БР (фиг. 9).



**Фигура 9** ФС на  $\delta$ -ПИ при ГДР и БР ( $p=0.068$ )

### 3. Резултати от анализа на невроизобразителните данни на проспективната извадка

## Резултати

### 3.1. Резултати от контраст: неутрални дистрактори>липса на дистрактори

На вътрегрупово ниво (one-sample t-test) при ЗК се установяват значими активации със степен на значимост на клъстърно ниво  $p < 0.05$  с FWE корекция в следните региони - десни: окципитален фузиформен, лингвален, среден фронтален, триангуларна част на долен фронтален гирус и десен външен церебелум и леви: орбитален (преден, заден, медиален и латерален), среден и долен фронтален (вкл. оперкуларна част), парахимпокампаден гирус, хипокамп и таламус.

В групата на ГДР остатъчни активации се наблюдаваха в следните структури - леви: окципитален полюс, калкарина, заден и латерален орбитален гирус и медиална фронтална кора и десни: окципитален фузиформен гирус, лингвален гирус, кунеус, заден, медиален и латерален орбитален гирус, медиална фронтална кора и предна цингуларна кора (Фиг. 10А).

В групата на БР остатъчни активации при този контраст се установиха в - десни: лингвален гирус, калкарина, окципитален полюс, окципитален фузиформен гирус, таламус, хипокамп, парахипокамп, амигдала, долен и среден фронтален гирус и леви: медиален орбитален гирус, хипокамп, парахипокамп, путамен, амигдала (Фиг. 10Б). Резултатите са представени в Таблица 7.

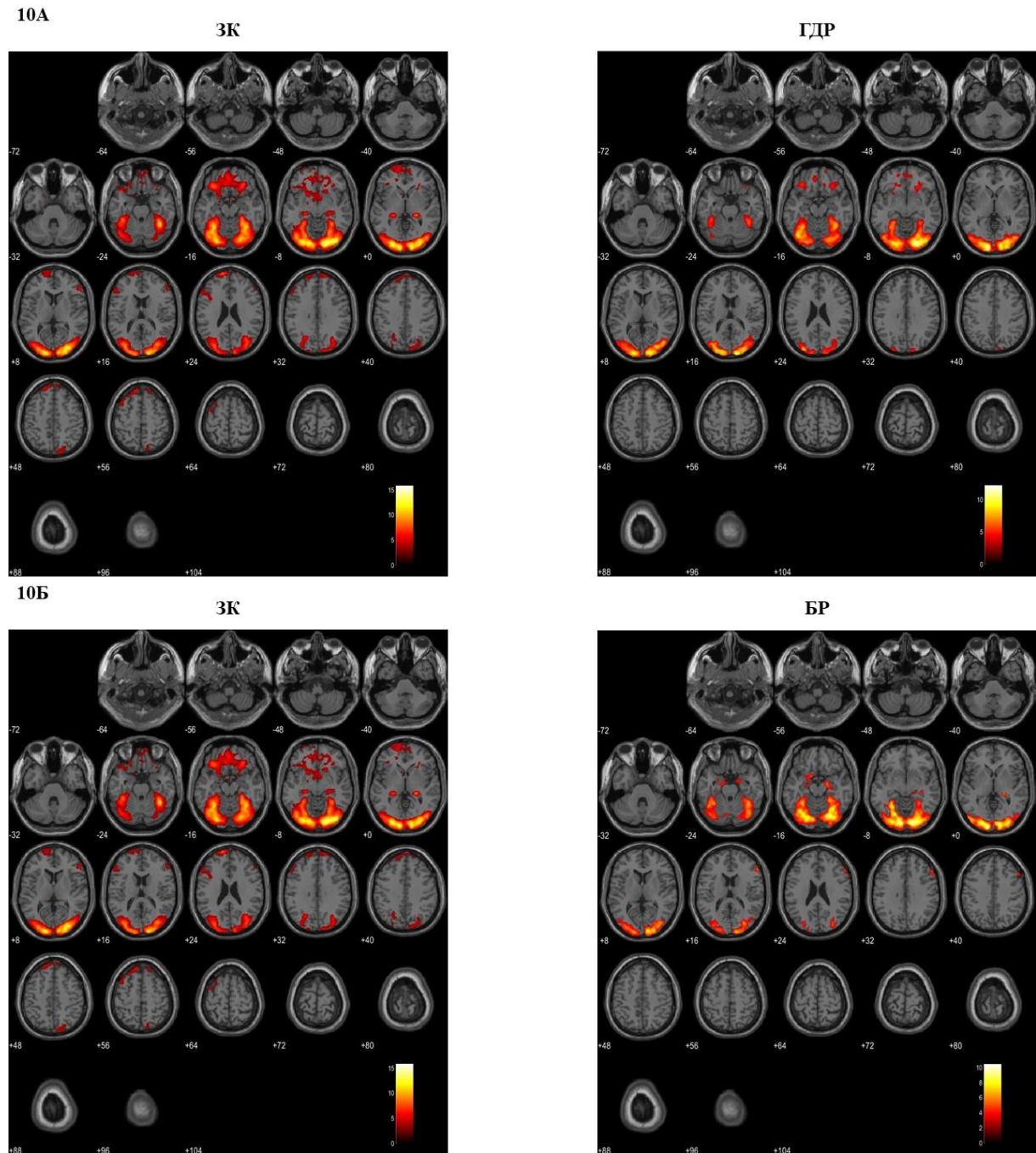
*Таблица 7 Статистически значими клъстери при контраст неутрални дистрактори>липса на дистрактори на вътрегрупово ниво*

Група	MNI координати x, y, z	Размер на клъстѐра	Ниво на значимост $p < 0.05$ , FWE	Региони в клъстѐра
ЗК	22 -86 -10	190600	<0.001	десни: ОФЗГ, ЛГ, ВЦ
	-32 30 -16	6437	<0.001	леви: ЗОГ, ЛОГ, ПОГ, МОГ,ДФГ
	-52 28 30	457	<0.001	леви: СФГ, оп.ч.ДФГ
	-22 -28 -4	224	0.005	леви: Тал, ХИП, ПХГ
	56 34 8	209	0.007	десни: тр.ч.ДФГ, СФГ

<b>ГДР</b>	-12 -96 0	137240	<0.001	леви: ОП, КЛК десни: ОФЗГ, ЛГ, ОП, Ку
	26 26 -12	427	<0.001	десни: ЗОГ, МОГ, ПИ, ЛОГ
	-32 32 -16	268	0.002	леви: ЗОГ, ЛОГ
	8 50 -10	268	0.002	десни: МедФК, ГФГ, ПЦК леви: МедФК
<b>БР</b>	14 -90 -6	126390	<0.001	десни: ЛГ, КЛК, ОП, ОФЗГ
	20 -30 -4	406	<0.001	десни: Тал, ХПК, ПХГ, АГД
	-12 8 -16	296	0.001	леви: МОГ, ХПК, ПН, АГД, ПХГ
	58 32 16	221	0.005	десни: тр.ч.ДФГ, СФГ

ОФЗГ - окципитален фузиформен вирус; ЛГ - лингвален вирус; ВЦ - външен церебелум; ЗОГ - заден орбитален вирус; ЛОГ - латерален орбитален вирус; ПОГ - преден орбитален вирус; МОГ - медиален орбитален вирус; ДФГ - долен фронтален вирус; СФГ - среден фронтален вирус; оп.ч.ДФГ - оперкуларна част на долния фронтален вирус; Тал - таламус; ХПК - хипокамп; ПХГ - парахипокампален вирус; тр.ч.ДФГ - триангуларна част на долния фронтален вирус; ОП - окципитален полюс; КЛК - калкарина; Ку - кунеус; ПИ - предна инсула; МедФК - медиална фронтална кора; ГФГ - горен фронтален вирус; ПЦК - предна цингулна кора; АГД – амигдала; ПН – путамен; ПреКу – прекунеус; ЗЦК - задна цингулна кора; ГПЛ - горна париетална лобула; ГТГ - горен темпорален вирус; СТГ - среден темпорален вирус; СМГ - супрамаргинален вирус; АнгГ - ангуларен вирус

## Резултати



*Фигура 10 Остатъчни активации при контраст неутрални дистрактори>липса на дистрактори на вътрегрупово ниво.*

Директното сравнение между ЗК и БР не даде статистически значими разлики в активността на мозъка при този контраст, но при ЗК за разлика от ГДР се наблюдаваха значими активации в няколко региона левостранно включително: горен и среден темпорален гирус, среден фронтален гирус, прекунеус, задна цингулна кора, горна париентална лобула, супрамаргинален гирус и ангуларен гирус (табл. 8). От друга страна, сравнението между БР и ГДР установи хиперактивност десностранно в: лингвален гирус, окципитален фузиформен гирус и външен церебелум при пациенти с БР за разлика от групата на ГДР (Фиг. 11А). На междугрупово

ниво при сравнението между ЗК и всички пациенти (П) се установиха остатъчни активации с тенденция към степен на значимост на клъстърно ниво  $p < 0.062$  с FWE корекция при ЗК левостранно в среден и горен фронтален гирус (Фиг. 11Б). Така описаните резултати са представени в Таблица 8.

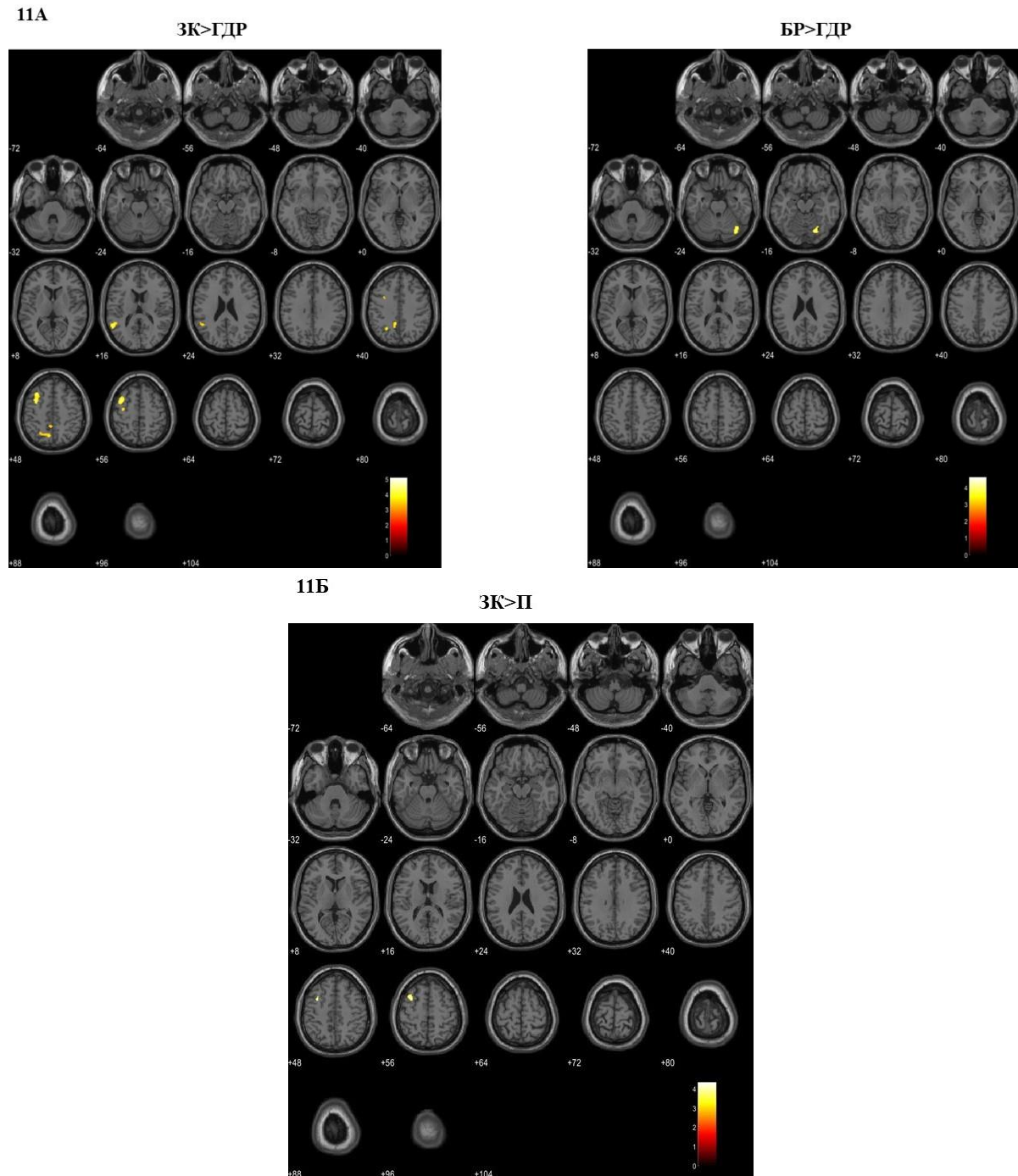
**Таблица 8. Статистически значими клъстъри при контраст неутрални дистрактори > липса на дистрактори на междугрупово ниво**

Група	MNI координати x, y, z	Размер на клъстъра	Ниво на значимост $p < 0.05$ , FWE	Региони в клъстъра
ЗК > П	-32 6 44	128	0.062*	леви: СФГ, ГФГ
ЗК > ГДР	-34 6 46	409	<0.001	л-СФГ
	-10 -56 42	273	<0.002	леви: ПреКу, ЗЦК, ГПЛ
	-52 -50 18	144	0.039	леви: ГТГ, СТГ, СМГ, АнГ
БР > ГДР	36 -68 -20	252	0.003	десни: ВЦ, ОФЗГ, ЛГ

При контраста неутрални дистрактори > липса на дистрактори сравнението между ЗК и ГДР показва налични активации в структури, асоциирани с когнитивното функциониране като фронталната, темпоралната кора и прекунеуса при същевременно активиране на супрамаргиналният гирус и ЗЦК (фигура 11А). Установи се тенденция към значимост ( $p = 0,062$ ) при сравнението между ЗК и групата на всички пациенти с резидуални активации в среден и горен фронтален гирус при ЗК (фигура 11Б).



# Резултати



*Фигура 11 Остатъчни активации при контраст неутрални дистрактори>липса на дистрактори на междугрупово ниво.*

## 3.2. Резултати от контраст: негативни дистрактори>липса на дистрактори

На вътрегрупово ниво (one-sample t-test) при ЗК се установяват значими активации със степен на значимост на клъстърно ниво  $p < 0.05$  с FWE корекция в следните региони - десни: окципитален фузиформен гирус, лингвален гирус, гирус ректус, медиална фронтална кора, прекунеус, задна цингулна кора, среден и долен фронтален гирус и леви: среден и долен

окципитален вирус, калкарина, окципитален полюс, лингвален вирус, преден, заден и латерален орибитален вирус, горен, медиален, среден и долен фронтален вирус, вирус ректус, прекунеус, задна цингулна кора

При ГДР се наблюдаваха остатъчни активации в - леви: калкарина, лингвален вирус, окципитален полюс, долен и фузиформен окципитален вирус, горен фронтален вирус и фронтален полюс и десни: лингвален вирус, окципитален фузиформен вирус, окципитален полюс, кунеус, горен и долен фронтален вирус, таламус, хипокамп, парахипокамп, амигдала, палидум, путамен, заден, латерален и медиален орбитален вирус и предна инсула (Фиг. 12А).

В групата на пациентите с БР значими активации се установиха в следните региони - леви: калкарина, лингвален вирус, окципитален и темпорален полюс, окципитален фузиформен вирус, амигдала, таламус, хипокамп, парахипокамп, енториална област, фузиформен вирус, горен и медиален фронтален вирус, заден орбитален вирус, вирус ректус и предна цингулна кора и десни: външен церебелум, окципитален фузиформен вирус, лингвален вирус, калкарина, окципитален и темпорален полюс, хипокамп, парахипокамп, амигдала, енториална област, заден орбитален вирус, горен, среден, медиален и долен фронтален вирус, вирус ректус, десен таламус (Фиг. 12Б). Гореописаните резултати са представени по-подробно в Таблица 9.

**Таблица 9** Статистически значими клъстъри при контраст негативни дистрактори>липса на дистрактори на вътрегрупово ниво

Група	MNI координати x, y, z	Размер на клъстъра	Ниво на значимост p<0.05, FWE	Региони в клъстъра
<b>ЗК</b>	22 -86 -10	210800	<0.001	десни-ОФЗК, ЛГ и леви ДОГ, СОГ, КЛК, ОП, ЛГ
	-34 32 -18	105310	<0.001	десни: ГР, медФК леви: ЗОГ, ЛОГ, ПОГ, ГФГ, ГР, медФК
	-16 -54 10	545	<0.001	десни: ПреКу, ЗЦК леви: ПреКу, ЗЦК, ЛГ
	-50 32 12	442	<0.001	леви: тр.ч.ДФГ, СФГ, оп.ч.ДФГ



## Резултати

	58 32 14	434	<0.001	десни: тр.ч.ДФГ, СФГ, оп.ч.ДФГ
	18 -50 8	204	0.012	десни: ПреКу, ЛГ, ЗЦК
	26 -18 76	144	0.053	десни: ПреЦГ, ПостЦГ
<b>ГДР</b>	-12 -94 -2	147910	<0.001	леви: КЛК, ОП, ЛГ, ОФЗГ, ДОГ десни: ЛГ, ОФЗГ, ОП, Ку
	0 60 4	2539	<0.001	десни: ГФГ, ФП леви: ГФГ, ФП
	20 -30 -2	430	<0.001	десни: Тал, ХИП, ПХГ, АГД, ПМ, ПН
	30 30 -8	327	0.001	десни: ЗОГ, ПИ, ор.ч.ДФГ, ЛОГ, МОГ, ВЦ, ОФЗГ, ЛГ, КЛК, ОП
<b>БР</b>	-10 -92 -4	152600	<0.001	леви: КЛК, ЛГ, ОП, ОФЗГ
	-22 -2 -20	1125	<0.001	леви: АГД, ЕО, Тал, ХИП, ПХГ, ФЗГ
	22 -30 -2	977	<0.001	десни: Тал, ХИП, ПХГ, АГД, ЕО, ТП, ЗОГ
	-10 60 12	843	<0.001	л-ГФГ д-ГФГ
	58 32 16	639	<0.001	десни: тр.ч.ДФГ, СФГ, оп.ч.ДФГ
	-36 22 -30	233	0.006	леви: ТП, ЗОГ

-2 46 -18

159

0.036

леви: медФК, ГР,

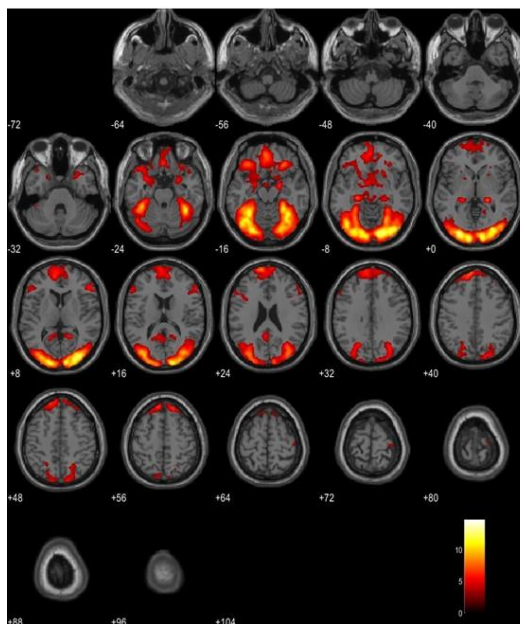
ПЦК

десни: медФК, ГР

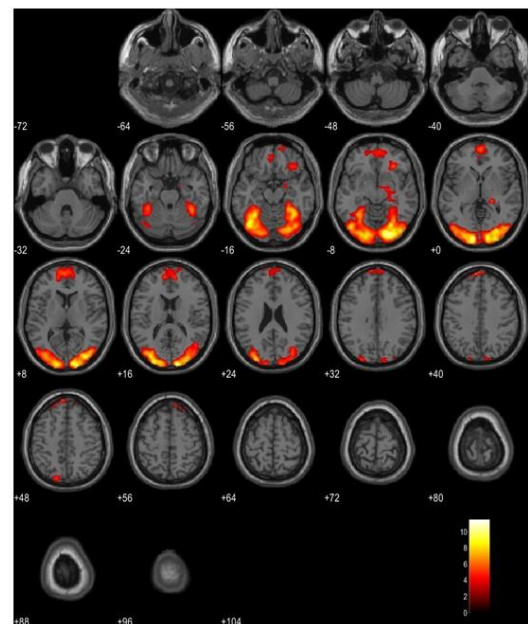
ОФЗК - окципитален фузиформен гирус; ЛГ - лингвален гирус; ДОГ - долен окципитален гирус; СОГ - среден окципитален гирус; КЛК - калкаринна кора; ОП - окципитален полюс; ЗОГ - заден орбитален гирус; ЛОГ - латерален орбитален гирус; ПОГ - преден орбитален гирус; ГФГ - горен фронтален гирус; ГР - гирус ректус; медФК - медиална фронтална кора; ПреКу – прекунеус; ЗЦК - задна цингулна кора; тр.ч.ДФГ - триангуларна част на долния фронтален гирус; СФГ - среден фронтален гирус; оп.ч.ДФГ - оперкуларна част на долния фронтален гирус; ПреЦГ - прецентрален гирус; ПостЦГ - постцентрален гирус; Ку – кунеус; ФП - фронтален полюс; Тал – таламус; ХИП – хипокамп; ПХГ - парахипокампаден гирус; АГД – амигдала; ПМ – палидум; ПН – путамен; ПИ - предна инсула; МОГ - медиален орбитален гирус; ВЦ - външен церебелум; ЕО - енторинална област; ТП - темпорален полюс; ПЦК - предна цингулна кора

12A

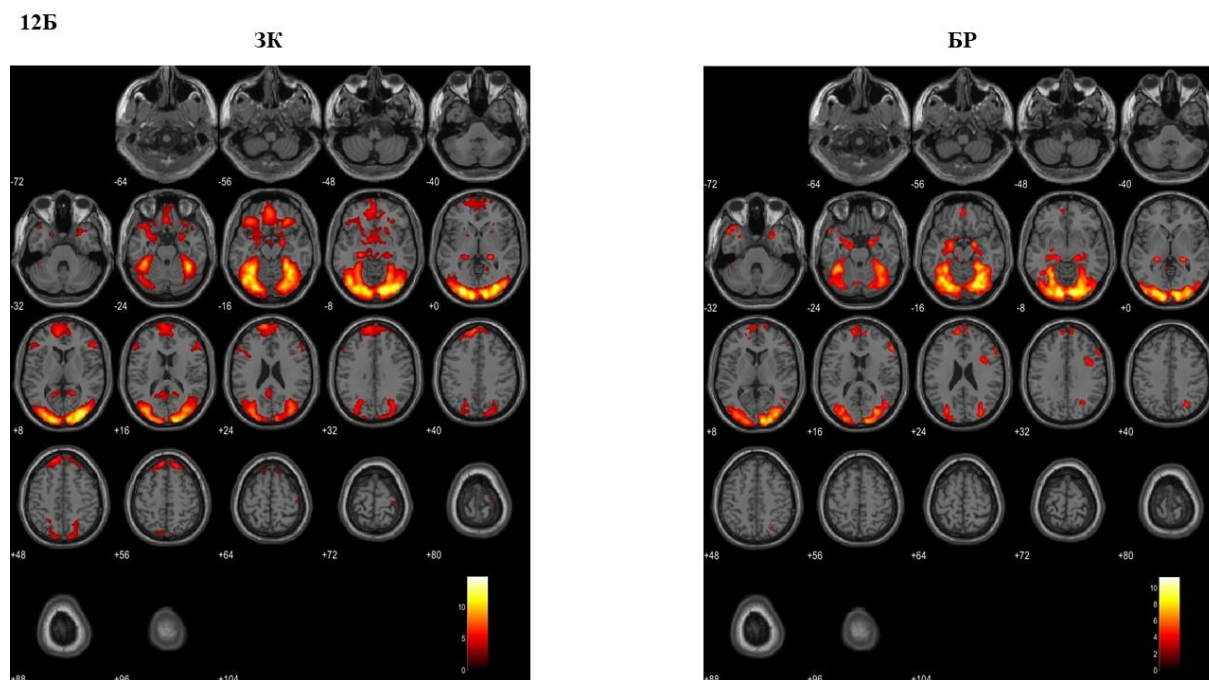
ЗК



ГДР



## Резултати

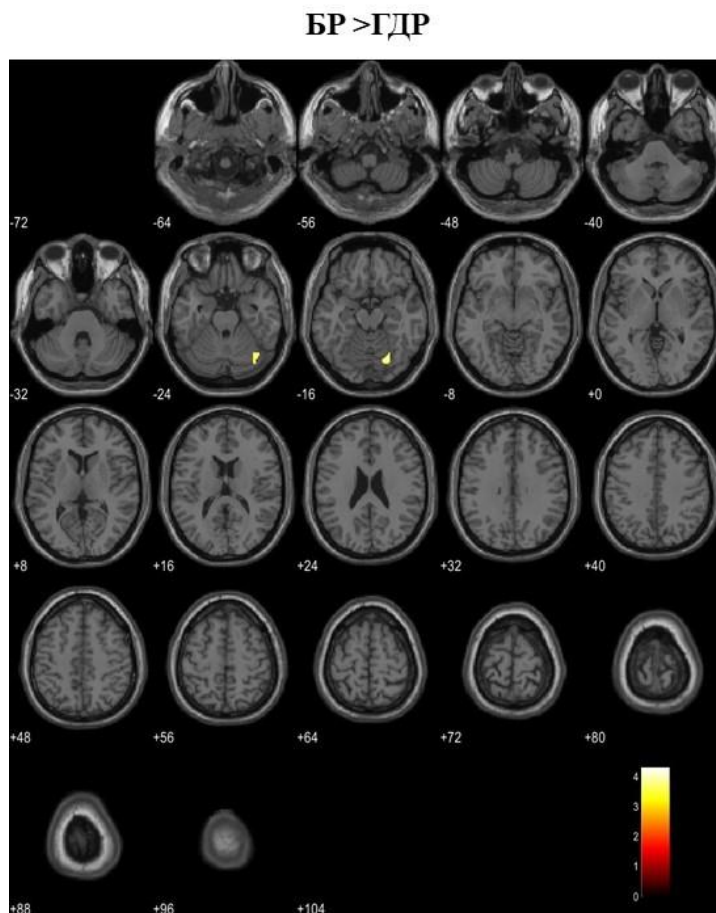


**Фигура 12** *Остатъчни активации при контраст негативни дистрактори > липса на дистрактори на вътрегрупово ниво.*

Директното сравнение между БР и ГДР показва наличие на статистически значими резидуални активации десностранно във външен церебелум, окципитален фузиформен гирус, лингвален гирус и долен окципитален гирус при пациенти с БР за разлика от ГДР (Таблица 10, Фиг. 13). При другите междугрупови анализи не се установиха остатъчни активации, преминаващи статистическия праг на значимост.

**Таблица 10** *Статистически значими кълъстър при контраст негативни дистрактори > липса на дистрактори на междугрупово ниво*

Група	MNI координати x, y, z	Размер на кълъстър	Ниво на значимост p<0.05, FWE	Региони в кълъстър
БР>ГДР	24 -72 -18	179	0.022	десни: ВЦ, ОФЗГ, ЛГ, ДОГ



*Фигура 13 Остатъчни активации при контраст негативни дистрактори > липса на дистрактори на междугрупово ниво.*

### **3.3. Резултати от контраст: негативни дистрактори > неутрални дистрактори**

На вътрегрупово ниво (one-sample t-test) при ЗК се установяват значими активации със степен на значимост на клъстърно ниво  $p < 0.05$  с FWE корекция в следните региони - леви: среден и долен темпорален гирус, среден и долен окципитален гирус, фузиформен гирус, окципитален полюс, горен фронтален гирус, предна цингулна кора, прекунеус и десни: долен темпорален гирус, среден и долен окципитален гирус, окципитален фузиформен гирус, горен фронтален гирус, задна цингулна кора и прекунеус.

При ГДР статистически значими остатъчни активации се наблюдаваха в - леви: горен, среден и долен окципитален гирус, окципитален фузиформен гирус, горен фронтален гирус, предна и задна цингулна кора, прекунеус и десни: среден и долен окципитален гирус, окципитален фузиформен гирус, външен церебелум, долен темпорален гирус, горен и долен фронтален гирус, предна цингулна кора, фронтален полюс и фронтален оперкулум (Фиг. 14А).

## Резултати

Значимите активации в групата на БР се откриха в следните региони - десни: среден и долен окципитален гирус, окципитален фузиформен гирус, окципитален полюс, калкарина, долен темпорален гирус, външен церебелум, таламус, хипокамп, парахипокамп, лингвален гирус, прекунеус, задна цингулна кора и леви: таламус, горен фронтален гирус, фронтален и окципитален полюс, предна цингулна кора, горен, среден и долен окципитален гирус (Фиг. 14Б).

При този контраст междугруповото сравнение не показва статистически значими резидуални активации. Резултатите са представени в Таблица 11.

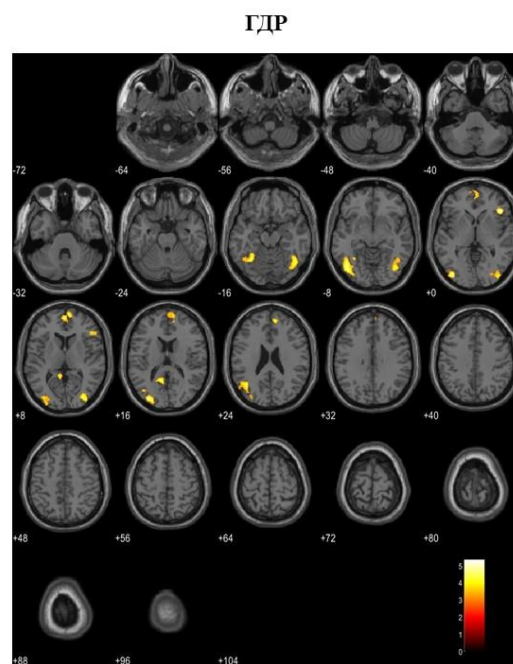
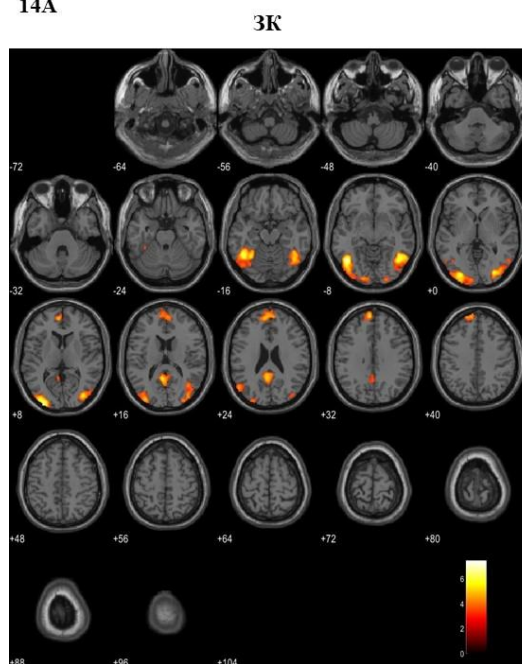
*Таблица 11 Статистически значими клъстери при контраст негативни дистрактори>неутрални дистрактори*

Група	MNI координати x, y, z	Размер на клъстѐра	Ниво на значимост p<0.05, FWE	Региони в клъстѐра
ЗК	-44 -62 -8	2939	<0.001	леви: ДТГ, ДОГ, СТГ, ФЗГ, СОГ, ОП
	46 -62 -12	2118	<0.001	десни: ДТГ, ДОГ, ОФЗГ, СОГ
	-6 56 32	1056	<0.001	леви: ГФГ, ПЦК Десни: ГФГ
	-4 -52 18	756	<0.001	леви: ЗЦК, ПреКу десни: ЗЦК, ПреКу
ГДР	-40 -84 2	1261	<0.001	леви: ДОГ, СОГ, ГОГ, ОФЗГ
	32 -82 4	679	<0.001	десни: ДОГ, СОГ, ОФЗГ, ВЦ, ДТГ
	12 48 20	478	<0.001	десни: ГФГ, ПЦК, ФП леви: ГФГ, ПЦК
	-8 -48 10	139	0.048	леви: ЗЦК, ПреКу, ЛГ
	42 28 2	137	0.051	десни: ФО, орб.ч.ДФГ, тр.ч.ДФГ,

БР	30 -86 -4	482	<0.001	ДОГ, ОФЗГ, ОП, КЛК, ДОГ, СОГ
	42 -62 -12	459	<0.001	десни: ДТГ, ОФЗГ, ДОГ, ВЦ
	-6 -14 4	290	0.001	леви: Тал десни: Тал, ХИП, ПХГ
	-8 58 26	258	0.002	леви: ГФГ, ФП, ПЦК
	8 -54 2	207	0.008	десни: ЛГ, ПреКу, ЗЦК, КЛК
	-22 -92 20	184	0.015	леви: ГОГ, СОГ, ДОГ, ОП

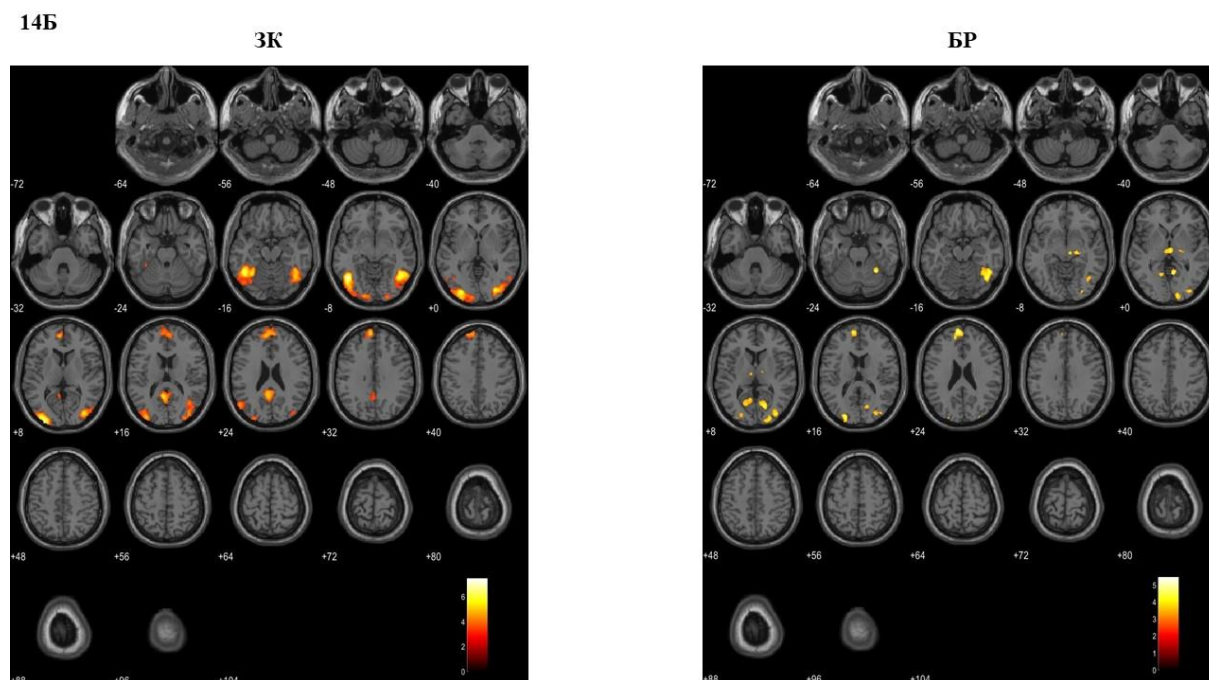
ДТГ - долен темпорален гирус; ДОГ - долен окципитален гирус; СТГ - среден темпорален гирус; ФЗГ - фузиформен гирус; СОГ - среден окципитален гирус; ОП - окципитален полюс; ОФЗГ - окципитален фузиформен гирус; ГФГ - горен фронтален гирус; ПЦК - предна цингулна кора; ПреКу – прекунеус; ЗЦК - задна цингулна кора; ГОГ - горен окципитален гирус; ВЦ - външен церебелум; ФП - фронтален полюс; ЛГ - лингвален гирус; ФО - фронтален оперкулум; орб.ч.ДФГ - орбитална част на долния фронтален гирус; тр.ч.ДФГ - триангуларна част на долния фронтален гирус; ОП - окципитален полюс; КЛК – калкарина; Тал – таламус; ХПКП – хипокамп; ПХПКП - парахипокампален гирус; ФП - фронтален полюс

14А





## Резултати

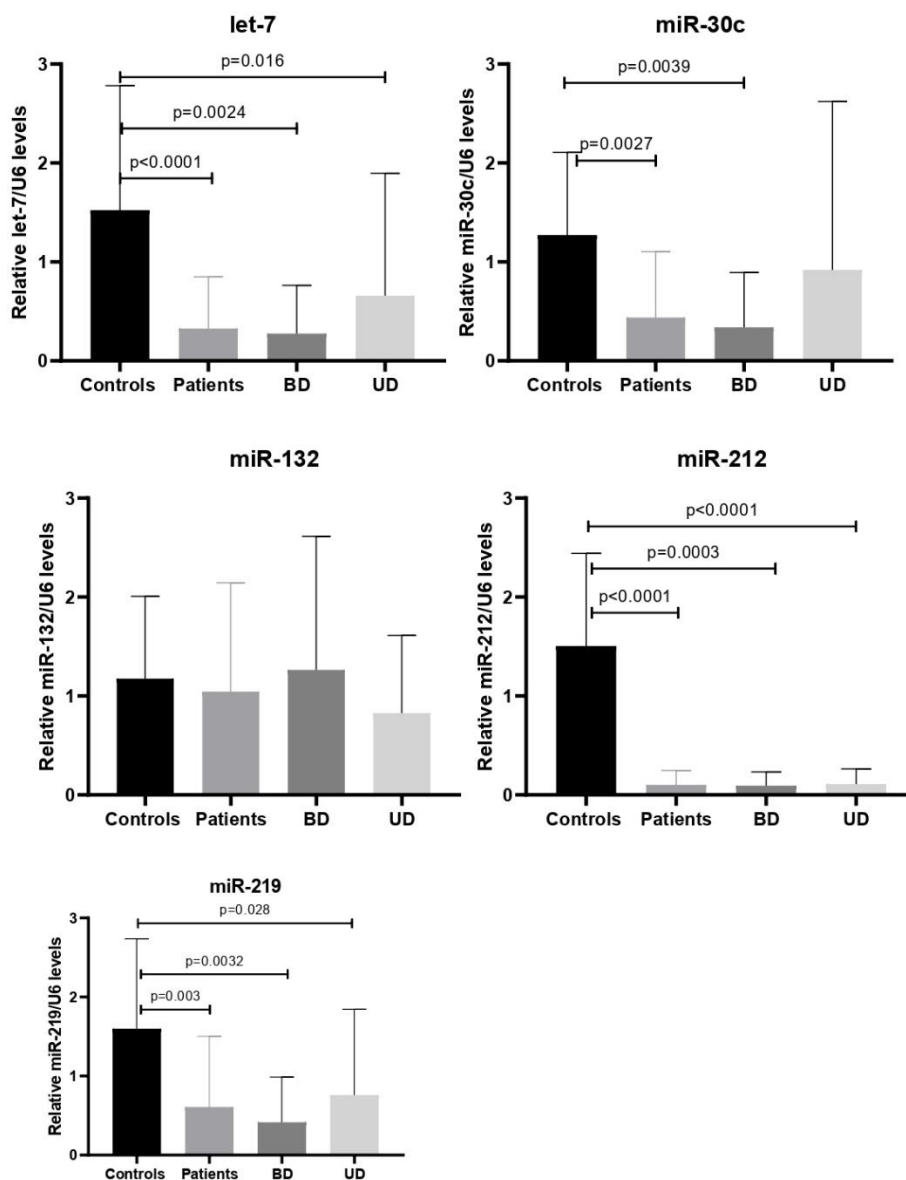


**Фигура 14** *Остатъчни активации при контраст негативни дистрактори > неутрални дистрактори на вътрегрупово ниво.*

### 4. Резултати от молекулно-биологични анализи

На междугрупово ниво в анализираната извадка от ЗК = 29, ГДР = 11 и БР = 16 не се установиха статистически значими разлики в нивото на експресия на избраните дълговерижни некодиращи РНК-и. При изследването на експресионните нива на определени микро-РНК-и в извадка от 14 ЗК, 11 пациенти с ГДР и 16 пациенти с БР се установи статистически значимо понижено транскрипционните нива на *let-7f*, *miR-30c*, *miR-212*, *miR-219* (Фиг. 15), *miR-125b*, *miR-126*, *miR-138*, *miR-146a* и *miR-182* (Фиг. 16) в групата на пациентите.

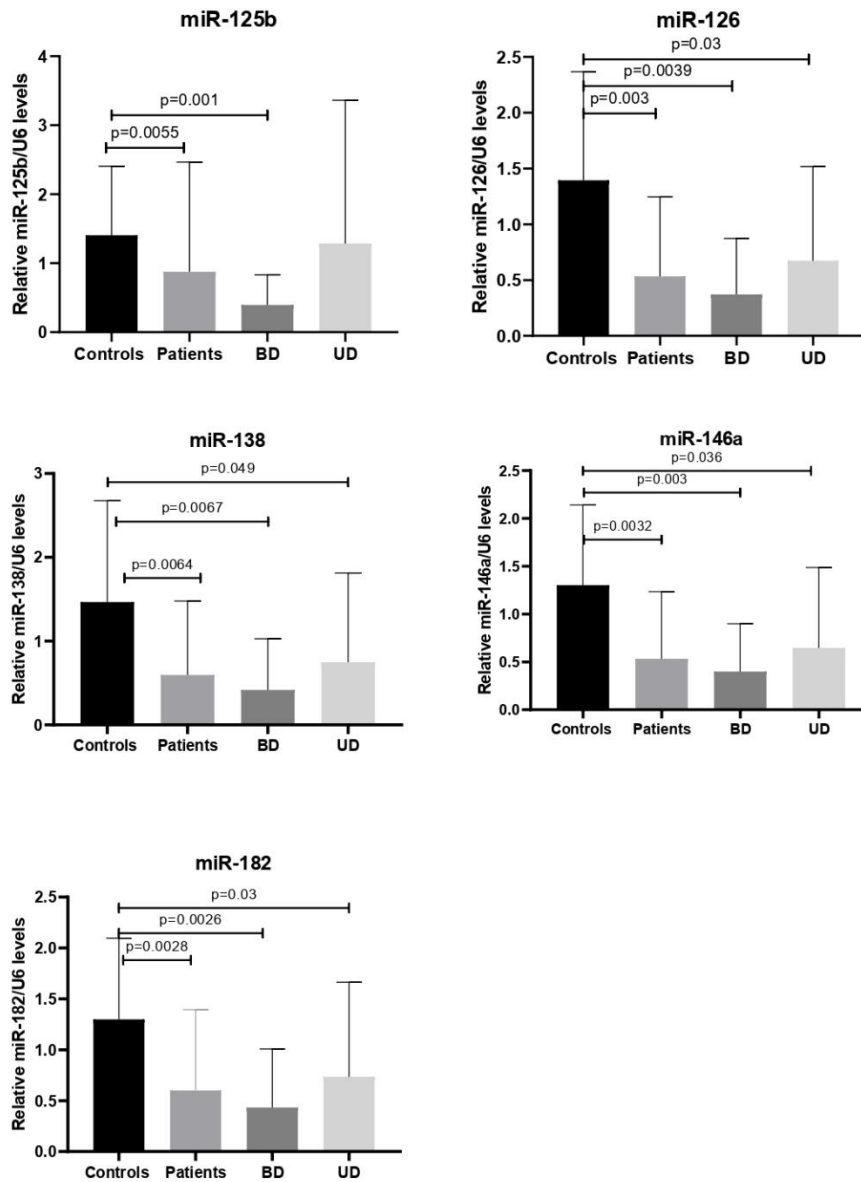
При пациенти с биполярна депресия се установиха понижени експресионни нива на *let-7f*, *miR-30c*, *miR-212*, *miR-219*, *miR-125b*, *miR-126*, *miR-138*, *miR-146a* и *miR-182* за разлика от здрави контроли. Пациентите с ГДР показаха по-ниски транскрипционни нива на *let-7f*, *miR-212*, *miR-219*, *miR-126*, *miR-138*, *miR-146a* и *miR-182* в сравнение със ЗК. Не се установи статистически значима разлика в експресионните нива на селектираните микро-РНКи между групите пациенти с униполярна и биполярна депресия. Нивата на *miR-132* също не показаха значими различия на междугрупово ниво (Фиг. 15, 16).



*Фигура 15 Междугрупови разлики в експресионните нива на избрани микро-РНКи*



# Резултати



*Фигура 16 Междугрупови разлики в експресионните нива на избрани микро-РНКи*

---

## Обсъждане

### 1. Обсъждане на невроизобразителните резултати на ретроспективната извадка

Първата значима находка от това проучване е увеличената функционална свързаност между ПЦК и първичния соматосензорен и моторен кортекс, както и горния париетален лобул, прекунеуса и десния латерален окципитален кортекс при всички пациенти с депресивен синдром в сравнение със ЗК. Тези резултати изглежда се дължат на пациентите с биполарна депресия, тъй като същите региони са значими при директното сравнение БР срещу ЗК.

Известно е, че ПЦК има множество функции. От голямо значение за депресията е обработката както на физическа, така и на психологическа болка, при която ПЦК е свързана с афективния компонент. Първичната соматосензорна кора, от друга страна, е свързана със сензорно-дискриминативния компонент. Повишена функционална свързаност между таламуса и соматосензорната кора (ССК) е открита при ГДР в сравнение със ЗК, което корелира с тежестта на основните симптоми на ГДР, като напр. когнитивна дисфункция, анхедония и др. Имайки предвид нашите констатации за повишена ФС между ПЦК/ССК в групата пациенти, ние предполагахме, че депресията може да е свързана с увреждане на сензорно-дискриминативната функция на ССК, което води до феноменологичната сигнатура на психична болка както при ГДР, така и при БР.

Друго интересно откритие в нашето проучване е, че ФС между ПЦК и дясната горна париетална лобула (ГПЛ) е увеличена както при ГДР, така и при БР в сравнение със ЗК. ГПЛ участва в интегрирането на соматосензорните и визуално-моторните процеси и особено в едновременната обработка на множество зрителни стимули. Следователно, хиперсвързаността на ПЦК-ГПЛ може да обясни общите когнитивни симптоми и при двете разстройства – нарушено възприятие, хипопросексия и псевдодеменция.

Убедителна констатация в проучването се оказа намаляването на ФС между ПЦК и малкия мозък при БР за разлика от ЗК и между ПЦК и левите малкомозъчни крачета при БР в сравнение с ГДР. Малкият мозък участва в обработката на психологическата болка и като се има предвид значителната връзка между психологическата и физическата болка, както и между психологическата болка и риска от самоубийство при депресия, промените в неговата свързаност могат да бъдат не само бъдещ диагностичен, но и терапевтичен маркер. Трябва да се отбележи, че церебеларните дисфункции също са от значение за психомоторната регулация, която теоретично е свързана с повишената свързаност между ПЦК и първичната моторна кора.

## Обсъждане

Латерализацията на мозъчната функция остава една от най-интересните области на изследване, особено след като е демонстрирана както при гръбначни, така и при безгръбначни видове. В нашето проучване промените във ФС на дясната ПИ демонстрират значителни разлики между групите за разлика от лявата ПИ, което повдига въпроса за функционалната специфика на дясната ПИ като регион на интерес в патофизиологията на разстройствата на настроението. Последните научни доказателства предполагат важна роля на дясната ПИ в процесите на интероцепция. Освен това, д-ПИ е свързана с афективно-перцептивната форма на емпатия, докато л-ПИ предполагаемо участва както в когнитивно-оценъчната, така и в афективно-перцептивната форма. Тези констатации, съчетани с настоящите резултати от нашето изследване, потвърждаващи промените във връзката между д-ПИ, соматосензорния и моторния кортекс при пациенти с биполарна депресия, предполагат нарушение в интероцептивната и афективна интеграция при БР в сравнение със ЗК. Освен това, хипосвързаността между д-ПИ и дясна средна мозъчна гънка в сравнение с л-ПИ може да се тълкува като увреждане както на интероцепцията, така и на когнитивния контрол при униполарна депресия, което предполага възможността за различна степен на нарушена свързаност в континуум с два феноменологични субстрата, а именно ГДР и БР.

Нашето изследване добавя към нарастващите доказателства за участието на салиентната мрежа в патофизиологията на разстройствата на настроението. Наблюдаваните промени могат да обяснят някои от когнитивните, психомоторните, емоционалните и волевите смущения, които се наблюдават във феноменологията както на ГДР, така и на БР. В допълнение, нашите открития предполагат както общи, така и различни аберации при униполарна и биполарна депресия, които могат да се разглеждат като подкрепящи хипотезата за съществуващ континуум от разстройства на настроението.

### **2. Обсъждане на невроизобразителните резултати на проспективната извадка**

Основните резултати от изпълнението на когнитивната задача с емоционални дистрактори включват активирането на структури, отговорни както за обработката на зрителни стимули, така и за основни когнитивни и социално-когнитивни функции като внимание, памет, взимане на решение, абстрактно мислене, отговор на социални стимули и т.н. в трите изследвани групи: ЗК, ГДР и БР при всички изследвани контрасти. При контраста неутрални дистрактори>липса на дистрактори в сравнението между ЗК и групата на пациентите и с ГДР и с БР се открие тенденция за хипоактивация на ляв среден фронтален гирус и на ляв горен фронтален гирус при пациенти. От друга страна при междугруповия анализ ANOVA се установи хипоактивация на ляв среден фронтален гирус, ляв прекунеус, лява задна

цингулна кора, лява горна париетална лобула, ляв горен темпорален гирус, ляв супрамаргинален гирус и ляв среден темпорален гирус в групата на ГДР за разлика от ЗК. В допълнение, директното сравнение на БР и ГДР демонстрира хиперактивация на десните външен церебелум, окципитален фузиформен гирус, лингвален гирус и фузиформен гирус при БР. Липсата на статистически значими разлики между ЗК и БР говори за значително по-леки нарушения в когнитивното функциониране при БР спрямо ГДР.

При контраста негативни дистрактори>липса на дистрактори статистически значими разлики се установиха само при сравнението между БР и ГДР, като се отличи повишена активация на десния външен церебелум, десния фузиформен гирус, десния лингвален гирус и десния долен окципитален гирус в групата на пациентите с БР. При контраста негативни дистрактори>неутрални дистрактори не се откриха статистически значими активации. Липсата на разлики може да се дължи на няколко причини: недостатъчен брой активни блокове, малка извадка, а също така и на bias, който се дължи на предоминантно използваната негативна емоция – отвращение.

Когницията е един от основните изследвани домейни с цел откриване на диагностични маркери при афективни разстройства. Няколко от регионите, които се откриха в настоящото проучване (горен и среден фронтален гирус, среден темпорален гирус, прекунеус, горна париетална лобула) са ангажирани именно с тази функция. Тези резултати допълват доказателствата, налични в досегашната литература.

Съществуват множество доказателства за променена активност на прекунеуса, префронталната, парацингулна, фронтална оперкуларна, задна париетална и латерална окципитална кора, инсула, амигдала, хипокамп и таламус при задачи, изследващи памет, внимание и взимане на решение при ГДР и БР и то не винаги обвързани със състоянието на афекта. Това говори за различно ангажиране на структурите, опосредстващи когнитивния контрол при афективни разстройства и предполага наличие на променена свързаност и/или междуклетъчни интеракции, които обуславят дефицита, често срещан като част от клиничната картина на ГДР и БР.

При униполярна и биполярна депресия са открити и различни структурни и функционални нарушения в невронните мрежи, ангажирани с обработката на емоции и стимули на възнаграждение (reward-processing). Най-често се наблюдава различна активност на региони като амигдала, ПЦК, префронтална кора и стриатум в контекста на задачи, активиращи когницията или емоционалното процесирание при двете афективни разстройства. Повечето от регионите, които се откриха в настоящето проучване също са конкордантни с научната литература.

## Обсъждане

Например, аберации в свързаността на ангуларния гирус са асоциирани с анхедония, а промени в активността му са наблюдавани по време на задача с лицево разпознаване на емоции при ГДР спрямо ЗК. Това говори за възможното участие на ангуларния гирус в мрежа, свързана с възприятието и отговора към емоционални стимули и предполага ролята на тази структура в патогенезата на афективните разстройства.

В допълнение, разлика в свързаността между стриатум и ангуларния гирус, таламус, церебелум, нуклеус каудатус и др. е открита при сравнение на пациенти с първи и такива с рекурентен депресивен епизод, а активността на стриатума е понижена при обработка на обратната връзка от удоволствени стимули (reward feedback) при пациенти с депресия за разлика от здрави контроли. Цитираните данни навеждат и на мисълта за наличието на конектом на емоционалното и когнитивно процесирание, който включва и региони, които до момента са предимно обвързвани с други функции, напр. ангуларния гирус, церебелума и др. Допълнителното обследване на този разширен конектом би могло да даде по-ясна представа за механизмите на афективните разстройства и за хетерогенната интериндивидуална симптоматика, характерна не само за тях, но и за психичните разстройства като цяло.

Освен нарушената емоционална реактивност, друг основен симптом на депресията е намалената волева активност. Този симптом не се ограничава само до афективните разстройства и е възможно да има отделен патофизиологичен механизъм. Например, съществуват доказателства, че нарушенията в активността и свързаността на вентро-медиалната префронтална кора са свързани с промяна във волевата активност и удоволствените преживявания не само при ГДР и БР, но и при шизофрения. Това предполага наличие на общи механизми при психичните разстройства не само на симптоматологично, но и на патофизиологично ниво и налага по-задълбоченото им изучаване като част от по-разширена рамка с евентуална цел откриване на патофизиологични комплекси, които могат да променят терапевтичната насока. Така например към момента транскраниалната магнитна стимулация се използва за индиректна стимулация на вентромедиалната префронтална кора и бъдещи проучвания биха могли да оценят този метод за лечение на конкретна симптоматика, а не на нозологична единица.

Макар че до скоро се считаше, че функцията на малкия мозък се ограничава до двигателната координация, все повече проучвания откриват функционална връзка между тази структура и множество когнитивни и емоционални процеси. Освен това научните изследвания сочат, че наличието на аберации в свързаността и активността на малкия мозък са асоциирани с различни психични заболявания, включително афективните разстройства.

Предвид собствените ни резултати, показващи разлика в активността на малкия мозък между ГДР и БР при контраста неутрални дистрактори>липса на дистрактори и негативни дистрактори>липса на дистрактори, можем да заключим, че малкия мозък е структура на интерес както за патогенезата на афективните разстройства, така и за възможността активността и свързаността му да са бъдещ таргет за изследване в диагностичен и терапевтичен аспект.

Установяването на консистентни промени в мозъчната активност и свързаност при афективни разстройства би могло да спомогне за подобряване на диагностиката, проследяването и терапията им. Въпреки множеството открития обаче до момента няма валидиран диагностичен биомаркер, тъй като се прилагат различни парадигми и методи на обработка и липсва сравнимост на направените открития в статистически значима извадка от населението. Затова са необходими още задълбочени проучвания, които да изяснят причините за наличните към момента хетерогенни резултати. Освен това използваната методология в невроизобразяването и обработката на данните също трябва да бъдат стандартизирани, тъй като е установено, че това са част от причините за липсата на достатъчна надеждност и валидност на резултатите.

Променената активност показана в настоящето проучване, свързана предимно с региони, които участват в когнитивни и регулаторни процеси, би могла да предположи, че основните нарушения при ГДР и БР са свързани с когнитивната обработка на външни и вътрешни стимули. Това се подкрепя и от липсата на остатъчни активации при наличието на емоционални дистрактори, което може да се интерпретира като еднакво процесирание на емоциите (в случая на емоцията „отвращение“, която е преобладаваща в използваната парадигма) при здрави индивиди и пациенти с ГДР и БР.

### **3. Обсъждане на резултатите от молекулно-биологичните изследвания**

Значимите резултати от молекулно-биологичните изследвания са откритите ниски транскрипционни нива на микроРНК let-7f, miR-212, miR-219, miR-126, miR-138, miR-146a и miR-182 както в групата на пациентите, така и в групите на ГДР и БР поотделно спрямо ЗК. MiR-30c и miR-125b показаха редуцирани транскрипционни нива в групата на пациентите и в тази на БР в сравнение със ЗК. MiR-132 не показва значима диференциална експресия. Не се откриха статистически значими разлики между ГДР и БР.

Повечето от изследваните микроРНК са асоциирани с процесите невrorазвитие, невронна пластичност, невродегенерация и невровъзпаление, като откритите в нашето проучване промени потвърждават хипотезите за връзката между тези процеси и патогенезата на афективните разстройства. Освен това, за повечето от изследваните



## Обсъждане

микроРНКи съществуват доказателства, че имат различна експресия при ГДР и БР.

Например, при пациенти с ГДР и БР са установени по-високи плазмени транскрипционни нива на *let-7e-5p* и *miR-125a-5p* в сравнение със здрави контроли, като Receiver operating curve анализ на комбинирани молекулно-биологични и клинични данни показва, че изследването на тези микро-РНКи може да подобри диагностичната специфичност с 10%. В допълнение, проучване на Liang et al. показва, че генетичен полиморфизъм на промотора на *let-7* и по-специфично rs10877887 CC и rs13293512 генотипите, се асоциират с по-висок риск от развитие на ГДР, а стратификационен анализ показва, че пациентите с генотип rs13293512 CC и TC имат по-висок риск от рецидив след лечение.

Други две от изследваните микро-РНКи са асоциирани с етиопатогенезата на терапевтично резистентна депресия, а именно *miR-146a* и *miR-126*. Освен това свръхекспресията на *miR-146a-5p* в хипокампа е асоциирана с потискане на неврогенезата и спонтанната екситаторна невронна активност при миши модел на депресия. Предвид познатите функции на конкретната мозъчна структура, това откритие може да се интерпретира и като възможно обяснение на променените паметови функции при депресия.

Някои от изследваните микроРНКи се свързват с конкретни симптоми, които се срещат не само при афективни разстройства, но и при други психични и неврологични разстройства като болест на Алцхаймер. Това говори за възможни общи патогенетични механизми и предполага нови възможности за терапевтични интервенции при подробно изучаване на интимните механизми, които водят до развитието на тези феноменологични единици.

Например, освен при болест на Алцхаймер, понижение на нивата на *let-7* е установено и при пациенти с хронична инсомния за разлика от здрави контроли. В допълнение, е открита промяна на транскрипционните нива на *let-7*, *miR-138* и *miR-125a* в различните стадии на съня, а блокирането на *let-7b* води до промяна в делта вълната (електроенцефалографски) по време на non-rapid eye movement (NREM) съня. Това говори за възможно участие на тази микроРНК в патогенезата на инсомнията, която е и един от припокривашите се симптоми при депресия в контекста на ГДР и БР.

В допълнение, е констатирано, че *miR-125b* има важно значение за функционирането на хипокампа и регулира както процесите на заучаване и запамятаване, така и тревожността. При депресивен епизод в контекста както на ГДР, така и на БР се наблюдават преходни промени в когнитивното функциониране, което говори за възможно участие на *miR-125b* в патогенезата на тази симптоматика. *MiR-219* също е обвързана в

патофизиологията на когнитивните нарушения. Един от основните таргети на miR-219 е сигналния път на N-methyl-d-aspartate (NMDA) глутаматния рецептор, нарушенията в който са свързани с когнитивния дефицит при афективни разстройства, шизофрения и др.

Интересно е, че дисрегулация на miR-125b и други микро-РНКи е установена при пациенти с БР в маниен епизод за разлика от ЗК. В контекста на резултатите от настоящото проучване и установяването на дисрегулация на miR-125b и в депресивен епизод при БР на фона на липса на статистически значима разлика между ЗК и ГДР, в бъдеще тази микроРНК може да бъде потенциален маркер с диагностична стойност за БР. В допълнение, тези резултати поставят под въпрос хипотезата за невровъзпалението като единствен общ подлежащ етиопатогенетичен механизъм при ГДР и БР. Това означава, че наличието на невровъзпаление не е достатъчен фактор за развитие на депресия, което се подкрепя и от липсата на подобрение на клиничната симптоматика при добавяне на противовъзпалителен медикамент към антидепресивната терапия.

Всички изследвани микроРНКи имат важна роля за множество различни процеси, което показва, че нарушената им регулация може да доведе до хетерогенни последици и това би могло да обясни многоликата клинична картина на психичните заболявания, включително ГДР и БР. Например, miR-146a има основна роля в регулацията на имунния отговор, докато miR-126 е свързана с регулацията на ангиогенезата. Но е открита повишена експресия на miR-146a при невродегенеративни заболявания като множествена склероза и болест на Алцхаймер, както и при прионна болест, чиито основни изяви са поведенчески и когнитивни нарушения, което предполага възможна асоциация с регулацията на когнитивното функциониране. В допълнение, повишена експресия на miR-146a и на miR-126 се свързва с ранните фази на мозъчна увреда при исхемия, а понижени транскрипционни нива на miR-126, последващи мозъчна исхемия потенцират невронната смърт.

Нашето проучване показва наличие на понижени транскрипционни нива на miR-126 и miR-146a в групите на БР и ГДР спрямо ЗК, което потвърждава възможното участие на двете микро-РНКи в патогенезата на ГДР и БР. От друга страна тези резултати биха могли да означават, че съществуват общи механизми между афективните разстройства и заболявания, предизвикващи исхемия в ЦНС, което разширява спектъра на патогенетичните изменения отвъд невровъзпалението и невродегенерацията и връща един от големите исторически въпроси, а именно делят ли се афективните разстройства и психичните такива като цяло на ендогенно и екзогенно индуцирани? А може би спектърът се разширява, тъй като установяваните промени са свързани само с конкретни симптоми, а не с нозологичната единица.



## Обсъждане

За някои от изследваните микроРНКи, а именно miR-132 и miR-212, съществуват доказателства, че биха могли да бъдат маркер за терапевтичен отговор. Например, Ahmadimanesh et al. установяват по-висока експресия на miR-132 и miR-124 при пациенти с ГДР за разлика от ЗК при понижени транскрипционни нива на miR-16 в групата на пациентите. Освен това след приложение на селективния инхибитор на серотониновия транспорт (СИСТ) сертралин се наблюдава понижение на експресията на miR-132 и miR-124 и повишение на miR-16. Според тези данни понижаването на нивата на тези две микроРНКи би могло да бъде маркер за терапевтичен отговор към СИСТ, но тази хипотеза трябва да се валидира в по-голяма извадка.

При miR-212 също е доказан подобен потенциал. Експериментално проучване е демонстрирало влияние на електроконвулсивната стимулация (аналог на електроконвулсивната терапия при хора) като антидепресивна терапия върху експресията на miR-212. Установява се, че след приложение на терапията транскрипционните нива на miR-212 се повишават както в дентатния вирус на мишките, така и в периферна кръв на фона на подобрене на симптоматиката. Друго проучване установява, че miR-183 и miR-212 имат повишено серумно ниво след четириседмично лечение с антидепресант. Нашите резултати показват участие на miR-212, но не и на miR-132 в патогенезата на депресията в контекста на ГДР и БР.

В заключение можем да обобщим проучването на микро-РНК и модулиращата им функция върху генната експресия като важна крачка към разкриването на етиопатогенезата на афективните разстройства. Освен това тези молекулни механизми предполагат нови методи както за диагностика, така и за проследяването на терапевтичния отговор при ГДР и БР. Нашето проучване не установи статистически значими разлики на изследваните микро-РНКи между униполярна и биполярна депресия, което говори за възможните общи механизми на двете заболявания и предполага изследването на по-обширен панел за целите на диференцирането на двете заболявания.

Липсата на статистически значими разлики в диференциалната експресия на дълговерижните некодиращи РНКи може да бъде обяснена с няколко различни аргумента. На първо място част от избраните РНКи са изолирани от post-mortem мозъчна тъкан и липсата на диференциална експресия в периферна кръв може да се дължи на тъканната специфичност на дълговерижните некодиращи РНКи и липсата на асоциация между периферните и тъканните нива на експресия. Липсата на резултат при другите дълговерижни некодиращи РНКи може да се интерпретира като отхвърляне на хипотезата за липса на междурасови различия в диференциалната им експресия, тъй като са избрани от проучване, проведено сред китайско население Хан. Това означава, че за да се установи

ролята на тези РНКи при афективните разстройства, следва да се проведе ново проучване с възможно най-широк панел от дълговерижни не кодиращи РНКи и при възможност при терапевтично наивни пациенти, тъй като психофармакотерапията може да представлява замъгляващ фактор.

## Изводи

### Изводи

1. Установиха се промени във функционална свързаност на предна цингулна кора и на дясна предна инсула при пациенти с депресия от здрави контроли, които биха могли да обяснят някои от когнитивните, психомоторните, емоционалните и волевите нарушения, наблюдавани във феноменологията както на ГДР, така и на БР.
2. Повишената функционална свързаност между предна цингулна кора и малкомозъчните крачета би могла да разграничи ГДР от БР.
3. Променената активност на външния церебелум, лингвалния гирус и окципиталния фузиформен гирус при задача, ангажираща вниманието и краткосрочната памет, би могла да диференцира униполярна от биполярна депресия.
4. Променената активност показана в настоящето проучване, свързана предимно с региони, които участват в когнитивни и регулаторни процеси, би могла да предположи, че основните нарушения при ГДР и БР са свързани с когнитивната обработка на външни и вътрешни стимули.
5. Установената диференциална експресия на микроРНКи, свързани пряко с процесите на невrorазвитие, неврогенеза, невродегенерация и невровъзпаление при пациенти с депресия, подкрепят хипотезата за ГДР и БР като разстройства с комплексна етиопатогенеза и дава възможно обяснение за хетерогенната им клинична картина.
6. Някои от изследваните микроРНКи се свързват с конкретни симптоми, срещани не само при афективни разстройства, но и при други психични и неврологични разстройства и това говори за възможност да бъдат доказани маркери на конкретни феноменологични единици, което дава възможност и за нови терапевтични подходи.
7. Липсата на значима разлика в експресията на изследваните микроРНКи предполага наличието на общи молекулни механизми при ГДР и БР, което подкрепя хипотезата за континуум на афективните разстройства.
8. Липсата на резултат от изследването на днкРНКи може да се интерпретира като отхвърляне на хипотезата за липса на междурасови различия в диференциалната им експресия, тъй като са избрани от проучване, проведено сред китайско население Хан.

## Приноси

### Теоретично-методологични:

- Разработена е и е валидирана нова парадигма за изследване на когнитивни функции с емоционални дистрактори.
- Приложен е интердисциплинарен транслационен подход, чрез който са натрупани още данни, подпомагащи изясняването на етиопатогенезата на афективните разстройства.

### Научно-приложни

- Генерирани са доказателства за ролята на променената свързаност на предна цингулна кора и малкомозъчните крачета като възможен диференциращ маркер при униполярна и биполярна депресия.
- Генерирани са пилотни данни за потенциала на изследването на малкомозъчната активност по време на задача, ангажираща когницията, като възможен диференциращ маркер при униполярна и биполярна депресия.
- Генерирани са пилотни данни за потенциална възможност за установяване на молекулно-биологични биомаркери за диагностика и проследяване на терапевтичния отговор при афективни разстройства.

## **Представяне на темата на национални и международни конференции:**

## **Представяне на темата на национални и международни конференции:**

- Sixth bi-annual Conference of the European Society for Cognitive and Affective Neuroscience, Виена (Австрия) – презентация на тема „Functional Connectivity Aberrations of the Default Mode and Salience Networks Outline the Continuum Major Depressive Disorder - Bipolar Disorder – Schizophrenia“
- 31st European Congress of Psychiatry, Париж (Франция) – постер на тема „Altered Functional Connectivity of Salience Network in Mood Disorders“
- Симпозиум „Философия и психично здраве: от стратегия към приложение“, София (България) – презентация на тема „Континуумът психично здраве – рецидивиращо депресивно разстройство - биполярно разстройство“
- 30та Годишна конференция на Българската психиатрична асоциация, Пампорово (България) – презентация на тема „Промени във функционалната свързаност между различни невронни мрежи в континуума на афективните разстройства“
- Конференция „Наука и младост“ 2023, Пловдив (България) – презентация на тема “Altered Activation of the Left Superior and Middle Temporal Gyri During a Cognitive Task with Emotional Distractors May Differentiate Unipolar from Bipolar Depression”

## Публикации по темите

1. Todeva-Radneva, A., Paunova, R., Kandilarova, S., & St Stoyanov, D. (2020). The Value of Neuroimaging Techniques in the Translation and Transdiagnostic Validation of Psychiatric Diagnoses - Selective Review. *Current topics in medicinal chemistry*, 20(7), 540–553. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200131095328>
2. Todeva-Radneva, A., Aryutova, K., Kandilarova, S., Paunova, R., & Stoyanov, D. (2021). The Translational Potential of Non-coding RNAs and Multimodal MRI Data Sets as Diagnostic and Differential Diagnostic Biomarkers for Mood Disorders. *Current topics in medicinal chemistry*, 21(11), 949–963. <https://doi.org/10.2174/1568026621666210521144534>
3. Todeva-Radneva A, Kandilarova S, Paunova R, Stoyanov D, Zdravkova T, Sladky R. Functional Connectivity of the Anterior Cingulate Cortex and the Right Anterior Insula Differentiates between Major Depressive Disorder, Bipolar Disorder and Healthy Controls. *Biomedicines*. 2023; 11(6):1608. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061608>