

Neciljani metabolomski pristup u funkciji otkrivanja terapijskog učinka duloksetina i fototerapije kod pacijenata s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja

Latin, Lavinia

Master's thesis / Diplomski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:018504>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Lavinia Latin

**NECILJANI METABOLOMSKI PRISTUP U
FUNKCIJI OTKRIVANJA TERAPIJSKOG
UČINKA DULOKSETINA I FOTOTERAPIJE
KOD PACIJENATA S DIJAGNOZOM
VELIKOG DEPRESIVNOG POREMEĆAJA**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2025. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu medicinu u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Matee Nikolac Perković, v. zn. sur. Nastavnica imenovana od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) pod nazivom Cirkulirajuće ekstracelularne vezikule kao prediktori antidepresivnog odgovora: Praćenje mehanizma djelovanja novih terapijskih pristupa u depresiji (IPS-2022-02-2497).

Zahvale

Svoje prve zahvale želim uputiti svojim mentoricama, doc. dr. sc. Matei Nikolac Perković i doc. dr. sc. Morani Dulić koje su kroz moju izradu ovog diplomskog rada dodatno produbile moju ljubav prema biokemiji. Također, želim izraziti zahvale za svaki savjet, pruženu priliku i pomoć te izlazak u susret koji su uvelike olakšali ovaj put.

Hvala Ericu i Tati koji su realizirali svih 5 godina mog studija te mi uvijek držali leđa bez da su postavljali pitanja. Hvala na strpljenu, podršci, ponosu i podupiranju. Bez Vas ne bih bila tu gdje sam sad.

Tereziji i Kristini koje su moje najveće bogatstvo ovog studentskog putovanja želim zahvaliti za svaki put koji sam mogla na njih računati i u njih se uzdati. Hvala na bezbroj trenutaka provedenih u razgovoru, zabavi i smijehu. Hvala na motivaciji, guranju i vječnom prijateljstvu koje beskrajno cijenim.

U svojoj najtežoj godini života pa tako i studija stekla sam još jednu osobu koja zaslužuje moje beskonačne zahvale. Hvala na enormnom strpljenju i pruženom osloncu, na svakom olakšanom trenutku i danu u kojem sam se imala kome obratiti. Mom sidru, mojim krilima, mom Marku, hvala.

Na kraju, ovaj diplomski rad posvećujem osobi bez koje ja ne bih bila ja, osobi koja je na mene uvijek najponosnija, koja mi je predala najviše znanja i pružila najsjajnije dragocjene trenutke. Hvala Ti na svakom razgovoru, rješenju, utjesi te na svakom trenutku u kojem si vjerovala u mene. Neprocjenjive uspomene koje si mi pružila zauvijek nosim sa sobom.

Mama, završila sam faks! ❤️

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	13
§ 2. LITERATURNI PREGLED	16
2.1. Veliki depresivni poremećaj (MDD).....	16
2.1.1. <i>Sinteza monoaminskih neurotransmitera i njihovi receptori.....</i>	<i>17</i>
2.1.2. <i>Monoaminska hipoteza.....</i>	<i>18</i>
2.1.3. <i>Djelovanje i inhibicija monoamin-oksidge (MAO)</i>	<i>19</i>
2.1.4. <i>Neurotrofna hipoteza</i>	<i>23</i>
2.1.5. <i>Farmakoterapija kod liječenja velikog depresivnog poremećaja</i>	<i>24</i>
2.1.6. <i>Terapija jakim svjetlom (fototerapija; BLT, eng. bright light therapy)</i>	<i>26</i>
2.2. Metabolomika	27
2.2.1. <i>Neciljano metabolomsko profiliranje.....</i>	<i>28</i>
2.2.2. <i>Analitičke metode u metabolomici</i>	<i>29</i>
2.2.3. <i>Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).....</i>	<i>30</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	32
3.1. Kemikalije i instrumenti	32
3.2. Ispitanici i uzorkovanje.....	33
3.3. Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS.....	34
3.3.1. <i>Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS.....</i>	<i>34</i>
3.4. Metabolomska analiza metodom GC-MS	36
3.5. Obrada podataka dobivenih GC-MS analizom.....	37
3.5.1. <i>Kvalitativna obrada podataka</i>	<i>37</i>
3.5.2. <i>Kvantitativna obrada podataka</i>	<i>38</i>
3.5.3. <i>Statistička obrada podataka</i>	<i>38</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	40
4.1. Derivatizacija metabolita za analizu metodom GC-MS.....	40
4.2. Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka dobivenih analizom GC-MS	40
4.3. Statistička obrada podataka i interpretacija rezultata	44
4.3.1. <i>Rezultati usporedbe skupina CTRL i MDD dobiveni univarijatnom statističkom analizom</i>	<i>46</i>
4.3.2. <i>Rezultati usporedbe skupina CTRL i TRD dobiveni univarijatnom statističkom analizom.....</i>	<i>53</i>
4.3.3. <i>Rezultati usporedbe skupina MDD i TRD dobiveni univarijatnom statističkom analizom</i>	<i>57</i>

4.3.4. Rezultati usporedbe skupina MDD i MDDD dobiveni univarijatnom statističkom analizom.....	61
4.3.5. Rezultati usporedbe skupina TRD i TRDDF dobiveni univarijatnom statističkom analizom.....	63
4.3.6. Rezultati usporedbe skupina CTRL i MDD dobiveni multivarijatnom statističkom analizom	67
4.3.7. Rezultati usporedbe skupina CTRL i TRD dobiveni multivarijatnom statističkom analizom.....	69
4.3.8. Rezultati usporedbe skupina MDD i TRD dobiveni multivarijatnom statističkom analizom	72
4.3.9. Rezultati usporedbe skupina MDD i MDDD dobiveni multivarijatnom statističkom analizom..	74
4.3.10. Rezultati usporedbe skupina TRD i TRDDF dobiveni multivarijatnom statističkom analizom.....	77
4.4. Sumarni rezultati univarijatne i multivarijate statističke obrade podataka dobivenih neciljanom GC-MS-metabolomskom analizom	79
§ 5. ZAKLJUČAK.....	86
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	88
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	90
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

NECILJANI METABOLOMSKI PRISTUP U FUNKCIJI OTKRIVANJA TERAPIJSKOG UČINKA DULOKSETINA I FOTOTERAPIJE KOD PACIJENATA S DIJAGNOZOM VELIKOG DEPRESIVNOG POREMEĆAJA

Lavinia Latin

Veliki depresivni poremećaj ozbiljan je mentalni poremećaj koji značajno narušava kvalitetu života, radnu sposobnost te interpersonalne odnose. Očituje se dugotrajnim lošim raspoloženjem, gubitkom interesa, smanjenjem energije te kognitivnim i somatskim simptomima. Farmakološka terapija najčešće uključuje antidepresive iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina i noradrenalina, poput duloksetina, dok se u nekim slučajevima primjenjuju i nefarmakološke metode poput fototerapije. Metabolomika, interdisciplinarna znanost koja se bavi analizom metabolita u biološkim uzorcima, pruža uvid u biokemijske promjene ovog poremećaja. Neciljano metabolomsko profiliranje plazme pacijenata omogućuje identifikaciju biomarkera povezanih s patofiziologijom poremećaja i odgovorom na terapiju. Tehnologije poput plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom mase ključne su za analizu metabolita, omogućujući detekciju i kvantifikaciju promjena u metabolizmu lipida, aminokiselina i energetske puteva. Univarijatna i multivarijatna statistička obrada rezultirala je sa značajno promijenjenim zastupljenostima metabolita unutar ispitivanih skupina koji služe kao biomarkeri za prilagodbu i odabir strategije liječenja velikog depresivnog poremećaja.

(103 stranice, 24 slike, 24 tablice, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: biomarkeri, duloksetin, fototerapija, metabolomika, veliki depresivni poremećaj

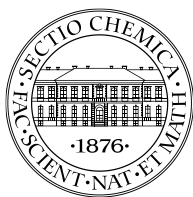
Mentorica: doc.dr. sc. Matea Nikolac Perković, v. zn. sur.

Nastavnica (imenovana od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. Doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. Doc. dr. sc. Ivan Nemet
- Zamjena: Doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2025.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

AN UNTARGETED METABOLOMIC APPROACH FOR THE PURPOSE OF DETECTING THE EFFECT OF DULOXETINE AND BRIGHT LIGHT THERAPY IN PATIENTS DIAGNOSED WITH MAJOR DEPRESSIVE DISORDER

Lavinia Latin

Major depressive disorder is a severe mental disorder that significantly impairs quality of life, work capacity, and relationships. It manifests as prolonged low mood, loss of interest, reduced energy, and cognitive and somatic symptoms. Treatment often includes antidepressants inhibiting serotonin and norepinephrine reuptake, such as duloxetine, while non-pharmacological methods like phototherapy are sometimes used. Metabolomics, an interdisciplinary science analyzing metabolites in biological samples, provides insight into the biochemical changes of this disorder. Untargeted metabolomic profiling of patient plasma enables the identification of biomarkers associated with the disorder's pathophysiology and response to therapy. Technologies such as gas chromatography-mass spectrometry are crucial for metabolite analysis, allowing the detection and quantification of changes in lipid, amino acid, and energy metabolism. Univariate and multivariate statistical analysis revealed significantly altered metabolite levels within the studied groups, serving as biomarkers for optimizing and selecting treatment strategies for major depressive disorder.

(103 pages, 24 figures, 24 tables, 61 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: biomarkers, duloxetine, major depressive disorder, metabolomics, phototherapy.

Mentor: Dr. Matea Nikolac Perković, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Ivan Nemet, Assistant Professor
- Substitute: Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 25th February 2025

§ 1. UVOD

Veliki depresivni poremećaj (MDD, eng. *Major Depressive Disorder*) vodeći je uzrok onesposobljenosti ljudi u aspektu psihijatrijskih poremećaja budući da je to najčešći psihijatrijski poremećaj. Kognitivni, fizički i emocionalni simptomi MDD-a dovode do značajnih oštećenja psihosocijalnih segmenata u fizičkom, društvenom, obrazovnom i radnom kontekstu. Problematika ovog poremećaja ima i ekonomski aspekt budući da depresija sa sobom nosi i neizravne troškove na radnom mjestu. Pod ove troškove spadaju niska produktivnost i izostanci koji čine više od 60 % ukupnog ekonomskog tereta depresije što je dvostruko više od troškova povezanih s medicinskom skrbi.¹ Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, eng. *World Health Organization*) rangirala je MDD kao treći uzrok tereta bolesti na globalnoj razini te je predvidjela da će zauzeti prvo mjesto do 2030. godine.²

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća simptomi depresije povezani su sa smanjenom razinom monoaminskih neurotransmitera.³ Istraživači su simptome poput nepravilnosti u spavanju, agresije ili lošeg raspoloženja povezali s nedovoljnom količinom serotonina, loše pamćenje s nedostatkom norepinefrina,⁴ dok su za manjak dopamina ustanovili da uzrokuje slabiji osjećaj motivacije.⁵ Tada je predstavljena prva hipoteza depresije, tzv. monoaminska hipoteza.³ Sukladno nedostatnoj količini monoaminskih neurotransmitera, razvijeni su i prvi lijekovi za depresiju, odnosno inhibitori monoaminskih transportera. Takvi su lijekovi vrlo brzo počeli pokazivati neželjene i opasne nuspojave zbog čega je nastala potreba za razvojem terapije s drugačijim mehanizmom djelovanja.⁶

U praksi, detekcija, dijagnoza i terapija velikog depresivnog poremećaja često predstavljaju izazove liječnicima zbog varijabilne manifestacije simptoma, nepredvidivih prognoza i različitih odgovora na terapiju.² Zbog široke primjene i spektra djelovanja, trenutni najčešći farmakološki pristupi uključuju selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (SSRI), selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina i norepinefrina (SNRI) i selektivne inhibitore ponovne pohrane norepinefrina i dopamina (NDRI).¹ Ove se vrste lijekova koriste i kod mnogih drugih psiholoških poremećaja izuzev velikog depresivnog poremećaja kao što su shizofrenija, bipolarni poremećaj, Alzheimerova i Parkinsonova bolest.⁷ Mehanizam djelovanja ovih vrsta lijekova je selektivna inhibicija transportera serotonina (SERT), norepinefrina (NET) i/ili dopamina (DAT) zbog čega se povećava količina monoaminskih neurotransmitera u sinapsi

što utječe na aktivnost međusobno povezanih neurotransmiterskih sustava.¹ U ovom se istraživanju predstavlja jedan od pripadnika skupine SNRI, duloksetin. Dvostruko inhibicijsko djelovanje duloksetina promijenilo je stavove o depresiji i boli budući da je ustanovljeno da duloksetin olakšava i fizičku bol koja se javlja kao simptom depresije uz kognitivne simptome i simptome koji su povezani s raspoloženjem.⁷

Farmakoterapija nije jedini pristup koji se koristi kod liječenja depresije. Najčešće se koristi u kombinaciji s nekom drugom metodom kao što je psihoterapija. Jedna od metoda koja polako postaje i standardna praksa liječenja simptoma depresije je i terapija jakim svjetlom, odnosno fototerapija.⁸ Fototerapija se primjenjuje na način da se pacijent određeni period u danu izlaže umjetnom i jakom svjetlu. Točan mehanizam iza djelotvornosti ove metode još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no ispitivanja su pokazala da je ova metoda veoma efikasna kod pacijenata koji boluju od sezonskog afektivnog poremećaja.⁹ Osim toga, pokazano je da primjena fototerapije u kombinaciji s antidepressivima rezultira smanjenjem ili nestankom simptoma u odnosu na placebo uvjete kod velikog depresivnog poremećaja.¹⁰

Obzirom na problematiku i kompleksnost koje stoje iza točne i precizne dijagnoze pojedinog pacijenta te na važnost prilagođavanja i individualiziranja strategija liječenja, razvio se veliki interes za pronalaskom biomarkera koji bi mogli imati presudnu ulogu u prilagodbi terapije. Biomarkeri koji omogućuju praćenje metaboličkih promjena koje su uzrokovane primjenom različitih vrsta terapije i pristupa liječenju su metaboliti.¹¹ Metaboliti su male molekule (masa < 1500 Da) koje se lako apsorbiraju te imaju sposobnost prelaska krvno-moždane barijere. Metabolomika je jedna od novijih „omika“ koja pomaže kod praćenja promjena koje se događaju nizvodno od genomskih, transkriptomskih i proteomskih modifikacija. Zbog navedenog, metabolomika je postala ključan alat u probiru lijekova kod liječenja velikog depresivnog poremećaja i mnogih drugih poremećaja.¹² U ovom istraživanju korišteno je neciljano metabolomsko profiliranje koje je omogućilo detekciju velikog broja metabolita u biološkom uzorku s ciljem pronalaska metabolita koji imaju različitu razinu zastupljenosti unutar skupine uzoraka. U svrhu analize uzoraka plazme pacijenata koji boluju od velikog depresivnog poremećaja, prije i poslije primjene odgovarajuće terapije, korištena je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).

U ovom diplomskom radu cilj je dobiti uvid u metaboličke i molekulske promjene koje nastaju kao rezultat raznih strategija liječenja depresije, odnosno monoterapije duloksetinom u usporedbi s terapijom duloksetinom u kombinaciji s fototerapijom. Naime,

farmakometabolomika je korištena u svrhu određivanja metabolomičkih profila pacijenata prije i nakon 8 tjedana liječenja. Nadalje, korištena je i u svrhu identifikacije metabolita koji su povezani s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja te s pojavom depresije koja je otporna na terapiju antidepresivima. Zbog navedenog u istraživanje su uključene tri skupine ispitanika, zdravi kontrolni ispitanici, osobe s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja (prva epizoda depresije) koji su liječeni duloksetinom te osobe s terapijski rezistentnom depresijom koje su primale terapiju duloksetinom u kombinaciji s fototerapijom. Osobe s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja uzorkovane su dva puta, prije i 8 tjedana nakon početka terapije. Rezultati ovog istraživanja dodatno će poduprijeti potencijal metabolomike u medicini.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

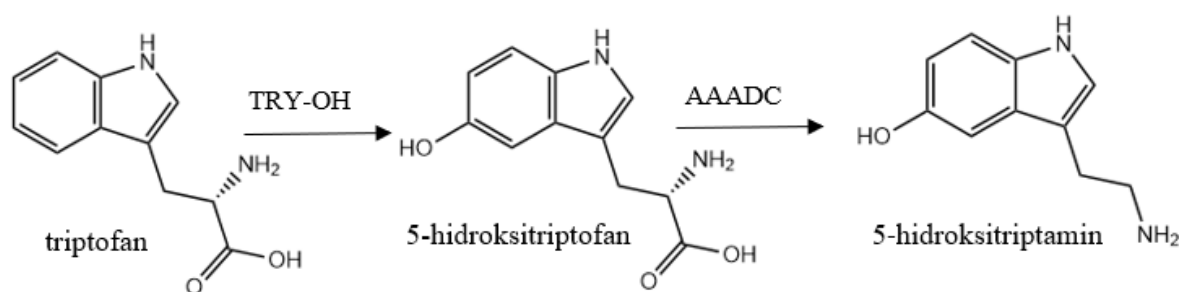
2.1. Veliki depresivni poremećaj (MDD)

Veliki je depresivni poremećaj često, kronično i iscrpljujuće psihijatrijsko stanje.¹³ Jedna se od pet osoba izjašnjava da je doživjela depresivnu epizodu u nekom dijelu svog života.¹⁴ Sve se više prepoznaje da depresija ne uključuje samo emocionalne simptome, već utječe na cijelo tijelo na način da uzrokuje bolne fizičke simptome koji mogu biti dio šireg skupa simptoma koji čine veliki depresivni poremećaj.¹³ Karakteristični simptomi uključuju smanjeni interes ili gubitak užitka u aktivnostima i prisutnost depresivnog raspoloženja. Konkretnije, simptomi uključuju promjenu tjelesne mase ili apetita, poremećeni san, smanjenu sposobnost koncentracije, psihomotornu retardaciju ili uznemirenost, umor, nemogućnost donošenja odluka i suicidalnost. Svi simptomi uzrokuju funkcionalne i socijalne poteškoće, a veća ozbiljnost simptoma depresije ograničava psihosocijalnu kvalitetu života.¹⁵ Trudnice, stariji i djeca pokazuju veću stopu incidencije koja može biti povezana s genetičkim, psihosocijalnim ili socijalnim faktorima. Depresija je često popraćena ponavljajućim napadajima koji se mogu javljati i u remisijskim fazama ili trajati duže od same depresije.¹⁶ Prva epizoda velikog depresivnog poremećaja najčešće se javlja u periodu koji se proteže od adolescencije do sredine četrdesetih godina života, ali gotovo 40 % pacijenata doživi prvu depresivnu epizodu prije dvadesete godine života. Kroz životni vijek, depresija je gotovo dvostruko češća kod žena nego kod muškaraca, a u oba je spola vrhunac prevalencije u drugom i trećem desetljeću života.¹⁴

Simptomi depresije uključuju poremećaje u ponašanju i funkcionalnosti za koje su odgovorni monoaminski neurotransmiteri. Monoaminski neurotransmiter serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) regulira raspoloženje, spavanje, agresiju, libido i apetit, a norepinefrin (NE) regulira pamćenje i održava budnost organizma.⁴ Osim navedenih, neurotransmiter dopamin (DA) također spada u monoaminsku skupinu neurotransmitera te je zadužen za osjećaj motivacije, regulaciju sustava nagrade i pokreta.⁵ Neuravnoteženost ovih funkcija često se povezuje s razvojem mnogih psihijatrijskih poremećaja kao što su bipolarni poremećaj, poremećaj anksioznosti, shizofrenija, depresija i mnogi drugi.¹⁷

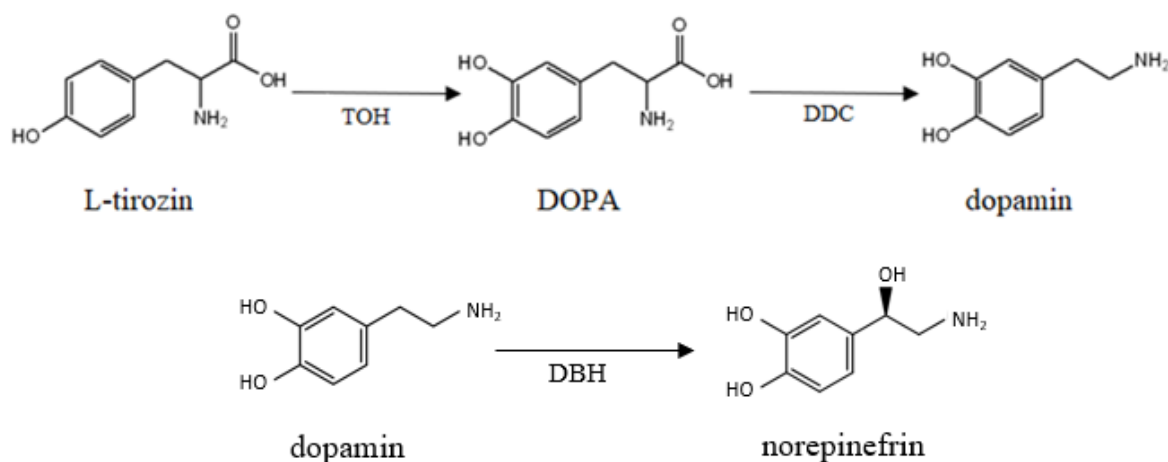
2.1.1. Sinteza monoaminskih neurotransmitera i njihovi receptori

5-hidroksitriptamin, odnosno serotonin, nastaje u nekoliko koraka iz prekursora, odnosno iz aminokiseline triptofan. U prvom koraku enzim triptofan-hidroksilaza (TRY-OH) hidrolizira triptofan u 5-hidroksitriptofan (5-HTP), a nakon toga dekarboksilaza aromatičnih aminokiselina (AAADC) pretvara 5-HTP u 5-HT. Nakon sinteze, 5-HT se pohranjuje u sinaptičkim vezikulama pomoću vezikularnog monoaminskog transportera (VMAT2) do kad ne nastane potreba za korištenjem 5-HT tijekom neurotransmisije.⁷ Prikaz sinteze 5-HT nalazi se na slici 1.



Slika 1. Sinteza serotonina iz triptofana kao prekursora uz međuprodukt 5-hidroksitriptofan i uz enzime triptofan-hidroksilazu i dekarboksilazu aromatičnih aminokiselina (AAADC). Slika napravljena pomoću ChemDraw programa.

DA i NE¹⁸ sintetiziraju se iz aminokiseline tirozin na živčanim završecima dopaminergičnih neurona u mozgu nakon što je tirozin prenesen iz ekstracelularnog matriksa i krvotoka pomoću tirozinske pumpe ili transportera. Tirozin-hidroksilaza (TOH) pretvara tirozin u 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) nakon čega se DOPA prevodi u DA pomoću enzima DOPA-dekarboksilaze (DDC). DA se također prenosi u sinaptičke vezikule pomoću VMAT2 kao i 5-HT i tamo se pohranjuje do sljedeće neurotransmisije.⁷ Unutar vezikula, DA se hidroksilira pomoću dopamin- β -hidroksilaze (DBH) i nastaje NE. Prikaz sinteze DA i NE nalazi se na slici 2.



Slika 2. Sinteza dopamina i norepinefrina iz L-tirozina kao prekursora uz međuprodukt L-3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) i uz enzime tirozin-hidroksilazu (TOH), DOPA-dekarboksilazu (DDC) i dopamin- β -hidroksilazu (DBH). Slika napravljena pomoću ChemDraw programa.

Osim neuravnoteženosti monoaminskih neurotransmitera, abnormalnosti u prijenosu signala također mogu nastati zbog promjena u funkciji receptora, a to može uključivati promjene u povezanosti između neurotransmitera i receptora ili promjene u signalnoj kaskadi nizvodno od receptora. Za noradrenergični, dopaminergični i serotonergični sustav identificiran je veliki broj receptora koji su klasificirani prema farmakološkim ili molekularnim karakteristikama.³

Prijenos norepinefrina regulira se putem α - ili β -adrenoreceptora i njihovih različitih podtipova koji imaju iste farmakološke osobine u mozgu i perifernom živčanom sustavu. Klasifikacija receptora serotonergičnog sustava i dalje napreduje te su do sada poznate glavne kategorije, uključujući receptore od 5-HT₁ do 5-HT₇ koje imaju svoje podtipove.³ Dopaminergični se receptori također dijele u skupine i to od D₁ do D₅ te su najčešće povezani s G-proteinima.⁷

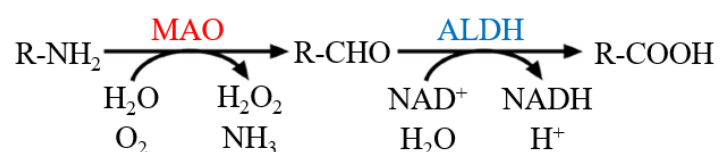
2.1.2. Monoaminska hipoteza

Monoaminska se hipoteza prvi puta počela spominjati prije pedesetak godina kad je predloženo da je uzrok depresije nedovoljna dostupnost monoaminskih neurotransmitera dok je uzrok manije suvišak istih u sinapsi. Dokazi ove pretpostavke dolazili su od kliničkih promatranja i testiranja na životinjama koja su pokazala da rezepin (antihipertenzivni lijek)

koji uzrokuje trošenje presinaptičkih zaliha NE, DA i 5-HT, inducira sindrom sličan depresiji. S druge strane, euforično i hiperaktivno ponašanje primijećeno je kod nekih pacijenata koji su bili liječeni iproniazidom, lijekom koji se koristi u terapiji tuberkuloze, koji povećava koncentraciju NE u mozgu.^{2,3} Nadalje, jedni od prvih antidepresiva funkcionirali su na način da su blokirali ponovno vezanje 5-HT i NE na presinaptički neuron. To je omogućilo veću količinu navedenih neurotransmitera u sinapsi zbog čega je bilo pojačano stimuliranje postsinaptičkih neurona.¹⁹ Osim navedenog, pretpostavljeno je da, ako je enzim koji katabolizira DA,⁷ NE i 5-HT u njihovim presinaptičkim neuronima, monoaminooksidaza, inhibiran, to će također pojačati dostupnost navedenih neurotransmitera u sinapsi.^{7,19} Upravo na ovim dokazima temelji se monoaminska hipoteza koja objašnjava da je nastanak depresije posljedica nedovoljne količine ovih neurotransmitera u sinapsama.^{2,3}

2.1.3. Djelovanje i inhibicija monoamin-oksidade (MAO)

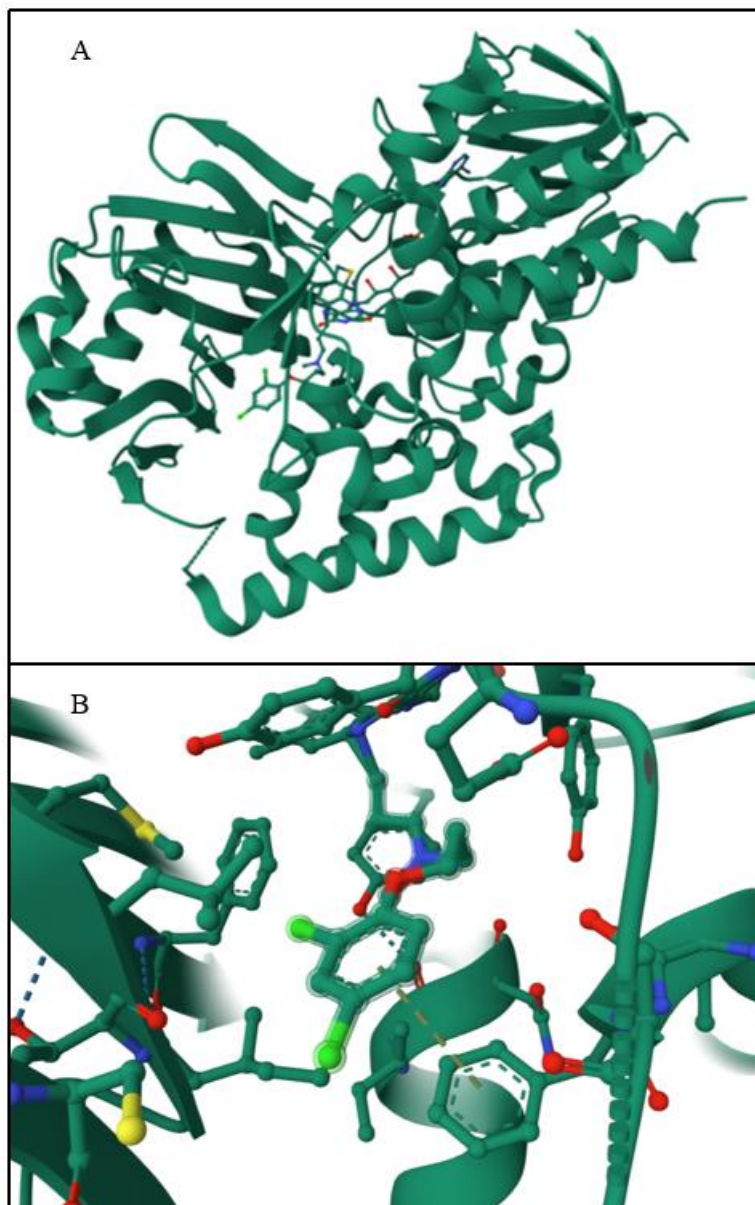
Monoamin-oksida (MAO) enzim je koji se nalazi na vanjskoj membrani mitohondrija u neuronima.²⁰ Supstrati monoamin-oksidade molekule su poput indolamina koje uključuju 5-HT (5-hidroksitriptamin) i triptamin, katekolamini poput DA, NE i epinefrina te amini u tragovima (beta-feniletamin i tiramin). Ona je odgovorna za degradaciju navedenih amina koju vrši na način da deaminira monoamin u odgovarajući aldehyd kojeg će nakon toga aldehyd-dehidrogenaza (ALDH) oksidirati u kiseline.²¹ Mehanizam djelovanja monoamin-oksidade prikazan je na slici 3.



Slika 3. Mehanizam djelovanja enzima monoamin-oksidade (MAO) i aldehyd-dehidrogenaze (ALDH)

Dvije strukturne forme koje poprima MAO otkrivene su prije gotovo sto godina²² te su određene prema osjetljivosti na vezanje ireverzibilnog inhibitora klorgilina.²⁰ Prva forma (MAO-A) pokazala je visoku osjetljivost na vezanje klorgilina dok za drugu formu (MAO-B) to nije slučaj. Nadalje, dodatna istraživanja pokazala su da je MAO-B osjetljivija na pargilin i deprenil nego što je to MAO-A. Osim toga, ustanovljeno je da MAO-A preferabilno oksidira 5-HT, NE

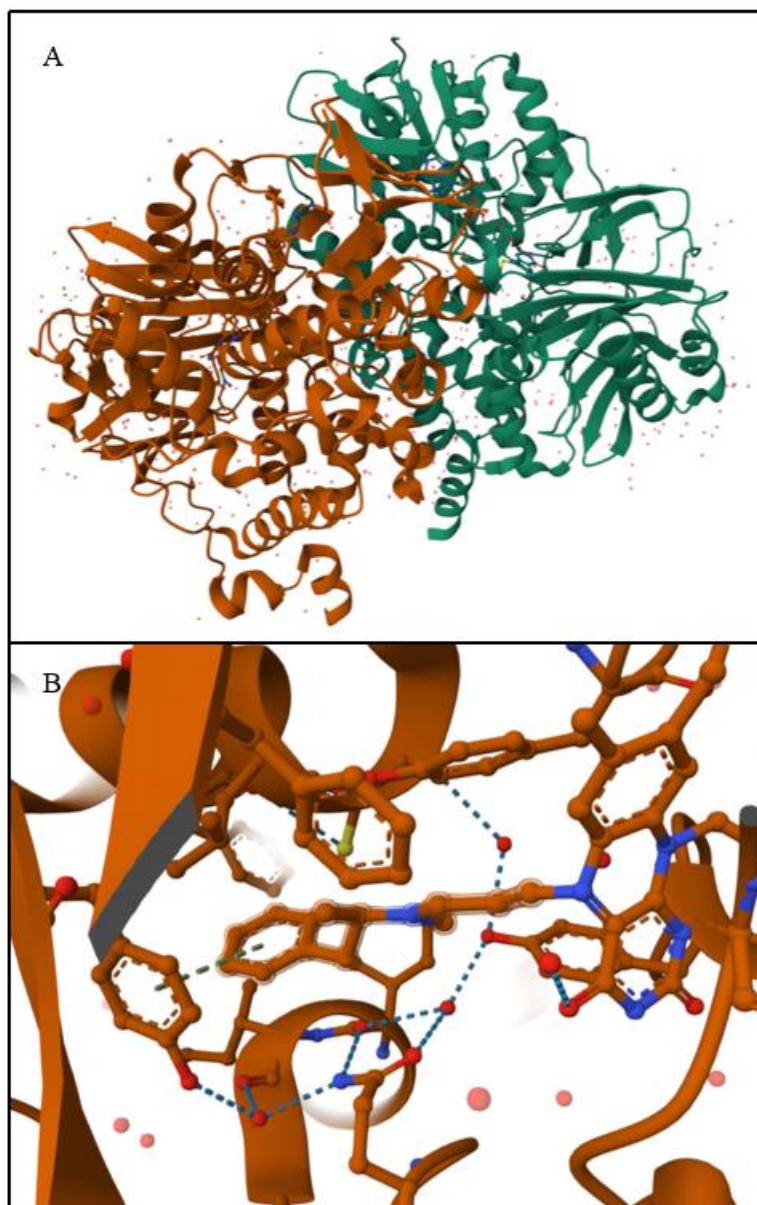
i DA, dok, s druge strane, MAO-B preferabilno oksidira benzilamin i beta-feniletilamin.^{20,21} MAO-A u kompleksu s klogilinom te MAO-B u kompleksu s deprenilom prikazane su na slikama 4 i 5, redom.



Slika 4. A) Stuktura monoamin-oksidge tipa A u kompleksu s klogilinom; B) Parcijalno vezno mjesto monoamin-oksidge tipa A s interakcijama klogilina i monoamin-oksidge tipa

A. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi

(<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 2BXR



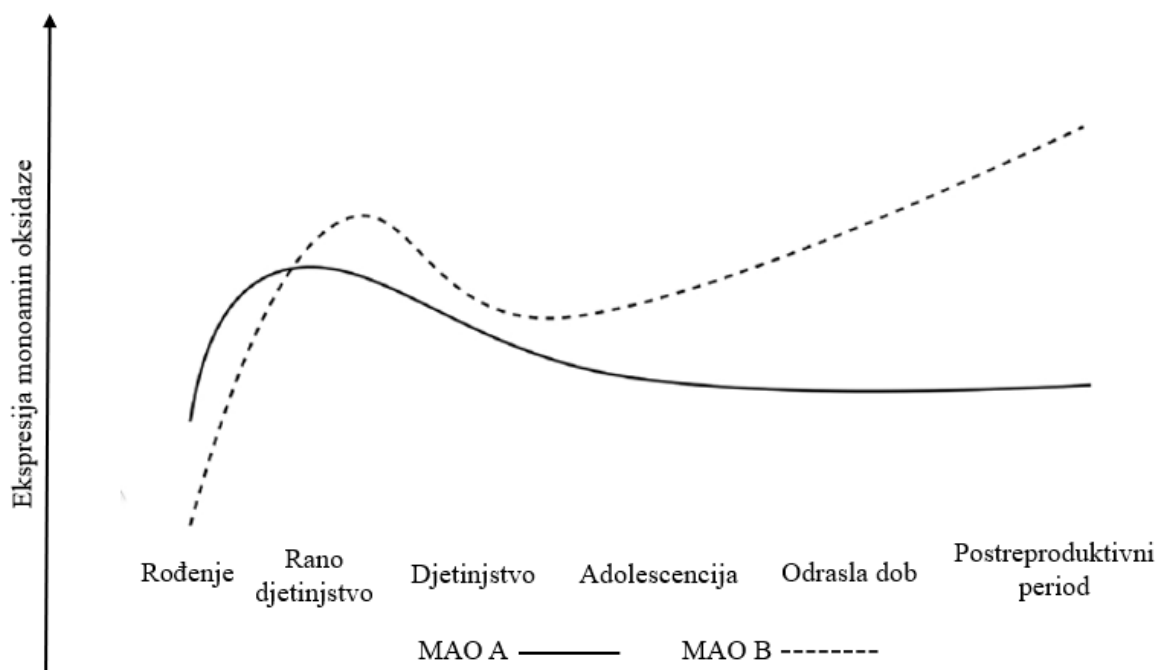
Slika 5. A) Stuktura monoamin-oksidadze tipa B u kompleksu s deprenilom; B) Parcijalno vezno mjesto monoamin-oksidadze tipa B s interakcijama deprenila i monoamin-oksidadze tipa

A. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi

(<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 2BYB

U ljudskom organizmu, izoenzimi MAO-A i MAO-B pokazuju različitu stopu ekspresije od početka života nadalje. Pri rođenju, obilnija je forma MAO-A, no vrhunac ekspresije MAO-A u prvoj je godini života čovjeka te nakon toga polako pada dok ne dostigne odraslu dob nakon koje ekspresija postaje stabilna. S druge strane, ekspresija MAO-B je niska pri rođenju te se također znatno povećava kroz rano djetinjstvo u prvoj godini života, a kroz kasnije djetinjstvo

ekspresija poprima blagi pad. Nakon djetinjstva, ekspresija MAO-B raste gotovo linearno i stabilno.²² Shematski prikaz razlika u ekspresiji izoenzima MAO-A i MAO-B nalazi se na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz različite stope ekspresije dviju formi enzima monoaminooksidaze (MAO-A i MAO-B) u ljudskom organizmu kroz životni vijek pojedinca

Budući da je ustanovljeno da pacijenti koji boluju od depresije imaju smanjene količine DA, NE i 5-HT u sinapsama za koje su odgovorne MAO-A i MAO-B, istraživači su počeli razvijati inhibitore ovih enzima (IMAO) kako bi pojačali dostupnost ovih neurotransmitera u sinapsama.^{6,7} Osim toga, kliničke studije koje su istraživale efikasnost IMAO, iproniazida, kod pacijenata koji boluju od tuberkuloze, otkrile su da su ti pacijenti postali društveniji, aktivniji i boljeg raspoloženja.^{6,7,21-23} Iproniazid je bio prvi klinički efikasni IMAO i prvi antidepresiv koji je stavljen na tržište. Samim time, prva kategorija antidepresiva koja je razvijena u svrhu liječenja depresije bili su IMAO. Iproniazid ne diskriminira između izoformi enzima MAO te stvara kovaletnu vezu u veznom mjestu zbog čega spada u ireverzibilni neselektivni IMAO.²⁴ Ova skupina inhibitora jedna je od šest skupina koje su razvijene u svrhu smanjivanja simptoma depresije. Ostale skupine su: ireverzibilni inhibitori selektivni za MAO-A, ireverzibilni inhibitori selektivni za MAO-B, reverzibilni neselektivni IMAO, reverzibilni inhibitori

selektivni za MAO-A i reverzibilni inhibitori selektivni za MAO-B.⁶ Ireverzibilni inhibitori, osim što omogućuju povećanje količine NE, DA i 5-HT u sinapsi, smanjuju količinu same MAO jer enzim više ne može vezati drugi supstrat. Zbog toga organizam pokušava nadomjestiti koncentraciju enzima MAO na način da ih regenerira. Proces regeneracije može potrajati tjednima tako da efekti inhibitora mogu trajati puno duže nego sam proces eliminacije lijeka iz organizma.²³

Iako su IMAO pokazali efikasnost kod liječenja simptoma depresije, više se ne koriste kao terapija zbog vrlo ozbiljnih nuspojava kao što je zatajenje jetre.⁶ Još je jedna od neželjenih nuspojava vrlo teška i potencijalno letalna hipertenzivna kriza s cerebralnim krvarenjima koja nastupna tipično nakon konzumacije sira, vina ili druge fermentirane hrane koja je bogata tiraminom. Tiramin uzrokuje rapidan porast tlaka zbog odsustva MAO-A i MAO-B zbog čega može doći do spomenutih krvarenja.²¹ Zbog navedenih i nekih drugih nuspojava te zbog unapređenja antidepresivne terapije, liječnici sve manje prepisuju IMAO za liječenje simptoma depresije, no ovi lijekovi su pokazali efikasnost i kod liječenja simptoma nekih drugih bolesti poput Parkinsonove bolesti.^{6,21}

2.1.4. Neurotrofna hipoteza

Osim monoaminske hipoteze o razvoju velikog depresivnog poremećaja, važno je spomenuti i neurotrofnu hipotezu. Neurotrofin je živčani čimbenik rasta koji potiče preživljavanje i aktivnost neurona.¹⁷ U ovoj hipotezi jedan je od glavnih neurotrofina tzv. moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, eng. *brain-derived neurotrophic factor*).⁴ BDNF regulira živčanu, odnosno sinaptičku plastičnost, regulira broj i gustoću sinapsi u mozgu na temelju njihove aktivnosti, neurogenezu, starenje i kognitivne aspekte ponašanja povezane s raspoloženjem. BDNF se eksprimira u velikim količinama u mozgu zrelih sisavaca, a ponajviše unutar prefrontalnog korteksa, amigdale, hipokampusu i hipotalamusu koji su uključeni u regulaciju ponašanja povezanog s raspoloženjem.²⁵

Kod nekih pacijenata koji pate od depresije, stres uzrokuje smanjenu količinu BDNF-a u hipokampusu i prefrontalnom korteksu.^{4,25,26} Za razliku od stresa i boli, terapija antidepresivima uzrokuje pojačanu ekspresiju BDNF-a u hipokampusu i prefrontalnom korteksu.²⁶

2.1.5. Farmakoterapija kod liječenja velikog depresivnog poremećaja

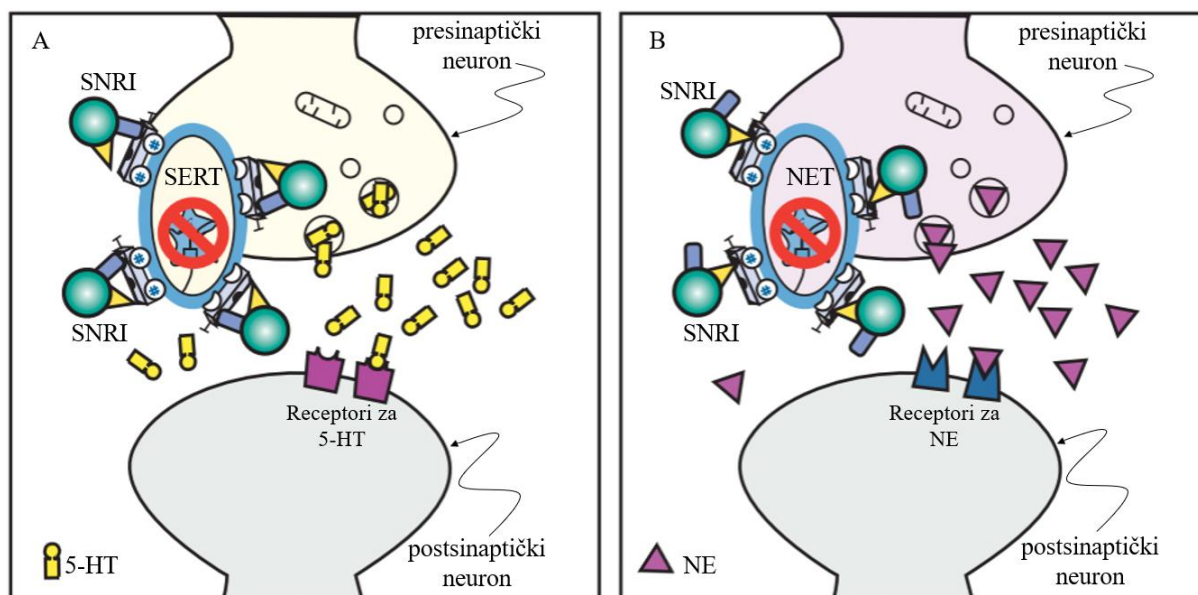
Antidepresivi prve generacije nisu samo već spomenuti IMAO, već i triciklički antidepresivi (TCA). TCA blokiraju transportirajuće proteine koji ponovno apsorbiraju DA, NE i 5-HT u odgovarajući presinaptički neuron kako bi neurotransmiteri dulje ostali u sinapsi i kako bi dulje podražavali postsinaptički neuron.⁴ U tom slučaju zadržavanja neurotransmitera u sinapsi, simptomi depresije počnu slabjeti. Međutim, kao i IMAO, TCA su također pokazali i negativne strane svog djelovanja. Osim na monoaminske neurotransmitere, TCA djeluju i na druge neurotransmitere u središnjem živčanom sustavu i periferiji kao što su neurotransmiteri histaminergičnog i acetil-kolinergičnog sustava. Rezultat takvog djelovanja je sedacija, hipotenzija, suhoća u ustima te zamućenje vida. Osim toga, zbog djelovanja na kardiovaskularni sustav, TCA mogu biti i letalni u slučaju predoziranja.³

Mehanizam djelovanja novijih generacija antidepresiva je antagoniziranje presinaptičkih inhibicijskih receptora 5-HT, NE i/ili DA što dovodi do povećanja sinaptičkih koncentracija ovih neurotransmitera.¹ Oni uključuju selektivne inhibitore ponovne pohrane 5-HT (SSRI), parcijalne agoniste 5-HT i inhibitore ponovne pohrane 5-HT, inhibitore ponovne pohrane 5-HT i NE (SNRI), inhibitore ponovne pohrane NE i DA, selektivne inhibitore ponovne pohrane NE i mnoge druge.^{7,13}

Skupina antidepresiva koja je uvelike unaprijedila farmakoterapiju u liječenju depresije je SSRI. Djelovanje ovih lijekova primjenjuje se na velik spektar psiholoških poremećaja, a ne samo za MDD-a. Djeluju na način da inhibiraju presinaptički transporter za 5-HT.⁷ Nadalje, svojstvo koje ih razlikuje od skupine antidepresiva TCA je da njihovo djelovanje ne rezultira ozbiljnim nuspojavama kao što je hipotenzija te da u slučaju predoziranja nisu letalni.¹³

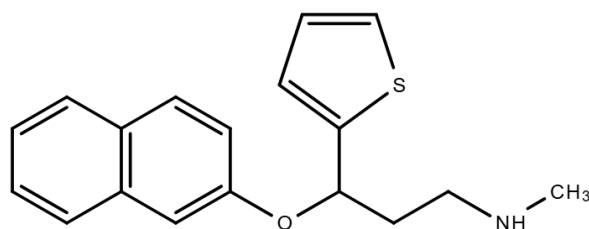
Važnu ulogu u liječenju depresije imaju i SNRI skupina antidepresiva. Oni kombiniraju robusnu inhibiciju SERT-a s varijabilnim razinama inhibicije NET-a zbog čega ova skupina ima prednost nad skupinom SSRI.⁷ Mehanizam djelovanja ove skupine antidepresiva prikazan je na slici 7. Osim navedene, dodatna prednost je da djelovanje skupine lijekova SNRI nije potpuno dualno, već gotovo trostruko. Ova skupina ne inhibira sve transportere DA u mozgu, ali povećava količinu DA u prefrontalnom korteksu mozga.^{7,13} Povećanje razine DA nije povezano s inhibicijom DAT-a, već s inhibicijom transportera za NE. Ovo ima posebno snažan učinak na razinu DA u prefrontalnom korteksu, gdje su prijenosnici DA rijetki.^{7,27} Osim uloge 5-HT i NE u neurobiologiji depresije, oni također upravljaju nizvodnim inhibitornim putevima boli u mozgu i leđnoj moždini. Stoga antidepresivi koji utječu na neurotransmisiju 5-HT i NE

pokazuju i veliki analgetički učinak koji je veći nego kod antidepresiva koji inhibiraju ponovnu pohranu samo jednog od monoaminskih neurotransmitera, kao što su to SSRI.²⁸



Slika 7. Shematski prikaz dualnog mehanizma djelovanja inhibitora ponovne pohrane serotonina (5-HT) na slici A i norepinefrina (NE) na slici B, odnosno inhibitora transportera serotonina (SERT) na slici A i inhibitora transportera norepinefrina (NET) na slici B⁷

Jedan od predstavnika skupine antidepresiva SNRI je i duloksetin prikazan na slici 8. Duloksetin ((+)-(S)-N-metil- γ -(1-naftiloksi)-2-tiofenpropilamin hidroklorid) vrlo je djelotvorni inhibitor SERT-a i NET-a, odnosno ponovne pohrane 5-HT i NE, a pri tome ne pokazuje afinitet prema drugim receptorima histaminergičnog, kolinergičnog, adrenergičnog, glutamatnog te drugih sustava.^{13,28}



Slika 8. Prikaz kemijske strukture duloksetina. Slika napravljena pomoću ChemSpider programa.

U kontekstu liječenja depresije, duloksetin se pokazao učinkovitim u svim fazama liječenja: akutnoj, nastavnoj i dugotrajnoj. Tijekom akutne faze, koja traje otprilike 6-12 tjedana, duloksetin pomaže u smanjenju osnovnih simptoma depresije, uključujući osjećaj tuge, gubitak interesa za svakodnevne aktivnosti, kronični umor, poteškoće s koncentracijom i poremećaje sna.¹³ Pacijenti često već u prvih nekoliko tjedana terapije primjećuju poboljšanja, posebno u smanjenju tjelesnih simptoma depresije, poput glavobolja, bolova u mišićima i opće nelagode, što je značajno jer tjelesni simptomi depresije često ostaju neprepoznati i neliječeni.⁷ Duloksetin djeluje na integriran način, istovremeno ublažavajući emocionalne i tjelesne aspekte bolesti, što ga čini idealnim izborom za pacijente s mješovitim simptomima.²⁸ Vrste boli koje se poboljšavaju uz primjenu duloksetina su različite, od dijabetičke periferne neuropatske boli, preko fibromialgije, do kronične mišićno-koštane boli, poput one povezane s osteoartritisom i problemima donjeg dijela leđa.⁷

Nastavna faza liječenja, koja traje nekoliko mjeseci nakon akutne faze, usredotočuje se na stabilizaciju postignutih rezultata i sprječavanje povratka simptoma.²⁹ U ovoj fazi duloksetin ne samo da održava remisiju depresije, već i pomaže u jačanju otpornosti pacijenata na stresne događaje. Kliničke studije pokazale su da pacijenti koji redovito uzimaju duloksetin tijekom nastavne faze imaju značajno niži rizik od relapsa u usporedbi s onima koji su prerano prekinuli terapiju.³⁰ Dugotrajna primjena duloksetina, koja može trajati godinu dana ili više, posebno je važna kod osoba s kroničnom ili ponavljajućom depresijom. Duloksetin u ovom razdoblju pomaže održati remisiju i spriječiti daljnje epizode depresije, čime poboljšava dugoročnu kvalitetu života pacijenta.^{28,30} Osim toga, duloksetin ima potencijalno važnu ulogu u liječenju tzv. "rezistentne depresije", gdje pacijenti nisu dobro odgovorili na terapiju drugim antidepresivima.^{7,31} Njegov dualni mehanizam djelovanja omogućuje ciljano djelovanje na više puteva neurobiološke deregulacije u depresiji, povećavajući šanse za postizanje remisije.³²

2.1.6. Terapija jakim svjetlom (fototerapija; BLT, eng. bright light therapy)

Veliki depresivni poremećaj zahvaća veliki broj ljudi od kojih samo oko 50 % adekvatno reagira na prvotno liječenje, odnosno na terapiju antidepresivima i psihoterapiju.^{8,9} Osim toga, samo oko 30 do 40 % pacijenata pokazuje znakove remisije simptoma nakon primjene antidepresiva kroz period od 8 tjedana.⁹ Nadalje, psihoterapija je ograničena dostupnošću psihijataru i psihologa te su gerijatrijski pacijenti pod većim rizikom od razvoja nuspojava na liječenje

antidepresivima od ostalih dobnih skupina.³³ Upravo zbog ovih razloga, postoji potreba za razvojem alternativne i efikasne metode liječenja depresivnog poremećaja.^{8,9,33}

Jedna od takvih alternativnih metoda je i terapija jakim svjetlom, odnosno fototerapija. BLT je sigurna, dobro podnosiva, nefarmakološka terapija koja se može koristiti zasebno ili u kombinaciji s drugim vrstama terapije.^{10,34} Terapija uključuje izlaganje umjetnom jakom svjetlu određeni period. Uređaj koji emitira takvo svjetlo najčešće se sastoji od fluorescentnih cijevi, reflektora i difuznog zaslona.⁹ Djelotvornost terapije jakim svjetlom ispitivana je pri pacijentima koji boluju od sezonskog afektivnog poremećaja. To je vrsta depresivnog poremećaja koji se javlja sezonski, najčešće u periodu jeseni i zime kada ima manje dnevnog svjetla.³⁵ Svjetlosna se terapija smatra efikasnom jer stimulira specijalizirane ganglijske stanice mrežnice osjetljive na svjetlo koje sadrže melanopsin. Svjetlo potiče oslobađanje glutamata u suprahijazmatskoj jezgri. Ona se smatra cirkadijalnim „pacemakerom“ mozga.⁸ Međutim, točan biomolekularni mehanizam još uvijek nije poznat.^{8,9} Razlog za primjenu ove vrste terapije kod osoba koje boluju od nesezonske depresije, odnosno od velikog depresivnog poremećaja, je da te osobe često pokazuju atipične simptome koji su povezani s cirkadijalnim poremećajima, poput nepravilnih obrazaca spavanja, dnevnih oscilacija raspoloženja ili promijenjene tjelesne temperature koji su implicirani u patofiziologiju MDD-a.^{9,10} Ispitivanja su pokazala da primjena BLT kao monoterapije ili kao dodatne terapije uz terapiju antidepresivima rezultira redukcijom simptoma depresije u usporedbi s placebo uvjetima te da ju pacijenti relativno dobro toleriraju.^{8,10,33} Neželjeni simptomi koji se povezuju s primjenom BLT terapije uključuju naprezanje očiju, blagu glavobolju, mučninu, maniju te neke manje promjene u raspoloženju, ali su ti simptomi tijekom provođenja kliničkih ispitivanja smatrani zanemarivima.⁹

2.2. Metabolomika

Veliki depresivni poremećaj poznat je kao poremećaj čija je simptomatologija heterogena i kompleksna. Osim toga, prilikom primjene jedne ili više vrsta terapija, odgovori su varijabilni i individualni. Zbog toga je prvenstveno bitno točno dijagnosticirati depresiju te razviti personaliziranu farmakološku strategiju. U tom aspektu borbe protiv depresije uvelike pomažu biomarkeri za kojima danas postoji rastući interes budući da omogućuju prilagođavanje terapije pojedinim pacijentima.¹⁵ Molekule koji imaju veliki biomarkerski potencijal u ovakvim situacijama su metaboliti, male molekule koje se lako apsorbiraju i koje mogu proći krvno-moždanu barijeru. To su endogene molekule poput lipida, aminokiselina, kratkih peptida,

nukleinskih kiselina, šećera, alkohola ili organskih kiselina. One se proizvode rutinski putem endogenog katabolizma ili anabolizma. Njihova je sinteza kodirana genomom domaćina te su ključni za rast, razvoj i mnoge važne fiziološke funkcije.¹² Za razliku od gena i proteina, metaboliti pokazuju puno veću varijabilnost ovisno o faktorima okoline, stresa, prehrane i unutarnjih biokemijskih i metaboličkih puteva.¹¹

Metabolomika je brzo rastuće područje znanosti o životu koje koristi napredne tehnike analitičke kemije u kombinaciji sa sofisticiranim statističkim metodama kako bi se sveobuhvatno karakterizirao metabolom. Metabolom se obično definira kao cjelokupna zbirka metabolita, odnosno malih molekula, pronađenih u određenom organelu, stanici, organu, tjelesnoj tekućini ili organizmu.¹² Metabolomika se temelji na kemijskim reakcijama koje uključuju molekule male molekularne mase (<1,5 kDa).³⁶ Predstavlja alat koji pruža informacije o složenim interakcijama genotipa i fenotipa, kao i o složenim metabolomskim i biokemijskim mehanizmima u zdravlju i bolesti.³⁷ Zbog navedenih svojstava, metabolomika ima široku primjenu u znanosti, odnosno, u biomedicinskim istraživanjima, uključujući onkologiju, mikrobiologiju, farmakologiju, neuropsihijatriju i mnoge druge.¹¹ Također, može se koristiti za identifikaciju dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera.³⁶ Kao glavni uzorci za metabolomsku analizu koriste se razne tjelesne tekućine, tkiva ili stanice uključujući serum, urin, cerebrospinalnu tekućinu, amnionsku tekućinu, cistične tekućine, krvne stanice, trombocite pa tako i ekstracelularne vezikule i plazmu koja je kao tip uzorka korištena u ovom radu.³⁷ Metabolomika je jedna od najnovijih znanstvenih disciplina koje spadaju u grupu „omika“ te omogućuje praćenje promjena koje se zbivaju nizvodno od genomskih, transkriptomskih i proteomskih modifikacija. Zbog toga je postala ključna u istraživanju i probiru lijekova jer posjeduje sposobnost identifikacije metaboličkih promjena koje su rezultat različitih modaliteta liječenja.¹²

2.2.1. Neciljano metabolomsko profiliranje

U metabolomici postoje dva glavna pristupa, a to su ciljano i neciljano metabolomsko analiza. Te dvije vrste analize najčešće su međusobno povezane jer istraživanja u velikom broju slučajeva započinju neciljanom metabolomskom analizom budući da ona pruža globalni i generalni uvid što onda omogućuje formulaciju hipoteze za ciljanu analizu. Ponekad to ne mora biti slučaj ovisno o biološkom pitanju koje treba riješiti.¹¹

U potrazi za metabolitima koji bi mogli predstavljati nove dijagnostičke, prognostičke ili prediktivne biomarkere, najčešće se koristi neciljana metabolomska analiza.³⁸ Za razliku od neciljane analize koja mjeri širok raspon značajki koje se mogu detektirati u određenom uzorku, ciljana se analiza temelji na već anotiranim biokemijskim metabolitima.³⁷ Ciljana analiza usmjerena je na mjerenje poznatih i identificiranih metabolita koji su dio već utvrđenog i biološki značajnog metaboličkog puta u organizmu zbog čega ova vrsta metabolomskog pristupa pruža veću osjetljivost i selektivnost.¹¹ S druge strane, neciljana analiza generira jako veliki skup podataka pa je potrebna kompleksna obrada podataka kako bi se mogla utvrditi povezanost između metabolita i postavljenog znanstvenog pitanja.³⁸ Nadalje, određivanje i identifikacija metabolita u neciljanoj analizi povezana je s bazama podataka ili knjižnicama zbog kojih ona omogućuje kvalitativnu analizu i relativnu kvantifikaciju.

Bez obzira na velik broj svojih prednosti, i ciljana i neciljana analiza imaju svoje nedostatke. Što se tiče neciljane analize, najveće izazove predstavljaju strukturalna identifikacija, obrada sirovih podataka i pristranost u detekciji.³⁹ Osim toga, rezultati dobiveni nakon neciljane, odnosno ciljane analize ne mogu objasniti uzroke određenih promjena ili poremećaja kao što su smanjene ili povećane razine određenih metabolita koje mogu biti posljedica različitih uzroka uključujući promjene u aktivnosti enzima.³⁸

2.2.2. *Analitičke metode u metabolomici*

Svaki segment neciljane metabolomske analize zahtijeva analitičke metode koje će omogućiti separaciju, detekciju i identifikaciju. Analitičke metode koje će to omogućiti moraju biti sofisticirane i visokog kapaciteta. Kao tehnike separacije metabolita u metabolomici koriste se tekućinska kromatografija (LC), plinska kromatografija (GC), kapilarna elektroforeza (CE) te separacija ionskom mobilnošću (IMS). Kako bi se metaboliti mogli detektirati, koriste se određene metode ionizacije. Najčešće korištene tehnike ionizacije su ionizacija elektronima (EI), ionizacija elektroraspršenjem (ESI), ablacija laserom u kombinaciji s tehnikom ESI (LAESI), kemijska ionizacija (CI), ionizacija kemijskim reagensima pod atmosferskim tlakom (APCI) te desorpcija/ionizacija laserom uz pomoć matriksa (MALDI), dok se u svrhu detekcije najčešće koriste UV/Vis spektroskopija i detekcija fluorescencijom.³⁷ No, osnovne analitičke metode koje se koriste u svrhu metabolomske analize u kombinaciji s različitim metodama separacije su spektrometrija masa (MS) sparena s odgovarajućom separacijskom metodom i nuklearna magnetska rezonancija (NMR).⁴⁰

2.2.3. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS)

U navedenom istraživanju za metabolomsko profiliranje uzoraka plazme pacijenata s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja, prije i nakon odgovarajuće terapije, te zdravih kontrolnih ispitanika, korištena je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).

Navedena je metoda sveobuhvatna metabolomska tehnika koja se koristi za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju velikog skupa metabolita u koji spadaju alkoholi, šećeri, lipidi, organske kiseline i aminokiseline, peptidi, aldehidi i ketoni te metaboliti lijekova.⁴¹ Ova je metoda osjetljiva, reproducibilna i vrlo učinkovita. Mobilne faze koje se koriste u ovoj metodi su inertni plinovi nosioci, najčešće helij, zbog njegove stabilnosti i učinkovitosti. Osim helija, koriste se i vodik ili dušik. Uzorak se injektira u sustav, gdje se u isparivaču pretvara u plinovito stanje. Prenosi se kroz kapilarnu kolonu koja je obložena tankim slojem stacionarne faze koja se bira ovisno o polaritetu analiziranih spojeva. Komponente uzorka odvajaju se u koloni na temelju razlika u hlapljivosti i interakciji sa stacionarnom fazom, dok temperaturni program omogućuje bolje odvajanje spojeva različitih svojstava. Nakon izlaska iz kolone, uzorak ulazi u spektrometar masa, gdje se ionizira elektronima koji su ubrzani potencijalom od 70 V. Ovaj proces izbacuje elektron iz molekula uzorka, stvarajući pozitivno nabijene ione, koji se često razlažu u karakteristične fragmente. Ti se ioni zatim selektiraju u analizatoru masa koji je najčešće kvadrupol. Kvadrupol razdvaja ione prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Konačno, detektor bilježi intenzitet iona i generira spektar mase koji omogućuje identifikaciju spojeva prema njihovim fragmentacijskim obrascima.⁴² Uzorak fragmentacije pojedinih metabolita (nastali ioni i njihova zastupljenost) osnova su za stvaranje knjižnica i baza podataka koje se koriste u identifikaciji metabolita detektiranih metodom GC-MS.⁴³ Usporedba spektra mase i retencijskog vremena pojedinog metabolita s korespondirajućim u bazi podataka, odnosno knjižnici, omogućuje identifikaciju tog metabolita.¹¹ Kao i svaka analitička tehnika, GC-MS ima određene nedostatke. Najčešće se plinska kromatografija koristi za separaciju hlapljivih spojeva koji su toplinski stabilni, a nehlapljivi se spojevi moraju ukloniti.^{41,43} U svrhu detekcije metabolita metodom GC-MS potrebno ih je učiniti hlapljivima i termostabilnima. Kako bi nehlapljivi spojevi postali hlapljivi i toplinski stabilni, moraju proći derivatizaciju poput metoksimacije i silylacije. Metoda GC-MS omogućava detekciju spojeva koji su u pravilu manji od 650 Da.

GC se obično kombinira s detektorima s jednim kvadrupolom što osigurava dobar dinamički raspon i visoku osjetljivost. Također, metoda je za razliku od LC-MS i CE-MS pristupa izrazito ekonomična, robusna te reproducibilna. Međutim, ponekad je broj metabolita prevelik što uzrokuje vrlo bliska retencijska vremena pojedinih metabolita i time otežava njihovu identifikaciju. Rješenje je ovog izazova spajanje GC-a kao separacijske tehnike s trostrukim kvadrupolom kako bi se omogućila identifikacija i kvantifikacija metabolita koji se zajedno izlučuju iz kolone.

GC-MS s EI smatra se zlatnim standardom u metabolomici te je jedna od glavnih analitičkih tehnika. Primjena ove analitičke metode je široka, a uključuje mikrobiološku i biljnu metabolomiku te kliničku metabolomiku.⁴¹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom je radu izučavano metabolomsko profiliranje uzoraka plazme pacijenata s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja, prije i nakon odgovarajuće terapije, te kontrolnih ispitanika, za koje je korištena metoda GC-MS.

3.1. Kemikalije i instrumenti

Reagensi i otapala korišteni u ovom istraživanju te njihova čistoća i proizvođači prikazani su u tablici 1, a instrumenti i njihovi proizvođači u tablici 2.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih za pripremu uzoraka i za analizu GC-MS, njihove specifikacije i proizvođači

Kemikalija	Specifikacije	Proizvođač
Acetonitril	za HPLC; čistoća 100 %	VWR Chemicals, SAD
Heptan	za HPLC; čistoća ≥ 99 %	VWR Chemicals, SAD
<i>O</i> -metoksiamin hidroklorid	čistoća 97,5-102,5 % (AT)	Sigma-Aldrich, Kina
<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil) trifluoroacetamid (BSTFA) s 1 %-tnim trimetilklorosilanom (TMCS)	čistoća 99,9 % (bez TMCS)	Sigma-Aldrich, Švicarska
Piridin	za HPLC; čistoća $\geq 99,8$ %	VWR Chemicals, SAD
Metil-stearat (C18)	referentni standard za GC	Sigma-Aldrich, Švicarska
F.A.M.E. Mix (C8-C22)	referentni materijal, 100 mg	Supelco, Sigma-Aldrich, Njemačka
Helij	čistoća 100 %	Messer Croatia Plin d.o.o., Hrvatska

Ultračista voda dobivena je koristeći sustav MilliQ®plus185 (Millipore, Billerica, MA, SAD).

Tablica 2. Popis instrumenata korištenih za pripremu uzoraka i za analizu GC-MS te njihovi proizvođači

Instrument	Proizvođač
Centrifuga	Centrifuga 5417 R, Eppendorf; Sorvall Legend RT
Koncentrator	Concentrator plus, Eppendorf
Vorteks	IKA Vortex 2, IKA
Pećnica	Binder Series E, Binder
Ultrasonikator	Sonorex Digiplus, Bandelin electronic
Sustav GC-MS	Agilent 7890A GC s automatskim uzorkivačem Agilent Technologies 7693 spregnut s MSD Agilent Technologies 5975, Agilent

3.2. Ispitanici i uzorkovanje

U istraživanju je sudjelovalo 100 ispitanika, 36 zdravih kontrolnih ispitanika prosječne životne dobi od 58 (37-68) godina i 64 ispitanika s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja. U istraživanje su uključeni ispitanici u dobi od 18 do 70 godina, oba spola, a dijagnozu velikog depresivnog poremećaja postavili su psihijatri Kliničkog bolničkog centra Zagreb prema kriterijima navedenim u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 5. izdanje (DSM-V).⁴⁴

Među ispitanicima s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja njih 33 su bolesnici s velikim depresivnim poremećajem koji su liječeni duloksetinom, prosječne životne dobi od 45 (19-67) godina. Druga skupina ispitanika s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja (N=31), prosječne životne dobi od 53 (21-69) godine, skupina je koja je primala terapiju duloksetinom u kombinaciji s fototerapijom. Svi ispitanici s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja dva puta su uzorkovani, prvi put prije početka odgovarajuće terapije, a drugi put nakon 8 tjedana terapije.

Ispitanicima je izvađena krv (10 ml) u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer®) s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom tijekom uobičajenih laboratorijskih pretraga na Klinici za psihijatriju i psihološku medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uzorci krvi svih ispitanika prikupljeni su dok su osobe bile natašte, a dostavljeni su i obrađeni unutar par sati od uzorkovanja na Institutu „Ruđer Bošković“ u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju. Serijom centrifugiranja iz pune krvi prvo je izdvojena plazma (3 min na 1 100×g), a zatim iz plazme trombociti (15 min na 5 087×g).

Plazma siromašna trombocitima alikvotirana je u odgovarajućem volumenu te je nakon toga pohranjena na -80 °C do daljnjih analiza.

3.3. Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS

Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazme svih 100 ispitanika uključenih u istraživanje, a u slučaju ispitanika s dijagnozom MDD-a uključeni su uzorci prije i nakon 8 tjedana odgovarajuće terapije. U analizu su uključeni i uzorci kontrole kvalitete (QC) te slijepa probe (BL). Uzorci kontrole kvalitete bili su smjesa jednakih volumena svih uzoraka plazme uključenih u analizu, a slijepa su probe pripremljene jednako kao i svi ostali uzorci, ali je u njih umjesto plazme dodan odgovarajući volumen ultračiste Milli-Q vode.

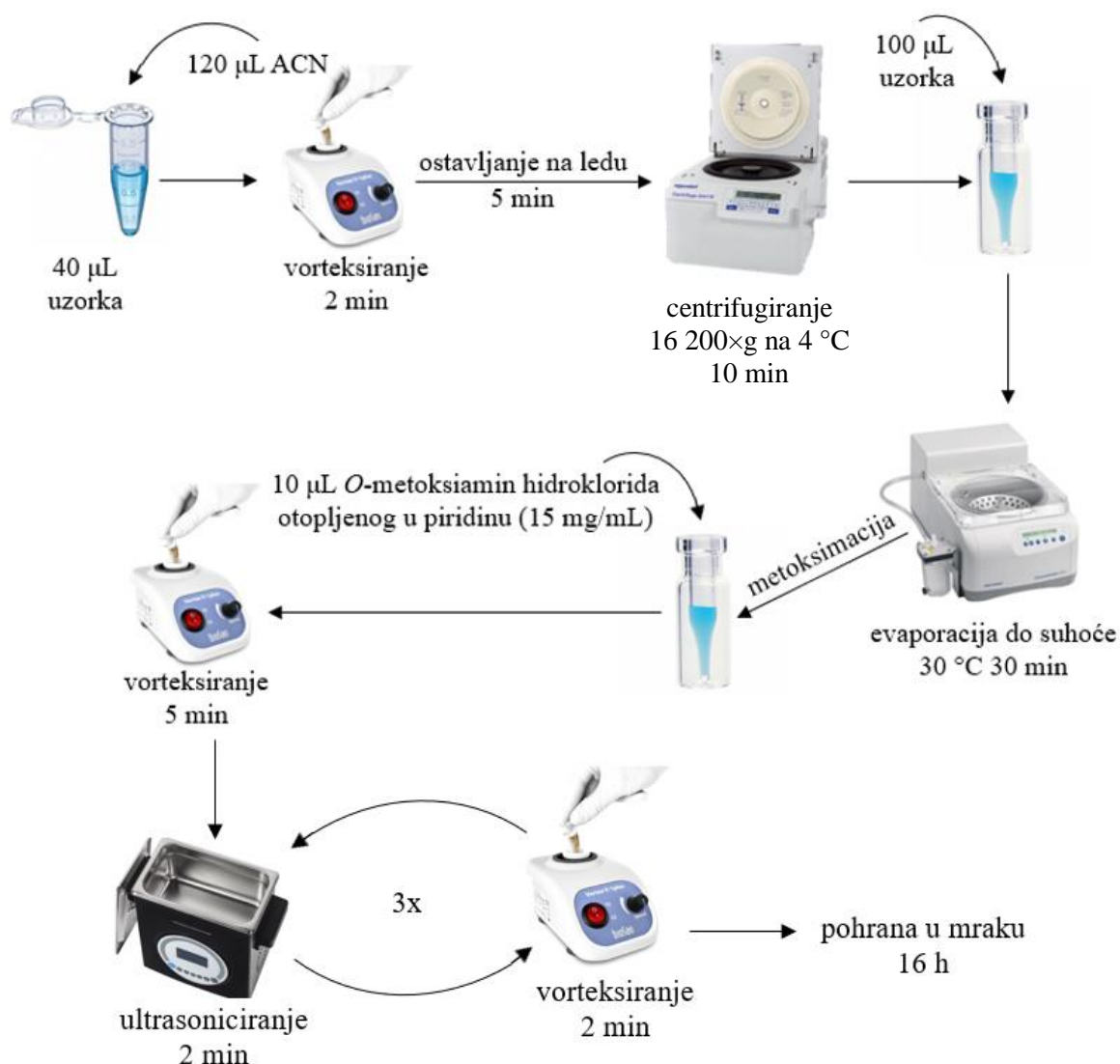
Priprema uzoraka za analizu GC-MS-om izvođena je u svrhu detekcije onih uzoraka koji pod određenim uvjetima postaju hlapljivi. Priprema je rađena unutar dva uzastopna dana.

3.3.1. Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS

Uzorci koji su bili pohranjeni na -80 °C otopljeni su na ledu te je na ledu rađena priprema uzoraka. Za svaki uzorak alikvotirano je 40 µL plazme. U slučaju uzoraka QC pripremljeno je ukupno 12 uzoraka koji su injektirani tijekom analize u sklopu analizirane sekvence te dva dodatna uzorka koja se koriste na početku sekvence za kalibriranje sustava. U slučaju slijepih proba, pripremljeno je 6 uzoraka s po 40 µL ultračiste Milli-Q vode. U slučaju slijepih proba 3 se uzorka injektiraju na početku sekvence, a 3 na kraju sekvence. U sljedećem je koraku svakom uzorku dodano 120 µL hladnog acetonitrila (omjer 1:3) kako bi se uzorak deproteinizirao. Svi su uzorci vorteksirani 2 minute te su nakon ostavljanja uzoraka 5 minuta na ledu, centrifugirani na 16 200×g pri 4 °C 10 minuta. Nakon centrifugiranja, pažljivo je prebačeno po 100 µL svakog uzorka u pripremljene staklene viala s fiksnim insertom (volumen inserta 0,3 mL, Clear Crimp 11 mm, Thermo Scientific, Njemačka) nakon čega su uzorci evaporirani do suhoće 30-45 minuta pri 30 °C u Eppendorf koncentratoru.

Prvi korak derivatizacije uzoraka bila je metoksimacija. Na svaki uzorak taloga dodano je 10 µL *O*-metoksiamin hidroklorida otopljenog u piridinu (15 mg/mL) te su zatim uzorci vorteksirani 5 minuta. Nakon toga, slijedila su tri ciklusa ultrasoniciranja po 2 minute i vorteksiranja po 2 minute. Prije drugog koraka derivatizacije, uzorci su prekriveni

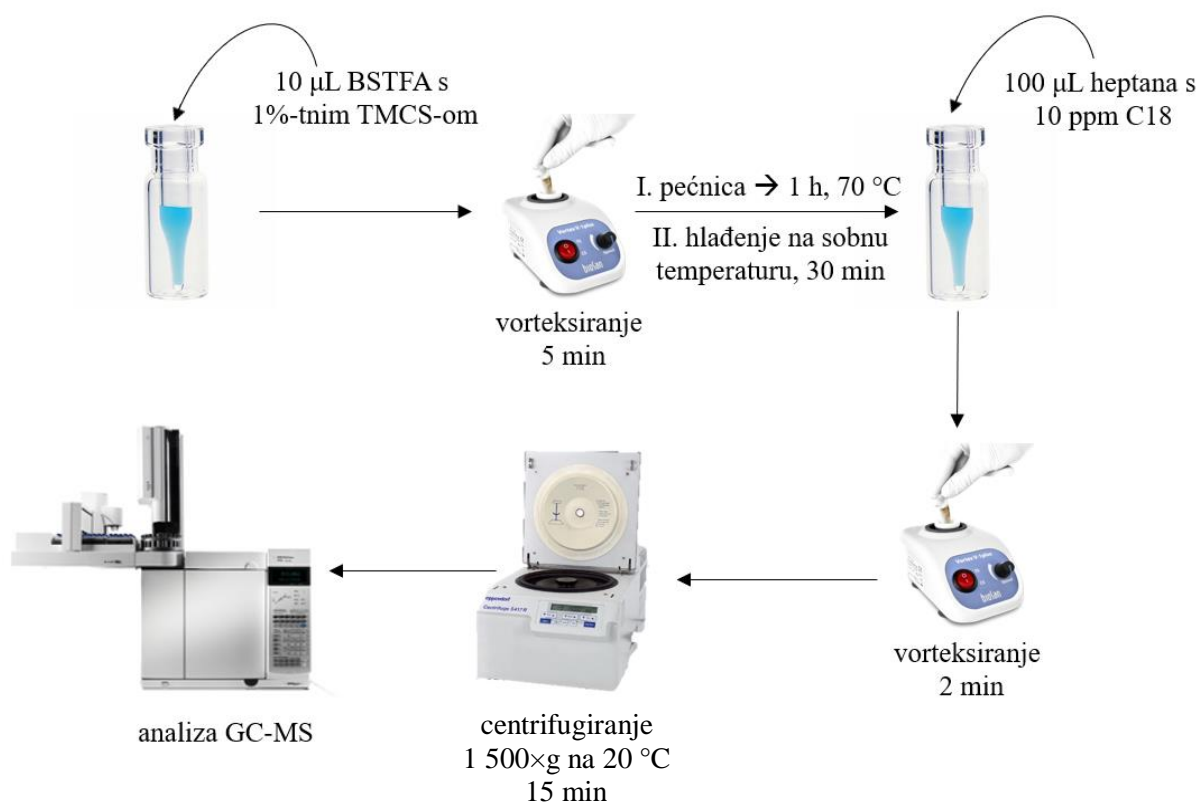
aluminijском folijom i ostavljeni 16 h na sobnoj temperaturi u mraku. Shematski prikaz prvog dana pripreme uzoraka prikazan je na slici 9.



Slika 9. Prikaz koraka prvog dana pripreme uzoraka za GC-MS analizu

Drugi korak derivatizacije uzoraka koji se izvodio drugi dan bila je sililacija. U svaki je uzorak dodano 10 µL *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) s 1 %-tnim trimetilklorosilanom (TMCS) te su uzorci vorteksirani 5 minuta. U svrhu sililacije metabolita, uzorci su stavljeni u pećnicu na 70 °C. Nakon jednog sata u pećnici, uzorci su ohlađeni 30 minuta na sobnu temperaturu. U uzorke je dodano po 100 µL heptana u koji je prethodno dodan interni standard metil-stearat C18 (10 ppm). Nakon vorteksiranja 2 minute, uzorci su

centrifugirani 15 minuta na $1\,500\times g$ pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analiza GC-MS slijedila je odmah po završetku drugog dana pripreme uzoraka. Shematski prikaz drugog dana pripreme uzoraka prikazan je na slici 10.



Slika 10. Prikaz koraka drugog dana pripreme uzoraka za GC-MS analizu

3.4. Metabolomska analiza metodom GC-MS

Odmah po završetku sililacije, uzorci su posloženi na stalke automatskog uzorkivača (Agilent Technologies 7693) koji je povezan s plinskim kromatografom (Agilent 7890A) spregnutim s kvadrupolnim spektrometrom mase (Agilent Technologies 5975). Kao ionski izvor korištena je ionizacija elektronima (EI). Za svaki derivatizirani uzorak ubrizgan je volumen od $2\text{ }\mu\text{L}$ s omjerom razdvajanja 1:10. Konstantna brzina protoka helija postavljena je na 1 mL/min , a temperatura ubrizgavača održavana je na $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperatura peći u kojoj se nalazi kolona postavljena je na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz brzinu povećanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ dok temperatura ne dosegne $325\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za analizu korištena je kolona GC-Column DB-5MS (duljina: 30 m, unutarnji promjer: $0,25\text{ mm}$, debljina filma: $0,25\text{ }\mu\text{m}$, punjenje: 95 % dimetilpolisiloksan/5 % difenilpolisiloksan) s

predkolumnom (10 m J&W integrirana s Agilent 122-5532G). Linija za prijenos prema detektoru postavljena je na 290 °C, temperatura ionskog izvora na 230 °C, a kvadrupol na 150 °C. Energija ionizacije elektronima (EI) postavljena je na 70 eV. Sustav je podešen da prikuplja spektre mase u rasponu masa između 50 i 600 m/z, brzinom od 2 spektra/s.

3.5. Obrada podataka dobivenih GC-MS analizom

3.5.1. Kvalitativna obrada podataka

Neobrađeni podaci koji su dobiveni analizom GC-MS uvedeni su u softver Agilent MassHunter Quantitative Analysis (verzija B.09.00, Agilent Technologies) kako bi se pregledali dobiveni kromatogrami ukupnih iona (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) za sve uzorke, a pogotovo kromatogrami ukupnih iona za uzorke QC i slijepe probe. Također, provjerena je i reproducibilnost signala internog standarda (C18) kod svih analiziranih uzoraka. Nakon toga, slijedila je identifikacija i dekonvolucija uzoraka. Za dekonvoluciju korišten je softverski paket Agilent MassHunter Unknowns Analysis (verzija B.09.00, Agilent Technologies). Isti programski paket nakon dekonvolucije kromatograma provodi i identifikaciju detektiranih spektara mase koristeći Fiehn bazu podataka (verzija 2013) na način da je identifikacija dodijeljena na temelju retencijskog vremena (RT), odnosno retencijskog indeksa (RI). RI je standardizirano retencijsko vrijeme koje Fiehn baza podataka koristi za identifikaciju spojeva. Retencijski indeksi svih detektiranih metabolita u našim uzorcima preračunati su iz njihovog RT-a uz pomoć kalibracijskog pravca pripremljenog koristeći F.A.M.E Mix. Ova komercijalna mješavina metilnih estera masnih kiselina sadrži metilne estere masnih kiselina s 8 do 22 C atoma za koje nam je poznat RI. Kalibracijski je pravac prikaz RT-a u odnosu na RI za ukupno 10 probranih metilnih estera (metil-kaprilat, metil-kaprat, metil-laurat, metil-miristat, metil-palmitat, metil-heptadekanoat, metil-oleat, metil-stearat, metil-eikozanoat, metil-dokozanoat). Naknadno, dodatna potvrda identifikacije spojeva i identifikacija nepoznatih spojeva rađena je koristeći bazu podataka NIST (National Institute of Standards and Technology, knjižnica 2.2, verzija 2014) koja za identifikaciju koristi usporedbu dobivenog spektra mase pojedinog metabolita sa spektrima pohranjenima unutar navedene baze.

3.5.2. Kvantitativna obrada podataka

Određivanje površine ispod pikova napravljeno je integriranjem koristeći softver Agilent MassHunter Quantitative Analysis (verzija B.09.00). Količina pojedinog spoja u dobivenoj podatkovnoj matrici normalizirana je prema količini internog standarda C18 nakon što su slijepe probe anulirane.

3.5.3. Statistička obrada podataka

Potrebna veličina uzorka određena je na temelju procedure opisane u radu kojeg su objavili Billoir i sur.⁴⁵ Prije statističke analize, neobrađeni podaci dobiveni analizom GC-MS filtrirani su na način da su zadržane varijable koje su bile prisutne u $\geq 80\%$ uzoraka QC i s relativnom standardnom devijacijom (RSD) $< 40\%$ u navedenim uzorcima.

Nadalje, koristeći rezultate dobivene kvantitativnom obradom podataka, odnosno rezultate kvantificiranja površine ispod pikova i normaliziranja prema intenzitetu internog standarda C18 za svaki pojedini uzorak, izračunat je i podatak postotka promjene za svaki metabolit u svakoj usporedbi skupina. On se računa tako da se razlika medijana dvaju skupa podataka ($Me(x) - Me(y)$) podijeli s medijanom onog skupa podataka koji je oduzet od prvog skupa ($Me(y)$), odnosno $\% \Delta$ se računa prema formuli:

$$\% \Delta = \frac{Me(x) - Me(y)}{Me(y)}$$

Za statističku obradu podataka korištena je online platforma MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Podaci su analizirani univarijatnom i multivarijatnom statističkom analizom, uključujući metodu analize glavnih komponenti (PCA) i ortogonalnu analizu metodom najmanjih kvadrata (OPLS-DA). Kolmogorov-Smirnov test korišten je za provjeru normalne raspodjele u skupu podataka za svaki spoj zasebno. Vrijednosti detektiranih i identificiranih metabolita uspoređivani su pomoću odgovarajućih parametrijskih ili neparametrijskih statističkih testova između različitih skupina ispitanika. U slučaju usporedbe dvaju zavisnih skupina (pacijenti prije i poslije terapije) korišten je t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test. U slučaju usporedbe nezavisnih uzoraka korišten je t-test za nezavisne uzorke ili Mann-Whitneyev U test. Prema potrebi napravljena je i transformacija podataka kako bi se zadovoljio uvjet normalne distribucije. Platforma MetaboAnalyst nudi opciju transformacije podataka, normalizacije te skaliranja prije daljnje statističke obrade. Za sve analize razina

značajnosti (p-vrijednost) postavljena je na 0,05 (5%). U slučaju univarijatne statističke obrade podataka za korigiranje p-vrijednosti zbog korištenja višestrukih usporednih testova MetaboAnalyst 6.0 koristi korekciju za višestruko testiranje pomoću Benjamini-Hochberg stope za lažna otkrića (FDR, eng. *False Discovery Rate*) od 5%, kojom se kontrolira udio krivo odbačenih hipoteza unutar skupa odbačenih hipoteza. Svi grafički prikazi također su napravljeni koristeći platformu MetaboAnalyst 6.0.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Derivatizacija metabolita za analizu metodom GC-MS

Metoksimacija i sililacija ključni su koraci u pripremi uzoraka za analizu metodom GC-MS. Ovi derivatizacijski postupci u metabolomskoj analizi poboljšavaju analitičku osjetljivost i ponovljivost mjerenja.

Metoksimacija se koristi u svrhu stabilizacije spojeva poput aldehida, ketona i ugljikohidrata. Karbonilne su skupine reaktivne te mogu stvarati hidrate ili polimere što može uzrokovati varijacije u analizi. Dakle, metoksimacija pretvara karbonilne skupine u stabilne derivate čime se sprječava njihova degradacija i omogućuje dosljedna kvantifikacija. Također, ovim se postupkom stabiliziraju ugljikohidrati na način da se smanjuje izomerizacija između α - i β -anomera šećera.

S druge strane, sililacija je derivatizacijski postupak koji se koristi za povećanje hlapljivosti i stabilnosti polarnih spojeva. Polarni metaboliti kao što su aminokiseline, organske kiseline i ugljikohidrati, sadrže hidroksilne, karboksilne ili aminoskupine koje su slabo hlapljive. Sililacija pomoću kemikalija BSTFA i TMCS zamjenjuje vodik u navedenim funkcijskim skupinama sa sililnim grupama ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), čime se povećava hlapljivost i poboljšava separacija plinskom kromatografijom. Dakle, sililacija se koristi zbog poboljšanja detektabilnosti spojeva pri GC-MS analizi te zbog smanjenja međumolekulskih interakcija koje bi potencijalno utjecale na separaciju.

U metabolomskoj analizi najčešće se koriste oba postupka derivatizacije jer metoksimacija osigurava stabilnost metabolita dok sililacija povećava hlapljivost i kompatibilnost spojeva s metodom GC-MS. Obje metode derivatizacije se, osim navedenog, koriste i u svrhu poboljšanja termičke stabilnosti spojeva.

4.2. Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka dobivenih analizom GC-MS

Analiza uzoraka metodom GC-MS rezultirala je velikim brojem kromatograma ukupnih iona (TIC) analiziranih uzorka koji su uvedeni u softver Agilent MassHunter Qualitative Analysis (verzija B.09.00, Agilent Technologies). Nakon pregleda dobivenih kromatograma ukupnih

iona i provjere reproducibilnosti signala internog standarda (C18), napravljena je dekonvolucija i identifikacija detektiranih metabolita pomoću softverskog paketa Agilent MassHunter Unknowns Analysis (verzija B.09.00, Agilent Technologies). Programski paket za dekonvoluciju koristi algoritam koji izdvaja pojedine ione iz pozadinske buke i rekonstruira spektre pojedinačnih komponenti iz informacija o RT-u i obliku kromatografskog pika. Dakle, dekonvolucija je proces izolacije spektra jednog spoja (metabolita) iz kompleksnih kromatograma. Nakon procesa dekonvolucije i identifikacije koristeći Fiehn bazu podataka, kromatogrami su pregledani te je svaka potencijalna identifikacija uz pomoć Fiehn baze podataka dodatno provjerena koristeći bazu podataka NIST. Preliminarno je identificirano 97 spojeva od kojih su 52 identificirana pomoću softvera koji koristi Fiehn bazu podataka te identifikaciju radi na temelju podataka o RI-u. Ostalih 45 pikova dodatno je identificirano pomoću baze podataka NIST. Nakon toga, napravljena je korekcija početnih rezultata te su odbačeni metaboliti koji su identificirani samo uz Fiehn bazu podataka, odnosno čija identifikacija nije mogla biti potvrđena bazom podataka NIST. Od 65 identificiranih metabolita koji su prikazani u tablici 3, 30 ih je automatski identificirano pomoću softvera uz Fiehn bazu podataka i potvrđeno uz bazu podataka NIST, a 35 ih je naknadno detektirano te identificirano uz pomoć baze podataka NIST.

Tablica 3. Popis 65 metabolita koji su identificirani tijekom kvalitativne obrade podataka. Za svaki metabolit prikazan je ion (ION) koji je odabran kao karakterističan ion koji se koristi u daljnjoj kvantifikaciji tog spoja te eksperimentalno dobivena vrijednost retencijskog vremena (RT_{EXP})

METABOLIT	ION (m/z)	RT_{EXP} (min)	METABOLIT	ION (m/z)	RT_{EXP} (min)
1,3-Oksatian	74	8,25	Limunska kiselina	273	16,56
1,5-Anhidroglucitol	217	16,95	Linolna kiselina	67	20,41
1,2,3-Butantriol	103	13,01	L-Izoleucin	86	8,64
2-Aminomalonska kiselina, N,O,O	320	12,53	L-Leucin 1	117	8,33
2-Hidroksibutirinska kiselina	131	7,82	L-Norleucin 2	159	9,94
2-Ketoizokaproinska kiselina 2	75	9,05	L-Prolin 2	142	10,27
3,4-Dimetoksimandelinska kiselina	239	22,02	L-Serin	132	9,74

METABOLIT	ION (m/z)	RT _{EXP} (min)	METABOLIT	ION (m/z)	RT _{EXP} (min)
3-Hidroksibutirinska kiselina	191	8,33	L-Treonin 2	130	11,44
5-Hidroksi-L-triptofan 1	290	22,14	L-Valin 1	72	7,65
5-Metilhidantoin	258	7,73	L-Valin 2	144	9,11
Arabinoza	204	18,17	Merkaptoetanol	207	13,03
Benzenpropanojska kiselina	207	6,28	Metil stearat	87	19,66
Borna kiselina	221	5,90	Mio-inozitol	305	19,31
D (+) Galaktoza 2, D-manitol	319	17,52	Mokraćna kiselina 1	441	19,35
D-Aloza 1, D-manoza	160	17,44	Norvalin 1	130	7,69
D-Glukoza 1	73	17,38	Oksalna kiselina	148	8,01
D-Manitol	191	18,17	Oktanska kiselina	201	9,79
DL-Izoleucin 2	158	10,15	Oleinska kiselina	129	20,46
Edeinska kiselina	292	22,14	Palmitinska kiselina	313	18,88
Fenilalanin 1	120	13,58	Penicilamin	291	11,42
Fosforna kiselina	299	9,92	Pentanska kiselina	89	8,57
Ftalna kiselina	149	17,09	Pentasiloksan	281	8,49
Glicerol 1	205	9,91	Piruvična kiselina - oktanska kiselina	73	6,97
Glicerol 2	205	10,34	Propilen glikol	75	6,07
Glicin	248	10,39	Putrescin	174	12,41
Glikolna kiselina	149	21,25	Ribitol	205	17,19
Heksanska kiselina	75	0,10	Sedoheptuloza anhidrid monohidrat	319	18,17
Heksanska kiselina	216	8,85	Stearinska kiselina	341	20,67
Kolesterol	207	27,57	Taloza 1	319	17,38
L-(+) Mliječna kiselina	117	6,88	Tirozin 2	219	17,83
L-5-Oksoprolin	156	13,20	Triptofan	202	20,36
Laktoza	361	17,98	Urea	189	9,48
L-Alanin 1	116	7,50			

65 metabolita je, nakon kvalitativne obrade, uvedeno u softver Agilent MassHunter Quantitative Analysis (verzija B.09.00). Nakon integriranja površine ispod pika pojedinog metabolita, zastupljenost svakog metabolita u svakom pojedinom uzorku normalizirana je prema intenzitetu internog standarda C18 za svaki pojedini uzorak. Od 65 metabolita, neki su

dvostruko detektirani, kao npr. L-valin 1 i L-valin 2. Navedeni su spojevi, zapravo, različiti derivati istog spoja (različiti broj vezanih TMS skupina) zbog čega postoji razlika u njihovoj masi, a time i u RT-u. U slučaju spoja L-valin 1 radi se o TMS derivatu, a u slučaju spoja L-valin 2 o di-TMS derivatu aminokiseline valin. Ovako detektirani metaboliti su nakon kvantifikacije sumirani, odnosno, njihova je zastupljenost u svakom pojedinom uzorku zbrojena. Također, u slučaju nekih monosaharida (aldoheksosa), kao što su npr. glukoza i galaktoza, nije moguće razlikovati spojeve jer su građeni od iste vrste i istog broja atoma koji su povezani u identičnoj konfiguraciji (dijastereomeri). Zbog navedenog, identifikacija takvih spojeva prikazana je kao kombinacija svih mogućih identifikacija (npr. Manoz/Galaktoza/Glukoza). Biološki značaj identificiranih metabolita provjeren je pomoću online baze podataka Human Metabolome Database (HMDB; <https://hmdb.ca>).⁴⁷ U slučaju da je provjera pokazala da identificirani metaboliti ne bi trebali biti prisutni u ljudskoj plazmi, isti su isključeni iz daljnje analize.

Prije statističke obrade podataka napravljena je dodatna filtracija na način da su za statističku analizu zadržani samo oni metaboliti koji su prisutni kod više od 50 % uzoraka te metaboliti čija je prisutnost u uzorcima kontrole kvalitete bila veća od 80 %, a RSD vrijednost manja od 40 %. U konačnu statističku obradu ušlo je 37 identificiranih i kvantificiranih metabolita koji se nalaze u tablici D1 zajedno s korespondirajućim postotnim vrijednostima relativne standardne devijacije (RSD) i postocima prisutnosti u uzorcima (PRES).

4.3. Statistička obrada podataka i interpretacija rezultata

U daljnju statističku obradu ušli su metaboliti prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Popis metabolita čija je zastupljenost u pojedinim skupinama ispitanika analizirana odgovarajućim statističkim metodama. Za svaki metabolit prikazan je ion (ION) koji je odabran kao karakterističan ion koji se koristi u kvantifikaciji tog spoja te eksperimentalno dobivena vrijednost retencijskog vremena (RT_{EXP})

METABOLIT	ION (m/z)	RT_{EXP} (min)
1,5-Anhidroglucitol	217	16,95
2-Ketobutirična kiselina	188	7,72
3-Hidroksibutirična kiselina	117	8,33
5-Oksoprolin	156,1	13,21
Acetoacetat	89	8,04
Alanin	116,1	7,51
Arahidonska kiselina	75	21,76
D-Manitol	319,2	17,59
Fenilalanin	120,0/218,0	13,61/14,47
Fosforna kiselina	299,1	9,92
Glicerol	205,1	9,93
Glicin	174,1	10,40
Glikolna kiselina	66	6,88
Heksanska kiselina	189	9,07
Hidroksiizomaslačna kiselina	131,1	7,84
Izoleucin	158,1	10,05
Jantarna kiselina	263	13,44
Kolesterol	329	27,59
Leucin	86,0/158,1	8,64/9,91
Linolna kiselina	337,3	20,43
Manoza/Galaktoza/Glukoza	205,1	17,28
Metil-galaktopiranozid	204	17,72
Mio-inozitol	305,1	19,33
Mliječna kiselina	117	6,89
Mokraćna kiselina	441,2	19,36
Oleinska kiselina	129	20,48
Palmitinska kiselina	313,3	18,89
Prolin	142	10,28/13,95

METABOLIT	ION (m/z)	RT _{EXP} (min)
Propanska kiselina	174,0/217,0	6,74/13,06
Serin	204	11,11
Stearinska kiselina	341,2	20,72
Tirozin	218	17,84
Treonin	218	11,45
Triptofan	202	20,38
Urea	189	9,50
Valin	144,1	9,12
β-D-Galaktofuranozid	217	18,20

Ispitanici su podijeljeni u pet skupina: zdrava, odnosno kontrolna skupina (CTRL), skupina ispitanika s prvom epizodom depresije prije terapije duloksetinom (MDD) i nakon 8 tjedana terapije duloksetinom (MDDD) te skupina ispitanika s depresijom otpornom na liječenje prije terapije (TRD) i nakon liječenja kombinacijom duloksetina i fototerapije u trajanju od 8 tjedana (TRDDF). U svrhu usporedbe dviju nezavisnih skupina korišten je t-test za nezavisne uzorke u sklopu univarijatne statističke analize te su uspoređene skupine CTRL i MDD, CTRL i TRD te MDD i TRD, a u svrhu usporedbe dviju zavisnih skupina korišten je t-test za zavisne uzorke te su na ovaj način uspoređene skupine MDD i MDDD te TRD i TRDDF.

Razina pojedinih metabolita u uzorku kvantificirana je na način da je za svaki metabolit odabran specifičan ion za koji je određena tzv. površina ispod pika. Navedena je vrijednost zatim normalizirana prema količini internog standarda C18 za svaki pojedini uzorak. Za svaku skupinu ispitanika i za svaki pojedini metabolit izračunati su medijani i određene su minimalne i maksimalne vrijednosti zastupljenosti. Navedeni podaci za skupinu CTRL prikazani su u tablici D2, podaci za skupine MDD i MDDD u tablici D3, a podaci za skupine TRD i TRDDF u tablici D4.

U ovom istraživanju korištene su dvije vrste multivarijatne statističke analize, a to su metoda analize glavnih komponenti (PCA) i ortogonalna analiza metodom najmanjih kvadrata (OPLS-DA). Analiza PCA korištena je za interpretaciju, vizualizaciju i smanjenje dimenzionalnosti velikog skupa podataka dobivenog nakon metabolomske analize. Ova metoda definira glavne komponente koje objašnjavaju varijabilnost podataka (metabolita) na najkoncizniji način. Glavni je cilj redukcija broja međusobno koreliranih varijabli i analiza njihove linearne povezanosti s ciljem dobivanja manjeg broja komponenti, novih varijabli, koje su međusobno nekorelirane, ali na način da se zadrži maksimalan broj informacija te da se

najbolje prikaže varijabilnost između analiziranih uzoraka. Metoda OPLS-DA služi za kreiranje ortogonalnih vektora koji maksimiziraju razliku (varijanciju) između dva različita skupa podataka. Slično kao i metoda PCA, OPLS-DA se primjenjuje kada imamo puno potencijalno koreliranih varijabli koje želimo svesti na manji broj relevantnih komponenti. Dakle, pomoću metode OPLS-DA iz originalnih varijabli kreiramo mali broj novih varijabli koje imaju svojstvo da najbolje predviđaju originalne varijable, istovremeno za oba skupa koja uspoređujemo. Ova analiza pronalazi linearne kombinacije originalnih varijabli (metabolita) koje su najbolji linearni predvoditelji svih tih originalnih varijabli koje su ušle u analizu. Iz OPLS-DA modela dobivaju se i tzv. vrijednosti važnosti pojedine varijable u projekciji (VIP, eng. *Variable Importance in Projection*) koje nam omogućuju da procijenimo važnost svake varijable u projekciji koja se koristi u OPLS-DA modelu. Varijabla VIP koja je veća od 1 (jedan) može se smatrati varijablom koja značajno doprinosi razdvajanju skupova podataka u danom modelu.

Objektive vrste modela korištene su za analizu važnosti doprinosa pojedinih metabolita pri razlikovanju skupina CTRL i MDD, CTRL i TRD, MDD i TRD, MDD i MDDD te TRD i TRDDF.

4.3.1. Rezultati usporedbe skupina CTRL i MDD dobiveni univarijatnom statističkom analizom

Za usporedbu skupina CTRL i MDD korišten je Studentov t-test, a prikazana je t-vrijednost, p-vrijednost prije korekcije za višestruko testiranje te p-vrijednost nakon korekcije (FDR) u tablici 5. One metabolite čija zastupljenost se nije razlikovala između uspoređivanih skupina, program MetaboAnalyst 6.0 označava kao neznačajne (NS, eng. *non-significant*).

Tablica 5. Rezultati usporedbe zastupljenosti detektiranih metabolita između skupina ispitanika CTRL i MDD nakon univarijatne statističke analize (Studentov t-test). U stupcu FDR, crveno su podebljane p-vrijednosti koje su nakon FDR korekcije ispale statistički neznačajne (FDR>0,050), a zeleno su podebljane one koje su nakon FDR korekcije ostale statistički značajne (FDR≤0,050)

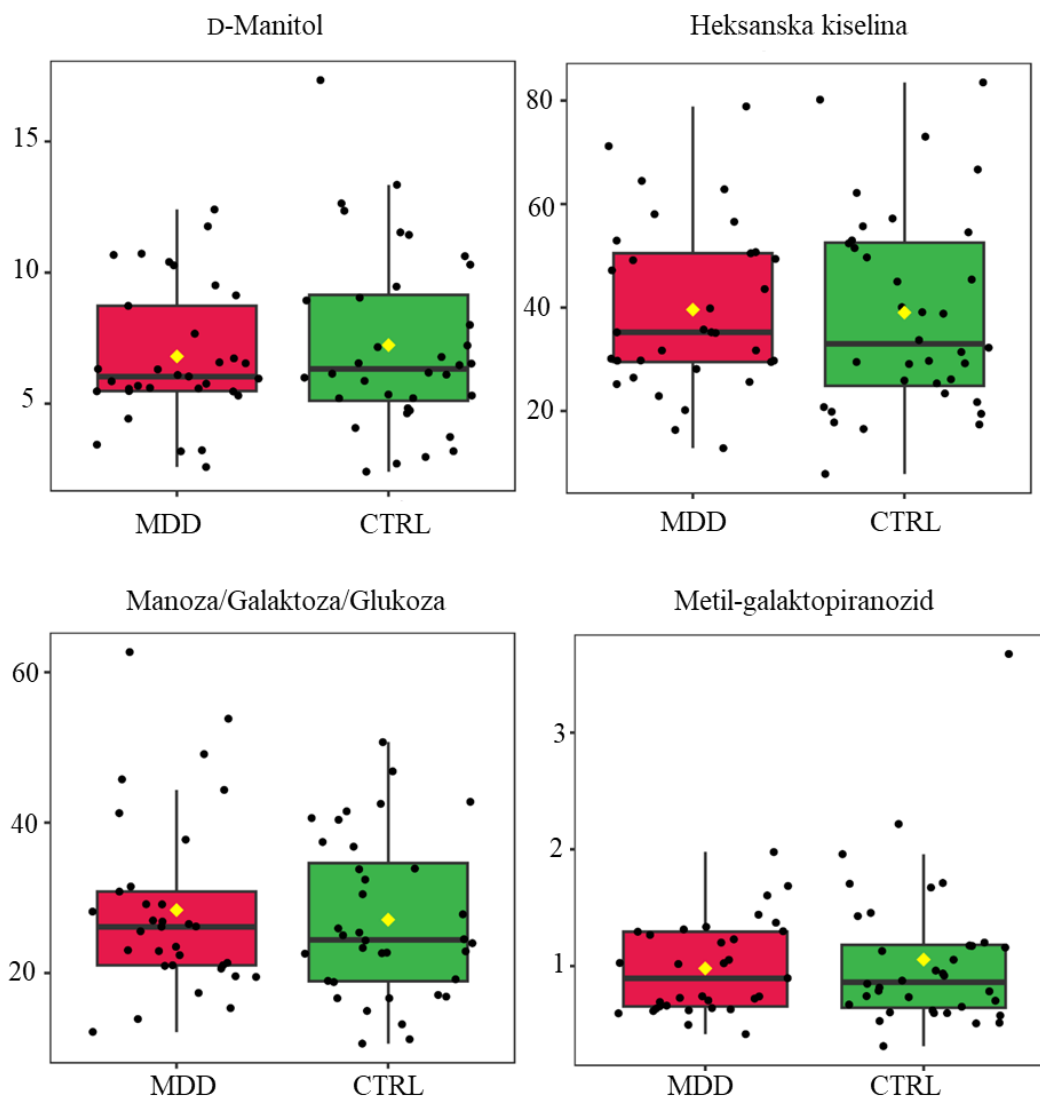
METABOLIT	CTRL vs MDD		
	t	p	FDR
1,5-Anhidroglucitol	NS	NS	NS
2-Ketobutirična kiselina	-2,040	0,045	0,112
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	NS
5-Oksoprolin	NS	NS	NS
Acetoacetat	2,052	0,044	0,112
Alanin	2,533	0,014	0,055
Arahidonska kiselina	-2,384	0,020	0,067
D-Manitol	3,739	0,000	0,006
Fenilalanin	NS	NS	NS
Fosforna kiselina	2,935	0,005	0,024
Glicerol	2,502	0,015	0,055
Glicin	NS	NS	NS
Glikolna kiselina	NS	NS	NS
Heksanska kiselina	3,531	0,001	0,006
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	NS
Izoleucin	NS	NS	NS
Jantarna kiselina	3,657	0,001	0,006
Kolesterol	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS
Linolna kiselina	NS	NS	NS
Manoza/Galaktoza/Gluukoza	4,262	$6,492 \times 10^{-5}$	0,002
Metil-galaktopiranozid	3,422	0,001	0,007
Mio-inozitol	NS	NS	NS
Mliječna kiselina	-2,284	0,026	0,073
Mokraćna kiselina	-2,845	0,006	0,027
Oleinska kiselina	2,300	0,025	0,073
Palmitinska kiselina	NS	NS	NS
Prolin	NS	NS	NS
Propanska kiselina	NS	NS	NS
Serin	NS	NS	NS
Stearinska kiselina	NS	NS	NS

METABOLIT	CTRL vs MDD		
	t	p	FDR
Tirozin	NS	NS	NS
Treonin	NS	NS	NS
Triptofan	NS	NS	NS
Urea	3,563	0,001	0,006
Valin	NS	NS	NS
β-D-Galaktofuranozid	NS	NS	NS

*FDR - p-vrijednost nakon korekcije za višestruko testiranje metodom FDR; **NS - statistički neznačajan rezultat

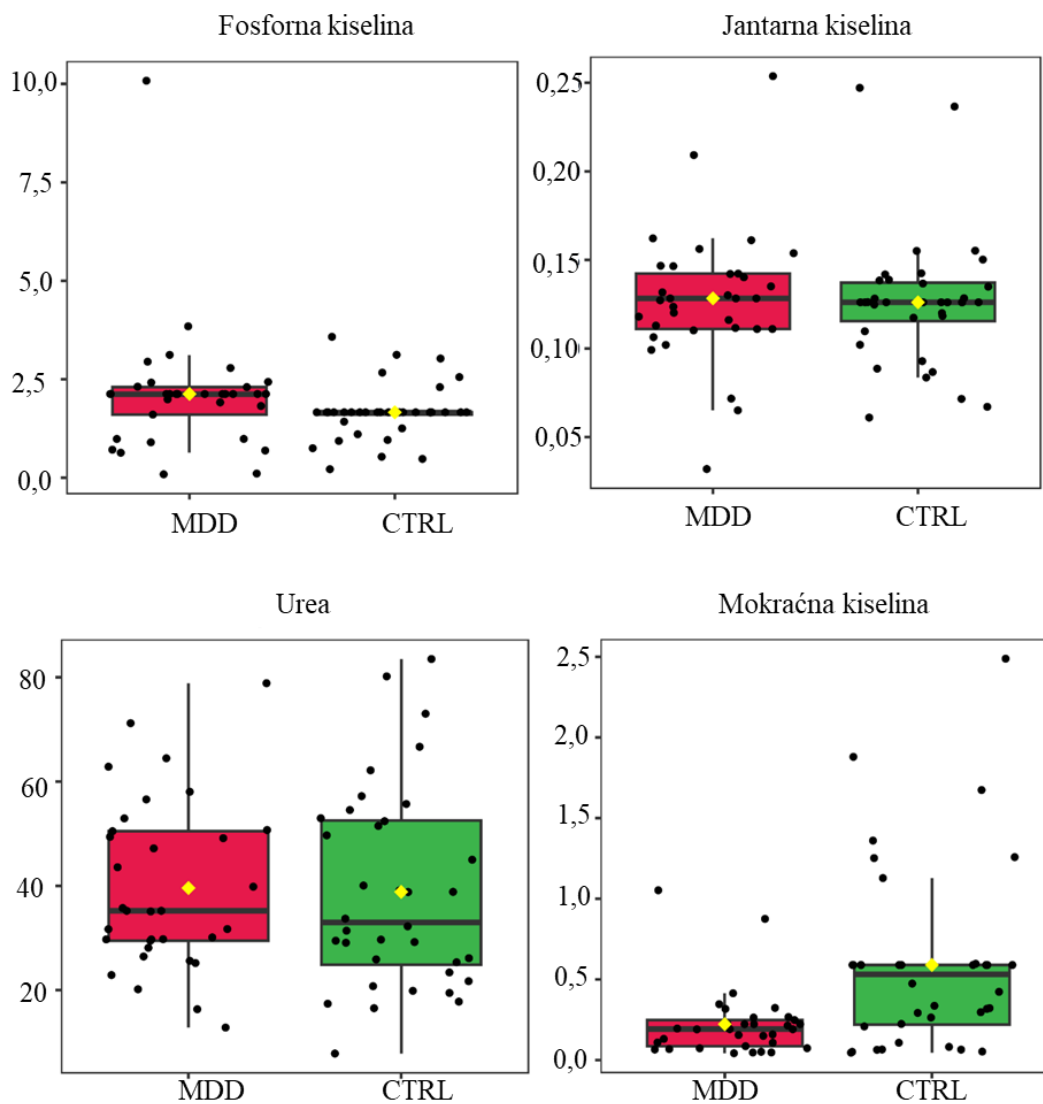
Usporedba skupina CTRL i MDD rezultirala je s petnaest metabolita čija zastupljenost se značajno razlikovala između uspoređivanih skupina. Nakon FDR korekcije, p-vrijednost je ostala značajna za 8 metabolita (tablica 5). Kod usporedbe skupina CTRL i MDD značajno promijenjeni metaboliti uključuju D-manitol, fosforu, heksansku i jantarnu kiselinu, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, mokraćnu kiselinu i ureu.

Zastupljenost metabolita koji su se značajno razlikovali između uspoređivanih skupina ispitanika prikazana je i pomoću dijagrama pravokutnika (kutijasti dijagram). Na ovaj način prikazani su metaboliti koji su ostali statistički značajno različiti između uspoređivanih skupina nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR. Rezultati su prikazani na slikama 11.1. i 11.2. Metaboliti čija je zastupljenost bila značajno različita između skupina CTRL i MDD nakon t-testa, ali čija se značajnost izgubila nakon FDR korekcije p-vrijednosti, su 2-ketobutirična kiselina, acetoacetat, alanin, arahidonska kiselina, glicerol, mliječna i oleinska kiselina te su prikazani na slikama 12.1 i 12.2.



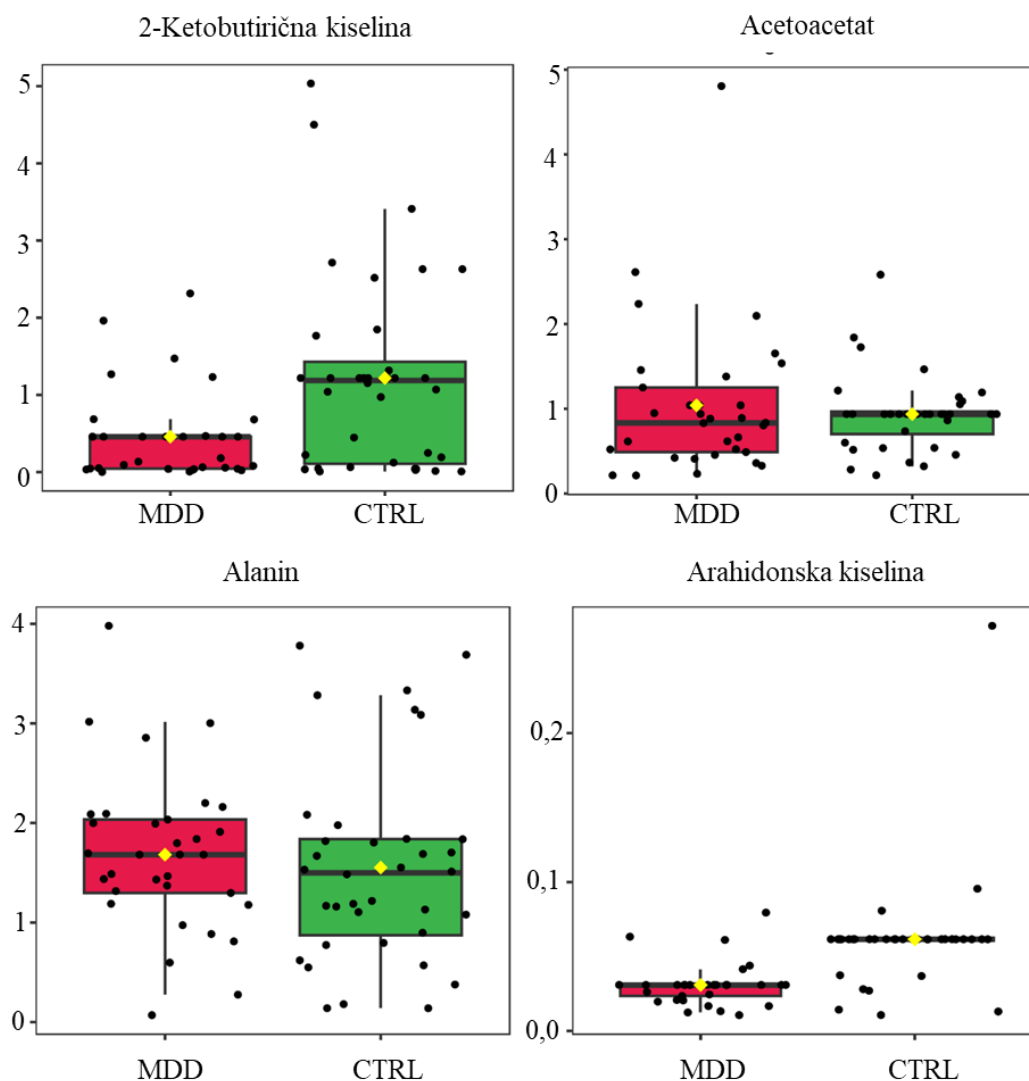
Slika 11.1. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se značajno razlikovali između skupina CTRL i MDD (prikazani su metaboliti čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

[\(https://www.metaboanalyst.ca/\)](https://www.metaboanalyst.ca/)



Slika 11.2. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se značajno razlikovali između skupina CTRL i MDD (prikazani su metaboliti čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

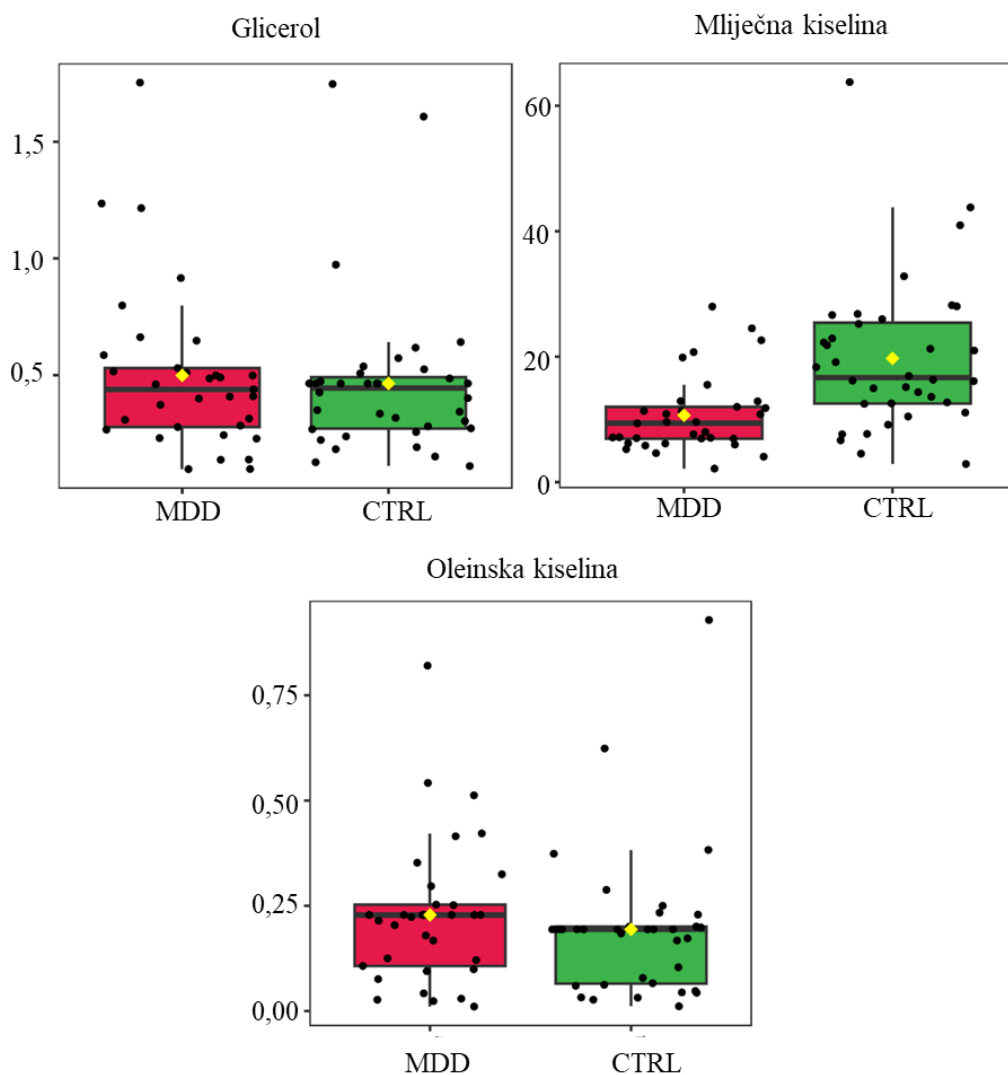
(<https://www.metaboanalyst.ca/>)



Slika 12.1. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se nominalno značajno razlikovali između skupina CTRL i MDD (prikazani su metaboliti čija zastupljenost između ispitivanih skupina nije ostala statistički značajna nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR).

Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)



Slika 12.2. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se nominalno značajno razlikovali između skupina CTRL i MDD (prikazani su metaboliti čija zastupljenost između ispitivanih skupina nije ostala statistički značajna nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR).

Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)

4.3.2. Rezultati usporedbe skupina CTRL i TRD dobiveni univarijatom statističkom analizom

U svrhu usporedbe skupina CTRL i TRD, također je napravljen Studentov t-test za nezavisne uzorke te su t-vrijednosti, p-vrijednosti prije korekcije za višestruko testiranje te p-vrijednosti nakon korekcije (FDR) prikazane u tablici 6. U slučaju da se zastupljenost pojedinih metabolita ne razlikuje između skupina CTRL i TRD, metaboliti su označeni kao neznačajni (NS, eng. *non-significant*).

Tablica 6. Rezultati usporedbe zastupljenosti detektiranih metabolita između skupina ispitanika CTRL i TRD nakon univarijatom statističke analize (Studentov t-test). U stupcu FDR zeleno su podebljane one p-vrijednosti koje su nakon FDR korekcije ostale statistički značajne ($FDR \leq 0,050$)

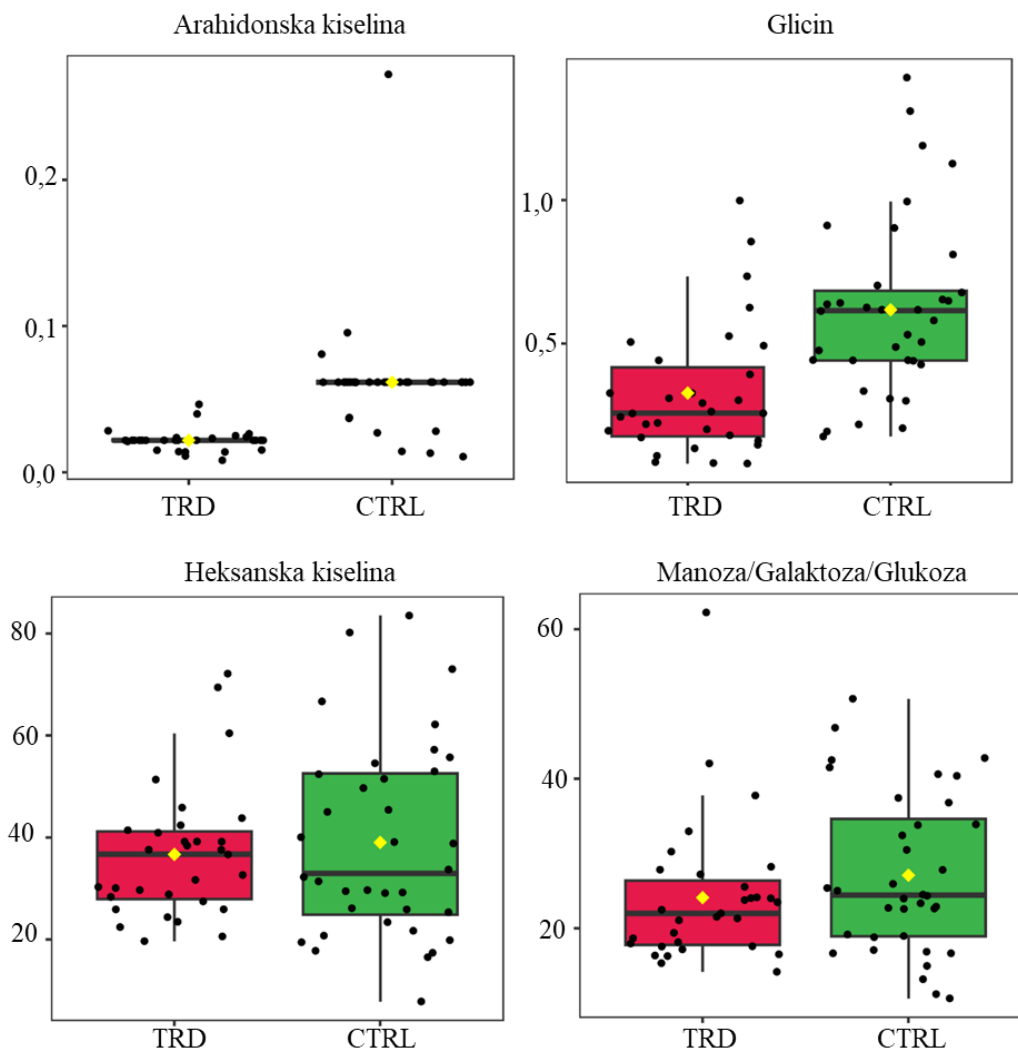
METABOLIT	CTRL vs TRD		
	t	p	*FDR
1,5-Anhidroglucitol	**NS	NS	NS
2-Ketobutirična kiselina	NS	NS	NS
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	NS
5-Oksoprolin	NS	NS	NS
Acetoacetat	NS	NS	NS
Alanin	NS	NS	NS
Arahidonska kiselina	-4,580	$2,16 \times 10^{-5}$	0,001
D-Manitol	NS	NS	NS
Fenilalanin	NS	NS	NS
Fosforna kiselina	NS	NS	NS
Glicerol	NS	NS	NS
Glicin	-2,819	0,006	0,047
Glikolna kiselina	NS	NS	NS
Heksanska kiselina	2,751	0,008	0,047
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	NS
Izoleucin	NS	NS	NS
Jantarna kiselina	3,333	0,001	0,026
Kolesterol	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS
Linolna kiselina	NS	NS	NS

METABOLIT	CTRL vs TRD		
	t	p	FDR
Manoza/Galaktoza/Glukoza	2,628	0,011	0,050
Metil-galaktopiranozid	NS	NS	NS
Mio-inozitol	NS	NS	NS
Mliječna kiselina	NS	NS	NS
Mokraćna kiselina	-2,990	0,004	0,047
Oleinska kiselina	NS	NS	NS
Palmitinska kiselina	NS	NS	NS
Prolin	2,644	0,010	0,050
Propanska kiselina	NS	NS	NS
Serin	NS	NS	NS
Stearinska kiselina	NS	NS	NS
Tirozin	NS	NS	NS
Treonin	NS	NS	NS
Triptofan	NS	NS	NS
Urea	2,783	0,007	0,047
Valin	NS	NS	NS
β-D-Galaktofuranozid	NS	NS	NS

*FDR - p-vrijednost nakon korekcije za višestruko testiranje metodom FDR; **NS - statistički neznačajan rezultat

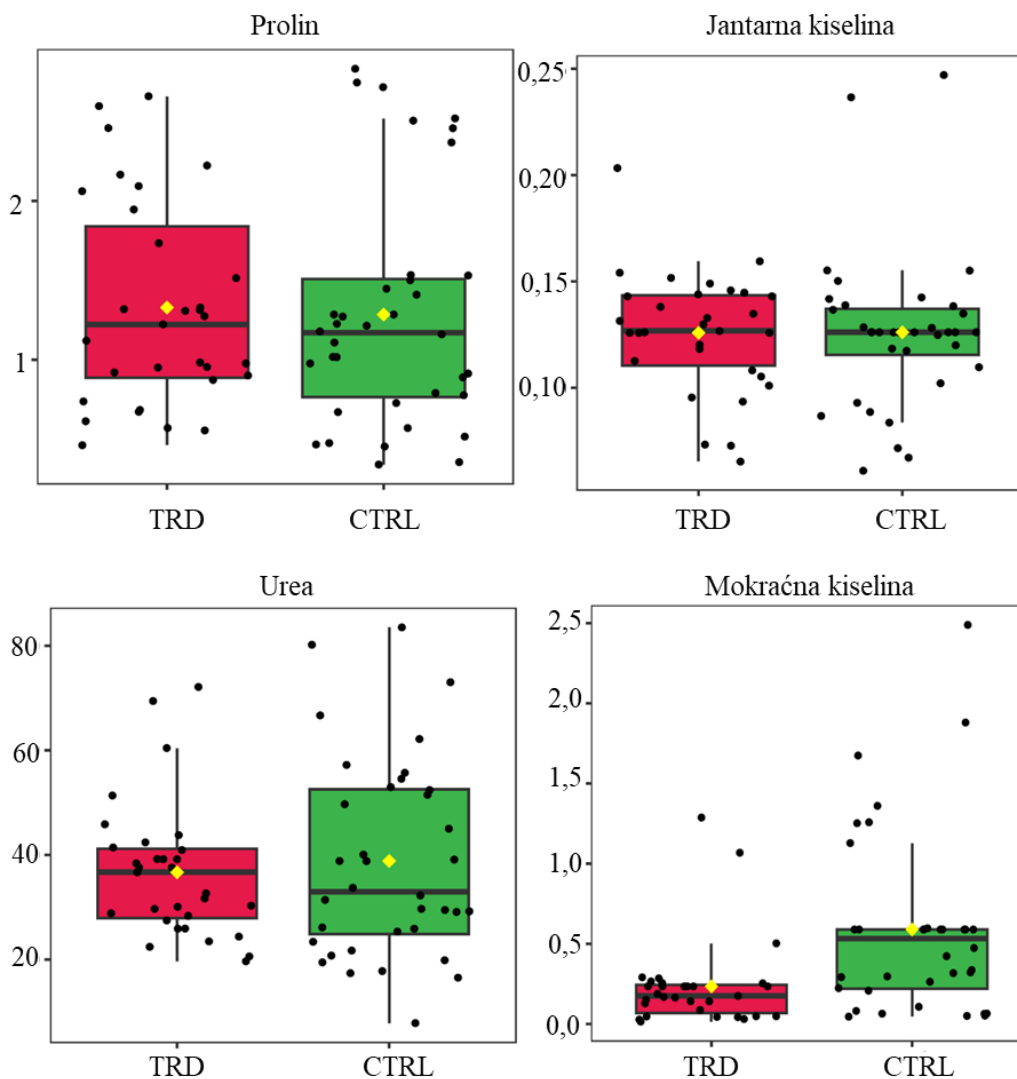
Usporedba skupina CTRL i TRD rezultirala je s osam metabolita čija se zastupljenost značajno razlikovala između uspoređivanih skupina, čak i nakon FDR korekcije (tablica 6). Kod usporedbe skupina CTRL i TRD, značajno različita zastupljenost detektirana je u slučaju arahidonske kiseline, glicina, heksanske kiseline, aldoheksoza (manoza/galaktoza/glukoza), prolina, jantarne kiseline, uree i mokraćne kiseline.

Zastupljenost metabolita koji su se značajno razlikovali između uspoređivanih skupina ispitanika prikazana je i pomoću dijagrama pravokutnika (kutijasti dijagram). Značajno zastupljeni metaboliti između skupina CTRL i TRD prikazani su na slikama 13.1 i 13.2. U slučaju skupina CTRL i TRD, svi metaboliti čija je zastupljenost bila statistički značajno različita između uspoređivanih skupina nakon analize t-testom, zadržali su tu značajnost i nakon FDR korekcije.



Slika 13.1. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se značajno razlikovali između skupina CTRL i TRD (prikazani su metaboliti čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)



Slika 13.2. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se značajno razlikovali između skupina CTRL i TRD (prikazani su metaboliti čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

[\(https://www.metaboanalyst.ca/\)](https://www.metaboanalyst.ca/)

4.3.3. Rezultati usporedbe skupina MDD i TRD dobiveni univarijatnom statističkom analizom

Za usporedbu skupina MDD i TRD prikazan je rezultat usporedbe zastupljenosti pojedinih metabolita Studentovim t-testom, odnosno prikazane su t-vrijednosti, p-vrijednosti prije korekcije za višestruko testiranje te p-vrijednosti nakon korekcije (FDR) u tablici 7. One metabolite čija zastupljenost se nije razlikovala između uspoređivanih skupina, program MetaboAnalyst 6.0 označava kao neznačajne (NS, eng. *non-significant*).

Tablica 7. Rezultati usporedbe zastupljenosti detektiranih metabolita između skupina ispitanika MDD i TRD nakon univarijatne statističke analize (Studentov t-test). U stupcu FDR crveno su podebljane p-vrijednosti koje su nakon FDR korekcije ispale statistički neznačajne (FDR>0,050), a zeleno su podebljane one koje su nakon FDR korekcije ostale statistički značajne (FDR≤0,050)

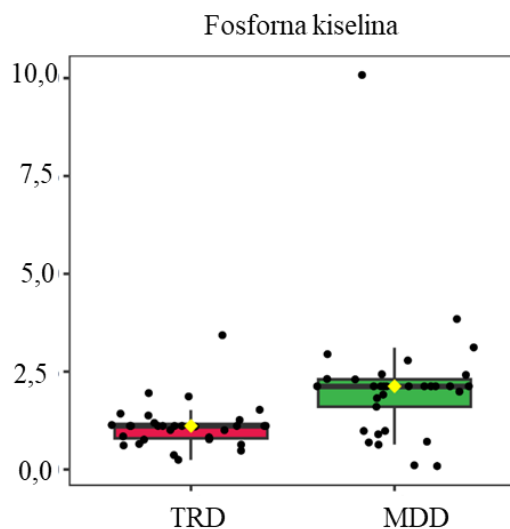
METABOLIT	MDD vs TRD		
	t	p	*FDR
1,5-Anhidroglucitol	**NS	NS	NS
2-Ketobutirična kiselina	NS	NS	NS
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	NS
5-Oksoprolin	NS	NS	NS
Acetoacetat	NS	NS	NS
Alanin	NS	NS	NS
Arahidonska kiselina	-2,811	0,007	0,122
D-Manitol	NS	NS	NS
Fenilalanin	NS	NS	NS
Fosforna kiselina	-3,420	0,001	0,041
Glicerol	NS	NS	NS
Glicin	NS	NS	NS
Glikolna kiselina	NS	NS	NS
Heksanska kiselina	NS	NS	NS
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	NS
Izoleucin	NS	NS	NS
Jantarna kiselina	NS	NS	NS
Kolesterol	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS
Linolna kiselina	-2,304	0,025	0,228

METABOLIT	MDD vs TRD		
	t	p	FDR
Manoza/Galaktoza/Glukoza	NS	NS	NS
Metil-galaktopiranozid	-2,352	0,022	0,228
Mio-inozitol	NS	NS	NS
Mliječna kiselina	NS	NS	NS
Mokraćna kiselina	NS	NS	NS
Oleinska kiselina	NS	NS	NS
Palmitinska kiselina	NS	NS	NS
Prolin	NS	NS	NS
Propanska kiselina	NS	NS	NS
Serin	NS	NS	NS
Stearinska kiselina	NS	NS	NS
Tirozin	NS	NS	NS
Treonin	NS	NS	NS
Triptofan	NS	NS	NS
Urea	NS	NS	NS
Valin	NS	NS	NS
β-D-Galaktofuranozid	NS	NS	NS

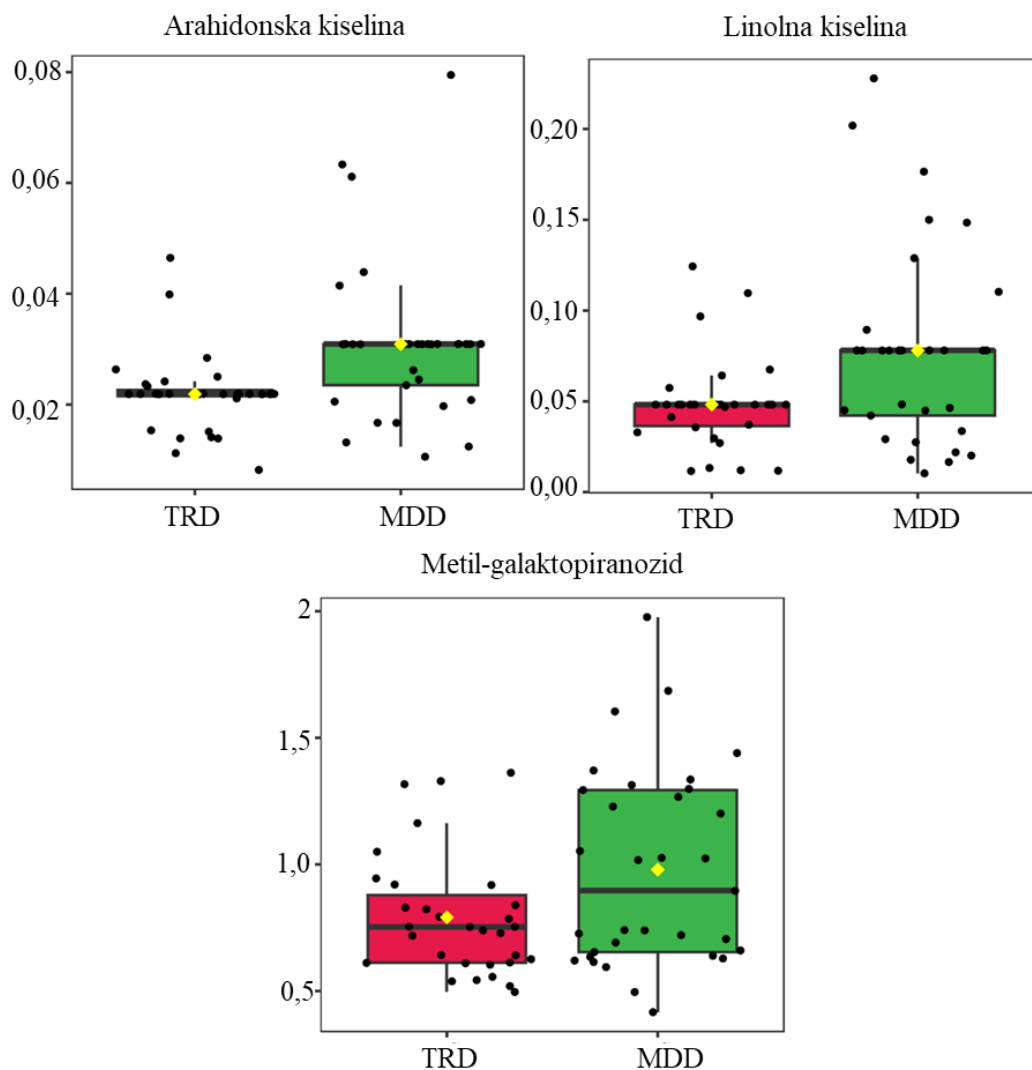
*FDR - p-vrijednost nakon korekcije za višestruko testiranje metodom FDR; **NS - statistički neznačajan rezultat

Usporedba skupina MDD i TRD rezultirala je s četiri metabolita koji su se značajno razlikovali između uspoređivanih skupina. Za navedene metabolite, nakon FDR korekcije, značajnost se izgubila, odnosno korigirana p-vrijednost bila je veća od 0,050 (Tablica 7). Jedino je fosforna kiselina ostala statistički značajno različita između uspoređivanih skupina i nakon FDR korekcije razine značajnosti (tablica 7).

Zastupljenost metabolita koji se značajno razlikovao između uspoređivanih skupina ispitanika prikazan je i pomoću dijagrama pravokutnika (kutijasti dijagram). Na ovaj način prikazana je fosforna kiselina koja je ostala statistički značajno različita između uspoređivanih skupina nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR te je prikazana na slici 14. Metaboliti koji nisu zadržali statistički značajnu p-vrijednost nakon FDR korekcije bili su arahidonska kiselina, linolna kiselina te metil-galaktopiranozid i prikazani su na slici 15.



Slika 14. Usporedba zastupljenosti fosforne kiseline između skupina MDD i TRD (prikazan je metabolit čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)



Slika 15. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se nominalno značajno razlikovali između skupina MDD i TRD (prikazani su metaboliti čija zastupljenost između ispitivanih skupina nije ostala statistički značajna nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR).

Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)

4.3.4. Rezultati usporedbe skupina MDD i MDDD dobiveni univarijatom statističkom analizom

U svrhu usporedbe dviju zavisnih skupina, korišten je t-test za zavisne uzorke te su na taj način uspoređene skupine MDD i MDDD. U tablici 8. prikazana je t-vrijednost, p-vrijednost prije korekcije za višestruko testiranje te p-vrijednost nakon korekcije (FDR). One metabolite čija zastupljenost se nije razlikovala između uspoređivanih skupina, program MetaboAnalyst 6.0 označava kao neznačajne (NS, eng. *non-significant*).

Tablica 8. Rezultati usporedbe zastupljenosti detektiranih metabolita između skupina ispitanika MDD i MDDD nakon univarijantne statističke analize (Studentov t-test). U stupcu FDR zeleno je podebljana ona p-vrijednost koja je nakon FDR korekcije ostala statistički značajna ($FDR \leq 0,050$)

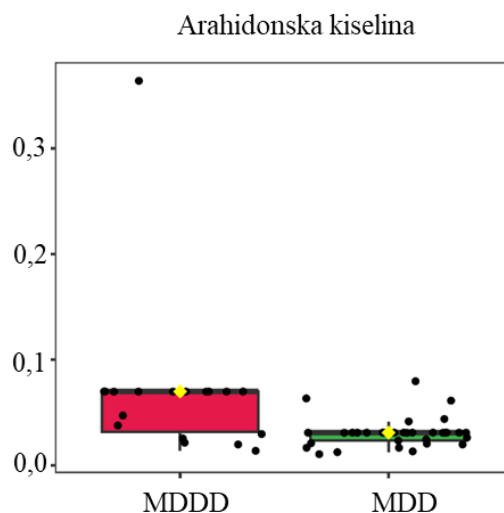
METABOLIT	MDD vs MDDD		
	t	p	*FDR
1,5-Anhidroglucitol	**NS	NS	NS
2-Ketobutirična kiselina	NS	NS	NS
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	NS
5-Oksoprolin	NS	NS	NS
Acetoacetat	NS	NS	NS
Alanin	NS	NS	NS
Arahidonska kiselina	3,445	0,001	0,044
D-Manitol	NS	NS	NS
Fenilalanin	NS	NS	NS
Fosforna kiselina	NS	NS	NS
Glicerol	NS	NS	NS
Glicin	NS	NS	NS
Glikolna kiselina	NS	NS	NS
Heksanska kiselina	NS	NS	NS
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	NS
Izoleucin	NS	NS	NS
Jantarna kiselina	NS	NS	NS
Kolesterol	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS
Linolna kiselina	NS	NS	NS

METABOLIT	MDD vs MDDD		
	t	p	FDR
Manoza/Galaktoza/Gluukoza	NS	NS	NS
Metil-galaktopiranozid	NS	NS	NS
Mio-inozitol	NS	NS	NS
Mliječna kiselina	NS	NS	NS
Mokraćna kiselina	NS	NS	NS
Oleinska kiselina	NS	NS	NS
Palmitinska kiselina	NS	NS	NS
Prolin	NS	NS	NS
Propanska kiselina	NS	NS	NS
Serin	NS	NS	NS
Stearinska kiselina	NS	NS	NS
Tirozin	NS	NS	NS
Treonin	NS	NS	NS
Triptofan	NS	NS	NS
Urea	NS	NS	NS
Valin	NS	NS	NS
β-D-Galaktofuranozid	NS	NS	NS

*FDR - p-vrijednost nakon korekcije za višestruko testiranje metodom FDR; **NS - statistički neznačajan rezultat

Usporedba skupina MDD i MDDD rezultirala je s jednim metabolitom čija se zastupljenost značajno razlikovala između uspoređivanih skupina prije ($p \leq 0,005$) te nakon FDR korekcije (tablica 8). Radi se o arahidonskoj kiselini.

Zastupljenost arahidonske kiseline koja se značajno razlikovala između uspoređivanih skupina ispitanika (MDD i MDDD) prikazana je i pomoću dijagrama pravokutnika (kutijasti dijagram) na slici 16.



Slika 16. Usporedba zastupljenosti arahidonske kiseline između skupina MDDD i MDD (prikazan je metabolit čija je zastupljenost između ispitivanih skupina ostala statistički značajna i nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR). Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)

4.3.5. Rezultati usporedbe skupina TRD i TRDDF dobiveni univarijatom statističkom analizom

U slučaju skupina TRD i TRDDF, također je korišten t-test za zavisne uzroke. Rezultati usporedbe prikazani su u tablici 9 kao t-vrijednosti, p-vrijednosti prije korekcije za višestruko testiranje te p-vrijednost nakon korekcije (FDR). One metabolite čija zastupljenost se nije razlikovala između uspoređivanih skupina, program MetaboAnalyst 6.0 označava kao neznačajne (NS, eng. *non-significant*).

Tablica 9. Rezultati usporedbe zastupljenosti detektiranih metabolita između skupina ispitanika TRD i TRDDF nakon univarijatne statističke analize (Studentov t-test). U stupcu FDR crveno su podebljane p-vrijednosti koje su nakon FDR korekcije ispale statistički neznačajne (FDR>0,050)

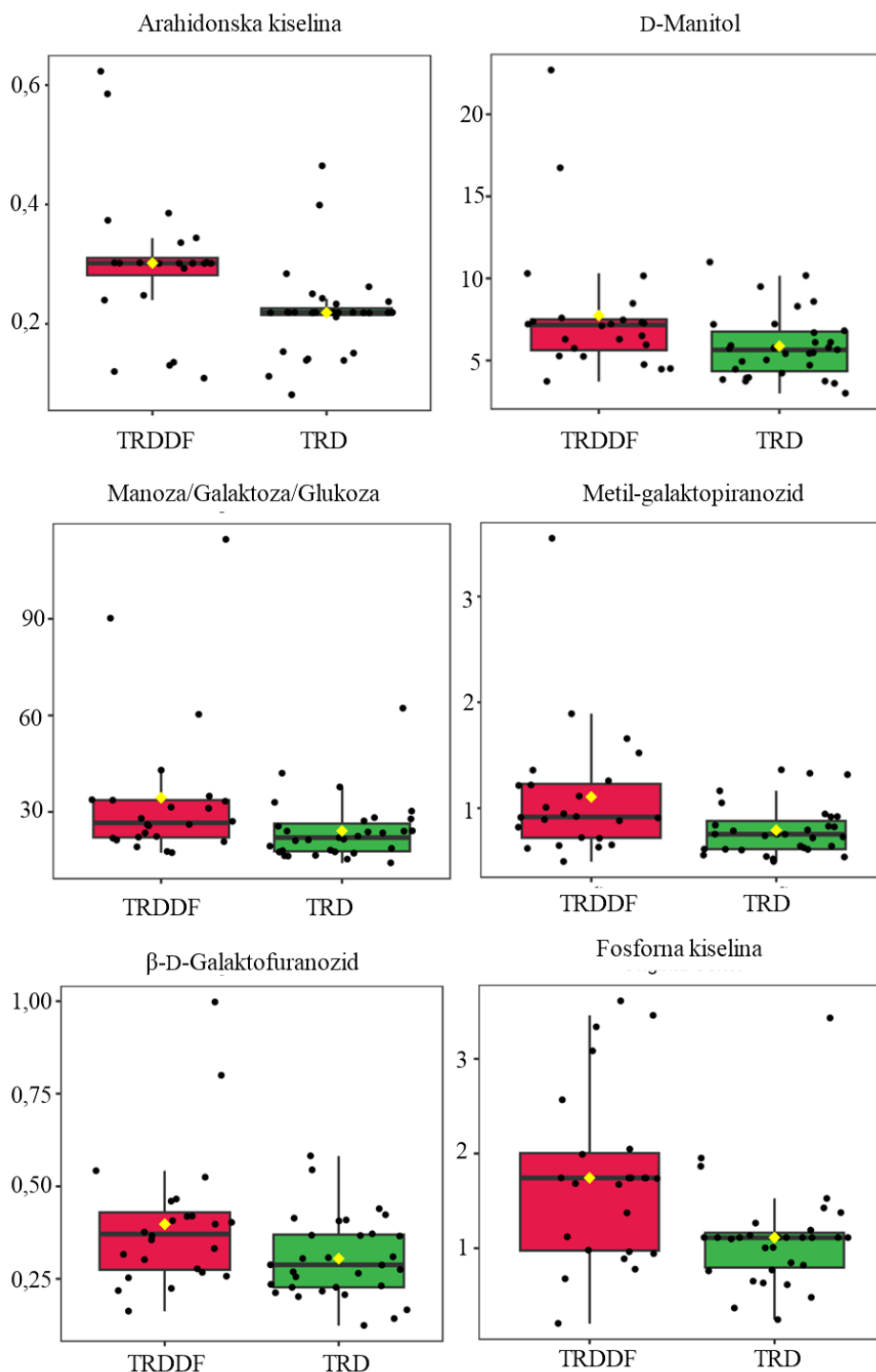
METABOLIT	TRD vs TRDDF		
	t	p	*FDR
1,5-Anhidroglucitol	**NS	NS	NS
2-Ketobutirična kiselina	NS	NS	NS
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	NS
5-Oksoprolin	NS	NS	NS
Acetoacetat	NS	NS	NS
Alanin	NS	NS	NS
Arahidonska kiselina	2,399	0,020	0,170
D-Manitol	2,106	0,040	0,247
Fenilalanin	NS	NS	NS
Fosforna kiselina	2,837	0,006	0,119
Glicerol	NS	NS	NS
Glicin	NS	NS	NS
Glikolna kiselina	NS	NS	NS
Heksanska kiselina	NS	NS	NS
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	NS
Izoleucin	NS	NS	NS
Jantarna kiselina	NS	NS	NS
Kolesterol	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS
Linolna kiselina	NS	NS	NS
Manoza/Galaktoza/Glukoza	2,541	0,014	0,170
Metil-galaktopiranozid	3,093	0,003	0,117
Mio-inozitol	NS	NS	NS
Mliječna kiselina	NS	NS	NS
Mokraćna kiselina	NS	NS	NS
Oleinska kiselina	NS	NS	NS
Palmitinska kiselina	NS	NS	NS
Prolin	NS	NS	NS
Propanska kiselina	NS	NS	NS
Serin	NS	NS	NS

METABOLIT	TRD vs TRDDF		
	t	p	FDR
Stearinska kiselina	NS	NS	NS
Tirozin	NS	NS	NS
Treonin	NS	NS	NS
Triptofan	NS	NS	NS
Urea	NS	NS	NS
Valin	NS	NS	NS
β -D-Galaktofuranozid	2,342	0,023	0,170

*FDR - p-vrijednost nakon korekcije za višestruko testiranje metodom FDR; **NS – statistički neznačajan rezultat

Kod usporedbe skupina TRD i TRDDF, prije korekcije p-vrijednosti metodom FDR, detektirana je značajno različita zastupljenost ukupno šest metabolita ($p \leq 0,005$); arahidonske kiseline, D-manitola, fosforne kiseline, aldoheksoza (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozida i β -D-galaktofuranozida. Nakon korekcije metodom FDR statistička značajna razlika između ispitivanih skupina nije zadržana ni za jedan od šest navedenih metabolita (tablica 9).

Zastupljenost metabolita koji su se nominalno značajno razlikovali između uspoređivanih skupina ispitanika prije FDR korekcije prikazana je i pomoću dijagrama pravokutnika (kutijasti dijagram) na slici 17.



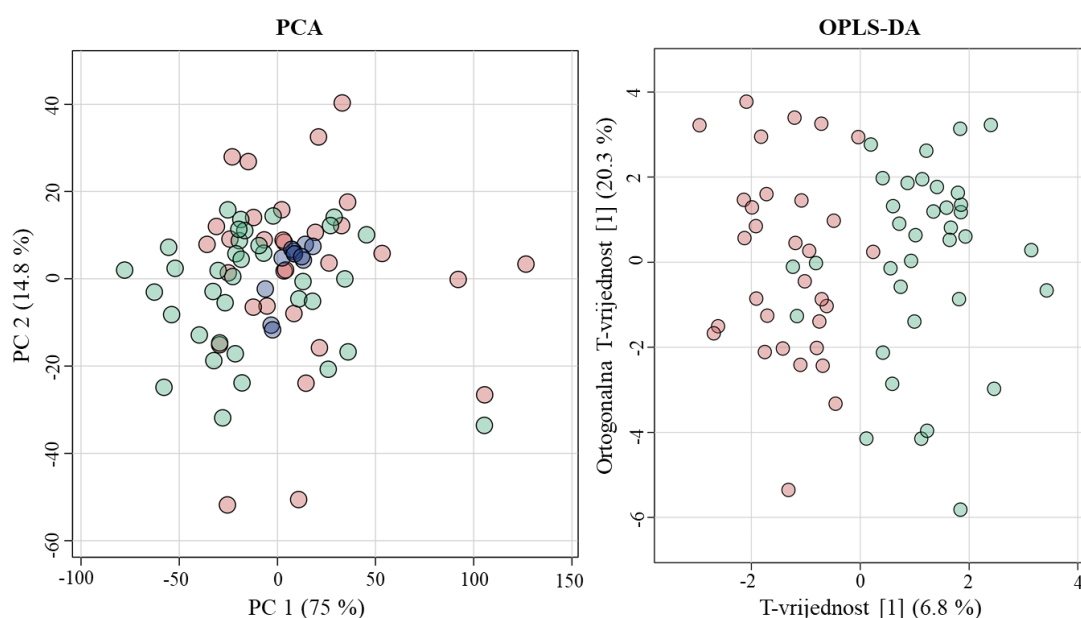
Slika 17. Usporedba zastupljenosti metabolita koji su se nominalno značajno razlikovali između skupina TRD i TRDDF (prikazani su metaboliti čija zastupljenost između ispitivanih skupina nije ostala statistički značajna nakon korekcije razine značajnosti metodom FDR).

Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)

4.3.6. Rezultati usporedbe skupina CTRL i MDD dobiveni multivarijatom statističkom analizom

PCA dijagram za skupine ispitanika CTRL i MDD pokazao je nejasnu distribuciju između osoba s dijagnozom MDD-a (prva epizoda depresije) i zdravih kontrolnih pojedinaca te zadovoljavajuće grupiranje uzoraka kontrole kvalitete (QC) (slika 18). Međutim, nadzirani OPLS-DA model (slika 18) pokazao je puno jasnije definirano razdvajanje između dvaju skupina ispitanika.



Slika 18. PCA (lijevo) i OPLS-DA (desno) grafički prikazi za usporedbu skupina CTRL (zeleni kružići) i MDD (crveni kružići). QC prikazani plavim kružićima. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶

(<https://www.metaboanalyst.ca/>)

Rezultati usporedbe skupina CTRL i MDD uz korištenje multivarijatne statističke analize, odnosno metode OPLS-DA prikazani su u tablici 10. Analiza OPLS-DA omogućava identifikaciju onih metabolita koji su odgovorni za klasifikaciju analiziranih skupina ispitanika. Važnost svakog pojedinog metabolita u razdvajanju uspoređivanih skupina ispitanika procijenjena je pomoću vrijednosti VIP na način da metaboliti kojima je dodijeljena vrijednost

VIP \geq 1 smatraju se onima koji značajno doprinose razdvajanju uspoređivanih skupina ispitanika, dok oni s manjom vrijednošću VIP imaju manji doprinos. Pri usporedbi skupina CTRL i MDD petnaest metabolita imalo je vrijednost VIP \geq 1 (tablica 10). Značajni metaboliti, odnosno metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan su 1,5-anhidroglucitol, 2-ketobutirična kiselina, acetoacetat, alanin, arahidonska kiselina, D-manitol, glicin, heksanska kiselina, hidroksiizomaslačna kiselina, jantarna kiselina, kolesterol, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), mokraćna kiselina, prolin i urea. U odnosu na kontrolnu skupinu, metaboliti koji su pokazali smanjenu zastupljenost u skupini MDD su svi metaboliti s vrijednošću VIP većom ili jednakom jedan osim alanina, heksanske i jantarne kiseline, aldoheksoza, prolina te uree.

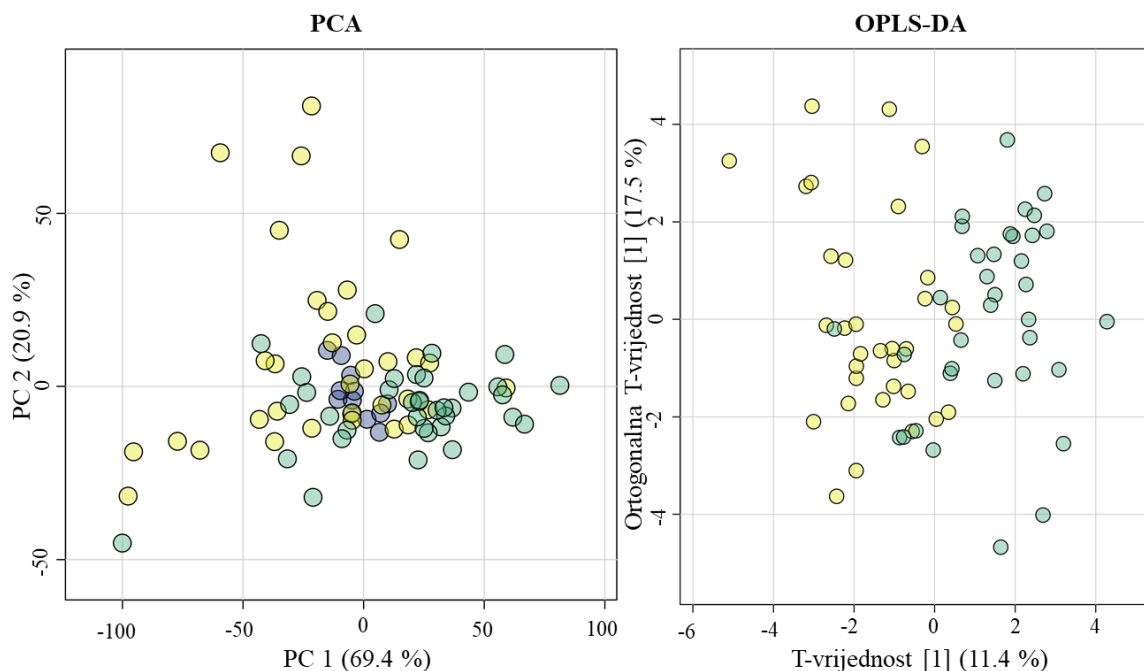
Tablica 10. Usporedba skupina CTRL i MDD: prikaz vrijednosti VIP dobivenih metodom OPLS-DA te vrijednosti postotka promjene (% Δ) za sve analizirane metabolite. Metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina (VIP \geq 1) označeni su zeleno, a njihove su vrijednosti VIP zelene i podebljane

METABOLIT	CTRL vs MDD	
	VIP	% Δ
1,5-Anhidroglucitol	1,31	-4,72
2-Ketobutirična kiselina	1,24	-158,67
3-Hidroksibutirična kiselina	0,48	-59,10
5-Oksoprolin	0,01	-17,12
Acetoacetat	1,28	-12,24
Alanin	1,08	10,95
Arahidonska kiselina	1,88	-99,45
D-Manitol	1,07	-4,82
Fenilalanin	0,89	-11,55
Fosforna kiselina	0,34	21,93
Glicerol	0,77	-1,32
Glicin	1,25	-56,13
Glikolna kiselina	0,05	-91,10
Heksanska kiselina	1,68	6,35
Hidroksiizomaslačna kiselina	1,27	-22,33
Izoleucin	0,50	-25,47
Jantarna kiselina	1,79	1,73
Kolesterol	1,28	-103,19
Leucin	0,58	-22,88

METABOLIT	CTRL vs MDD	
	VIP	% Δ
Linolna kiselina	0,64	0,29
Manoza/Galaktoza/Gluukoza	1,24	6,65
Metil-galaktopiranozid	0,85	3,86
Mio-inozitol	0,26	-24,16
Mliječna kiselina	0,28	-77,33
Mokraćna kiselina	2,16	-177,78
Oleinska kiselina	0,18	15,03
Palmitinska kiselina	0,20	-15,68
Prolin	1,32	10,28
Propanska kiselina	0,05	-60,29
Serin	0,25	-27,64
Stearinska kiselina	0,28	-3,74
Tirozin	0,02	-47,69
Treonin	0,27	-35,30
Triptofan	0,68	-30,05
Urea	1,68	6,35
Valin	0,49	-11,48
β -D-Galaktofuranozid	0,25	-10,81

4.3.7. Rezultati usporedbe skupina CTRL i TRD dobiveni multivarijantnom statističkom analizom

PCA dijagram za skupine ispitanika CTRL i TRD pokazao je nejasnu distribuciju između osoba s dijagnozom TRD-a (depresija otporna na liječenje) i zdravih kontrolnih pojedinaca te zadovoljavajuće grupiranje uzoraka QC (slika 19). No, nadzirani OPLS-DA model (slika 19) pokazao je puno jasnije definirano razdvajanje između dvaju skupina ispitanika.



Slika 19. PCA (lijevo) i OPLS-DA (desno) grafički prikazi za skupine CTRL (zeleni kružići) i TRD (žuti kružići). QC prikazani plavim kružićima. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)

Rezultati usporedbe skupina CTRL i TRD uz korištenje multivarijatne statističke analize, odnosno metode OPLS-DA prikazani su u tablici 11. Metaboliti s vrijednostima VIP koje su veće ili jednake jedan smatraju se metabolitima koji značajno doprinose razlici između skupina CTRL i TRD (tablica 11). Značajni metaboliti, odnosno metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan su acetoacetat, D-manitol, fosforna kiselina, glicerol, heksanska kiselina, jantarna kiselina, linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, mliječna, mokraćna, oleinska, palmitinska, stearinska kiselina i urea. Metaboliti s vrijednošću VIP većom ili jednakom jedan čija je zastupljenost povećana u odnosu na kontrolnu skupinu bile su heksanska i jantarna kiselina te urea. Zastupljenosti svih ostalih metabolita s vrijednošću VIP većom ili jednakom jedan bile su smanjene u skupini TRD.

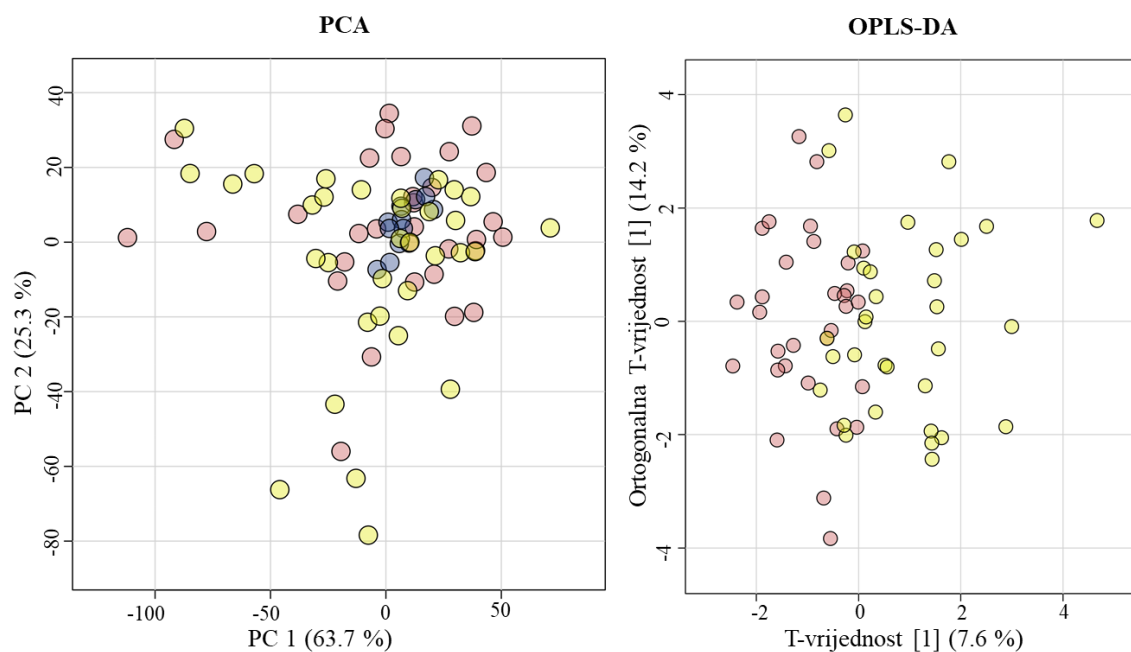
Tablica 11. Usporedba skupina CTRL i TRD: prikaz vrijednosti VIP dobivenih metodom OPLS-DA te vrijednosti postotka promjene (% Δ) za sve analizirane metabolite. Metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina ($VIP \geq 1$) označeni su zeleno, a njihove su vrijednosti VIP zelene i podebljane

METABOLIT	CTRL vs TRD	
	VIP	% Δ
1,5-Anhidroglucitol	0,39	-2,23
2-Ketobutirična kiselina	0,74	-56,89
3-Hidroksibutirična kiselina	0,49	-42,31
5-Oksoprolin	0,21	-19,26
Acetoacetat	1,01	-23,51
Alanin	0,40	-4,32
Arahidonska kiselina	0,85	-64,45
D-Manitol	1,82	-10,68
Fenilalanin	0,12	-6,56
Fosforna kiselina	1,10	-32,98
Glicerol	1,20	-10,42
Glicin	0,13	-58,25
Glikolna kiselina	1,02	-38,43
Heksanska kiselina	1,62	11,23
Hidroksiizomaslačna kiselina	0,14	-27,67
Izoleucin	0,27	-21,49
Jantarna kiselina	1,69	0,48
Kolesterol	0,22	-50,24
Leucin	0,36	-17,58
Linolna kiselina	1,23	-38,01
Manoza/Galaktoza/Glukoza	2,02	-9,90
Metil-galaktopiranozid	1,82	-12,58
Mio-inozitol	0,64	-26,16
Mliječna kiselina	1,18	-41,78
Mokraćna kiselina	1,27	-67,05
Oleinska kiselina	1,31	-21,41
Palmitinska kiselina	1,25	-36,57
Prolin	0,48	4,56
Propanska kiselina	0,85	-29,70
Serin	0,12	-20,15
Stearinska kiselina	1,29	-27,51

METABOLIT	CTRL vs TRD	
	VIP	% Δ
Tirozin	0,22	-32,39
Treonin	0,23	-20,53
Triptofan	0,26	-12,66
Urea	1,62	11,23
Valin	0,44	-12,42
β -D-Galaktofuranozid	0,42	-13,82

4.3.8. Rezultati usporedbe skupina MDD i TRD dobiveni multivarijatom statističkom analizom

PCA dijagram za skupine ispitanika MDD i TRD pokazao je nejasnu distribuciju između osoba s dijagnozom TRD-a (depresija otporna na liječenje) i osoba s dijagnozom MDD-a (prva epizoda depresije) te zadovoljavajuće grupiranje uzoraka QC (slika 20). Međutim, nadzirani OPLS-DA model (slika 20) pokazao je puno jasnije definirano razdvajanje između dvaju skupina ispitanika.



Slika 20. PCA (lijevo) i OPLS-DA (desno) grafovi za skupine **MDD** (crveni kružići) i **TRD** (žuti kružići). **QC** prikazani plavim kružićima. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)

Rezultati usporedbe skupina MDD i TRD uz korištenje multivarijatne statističke analize, odnosno metode OPLS-DA prikazani su u tablici 12. Pri usporedbi skupina MDD i TRD jedanaest metabolita je imalo vrijednost $VIP \geq 1$ (tablica 12). Značajni metaboliti, odnosno metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan su 3-hidroksibutirična kiselina, arahidonska kiselina, fenilalanin, fosforna kiselina, hidroksiizomaslačna kiselina, linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina. Fenilalanin jedini je metabolit s vrijednošću VIP većom od jedan čija je zastupljenost povećana u skupini ispitanika s depresijom otpornom na liječenje u odnosu na ispitanike s prvom epizodom depresije.

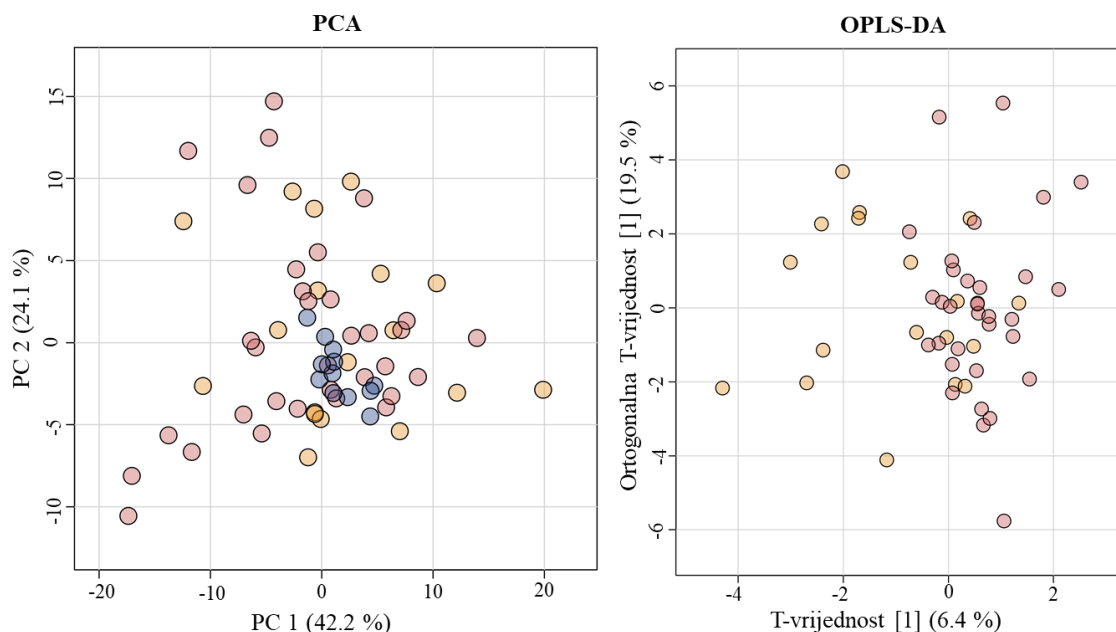
Tablica 12. Usporedba skupina MDD i TRD: prikaz vrijednosti VIP dobivenih metodom OPLS-DA te vrijednosti postotka promjene ($\% \Delta$) za sve analizirane metabolite. Metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina ($VIP \geq 1$) označeni su zeleno, a njihove su vrijednosti VIP zelene i podebljane

METABOLIT	MDD vs TRD	
	VIP	$\% \Delta$
1,5-Anhidroglucitol	0,63	2,38
2-Ketobutirična kiselina	0,11	11,52
3-Hidroksibutirična kiselina	1,26	-8,22
5-Oksoprolin	0,09	-5,43
Acetoacetat	0,41	-14,15
Alanin	0,37	-14,80
Arahidonska kiselina	1,90	-29,09
D-Manitol	0,83	-6,38
Fenilalanin	1,33	4,24
Fosforna kiselina	1,35	-47,67
Glicerol	0,95	-9,24
Glicin	0,78	-34,81
Glikolna kiselina	0,57	17,67
Heksanska kiselina	0,25	4,16
Hidroksiizomaslačna kiselina	1,52	-11,52
Izoleucin	0,96	-1,50
Jantarna kiselina	0,35	-1,26
Kolesterol	0,31	1,11
Leucin	0,98	1,28

METABOLIT	MDD vs TRD	
	VIP	% Δ
Linolna kiselina	1,86	-38,19
Manoza/Galaktoza/Glukoza	1,16	-15,88
Metil-galaktopiranozid	1,81	-15,96
Mio-inozitol	0,65	-8,32
Mliječna kiselina	0,56	3,25
Mokraćna kiselina	0,18	-8,48
Oleinska kiselina	1,85	-33,22
Palmitinska kiselina	1,73	-26,62
Prolin	0,31	-6,19
Propanska kiselina	0,52	12,68
Serin	0,63	1,91
Stearinska kiselina	1,70	-24,80
Tirozin	0,50	-0,15
Treonin	1,00	7,53
Triptofan	0,39	13,58
Urea	0,25	4,16
Valin	0,05	-2,36
β -D-Galaktofuranozid	0,30	-4,50

4.3.9. Rezultati usporedbe skupina MDD i MDDD dobiveni multivarijatom statističkom analizom

PCA dijagram za skupine ispitanika MDD i MDDD pokazao je nejasnu distribuciju između osoba s dijagnozom MDD-a (prva epizoda depresije) prije i nakon 8 tjedana liječenja duloksetinom te zadovoljavajuće grupiranje uzoraka QC (slika 21). No, nadzirani OPLS-DA model (slika 21) pokazao je puno jasnije definirano razdvajanje između dvaju skupina ispitanika.



Slika 21. PCA (lijevo) i OPLS-DA (desno) grafovi za skupine MDD (crveni kružići) i MDDD (narančasti kružići). QC prikazani plavim kružićima. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)

Rezultati usporedbe skupina MDD i MDDD uz korištenje multivarijatne statističke analize, odnosno metode OPLS-DA prikazani su u tablici 13. Metaboliti s vrijednostima VIP većima od jedan su oni metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina MDD i MDDD i takvih metabolita ima trinaest. Značajni metaboliti, odnosno metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan su arahidonska kiselina, glicerol, heksanska kiselina, hidroksiizomaslačna kiselina, jantarna kiselina, kolesterol, mio-inozitol, oleinska kiselina, propanska kiselina, stearinska kiselina, tirozin, urea i β -D-galaktofuranozid. Po pitanju promjene u zastupljenosti između navedenih skupina, metaboliti s vrijednošću VIP većom ili jednakom jedan koji su više zastupljeni u skupini MDDD u odnosu na skupinu MDD su arahidonska kiselina, mio-inozitol, kolesterol i β -D-galaktofuranozid. Ostali su metaboliti sa statističkom značajnošću manje zastupljeni u skupini MDDD u odnosu na MDD.

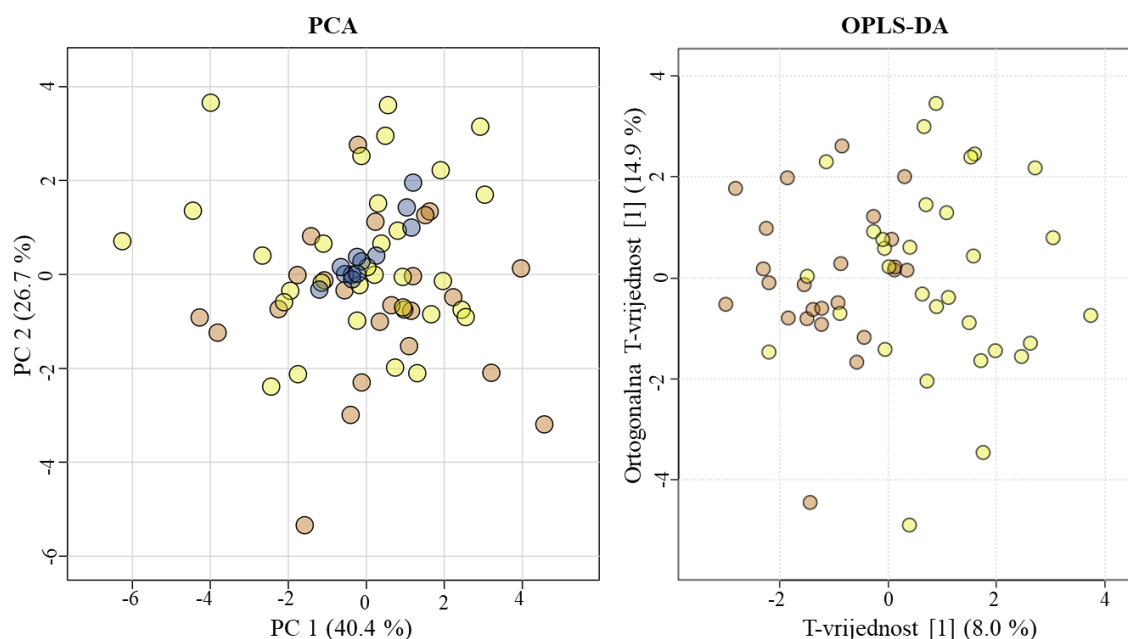
Tablica 13. Usporedba skupina MDD i MDDD: prikaz vrijednosti VIP dobivenih metodom OPLS-DA te vrijednosti postotka promjene ($\% \Delta$) za sve analizirane metabolite. Metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina ($VIP \geq 1$) označeni su narančasto, a njihove su vrijednosti VIP zelene i podebljane

METABOLIT	MDD vs MDDD	
	VIP	$\% \Delta$
1,5-Anhidroglucitol	0,47	-7,15
2-Ketobutirična kiselina	0,47	8,82
3-Hidroksibutirična kiselina	0,83	-0,02
5-Oksoprolin	0,05	-5,30
Acetoacetat	0,98	30,16
Alanin	0,52	-8,45
Arahidonska kiselina	1,76	126,17
D-Manitol	0,50	4,74
Fenilalanin	0,35	6,22
Fosforna kiselina	0,04	10,65
Glicerol	1,98	-29,31
Glicin	0,11	22,13
Glikolna kiselina	0,67	36,55
Heksanska kiselina	1,76	-3,28
Hidroksiizomaslačna kiselina	1,22	-24,01
Izoleucin	0,59	6,05
Jantarna kiselina	1,77	-12,00
Kolesterol	1,01	4,58
Leucin	0,58	7,08
Linolna kiselina	0,92	-29,65
Manoza/Galaktoza/Glukoza	0,67	-3,74
Metil-galaktopiranozid	0,81	-11,52
Mio-inozitol	1,11	7,30
Mliječna kiselina	0,65	9,25
Mokraćna kiselina	0,55	-10,66
Oleinska kiselina	1,27	-39,17
Palmitinska kiselina	0,99	-1,73
Prolin	0,94	-21,71
Propanska kiselina	1,07	-3,96
Serin	0,77	-2,98
Stearinska kiselina	1,14	-19,14
Tirozin	1,19	-5,27
Treonin	0,12	14,12

METABOLIT	MDD vs MDDD	
	VIP	% Δ
Triptofan	0,18	7,38
Urea	1,76	-3,28
Valin	0,93	3,04
β -D-Galaktofuranozid	1,24	21,14

4.3.10. Rezultati usporedbe skupina TRD i TRDDF dobiveni multivarijatom statističkom analizom

PCA dijagram za skupine ispitanika TRD i TRDDF pokazao je nejasnu distribuciju između osoba s dijagnozom TRD-a (depresija otporna na liječenje) prije i nakon 8 tjedana liječenja duloksetinom i fototerapijom te zadovoljavajuće grupiranje uzoraka QC (slika 22). Međutim, nadzirani OPLS-DA model (slika 22) pokazao je puno jasnije definirano razdvajanje između dvaju skupina ispitanika.



Slika 22. PCA (lijevo) i OPLS-DA (desno) grafovi za skupine TRD (žuti kružići) i TRDDF (crveni kružići). QC prikazani plavim kružićima. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u programu MetaboAnalyst 6.0⁴⁶ (<https://www.metaboanalyst.ca/>)

Rezultati usporedbe skupina TRD i TRDDF uz korištenje multivarijatne statističke analize, odnosno metode OPLS-DA prikazani su u tablici 14. Metaboliti s vrijednostima VIP većima od jedan su oni metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina TRD i TRDDF i takvih metabolita ima četrnaest. Značajni metaboliti, odnosno metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan su 5-oksoprolin, arahidonska kiselina, D-manitol, fosforna kiselina, glicin, glikolna kiselina, linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, mliječna i mokraćna kiselina, tirozin, triptofan i β -D-galaktofuranozid. Što se tiče promjena u zastupljenosti navedenih metabolita s vrijednošću VIP većom ili jednakom jedan, zastupljenosti linolne kiseline, tirozina i triptofana su smanjene kod ispitanika skupine TRDDF u odnosu na skupinu TRD. Zastupljenost ostalih značajnih metabolita povećana je u skupini TRDDF.

Tablica 14. Usporedba skupina TRD i TRDDF: prikaz vrijednosti VIP dobivenih metodom OPLS-DA te vrijednosti postotka promjene (% Δ) za sve analizirane metabolite. Metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju skupina ($VIP \geq 1$) označeni su plavo, a njihove su vrijednosti VIP zelene i podebljane.

METABOLIT	TRD vs TRDDF	
	VIP	% Δ
1,5-Anhidroglucitol	0,22	2,76
2-Ketobutirična kiselina	0,31	38,87
3-Hidroksibutirična kiselina	0,91	12,22
5-Oksoprolin	1,15	9,69
Acetoacetat	0,95	-22,06
Alanin	0,50	-4,39
Arahidonska kiselina	1,22	37,85
D-Manitol	1,82	26,67
Fenilalanin	0,29	6,51
Fosforna kiselina	1,85	56,38
Glicerol	0,09	9,95
Glicin	1,12	73,38
Glikolna kiselina	1,41	6,14
Heksanska kiselina	0,79	-8,41
Hidroksiizomaslačna kiselina	0,01	-2,11
Izoleucin	0,24	0,75

METABOLIT	TRD vs TRDDF	
	VIP	%Δ
Jantarna kiselina	0,12	3,29
Kolesterol	0,59	8,95
Leucin	0,39	1,44
Linolna kiselina	1,21	-12,41
Manoza/Galaktoza/Gluukoza	1,93	20,89
Metil-galaktopiranozid	1,52	21,78
Mio-inozitol	0,54	5,26
Mliječna kiselina	1,52	7,02
Mokraćna kiselina	1,23	2,63
Oleinska kiselina	0,63	-28,46
Palmitinska kiselina	0,65	5,82
Prolin	0,25	-13,98
Propanska kiselina	0,87	1,18
Serin	0,09	-0,87
Stearinska kiselina	0,47	4,98
Tirozin	1,31	-3,17
Treonin	0,90	-23,12
Triptofan	1,23	-11,00
Urea	0,79	-8,41
Valin	0,04	0,10
β-D-Galaktofuranozid	1,63	29,29

4.4. Sumarni rezultati univarijatne i multivarijate statističke obrade podataka dobivenih neciljanom GC-MS-metabolomskom analizom

Kombinacijom rezultata univarijatne i multivarijate statističke obrade podataka dobivenih neciljanom GC-MS-metabolomskom analizom na uzorcima plazme ispitanika s dijagnozom MDD-a (prva epizoda depresije i TRD), prije i poslije 8 tjedana odgovarajuće terapije (duloksetin i fototerapija), te zdravih kontrolnih ispitanika, dobiveni su metaboliti čija se zastupljenost značajno razlikovala između ispitivanih skupina ispitanika te su prikazani u tablici 15.

Tablica 15. Metaboliti koji su kombinacijom statistički značajnih rezultata univarijatne i multivarijatne statistike zadržali značaj promjene u zastupljenosti u uzorku, njihove FDR i vrijednosti VIP te vrijednosti postotka promjene (% Δ) u zastupljenosti u skupini (crvenom bojom označeno smanjenje u zastupljenosti, a zelenom povećanje)

	Univarijanta statistička analiza	Multivarijanta statistička analiza	
CTRL vs MDD	FDR	VIP	%Δ
D-Manitol	0,006	1,07	-4,82
Heksanska kiselina	0,006	1,68	6,35
Jantarna kiselina	0,006	1,79	1,73
Manoza/Galaktoza/Glukoza	0,002	1,24	6,65
Mokraćna kiselina	0,027	2,16	-177,78
Urea	0,006	1,68	6,35
CTRL vs TRD	FDR	VIP	%Δ
Heksanska kiselina	0,047	1,62	11,23
Jantarna kiselina	0,026	1,69	0,48
Manoza/Galaktoza/Glukoza	0,050	2,02	-9,90
Mokraćna kiselina	0,047	1,27	-67,05
Urea	0,047	1,62	11,23
MDD vs TRD	FDR	VIP	%Δ
Fosforna kiselina	0,041	1,35	-47,67
MDD vs MDDD	FDR	VIP	%Δ
Arahidonska kiselina	0,044	1,76	126,17
TRD vs TRDDF	FDR	VIP	%Δ
/	/	/	/

Kombinirani rezultati univarijatne i multivarijatne statističke analize istaknuli su važnost osam metabolita (tablica 15) među kojima je i D-manitol, šećerni alkohol koji je prisutan u ljudskom organizmu, a sintetiziraju ga bakterije, gljive te različite biljke. Najčešće se javlja u niskim koncentracijama te se, zbog svoje minimalne metabolizacije u ljudskom organizmu, D-manitol brzo izlučuje putem bubrega što ga čini korisnim sredstvom za poticanje diureze i za olakšavanje izlučivanja toksičnih tvari.⁴⁸ Zanimljivo je i da se mjerenje razine manitola koristi kao jedan od markera propusnosti crijeva, a u zadnje se vrijeme jako puno govori o važnosti dvosmjerne komunikacije između crijeva i mozga te njezine uloge u nastanku psihijatrijskih poremećaja.⁴⁹ U našem istraživanju, detektirana je značajno promijenjena zastupljenost D-manitola između skupina CTRL i MDD na način da je njegova zastupljenost smanjena u skupini MDD u odnosu na CTRL što je prikazano u tablici 15. S druge strane, recentna istraživanja

indikiraju povišene razine manitola kod pacijenata koji boluju od MDD-a. Ova činjenica implicira povezanost između razina D-manitola i MDD-a, međutim potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdila pozadina.⁵⁰

Nadalje, heksanska kiselina, također poznata kao i kapronska kiselina, često se javlja u ljudskim tjelesnim tekućinama i tkivima, uključujući i urin.⁵¹ Heksanska je kiselina kratkolančana masna kiselina i glavni je metabolit koji nastaje u debelom crijevu putem anaerobne fermentacije neprobavljivih polisaharida. Kratkolančane masne kiseline mogu prijeći krvno-moždanu barijeru i pronađene su u ljudskom cerebrospinalnom likvoru. Također se pretpostavlja da kratkolančane masne kiseline pozitivno utječu na emocije, kogniciju i patofiziologiju neuroloških poremećaja, uključujući inhibiciju poremećaja nalik depresiji. Jedna je studija pokazala da su razine heksanske kiseline smanjene u urinu starijih osoba s MDD-om i/ili agorafobijom, što sugerira da bi kod tih osoba proizvodnja heksanske kiseline putem crijevne mikrobiote mogla biti smanjena i/ili da je smanjena razina heksanske kiseline kod takvih osoba potencijalno povezana s razvojem depresije.⁵² Kombinacija značajnih rezultata univarijatne i multivarijatne statistike pokazala je da je razina heksanske kiseline značajno promijenjena između skupine CTRL i MDD te skupina CTRL i TRD. U oba slučaja, detektirana je povećana razina zastupljenosti heksanske kiseline kod osoba s prvom epizodom depresije ili s depresijom otpornom na liječenje antidepressivima u odnosu na zdrave kontrole (tablica 15) što nije u skladu s dosadašnjim literaturnim podacima.⁵²

Sljedeći metabolit čija je zastupljenost bila značajno različita kod usporedbe skupina CTRL i MDD te CTRL i TRD je jantarna kiselina. Jantarna kiselina, ključni intermedijer u ciklusu limunske kiseline, sudjeluje u proizvodnji energije u mitohondrijima, a poremećaji u mitohondrijskoj funkciji prepoznati su kao potencijalni čimbenik u patofiziologiji depresije.⁵³ Istraživanja derivata jantarne kiseline pokazala su da ovaj metabolit ima akutne antidepressivne učinke u eksperimentalnim uvjetima te stimulira oporavak živčanog sustava i jača imunološki sustav.⁵³ Uspoređujući skupine CTRL i MDD te CTRL i TRD detektirana je povećana razina zastupljenosti jantarne kiseline kod osoba s prvom epizodom depresije i kod osoba s depresijom otpornom na liječenje u odnosu na zdrave kontrole što je prikazano u tablici 15. S druge strane, u urinu mišjeg modela depresije detektirana je smanjena razina jantarne kiseline u odnosu na kontrolne životinje, što upućuje na prepreku u sustavu opskrbe energijom kod miševa sa simptomima depresije.⁵⁴

Aldoheksoze, uključujući glukozu, manozu i galaktozu, monosaharidi su sa šest ugljikovih atoma koji su široko prisutni u ljudskoj fiziologiji. Ovi šećeri igraju ključnu ulogu u energetske metabolizmu i staničnim funkcijama. Koristeći metodu GC-MS i dostupne knjižnice za identifikaciju metabolita, nije moguće točno identificirati o kojoj se aldoheksozi radi budući da su to diastereomeri, odnosno građeni su od iste vrste i istog broja atoma zbog čega ih je nemoguće razlikovati. Glukoza je primarni izvor energije za stanice tijela. Njena je razina u krvi strogo regulirana, a odstupanja mogu dovesti do stanja poput dijabetesa. Ona je također prekursor za sintezu drugih aldoheksoza, uključujući manozu i galaktozu. Manozu je manje zastupljena od glukoze, ali je ključna za procese glikozilacije, gdje doprinosi pravilnom smatanju i stabilnosti glikoproteina. Poremećen metabolizam manoze povezan je s depresijom.⁷ Povećane razine GDP-manoza-pirofosforilaze B, ključnog enzima u metabolizmu manoze, detektirane su u prefrontalnom korteksu osoba s depresijom, što je popraćeno i višim razinama manoze u plazmi. Zanimljivo je da je primjena vitamina B12 normalizirala razinu GDP-manoza-pirofosforilaze B i razinu manoze u plazmi, što sugerira potencijalni terapijski učinak.⁵⁵ U ovom istraživanju, zastupljenost aldoheksoza također je značajno različita kod skupina CTRL i MDD te kod skupina CTRL i TRD (tablica 15). U slučaju osoba s MDD-om, detektirana je povećana zastupljenost aldoheksoza u odnosu na kontrolne ispitanike, a u slučaju osoba s TRD-om, detektirana je smanjena zastupljenost.

Sljedeći metabolit čija se razina kod skupine CTRL značajno razlikovala od razine detektirane kod skupina ispitanika s dijagnozom depresije (skupine MDD i TRD) je mokraćna kiselina. Mokraćna kiselina djeluje kao snažan antioksidans i kontinuirano se troši u borbi protiv oksidativnog stresa.⁵⁶ Smatra se da njezina povezanost sa simptomima depresije proizlazi iz negativnih učinaka oksidativnog stresa, uključujući povećano oštećenje stanica i smanjenje razine antioksidansa. To može dovesti do poremećaja moždanih funkcija i nepravilnosti u neuronskoj signalizaciji, što doprinosi razvoju depresije.⁵⁶ Naše je istraživanje pokazalo da su razine mokraćne kiseline smanjene kod ispitanika s dijagnozom depresije (skupine MDD i TRD) u odnosu na kontrolne ispitanike (skupina CTRL), što je prikazano u tablici 15.

Zastupljenost uree također je bila značajno različita kod skupine CTRL u odnosu na skupine ispitanika MDD i TRD. Urea (karbamid) organski je spoj koji je glavni krajnji produkt metabolizma dušikovih spojeva te nastaje u jetri tijekom ciklusa uree. Rezultati nedavnih studija sugeriraju da kronična upala ima ključnu ulogu u induciranju neuroinflamacije i depresije, što je već potvrđeno i kod mnogih drugih kroničnih bolesti (poput kardiovaskularnih

bolesti, ateroskleroze, kronične bubrežne bolesti i raka), kao i u fiziologiji staničnog starenja.⁵⁷ Slično tome, markeri upale i oksidativnog stresa značajno su i pozitivno povezani s prisutnošću depresije. Osim toga, recentna istraživanja sugeriraju povezanost depresije i oštećenja sinaptičke plastičnosti uzrokovanih karbamilacijom. Trenutno razumijevanje sugerira da narušeni metabolizam uree, zajedno s oksidativnim i upalnim odgovorima u mozgu, može igrati značajnu ulogu u razvoju i trajnosti simptoma depresije.⁵⁷ Slično heksanskoj kiselini, također je detektirana povećana razina uree u skupinama MDD i TRD u odnosu na CTRL.

Fosforna kiselina mineralna je kiselina koja u biološkim sustavima disocira u fosfatne ione. Fosfati su ključni za različite fiziološke procese, uključujući proizvodnju energije, mineralizaciju kostiju i staničnu signalizaciju. U istraživanju gdje je mjerena razina anorganskog fosfata u serumu kod 33 hospitalizirana pacijenta s MDD-om rezultati su pokazali značajnu korelaciju između razine fosfata u serumu i anksioznih simptoma. Navedeno sugerira da niže razine fosfata mogu biti povezane s jakim intenzitetom anksioznosti kod MDD-a.⁵⁸ Osim navedenog, istraživanje u kojem je korištena magnetska rezonancijska spektroskopija fosfora pokazalo je da su razine fosfokreatina značajno smanjene kod teško depresivnih bolesnika u usporedbi s onima s blažim simptomima depresije.⁵⁹ Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je razina fosforne kiseline kod osoba s prvom epizodom depresije (skupina MDD) značajno viša nego kod zdravih ispitanika (univarijatna statistička analiza). Razina ovog metabolita značajno pada kod ispitanika s depresijom rezistentnom na terapiju (skupina TRD) u odnosu na ispitanike s prvom epizodom depresije (tablica 15). Zbog navedenog, fosforna se kiselina ističe kao potencijalni marker za razlikovanje depresije otporne na terapiju od depresije koja dobro odgovara na liječenje antidepresivima. Ovaj je rezultat od osobitog značaja budući da se u oba slučaja radi o ispitanicima s MDD-om, a samu razliku čini intenzitet simptoma, dugotrajnost poremećaja te mogućnost liječenja antidepresivima.

Kod istraživanja utjecaja duloksetina na metabolički profil osoba s dijagnozom depresije, usporedba skupina MDD i MDDD, multivarijatna statistička analiza dala je velik broj metabolita koji doprinose razdvajanju navedenih skupina ispitanika, uključujući arahidonsku kiselinu, glicerol, heksansku kiselinu, hidroksiizomaslačnu kiselinu, jantarnu kiselinu, kolesterol, mio-inozitol, oleinsku kiselinu, propansku kiselinu, stearinsku kiselinu, tirozin, urea i β -D-galaktofuranozid. Međutim, univarijatna statistička analiza potvrdila je značajni doprinos samu u slučaju arahidonske kiseline (tablica 15). Arahidonska kiselina detektirana kao metabolit čija je zastupljenost značajno promijenjena na način da je njena razina povećana kod

ispitanika koji su liječeni 8 tjedana duloksetinom u odnosu na te iste ispitanike prije početka terapije (tablica 15). Općenito, arahidonska kiselina i njezini metaboliti imaju važnu ulogu u razvoju organa i različitim bolestima, uključujući razvoj kardiovaskularnog sustava, bubrega, jetre i kostiju, kao i u stanjima poput dijabetesa, pretilosti i raka.⁶⁰ Arahidonska je kiselina esencijalna masna kiselina koja sudjeluje u sintezi eikozanoida, medijatora upale. Povećana razina upalnih procesa sve se više povezuje s patogenezom depresije, što implicira da poremećaji u metabolizmu arahidonske kiseline mogu igrati važnu ulogu u razvoju simptoma depresije.⁶¹ U slučaju arahidonske kiseline zanimljivo je da je njezina razina bila nominalno značajno niža kod ispitanika s dijagnozom depresije u odnosu na kontrolne ispitanike prije početka terapije duloksetinom (tablica 15). Nakon terapije duloksetinom u trajanju od 8 tjedana, dolazi do značajnog povećanja u razini arahidonske kiseline kod ispitanika s MDD-om, odnosno, do normalizacije razine ovog metabolita, što upućuje na protuupalni učinak duloksetina.

U slučaju osoba koje boluju od depresije koja je rezistentna na liječenje antidepresivima, multivarijatna statistička analiza pokazala je da kod navedenih ispitanika, prije i poslije dodatne fototerapije u trajanju od 8 tjedana, postoji značajna razlika u zastupljenosti 5-oksoprolina, arahidonske kiseline, D-manitola, fosforne kiseline, glicina, glikolne kiseline, linolne kiseline, aldoheksoza (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozida, mliječne i mokraćne kiseline, tirozina, triptofana i β -D-galaktofuranozida (tablica 14). Univarijatna statistička analiza dala je par nominalno značajnih metabolita čija se razina mijenja kao posljedica fototerapije (tablica 9). Nominalna značajnost za arahidonsku kiselinu, D-manitol, fosfornu kiselinu, aldoheksoze, metil-galaktopiranozid te β -D-galaktofuranozida izgubila se nakon korekcije za višestruko testiranje (tablica 15). Međutim, zanimljivo je da i u slučaju depresije otporne na terapiju nakon 8 tjedana fototerapije dolazi do povećanja razine arahidonske kiseline, unatoč tome što ta promjena nije ostala statistički značajna nakon FDR korekcije.

Ako se uzmu u obzir nominalno značajni rezultati (prije FDR korekcije) univarijatne statistike u kombinaciji s metabolitima koji su značajno doprinijeli razdvajanju skupina u OPLS-DA modelu, tada uz već spomenute metabolite tu su i 2-ketobutirična kiselina, acetoacetat, alanin i arahidonska kiselina koji potencijalno doprinose razlici između ispitivanih skupina ispitanika CTRL i MDD čiji su rezultati prikazani u tablici D5. U slučaju usporedbe skupina CTRL i TRD, svi metaboliti koji su bili značajni prije FDR korekcije, ostali su značajni i nakon korekcije za višestruko testiranje (tablica D6). Rezultati univarijatne statistike upućuju

i na značajno različitu zastupljenost arahidonske i linolne kiseline te metil-galaktopiranozida između skupina ispitanika MDD i TRD, međutim, ova značajnost se gubi nakon FDR korekcije (tablica D7). S obzirom na to da je njihov značajni doprinos razdvajanju skupina potvrđen i modelom OPLS-DA, ne treba zanemariti ove metabolite. U slučaju skupina MDD i MDDD, ni jedan drugi metabolit ne doprinosi razlici između skupina budući da je u univarijantnoj statistici jedino arahidonska kiselina bila ta koja je zadovoljila uvjete statističke značajnosti prije, ali i poslije FDR korekcije (tablica D8) te je značajno doprinijela i razdvajanju skupina u modelu OPLS-DA. Konačno, bez obzira što kombinacija značajnih rezultata univarijantne i multivarijantne statistike skupina TRD i TRDDF nije dala ni jedan značajni metabolit (tablica 15), ne treba zanemariti metabolite s nominalno značajnim p-vrijednostima i značajnim vrijednostima VIP i trebalo bi ih uzeti u obzir u budućim istraživanjima na potencijalno većim skupinama ispitanika. Navedeni metaboliti prikazani su u tablici D9. Također, navedeni metaboliti detektirani su s povećanom zastupljenošću kod osoba s TRD-om nakon 8 tjedana liječenja duloksetinom i fototerapijom u odnosu na stanje prije početka adekvatne terapije.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu napravljeno je neciljano metabolomsko profiliranje u svrhu otkrivanja terapijskog učinka duloksetina i fototerapije na uzorcima plazme ispitanika s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja. Metaboliti su razdvojeni i analizirani metodom GC-MS te su nakon kvalitativne obrade i kvantifikacije podvrgnuti statističkoj obradi podataka koristeći univarijatnu i multivarijatnu statističku analizu na skupini zdravih kontrolnih ispitanika (CTRL), ispitanika s prvom epizodom depresije prije (MDD) i nakon (MDDD) 8 tjedana liječenja duloksetinom te na skupini ispitanika s depresijom otpornom na liječenje prije (TRD) i nakon (TRDDF) 8 tjedana kombinirane terapije duloksetina i fototerapije.

Statistički značajna razlika u zastupljenosti metabolita između skupina CTRL i MDD, nakon primjene univarijatne statističke analize, detektirana je u slučaju D-manitola, fosforne, heksanske i jantarne kiseline, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metilgalaktopiranozida, mokraćne kiseline i uree. U slučaju skupina CTRL i TRD, metaboliti koji su zadržali statistički značaj nakon FDR korekcije uključuju arahidonsku kiselinu, glicin, heksansku kiselinu, aldoheksozu (manoza/galaktoza/glukoza), prolin, jantarnu kiselinu, ureu i mokraćnu kiselinu. Kod usporedbe skupina MDD i TRD, samo je fosforna kiselina zadržala željenu razinu značaja. Usporedba skupina MDD i MDDD također je rezultirala jednim metabolitom za kojeg je određena značajno promijenjena razina zastupljenosti, a to je arahidonska kiselina. U slučaju skupina TRD i TRDDF, univarijatna statistička analiza nije potvrdila značajnu povezanost niti jednog detektiranog metabolita s dobrim odgovorom na fototerapiju.

Multivarijatna statistika korištena je kako bi se za sve pojedine detektirane metabolite odredila vrijednost VIP koja nam govori koji to metaboliti značajno doprinose razdvajanju uspoređivanih skupina ispitanika u modelu OPLS-DA. Za skupine CTRL i MDD metaboliti s vrijednostima VIP većima od jedan su 1,5-anhidroglucitol, 2-ketobutirična kiselina, acetoacetat, alanin, arahidonska kiselina, D-manitol, glicin, heksanska, hidroksiizomaslačna i jantarna kiselina, kolesterol, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), mokraćna kiselina, prolin i urea. U slučaju usporedbe skupina CTRL i TRD, metaboliti koji značajno doprinose razdvajanju ovih skupina u modelu OPLS-DA su acetoacetat, D-manitol, fosforna kiselina, glicerol, heksanska, jantarna i linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-

galaktopiranozid, mliječna, mokraćna, oleinska, palmitinska, stearinska kiselina i urea. U slučaju skupina MDD i TRD, kao značajni metaboliti istaknuli su se 3-hidroksibutirična i arahidonska kiselina, fenilalanin, fosforna, hidroksiizomaslačna kiselina i linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina. Metaboliti s vrijednošću VIP većom od jedan kod usporedbe skupina MDD i MDDD su arahidonska kiselina, glicerol, heksanska, hidroksiizomaslačna i jantarna kiselina, kolesterol, mio-inozitol, oleinska, propanska kiselina i stearinska kiselina, tirozin, urea i β -D-galaktofuranozid, a u slučaju skupina TRD i TRDDF takvi metaboliti su 5-oksoprolin, arahidonska kiselina, D-manitol, fosforna kiselina, glicin, glikolna i linolna kiselina, aldoheksoze (manoza/galaktoza/glukoza), metil-galaktopiranozid, mliječna i mokraćna kiselina, tirozin, triptofan i β -D-galaktofuranozid.

Rezultati kombiniranih statističkih pristupa za usporedbu skupina CTRL i MDD pokazali su da su metaboliti, čija je zastupljenost značajno promijenjena između uspoređivanih skupina, D-manitol, heksanska i jantarna kiselina, aldoheksoza (manoza/galaktoza/glukoza), mokraćna kiselina i urea, a u slučaju usporedbe skupina CTRL i TRD takvi metaboliti su heksanska i jantarna kiselina, aldoheksoza (manoza/galaktoza/glukoza) mokraćna kiselina i urea. U slučaju skupina MDD i TRD, kombinacija statističkih pristupa rezultirala je samo s jednim metabolitom (fosfornom kiselinom) čija zastupljenost je značajno promijenjena između navedenih skupina ispitanika, kao i u slučaju skupina MDD i MDDD gdje je to arahidonska kiselina. Budući da metaboliti kod usporedbe skupina TRD i TRDDF nisu zadržali značajnu p-vrijednost nakon FDR korekcije, kombinacija statističkih pristupa za usporedbu navedenih skupina ispitanika nije iznjedrila niti jedan značajan metabolit koji odgovara ovim strogim kriterijima probira značajnih rezultata metabolomskih istraživanja.

Navedeni metaboliti koji su bili značajni nakon univarijatne ili multivarijatne statističke analize, a osobito oni koji su se istaknuli kao značajni u oba pristupa analizi podataka, predstavljaju biomarkere koji mogu doprinjeti prilagodbi i individualizaciji terapije pacijenata s velikim depresivnim poremećajem te omogućiti efikasan odgovor na terapiju.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

- 5-HT – serotonin
- 5-HTP – 5-hidroksitriptofan
- BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (eng. *brain-derived neurotrophic factor*)
- BL – slijepa proba
- BLT – fototerapija (eng. *bright light therapy*)
- BSTFA – *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
- C18 – interni standard metil-stearat
- CTRL – skupina zdravih kontrolnih ispitanika
- DA – dopamin
- DAT – transporter dopamina
- EI – ionizacija elektronima
- GC-MS – plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
- IMAO – inhibitori monoamin-oksidge
- LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
- MAO – monoamin-oksidge
- MDD – veliki depresivni poremećaj
- MDD – skupina ispitanika koja dobro reagira na terapiju antidepresivima
- MDDD – skupina ispitanika liječena duloksetinom 8 tjedana
- NE – norepinefrin
- NET- transporter norepinefrina
- NS – neznačajni rezultati
- OPLS-DA – ortogonalna analiza metodom najmanjih kvadrata
- PCA – analiza glavnih komponenti
- QC – uzorci kontrolne kvalitete
- RI – retencijski indeks
- RT – retencijsko vrijeme
- SERT – transporter serotonina
- SNRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina i norepinefrina
- SSRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

- TCA – triciklički antidepresivi
- TMCS – trimetilklorosilan
- TRD – skupina ispitanika s depresijom otpornom na liječenje
- TRDDF – skupina ispitanika liječena duloksetinom i fototerapijom 8 tjedana
- VIP – vrijednost važnosti pojedine varijable u projekciji (VIP, eng. *Variable Importance in Projection*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. F. Saltiel, D. I. Silvershein, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **11** (2015) 875–888.
2. G. S. Malhi, J. J. Mann, *Lancet.* **392** (2018) 2299–2312.
3. B. Brigitta, *Dialogues. Clin. Neurosci.* **4** (2002) 7–20.
4. B. Ivanović, *Psyche* **3** (2020) 70–82.
5. H. Juárez Olguín et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016** (2016). 1–13.
6. M. Entzeroth, A.K. Ratty, *Open J. Depress.* **06** (2017) 31–68.
7. S. M. Stahl, *Stahl's Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and Practical Application Fourth Edition*, Cambridge University Press, New York, 2013, 79–370.
8. L. Tao et al., *Psychiatry Res.* **291** (2020) 1–10.
9. S. Perera et al., *BJPsych Open* **2** (2016) 116–126.
10. R. W. Lam et al., *JAMA Psychiatry* **73** (2016) 56–63.
11. G. Nedic Erjavec, M. Sagud, M. Nikolac Perkovic, D. Svob Strac, M. Konjevod, L. Tudor, N. Pivac, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **105** (2021) 1–43.
12. D. S. Wishart, *Physiol. Rev.* **99** (2019) 1819–1875.
13. D. J. Goldstein, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **3** (2007) 193–209.
14. G. S. Malhi, J. J. Mann, *Lancet.* **392** (2018) 2299–2312.
15. S. Uzun, M. Sagud, N. Pivac, *Psychiatr. Danub.* **33** (2021) 463–470.
16. L. Cui et al., *Signal Transduct. Target Ther.* **9** (2024) 1–32.
17. J. W. Kalat, *Biological Psychology*, Thomson Wadsworth, Belmont, 2007, 81–353.
18. D. B. Bylund, *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Elsevier, Cleveland 2016.
19. R. H. Belmaker, G. Agam, *N. Engl. J. Med.* **358** (2008) 55–68.
20. J. C. Shih, K. Chen, M.J. Ridd, *Annu. Rev. Neurosci.* **22** (1999) 197–217.
21. M. Bortolato, K. Chen, J.C. Shih, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **60** (2008) 1527–1533.
22. D. N. Jones, M.A. Raghanti, *J. Chem. Neuroanat.* **114** (2021) 1–13.
23. J. G. Fiedorowicz, K.L. Swartz, *J. Psychiatr. Pract.* **10** (2004) 239–248.
24. I. Fagervall, S.B. Ross, *Biochem. Pharmacol.* **35** (1986) 1381–1387.
25. M. Jaggar et al. *Neurobiology of Depression*, Elsevier, London, 2019, 43–62.
26. R. S. Duman, N. Li, *Biol. Sci.* **367** (2012) 2475–2484.
27. X. Li et al., *PLoS One* **13** (2018) 1–15.

28. M.J. Detke et al., *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14** (2004) 457–470.
29. A. Lisinski et al., *Neuropsychopharmacology* **45** (2020) 553–560.
30. M. M. Wohlreich et al., *Depress. Anxiety* **24** (2007) 41–52.
31. M. J. Arnold, S. Fulleborn, J. Farrell, *Am. Fam. Physician* **103** (2021) 16–19.
32. M. K. Jha, S. J. Mathew, *Am. J. Psychiatry* **180** (2023) 190–199.
33. C. H. Chang, C. Y. Liu, S. J. Chen, H. C. Tsai, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **14** (2018) 3091–3102.
34. M. A. Oldham, D. A. Ciraulo, *Chronobiol. Int.* **31** (2014) 305–319.
35. P. D. Campbell, A. M. Miller, M. E. Woesner, *Einstein J. Biol. Med.* **32** (2017) 13–25.
36. R. Ramautar, R. Berger, J. van der Greef, T. Hankemeier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17** (2013) 841–846.
37. M. Konjevod, *Metabolomski pristup posttraumatskom stresnom poremećaju: neciljana i ciljana metabolomska analiza*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2021, str. 70–107.
38. C. H. Johnson, J. Ivanisevic, G. Siuzdak, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **17** (2016) 451–459.
39. G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, *Nat. Rev.* **13** (2012) 263–269.
40. M. de Raad, C. R. Fischer, T. R. Northen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **30** (2016) 7–13.
41. W. B. Dunn, D. I. Ellis, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005) 285–294.
42. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5. izdanje, Saunders Collage Publishing, Philadelphia, 1998. 701–724.
43. A. Garcia, C. Barbas, *Methods Mol. Biol.* **708** (2011) 191–204.
44. The American Psychiatric Association, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* 5. izdanje, American Psychiatric Publishing, Arlington, 2013, 155–189.
45. E. Billoir, V. Navratil, B. J. Blaise, *Brief. Bioinform.* **16** (2014) 813–819.
46. Z. Pang et al., *Nucleic Acids Res.* **52** (2024) 398–406.
47. <https://hmdb.ca/> (datum pristupa 29. kolovoza 2024.)
48. L. Durai, S. Badhulika, *IEEE Sens. J.* **21** (2021) 5736–5742.
49. L. Ohlsson et al., *Acta Psychiatr. Scand.* **139** (2019) 185–193.
50. A. van der Spek et al., *Mol. Psychiatry* **28** (2023) 3874–3887.
51. A. Fujita et al., *Discov. Ment. Health* **2** (2022) 1–20.
52. M. Wu, et al., *Transl. Psychiatry* **10** (2020) 1–10.
53. A. Volchegorskii et al., *Neurosci. Behav. Physiol.* **49** (2019) 495–501.

54. T. Liu et al., *Artif Cells Nanomed. Biotechnol.* **48** (2020) 718–727.
55. P. Franzka et al., *Front. Nutr.* **9** (2022) 1–9.
56. Y. Luo et al., *Brain. Behav. Immun. Health* **42** (2024) 1–7.
57. H. Levassort et al., *Toxins* **16** (2024) 1–14.
58. R. J. Maddock et al., *Psychiatry Res.* **22** (1987) 29–36.
59. T. Kato et al., *J. Affect. Disord.* **26** (1992) 223–230
60. Y. Zhang, et al., *MedComm.* **4** (2023) 1–30.
61. G. Traina, M. Cocchi, *Appl. Sci.* **10** (2020) 1–12.

§ 8. DODATAK

Tablica D1. Identificirani i kvantificirani metaboliti zajedno s korespondirajućim postotnim vrijednostima relativne standardne devijacije (RSD) i postocima prisutnosti u uzorcima (PRES).

METABOLIT	RSD/ %	PRES/ %	METABOLIT	RSD/ %	PRES/ %
1,5-Anhidroglucitol	32,45	100	L-Mliječna kiselina	45,34	100
2-Hidroksibutirična kiselina	39,81	100	Mio-inozitol	36,10	100
2-Ketoizokaproinska kiselina	26,18	100	Norleucin	28,58	100
3-Hidroksibutirična kiselina	47,20	100	Oksalna kiselina	47,98	100
5-Hidroksitriptofan	38,42	80	Oksoprolin	44,69	100
Alanin	37,74	100	Oktanska kiselina	13,37	80
Arabinoza	44,55	100	Oleinska kiselina	8,72	100
D-Manitol	44,62	100	Palmitinska kiselina	5,22	100
Fenilalanin	23,38	100	Pentanska kiselina	12,20	100
Fosforna kiselina	35,40	100	Piruvinska kiselina	43,83	100
Galaktoza / Glukoza / Manoza	45,88	100	Prolin	35,35	100
Glicerol	19,88	100	Propilen glikol	27,13	100
Glicin	23,86	80	Serin	43,99	100
Glikolna kiselina	8,68	100	Stearinska kiselina	19,55	100
Izoleucin	30,12	100	Tirozin	12,33	80
Kolesterol	16,96	100	Triptofan	40,31	100
Leucin	24,06	100	Urea	34,56	100
Limunska kiselina	46,36	80	Valin	38,56	100
Linolna kiselina	4,74	100			

Tablica D2. Vrijednosti medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti rezultata kvantitativne obrade podataka za zdravu skupinu ispitanika (CTRL).

METABOLIT	CTRL		
	MEDIAN	MIN	MAX
1,5-Anhidroglucitol	0,559	0,274	1,612
2-Ketobutirična kiselina	1,185	0,008	5,035
3-Hidroksibutirična kiselina	1,026	0,143	4,406
5-Oksoprolin	0,918	0,324	1,569
Acetoacetat	0,937	0,216	2,582
Alanin	1,498	0,140	3,781
Arahidonska kiselina	0,062	0,011	0,272
D-Manitol	6,328	2,408	17,339
Fenilalanin	0,270	0,043	0,528
Fosforna kiselina	1,661	0,217	3,578
Glicerol	0,445	0,111	1,747
Glicin	0,615	0,176	1,427
Glikolna kiselina	1,825	0,362	7,390
Heksanska kiselina	32,976	7,836	83,507
Hidroksiizomaslačna kiselina	0,277	0,081	1,386
Izoleucin	1,784	0,061	4,044
Jantarna kiselina	0,126	0,061	0,247
Kolesterol	2,114	0,418	6,702
Leucin	1,747	0,170	4,044
Linolna kiselina	0,078	0,013	0,280
Manoza/Galaktoza/Glukoza	24,418	10,621	50,704
Metil-galaktopiranozid	0,861	0,313	3,674
Mio-inozitol	0,125	0,021	0,324
Mliječna kiselina	16,630	2,892	63,768
Mokraćna kiselina	0,532	0,046	2,488
Oleinska kiselina	0,194	0,011	0,929
Palmitinska kiselina	0,456	0,053	1,690
Prolin	1,169	0,340	2,831
Propanska kiselina	0,690	0,234	2,323
Serin	0,204	0,065	0,408
Stearinska kiselina	0,088	0,012	0,293
Tirozin	0,488	0,073	1,347
Treonin	0,196	0,055	0,525

METABOLIT	CTRL		
	MEDIAN	MIN	MAX
Triptofan	0,456	0,119	1,333
Urea	32,976	7,836	83,507
Valin	1,914	0,180	4,621
β -D-Galaktofuranozid	0,333	0,127	1,371

Tablica D3. Vrijednosti medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti rezultata kvantitativne obrade podataka za skupinu ispitanika koja dobro ponosi liječenje antidepresivima prije (MDD) i nakon 8 tjedana terapije duloksetinom (MDDD).

METABOLIT	MDD			MDDD		
	MEDIAN	MIN	MAX	MEDIAN	MIN	MAX
1,5-Anhidroglucitol	0,534	0,119	0,986	0,495	0,285	1,203
2-Ketobutirična kiselina	0,458	0,001	2,315	0,499	0,010	2,235
3-Hidroksibutirična kiselina	0,645	0,242	7,472	0,645	0,477	2,082
5-Oksoprolin	0,784	0,109	1,867	0,743	0,393	1,646
Acetoacetat	0,835	0,214	4,805	1,086	0,264	3,505
Alanin	1,682	0,070	3,980	1,540	0,184	3,338
Arahidonska kiselina	0,031	0,011	0,080	0,070	0,014	0,364
D-Manitol	6,037	2,586	12,404	6,323	3,627	21,083
Fenilalanin	0,242	0,037	0,482	0,257	0,044	0,500
Fosforna kiselina	2,127	0,087	10,080	2,354	0,276	6,783
Glicerol	0,439	0,098	1,753	0,311	0,088	1,135
Glicin	0,394	0,081	1,159	0,481	0,145	1,003
Glikolna kiselina	0,955	0,250	3,159	1,304	0,454	6,895
Heksanska kiselina	35,212	12,818	78,871	34,056	14,792	71,411
Hidroksiizomaslačna kiselina	0,226	0,075	0,629	0,172	0,098	0,397
Izoleucin	1,422	0,096	2,710	1,508	0,481	2,778
Jantarna kiselina	0,128	0,032	0,254	0,113	0,066	0,169
Kolesterol	1,040	0,204	6,676	1,088	0,489	4,262
Leucin	1,422	0,145	2,710	1,522	0,533	2,778
Linolna kiselina	0,078	0,010	0,228	0,055	0,027	0,155
Manoza/Galaktoza/Glukoza	26,156	12,176	62,686	25,179	15,941	96,900
Metil-galaktopiranozid	0,896	0,416	1,977	0,793	0,499	3,354
Mio-inozitol	0,100	0,016	0,271	0,108	0,033	0,231
Mliječna kiselina	9,378	2,155	27,990	10,246	3,560	63,156
Mokraćna kiselina	0,192	0,043	1,053	0,171	0,033	1,415

METABOLIT	MDD			MDDD		
	MEDIAN	MIN	MAX	MEDIAN	MIN	MAX
Oleinska kiselina	0,228	0,011	0,820	0,139	0,020	0,457
Palmitinska kiselina	0,394	0,117	1,418	0,387	0,149	0,770
Prolin	1,303	0,110	5,865	1,020	0,197	3,569
Propanska kiselina	0,430	0,159	1,162	0,413	0,119	2,289
Serin	0,160	0,019	0,349	0,155	0,054	0,282
Stearinska kiselina	0,085	0,020	0,307	0,068	0,016	0,182
Tirozin	0,330	0,117	0,892	0,313	0,066	1,089
Treonin	0,145	0,011	0,314	0,166	0,063	0,490
Triptofan	0,351	0,064	1,461	0,377	0,115	0,680
Urea	35,212	12,818	78,871	34,056	14,792	71,411
Valin	1,717	0,305	3,371	1,769	0,631	3,624
β -D-Galaktofuranozid	0,301	0,078	0,615	0,365	0,156	0,981

Tablica D4. Vrijednosti medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti rezultata kvantitativne obrade podataka za skupinu ispitanika koja je otporna na liječenje prije (TRD) i nakon 8 tjedana kombinirane terapije duloksetinom i fototerapije (TRDDF).

METABOLIT	TRD			TRDDF		
	MEDIAN	MIN	MAX	MEDIAN	MIN	MAX
1,5-Anhidroglucitol	0,546	0,083	1,040	0,561	0,296	0,960
2-Ketobutirična kiselina	0,511	0,006	2,351	0,710	0,010	3,237
3-Hidroksibutirična kiselina	0,592	0,368	1,384	0,664	0,331	3,609
5-Oksoprolin	0,742	0,402	1,068	0,813	0,446	1,758
Acetoacetat	0,717	0,175	9,405	0,558	0,031	4,982
Alanin	1,433	0,171	4,013	1,370	0,070	4,370
Arahidonska kiselina	0,022	0,008	0,047	0,030	0,011	0,062
D-Manitol	5,652	3,004	10,994	7,160	3,728	22,694
Fenilalanin	0,252	0,040	0,464	0,269	0,072	0,530
Fosforna kiselina	1,113	0,247	3,432	1,741	0,205	3,612
Glicerol	0,399	0,066	1,314	0,438	0,194	2,012
Glicin	0,257	0,082	0,998	0,446	0,112	1,021
Glikolna kiselina	1,124	0,385	5,161	1,193	0,542	2,793
Heksanska kiselina	36,678	19,674	72,124	33,594	11,056	58,763
Hidroksiizomaslačna kiselina	0,200	0,031	0,612	0,196	0,082	0,711
Izoleucin	1,400	0,485	2,706	1,411	0,228	3,160

METABOLIT	TRD			TRDDF		
	MEDIAN	MIN	MAX	MEDIAN	MIN	MAX
Jantarna kiselina	0,127	0,065	0,203	0,131	0,067	0,184
Kolesterol	1,052	0,622	4,966	1,146	0,509	3,792
Leucin	1,440	0,589	2,779	1,461	0,489	3,160
Linolna kiselina	0,048	0,012	0,124	0,042	0,013	0,249
Manoza/Galaktoza/Glukoza	22,002	14,177	62,240	26,598	17,358	114,694
Metil-galaktopiranozid	0,753	0,496	1,362	0,917	0,496	3,550
Mio-inozitol	0,092	0,025	0,268	0,097	0,032	0,173
Mliječna kiselina	9,683	3,355	45,928	10,363	4,683	32,985
Mokraćna kiselina	0,175	0,015	1,288	0,180	0,030	0,897
Oleinska kiselina	0,152	0,024	0,431	0,109	0,035	1,276
Palmitinska kiselina	0,289	0,097	0,967	0,306	0,134	1,602
Prolin	1,222	0,462	2,659	1,051	0,409	2,579
Propanska kiselina	0,485	0,218	1,011	0,491	0,210	0,923
Serin	0,163	0,045	0,314	0,162	0,037	0,412
Stearinska kiselina	0,064	0,012	0,161	0,067	0,022	0,341
Tirozin	0,330	0,131	1,118	0,319	0,120	0,605
Treonin	0,156	0,029	0,294	0,120	0,031	0,410
Triptofan	0,398	0,164	1,185	0,354	0,145	0,503
Urea	36,678	19,674	72,124	33,594	11,056	58,763
Valin	1,677	0,444	2,769	1,678	0,068	3,879
β-D-Galaktofuranozid	0,287	0,124	0,582	0,372	0,163	0,998

Tablica D5. Rezultati univarijatne statističke analize (p-vrijednost i FDR) i multivarijatne statističke analize (VIP) te postotak promjene (% Δ) u zastupljenosti metabolita kod usporedbe skupina CTRL i MDD. Prikazani metaboliti pokazuju značajni (zeleno podebljanje) rezultat ili u univarijatnoj statistici ili u multivarijatnoj ili u obje. Crveno podebljanje označuje neznačajnu p-vrijednost nakon FDR korekcije.

CTRL vs MDD	Univarijatna statistička analiza		Multivarijatna statistička analiza	
	p-vrijednost	FDR	VIP	% Δ
1,5-Anhidroglucitol	NS	NS	1,31	-4,72
2-Ketobutirična kiselina	0,045	0,112	1,24	-158,67
Acetoacetat	0,044	0,112	1,28	-12,24
Alanin	0,014	0,055	1,08	10,95
Arahidonska kiselina	0,020	0,067	1,88	-99,45
D-Manitol	$3,85 \times 10^{-4}$	0,006	1,07	-4,82
Fosforna kiselina	0,005	0,024	0,34	21,93
Glicerol	0,015	0,055	0,85	-1,32
Glicin	NS	NS	1,25	-56,13
Heksanska kiselina	0,001	0,006	1,68	6,35
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	1,27	-22,33
Jantarna kiselina	0,001	0,006	1,79	1,73
Kolesterol	NS	NS	1,28	-103,19
Manoza/Galaktoza/Glukoza	$6,492 \times 10^{-5}$	0,002	1,24	6,65
Metil-galaktopiranozid	0,001	0,007	0,85	3,86
Mliječna kiselina	0,026	0,073	0,28	-77,33
Mokraćna kiselina	0,006	0,027	2,16	-177,78
Oleinska kiselina	0,025	0,073	0,18	15,03
Prolin	NS	NS	1,32	10,28
Urea	0,001	0,006	1,68	6,35

*NS - statistički neznačajan rezultat

Tablica D6. Rezultati univarijatne statističke analize (p-vrijednost i FDR) i multivarijatne statističke analize (VIP) te postotak promjene (% Δ) u zastupljenosti metabolita kod usporedbe skupina CTRL i TRD. Prikazani metaboliti pokazuju značajni (zeleno podebljanje) rezultat ili u univarijatnoj statistici ili u multivarijatnoj ili u obje.

CTRL vs TRD	Univarijatna statistička analiza		Multivarijatna statistička analiza	
	p-vrijednost	FDR	VIP	% Δ
Acetoacetat	NS	NS	1,01	-23,51
Arahidonska kiselina	2,16 $\times 10^{-5}$	0,001	0,85	-64,45
D-Manitol	NS	NS	1,82	-10,68
Fosforna kiselina	NS	NS	1,10	-32,98
Glicerol	NS	NS	1,20	-10,42
Glicin	0,006	0,047	0,13	-58,25
Glikolna kiselina	NS	NS	1,02	-38,43
Heksanska kiselina	0,008	0,047	1,62	11,23
Jantarna kiselina	0,001	0,026	1,69	0,48
Linolna kiselina	NS	NS	1,23	-38,01
Manoza/Galaktoza/Glukoza	0,011	0,050	2,02	-9,90
Metil-galaktopiranozid	NS	NS	1,82	-12,58
Mliječna kiselina	NS	NS	1,18	-41,78
Mokraćna kiselina	0,004	0,047	1,27	-67,05
Oleinska kiselina	NS	NS	1,31	-21,41
Palmitinska kiselina	NS	NS	1,25	-36,57
Prolin	0,010	0,050	0,48	4,56
Stearinska kiselina	NS	NS	1,29	-27,51
Urea	0,007	0,047	1,62	11,23

*NS - statistički neznačajan rezultat

Tablica D7. Rezultati univarijatne statističke analize (p-vrijednost i FDR) i multivarijatne statističke analize (VIP) te postotak promjene (% Δ) u zastupljenosti metabolita kod usporedbe skupina MDD i TRD. Prikazani metaboliti pokazuju značajni (zeleno podebljanje) rezultat ili u univarijatnoj statistici ili u multivarijatnoj ili u obje. Crveno podebljanje označuje neznačajnu p-vrijednost nakon FDR korekcije.

MDD vs TRD	Univarijatna statistička analiza		Multivarijatna statistička analiza	
	p-vrijednost	FDR	VIP	% Δ
3-Hidroksibutirična kiselina	NS	NS	1,26	-8,22
Arahidonska kiselina	0,007	0,122	1,90	-29,09
Fenilalanin	NS	NS	1,33	4,24
Fosforna kiselina	0,001	0,041	1,35	-47,67
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	1,52	-11,52
Linolna kiselina	0,025	0,228	1,86	-38,19
Manoza/Galaktoza/Glukoza	NS	NS	1,16	-15,88
Metil-galaktopiranozid	0,022	0,228	1,81	-15,96
Oleinska kiselina	NS	NS	1,85	-33,22
Palmitinska kiselina	NS	NS	1,73	-26,62
Stearinska kiselina	NS	NS	1,70	-24,80

*NS - statistički neznačajan rezultat

Tablica D8. Rezultati univarijatne statističke analize (p-vrijednost i FDR) i multivarijatne statističke analize (VIP) te postotak promjene (% Δ) u zastupljenosti metabolita kod usporedbe skupina MDD i MDDD. Prikazani metaboliti pokazuju značajni (zeleno podebljanje) rezultat ili u univarijatnoj ili u multivarijatnoj statistici ili u obje.

MDD vs MDDD	Univarijatna statistička analiza		Multivarijatna statistička analiza	% Δ
	p-vrijednost	FDR	VIP	
Arahidonska kiselina	0,001	0,044	1,76	126,17
Glicerol	NS	NS	1,98	-29,31
Heksanska kiselina	NS	NS	1,76	-3,28
Hidroksiizomaslačna kiselina	NS	NS	1,22	-24,01
Jantarna kiselina	NS	NS	1,77	-12,00
Kolesterol	NS	NS	1,01	4,58
Mio-inozitol	NS	NS	1,11	7,30
Oleinska kiselina	NS	NS	1,27	-39,17
Propanska kiselina	NS	NS	1,07	-3,96
Stearinska kiselina	NS	NS	1,14	-19,14
Tirozin	NS	NS	1,19	-5,27
Urea	NS	NS	1,76	-3,28
β -D-Galaktofuranozid	NS	NS	1,24	21,14

*NS - statistički neznačajan rezultat

Tablica D9. Rezultati univarijatne statističke analize (p-vrijednost i FDR) i multivarijatne statističke analize (VIP) te postotak promjene (% Δ) u zastupljenosti metabolita kod usporedbe skupina TRD i TRDDF. Prikazani metaboliti pokazuju značajni (zeleno podebljanje) rezultat ili u univarijatnoj statistici ili u multivarijatnoj. Crveno podebljanje označuje neznačajnu p-vrijednost nakon FDR korekcije.

TRD vs TRDDF	Univarijatna statistička analiza		Multivarijatna statistička analiza	
	p-vrijednost prije FDR	FDR	VIP	% Δ
5-Oksoprolin	NS	NS	1,15	9,69
Arahidonska kiselina	0,020	0,170	1,22	37,85
D-Manitol	0,040	0,247	1,82	26,67
Fosforna kiselina	0,006	0,119	1,85	56,38
Glicin	NS	NS	1,12	73,38
Glikolna kiselina	NS	NS	1,41	6,14
Linolna kiselina	NS	NS	1,21	-12,41
Manoza/Galaktoza/Glukoza	0,014	0,170	1,93	20,89
Metil-galaktopiranozid	0,003	0,117	1,52	21,78
Mliječna kiselina	NS	NS	1,52	7,02
Mokraćna kiselina	NS	NS	1,23	2,63
Tirozin	NS	NS	1,31	-3,17
Triptofan	NS	NS	1,23	-11,00
β -D-Galaktofuranozid	0,023	0,170	1,63	29,29

*NS - statistički neznačajan rezultat

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Lavinia Latin

Datum rođenja: 24. rujna 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2005–2013	Osnovna škola Bisag, Bisag
2013–2017	Srednja škola Dragutina Stražimira, Sv. I. Zelina
2017–2022	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2022-2025	Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, smjer Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2022	Smotra sveučilišta u Zagrebu
------	------------------------------