

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) u psihijatrijskih bolesnika oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja

Novački, Karolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:767576>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Karolina Novački

**Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) u
psihijatrijskih bolesnika oboljelih od shizofrenije
i velikog depresivnog poremećaja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić te je predan kao diplomski rad.

Zahvale

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, pomoći u izvedbi praktičnog dijela rada, korisnim savjetima pri pisanju ovog rada te na tome što mi je omogućila korištenje instrumenata i opreme u prostorijama Kliničkog zavoda za kemiju KBC-a Sestre milosrdnice.

Zahvaljujem osoblju Kliničkog zavoda za kemiju koje je također pomoglo pri izradi praktičnog dijela rada te prof. dr. sc. Daliboru Karloviću, specijalisti psihijatrije i predstojniku Klinike za psihijatriju koji je u sklopu svojeg znanstvenog projekta osigurao reagense te odabrao pacijente preme kriterijima uključivanja.

Posebnu zahvalnost dugujem svim ispitanicima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti.

I na kraju, veliko hvala svim mojim bližnjima koji su bili uz mene ovih pet godina studiranja i pridonijeli tome da sve prođe lakše, manje stresno i veselije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)	1
1.1.1. Genska i proteinska struktura	1
1.1.2. Receptori i transdukcija signala	1
1.1.3. Lokalizacija i funkcija	2
1.2. Psihički poremećaji	3
1.2.1. Veliki depresivni poremećaj	4
1.2.1.1. Definicija i epidemiologija	4
1.2.1.2. Etiologija	4
1.2.1.3. Klinička slika	5
1.2.1.4. Postavljenje dijagnoze	5
1.2.1.5. Liječenje	6
1.2.2. Shizofrenija	6
1.2.2.1. Definicija i epidemiologija	6
1.2.2.2. Etiologija	7
1.2.2.3. Klinička slika	7
1.2.2.4. Postavljanje dijagnoze	8
1.2.2.5. Liječenje	9
1.3. Povezanost BDNF-a sa psihičkim poremećajima	9
1.3.1. BDNF i veliki depresivni poremećaj	10
1.3.2. BDNF i shizofrenija	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Ispitanici i materijali	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Laboratorijske metode	16
3.2.2. Statističke metode	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. REZULTATI	21
4.1.1. Deskriptivna statistika	21
4.1.2. Ispitivanje korelacije	23
4.1.3. Statističko testiranje	24
4.2. RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	32
7. SAŽETAK / SUMMARY	36

7.1. Sažetak	36
7.2. Summary	37
8. PRILOZI.....	38
8.1. Popis kratica	38

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, engl. *brain-derived neurotrophic factor*) jest čimbenik rasta otkriven 1982. godine. Čimbenici rasta pripadaju skupini citokina. Citokini su hormonima slične glikoproteinske molekule koje luče mnoge stanice, a glavna funkcija im je međustanična komunikacija. Kao takvi, čimbenici rasta sudjeluju u aktivaciji, diferencijaciji i proliferaciji stanica, reguliraju razvoj svih tkiva pa tako i moždanog tkiva. Moždani neurotrofni čimbenik jedan je od najviše proučavanih čimbenika rasta, otkriven kao drugi član „neurotrofne obitelji“ neurotrofnih čimbenika uz prethodno otkriveni živčani čimbenik rasta (NGF, engl. *nerve growth factor*). Od tada su proučavani i opisani ostali članovi neurotrofne obitelji poput neurotrofina-3 (NT-3) i neurotrofina-4/5 (NT-4/5), svaki sa specifičnim učinkom na subpopulacije živčanih stanica u perifernom i središnjem živčanom sustavu (Binder i Scharfman, 2004).

1.1.1. Genska i proteinska struktura

BDNF gen (u ljudskom genomu mapiran na kromosomu 11p13) sastoji se od četiri 5'-egzona (egzoni I-IV) i jednog 3'-egzona (egzon V) koji kodira za aktivni BDNF protein. Iz tog gena transkribira se osam različitih mRNA. Transkripti koji sadrže egzone I-III eksprimirani su u mozgu, dok se egzon IV pronalazi u plućima i srcu. BDNF dijeli 50% aminokiselinskog sastava s NGF-om, NT-3 i NT-4/5. Neurotrofini (pripadnici neurotrofne obitelji) su po svojoj strukturi homodimeri, čiji ostaci aminokiseline cisteina čine važnu ulogu u nekovalentnoj interakciji podjedinica. Molekula homodimera sastoji se od dva para antiparalelnih beta lanaca koji su spojeni trima, veoma fleksibilnim kratkim vezama. Ta mjesta vezanja su mjesta u kojima postoje razlike u aminokiselinama, što međusobno razdvaja neurotrofine unutar neurotrofne obitelji (Önger i sur., 2016). Homodimeri sadrže signalni peptid koji slijedi inicijacijski kodon te pro-regiju koja sadrži N-vezano glikozilacijsko mjesto. Prvotno stvoreni proneurotrofini ($M_r \sim 30$ kDa), pomoću prohormon konvertaza pretvaraju se u aktivne proteine, neurotrofine ($M_r \sim 14$ kDa) (Binder i Scharfman, 2004).

1.1.2. Receptori i transdukcija signala

Neurotrofini ispoljavaju svoju aktivnost interakcijom s dvije skupine receptora, to su: p75 i Trk (tropomiozin receptor-kinaza). p75 receptor je član obitelji faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α) i za njega se vežu svi neurotrofini sličnim afinitetom. Trk receptor je član obitelji tirozin receptor-kinaza i više je selektivan u vezanju neurotrofina. Točnije, BDNF se većim

afinitetom veže za TrkB, dok NGF za TrkA receptor. Pronađene su dvije izvanstanične domene Trk receptora koje sudjeluju u interakciji s neurotrofinima. Jedna od tih domena, imunoglobulinima-slična domena, ima aktivnu ulogu u specifičnom vezanju liganda, a također sudjeluje u regulaciji vezanja te aktivaciji neurotrofina (Önger i sur., 2016). Prilikom vezanja liganda za Trk receptor dolazi do dimerizacije receptora, što uzrokuje aktivaciju kinaza i autofosforilaciju tirozinskih ostataka. Takvom aktivacijom receptora stvaraju se specifična vezna mjesta za unutarstanične proteine koji se vežu za njega pomoću SH2 domena. Na taj način aktiviraju se proteini poput fosfolipaze C (PLC), fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) i Shc proteina, čime se aktiviraju različite unutarstanične signalne kaskade, poput Ras-MAP (signalni put koji regulira proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica) te fosforilacija CREB proteina (engl. *cyclic AMP-response element binding protein*). Ti signalni putevi uključeni su u različite aspekte preživljavanja i rasta živčanih stanica (Murray i Holmes, 2011). Postoje dva oblika Trk receptora – receptori pune duljine i skraćeni oblici receptora kojima nedostaje kinazna domena. Unatoč tome što je većina funkcija koje se pripisuju BDNF povezana s receptorom TrkB pune duljine, smatra se da nekoliko uloga izvršavaju i skraćeni oblici receptora. Neke od tih uloga su rast i razvoj, te negativna modulacija ekspresije i funkcije aktivnog TrkB receptora. Osim za Trk receptore, svi neurotrofini, pa tako i BDNF, vežu se za p75 receptor. p75, kao član TNF- α superobitelji receptora, ima glikoziliranu izvanstaničnu regiju koja je uključena u vezanje liganda, transmembransku regiju i kratku citoplazmatsku sekvencu kojoj nedostaje intrinzična katalitička aktivnost. Vezanjem neurotrofina za p75 također se aktiviraju različite unutarstanične signalne kaskade. U ovom slučaju to su putevi koji uključuju nuklearni faktor κ B (NF- κ B), Janus kinaze i hidrolizu sfingomijelina. Signalizacija putem ovog receptora rezultira različitim biološkim učincima od onih koji se događaju putem Trk receptora. p75 uključen je prvenstveno u pro-apoptičke procese koji se zbivaju u mozgu, stoga ima regulatornu ulogu u neuronalnoj proliferaciji koja se odvija putem Trk receptora (Binder i Scharfman, 2004).

1.1.3. Lokalizacija i funkcija

BDNF doprinosi preživljavanju i diferencijaciji živčanih vlakana u središnjem i perifernom živčanom sustavu, no njegova ekspresija posebice je značajna u hipokampusu. Lokaliziran je na krajevima neurona gdje je pohranjen u vezikulama i odakle se transportira u sinaptičku pukotinu. BDNF regulira sinaptičku transmisiju presinaptičkim i postsinaptičkim djelovanjem. Presinaptički djeluje na način da pojačava ekscitatornu sinaptičku transmisiju

potičući otpuštanje glutamata, a oslabljuje inhibitornu sinaptičku transmisiju blokirajući otpuštanje gamaaminomaslačne kiseline (GABA). Postsinaptički djeluje regulacijom fosforilacije receptora navedenih neurotransmitora. Točnije, fosforilacijom NR2B podjedinice NMDA receptora pojačava se sinaptička transmisija glutamata, dok negativno regulira fosforilaciju GABA-A receptora, a također smanjuje učinkovitost GABA-inhibicijskog djelovanja blokirajući transport kloridnih iona. Stoga su od velike važnosti i pre- i post-sinaptički TrkB receptori u hipokampusu (Binder i Scharfman, 2004). Dokazano je da BDNF potiče neurogenezu i plastičnost neurona te ostale procese koji doprinose poboljšanoj funkciji hipokampusa, što ima veliki utjecaj na memoriju i učenje. Osim toga, ima značajan učinak na morfologiju dendrita i razvoj aksona. Studije su pokazale da se BDNF mRNA nalazi u relativno niskim razinama tijekom ranog embrionalnog razvoja i života, a povisuje se prema odrasloj dobi, posebice u određenim regijama hipokampusa. To je dokaz važne uloge BDNF u razvoju mozga (Murray i Holmes, 2011). Ekspresija ovog proteina veoma je osjetljiva na razvojne i okolišne čimbenike. Primjerice, svjetlost stimulira sintezu BDNF mRNA u vizualnom korteksu, osmotska stimulacija na isti način djeluje u hipotalamusu, električna stimulacija pojačava ekspresiju BDNF-a i NGF-a, starenjem se smanjuje razina BDNF-a, a posebice važan učinak na povećanje razine BDNF-a ima fizička aktivnost (Binder i Scharfman, 2004). Unatoč tome što znamo da su neurotransmitori, poput dopamina i serotonina, važni za normalnu funkciju mozga zbog svoje uloge u prijenosu signala živčanim stanicama, BDNF kao čimbenik rasta omogućava i održava cirkulaciju tih signalnih molekula (<https://examinedexistence.com>).

1.2. Psihički poremećaji

Psihijatrija je grana medicine koja se bavi proučavanjem psihičkih poremećaja, liječenjem i rehabilitacijom oboljelih osoba i općenito zaštitom i unapređivanjem duševnog zdravlja. U psihijatriji ima malo bolesti za koje bi se moglo tvrditi da imaju sasvim određeni organski uzrok. Smatra se da je uzrok psihičkih poremećaja multifaktorski, tj. da je riječ o međuovisnosti konstitucijskih i čimbenika okoline. Najčešće se govori o genetskoj predispoziciji, osobinama ličnosti, tjelesnim čimbenicima, uvjetima sredine i specifičnom životnom iskustvu. Kako bi pravilno dijagnosticirali i liječili pojedini psihički poremećaj, korisno je razlikovati predispoziciju za određeni poremećaj, čimbenike koji su poremećaj pokrenuli i one koji utječu na održavanje takvog stanja (Thaller i sur., 2004).

1.2.1. Veliki depresivni poremećaj

1.2.1.1. Definicija i epidemiologija

Veliki depresivni poremećaj poznat je još kao unipolarna depresija ili unipolarna afektivna psihoza. U kliničkoj praksi, afektivna psihoza pojavljuje se u dva oblika: bipolarnom, koji uključuje barem jednu maničnu fazu i unipolarnom obliku, kod kojeg se javljaju samo depresivne epizode. Depresivna psihoza je jedna od najčešćih bolesti u psihijatriji, ali podaci o učestalosti veoma variraju s obzirom na kriterije koji se primjenjuju u dijagnostičkom postupku. Populacijska istraživanja pokazuju da najmanje 10% stanovništva ispunjava kriterije za depresivnu bolest, a 20% će tijekom života proći kroz jednu ili više depresivnih epizoda. Velika većina njih nikad ne dođe na liječenje. Epizode bolesti mogu se javiti u bilo kojoj dobi, čak i u dječjoj, ali u pravilu se javljaju kasnije u životu. Veliki depresivni poremećaj dva puta se češće dijagnosticira u žena, nego u muškaraca, i to iz razloga što se u žena bolest javlja češće, a i one se lakše odluče na odlazak liječniku (Thaller i sur., 2004). Smatra se da je učestalost obolijevanja češća u žena zbog genetske predispozicije i fluktuirajućih hormona, posebice za vrijeme puberteta, nakon poroda i u menopauzi (www.psycom.net). Jedan dio depresija u muškaraca je sigurno pokriven alkoholizmom. Stope pojavljivanja bolesti su niže kod oženjenih muškaraca, nego kod samaca, udovaca i rastavljenih, dok je kod žena manje uočljiva zaštitna uloga braka, što se povezuje s opterećenjima u svakodnevnom životu i odgovornošću za djecu i obitelj (Thaller i sur., 2004).

1.2.1.2. Etiologija

Uzrok depresije uključuje više čimbenika koji zajedno dovode do pojave bolesti. Genetska predispozicija je dokazana, a postoci vjerojatnosti pojavljivanja bolesti kod rođaka bolesnika su sljedeći: rođaci u prvom koljenu 10-20%, monozigotni blizanci 50-70%, heterozigotni blizanci 15-30%. S druge pak strane, neurokemijska istraživanja pokazuju da koncentracija monoaminskih neurotransmitora (noradrenalina i serotonina) i osjetljivost moždanih receptora igraju značajnu ulogu u javljanju depresije. Postoje brojni dokazi za neurotransitorsku hipotezu, neki od njih su sljedeći: u depresivnih bolesnika smanjena je koncentracija triptofana (prekursora serotonina) u plazmi i krvnim stanicama; također su smanjene koncentracije neurotransitorskih metabolita u likvoru i urinu; postmortalne studije na žrtvama suicida pokazuju niske koncentracije serotonina i njegovih metabolita u mozgu; lijekovi koji su primjenjivani za sniženje krvnog tlaka, kao što je reserpin, mogu uzrokovati depresivna stanja zato što prazne skladišta moždanih monoamina; lijekovi koji se primjenjuju u liječenju depresija uglavnom mijenjaju količinu i dostupnost noradrenalina i serotonina u

mozgu. Dokazane su i značajne hormonalne promjene kod bolesnika koji boluju od depresije, posebice promjene u lučenju kortizola, hormona rasta, tireoidnog hormona i spolnih hormona. Postoje i razne teorije koje pokušavaju objasniti etiologiju bolesti proučavajući različite aspekte života, kao što su psihodinamska teorija, bihevioralne i kognitivne teorije, studije o strukturi ličnosti i dr. (Thaller i sur., 2004).

1.2.1.3. Klinička slika

Od psihičkih simptoma najuočljivije je disforičko raspoloženje (bezzvoljnost), tuga, bespomoćnost, tjeskoba, osjećaj krivnje, pesimizam, beznade. U nekih bolesnika se može uočiti i iritabilnost, neprijateljsko reagiranje na uobičajene, svakodnevne povode. Također je prisutna anhedonija (nezadovoljstvo), nemaju životne energije, pasivni su, povlače se, nemaju interesa za kontakte s ljudima ili bilo kakvu aktivnost, nemaju dovoljno koncentracije, teško donose odluke, a seksualni nagoni su smanjeni. Bolesnici nisu uvijek svjesni svog depresivnog stanja. Neki od bolesnika su uz ove simptome i mentalno usporeni, a neki mogu biti vrlo napeti i skloni naglim akcijama, što doprinosi opasnosti suicida. Suicid je stalna, prijetuća opasnost u depresivnih bolesnika. Kod teških depresivnih slika javljaju se i psihotični simptomi, kao što su sumanute misli i halucinacije. Tjelesni simptomi su gotovo uvijek zastupljeni i bolesnik najčešće o njima govori liječniku opće medicine kad prvi put zatraži pomoć. Najčešći tjelesni simptomi su poremećeno spavanje, smanjeni tek, opstipacija, impotentnost, česte jake glavobolje, umor, a kod žena i izostanak menstruacije. Prema DSM klasifikaciji (Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje – službeni klasifikacijski sustav Američkog psihijatrijskog društva), kada bolest uključuje i psihičke i tjelesne simptome, a uz to se mogu javiti i psihotične epizode, tada se govori o „velikoj depresiji“, odnosno velikom depresivnom poremećaju (Thaller i sur., 2004).

1.2.1.4. Postavljenje dijagnoze

U dijagnostičkom postupku na depresiju upućuje produženo depresivno raspoloženje koje nije primjereno događaju koji mu je prethodio, prisutnost tjelesnih simptoma, anhedonija, osjećaj krivnje, nisko samovrednovanje i samopoštovanje, te suicidalne misli. Istraživanja pokazuju da u velikog broja bolesnika, bilo da su liječeni u bolnici ili od liječnika primarne zaštite, depresija nije bila prepoznata. Razlog tome je vjerojatno činjenica da se bolesnik uglavnom tuži na tjelesne poteškoće, ili se njegovo depresivno stanje, kad prati neku tešku tjelesnu bolest, smatra normalnom i neizbježnom reakcijom. Diferencijalna dijagnostika depresije uključuje: sekundarnu depresiju, tj. depresiju tijekom teških tjelesnih bolesti (tumora, tuberkuloze, AIDS-a, neuroloških i endokrinoloških bolesti); depresiju kao reaktivno stanje na

droge (lijekovi poput reserpina, metildope, kortikosteroida, seksualnih hormona, neki antimalarici, sulfonamidi i antipsihotici mogu precipitirati depresiju); druge psihijatrijske bolesti mogu biti praćene depresivnim raspoloženjem, poput demencije i shizofrenije (Thaller i sur., 2004).

1.2.1.5. Liječenje

U liječenju depresije postoje tri osnovna pristupa koja se obično kombiniraju, to su: antidepresivi, elektrokonvulzivna terapija (EKT) i psihološki-psihoterapijski postupci. Od lijekova, triciklički antidepresivi, kao što su amitriptilin i imipramin, standardni su lijekovi prve linije izbora i djeluju u oko 70% slučajeva, ali nezgodna im je tireotoksičnost u većim dozama. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI), kao što su fluoksetin i paroksetin, danas se smatraju lijekovima izbora, jer su sigurniji u slučajevima predoziranja i imaju manje nuspojava od tricikličkih lijekova. Treći izbor su inhibitori monoaminooksidaze (MAOI), kao što su fenelzin i moklobemid, koji se još uvijek manje propisuju, ali katkad mogu imati dramatičan efekt kod bolesnika s rezistentnom depresijom. U liječenju je potrebna dobra suradnja s bolesnikom radi dugotrajnog uzimanja lijeka. Važno je postići optimalnu dozu i održavati je najmanje četiri tjedna, prije eventualne odluke o promjeni lijeka. Ako je terapija djelotvorna, potrebno je održati propisanu dozu najmanje šest mjeseci po nestanku simptoma, a zatim dozu postupno smanjivati, ako se bolesnik osjeća dobro. EKT je obično terapija izbora kod suicidalnih bolesnika, te kod onih koji odbijaju hranu i tekućinu, ili u slučajevima kad drugi oblici liječenja nisu uspjeli. Ta terapija je djelotvorna u oko 80% slučajeva, a uz nju treba primjenjivati i liječenje antidepresivima. Psihoterapijske mjere potrebne su za dugotrajnu terapijsku vezu suradnje i podrške, jer je to obično važan aspekt liječenja svake depresije (Thaller i sur., 2004).

1.2.2. Shizofrenija

1.2.2.1. Definicija i epidemiologija

Shizofrenija je psihička bolest kod koje u akutnoj fazi postoje sumanute misli, halucinacije i poremećaji u brojnim psihičkim funkcijama. U mnogim slučajevima proces poprima kronični tijek te bolesnici žive uz rezidualne simptome i oštećeno socijalno funkcioniranje. Ova se bolest uvijek smatrala najozbiljnijom, najtežom i neizbježno stigmatizirajućom bolesti u psihijatriji. Zbog nje su bolesnici sve donedavna provodili čitav život u psihijatrijskim bolnicama. Danas se liječenje u bolnici provodi uglavnom za vrijeme akutne faze bolesti, a sve ostale terapijske aktivnosti čine dio izvanbolničkog programa. Bolest se najčešće javlja krajem adolescencije, a paranoidni se oblici mogu javljati i u srednjoj i starijoj životnoj dobi.

Srednja dob pojavljivanja bolesti u žena je 33 godine, a u muškaraca 28 godina. Učestalost obolijevanja po spolu je podjednaka (Thaller i sur., 2004).

1.2.2.2. Etiologija

Smatra se da su u etiologiju shizofrenije uključeni brojni biološki, psihološki i društveni čimbenici, koji se integriraju u opći neurorazvojni model. Po tom modelu tijekom razvoja, bilo u trudnoći ili poslije, dolazi do poremećaja u strukturi ili funkciji, što rezultira većom vulnerabilnošću jedinke prema shizofreniji. Klinička slika bolesti javlja se tek u mlađoj odrasloj dobi, ako na tako osjetljiviju ličnost djeluju biološki ili sociopsihološki stresni čimbenici. Genetičkim istraživanjima dokazano je da postoji genetska predispozicija za shizofreniju. U pojedinim je obiteljima dokazan poligeniski tip nasljeđivanja, dok je u drugima uočen jedan gen, ali s inkompletnom penetracijom. Još uvijek se ne može tvrditi sa sigurnošću da je lociran gen odgovoran za bolest na specifičnom kromosomu. O genetičkoj predispoziciji govori i povećanje učestalosti javljanja bolesti tijekom života u rođaka shizofrenog bolesnika. Interesantne su i studije na jednojajčanim blizancima koji su odgajani u različitim sredinama, odvojeni jedan od drugoga, ili su posvajanjem odvojeni od svojih bolesnih roditelja. Učestalost shizofrenije u njih je samo za nijansu manja nego bi bila u originalnim obiteljima, što je vrlo jak dokaz o utjecaju genetskih čimbenika na javljanje bolesti. Što se tiče neurokemijskih istraživanja, najšire prihvaćena biokemijska teorija jest „dopaminska hipoteza“. Dopamin je monoaminski neurotransmiter, sintetiziran iz L-tirozina preko L-dope. Najviše je koncentriran u tri moždana puta: nigrostrijarnom traktu, hipotalamičkom sustavu i mezolimbicnom sustavu. Najvažniji od njih u patologiji shizofrenije je mezolimbicni sustav, jer pojačana aktivnost dopamina u tom sustavu izaziva shizofreniju, što može biti posljedica ili povišene aktivnosti dopamina ili rezultat smanjenja utjecaja njegovih antagonista, kao što su GABA i acetilkolin. Za pojavu shizofrenije može biti odgovorna i povećana senzibilnost dopaminergičkih receptora. Svaka makroskopska promjena ili oštećenje moždanog tkiva može također prouzrokovati simptome slične shizofreniji. Činjenice koje podupiru tu tvrdnju jesu one u kojima je shizofrenija povezana s postojanjem: temporalne epilepsije u dominantnoj hemisferi, komplikacije i oštećenja mozga u porodu, porodi u zimskom razdoblju te virusne infekcije majke tijekom trudnoće (Thaller i sur., 2004).

1.2.2.3. Klinička slika

Početak bolesti može biti nagao ili postupan. Najčešći simptomi su iz područja mišljenja (sumanute ideje), poremećaji percepcije (halucinacije), poremećaji u osjećajnom životu te poremećaji volje i ponašanja. Oštećenja kognitivnih ili spoznajnih funkcija nalaze se samo u

kroničnim stanjima i vjerojatno su ishod dugotrajnog procesa bolesti. Međutim, ova oštećenja su sigurno i rezultat dugotrajnog boravka u bolnicama i sličnim institucijama, a neminovnim osiromašenjem životnih sadržaja i interakcija. Depresivno raspoloženje može se naći u 50% slučajeva, što je vjerojatno sastavni dio shizofrenog procesa, ali može biti i nuspojava liječenja antipsihoticima, te posljedica bolesnikova uvida u realnost postojanja teške i stigmatizirajuće bolesti. Simptomi shizofrenije se u širem smislu dijele na pozitivne i negativne. U pozitivne ubrajamo sumanute ideje i halucinacije, a u negativne osiromašenje mišljenja i govora, gubitak životne energije i inicijative, povlačenje iz socijalnih relacija i funkcija, usporenost, nebriga za sebe, gubitak samopoštovanja. Pozitivni simptomi dolaze do izražaja tijekom akutnih faza, oni obično dobro reagiraju na primjenu antipsihotika, a negativni simptomi ometaju uspješniju reintegraciju i funkcionalnost bolesnika u kroničnoj fazi bolesti i samo ograničeno na njih se može djelovati novijim, atipičnim antipsihoticima. Postoji i novija podjela simptoma na tri skupine koja podrazumijeva: simptome promjene i dezintegracije realiteta, simptome dezorganizacije funkcionalnosti ličnosti i simptome psihomotornog osiromašenja (Thaller i sur., 2004).

1.2.2.4. Postavljanje dijagnoze

Postavljanje dijagnoze shizofrenije još uvijek je opterećeno nedorečenostima i dvojabama, kao što su sljedeće: je li naziv shizofrenija rezerviran za stanja u kojima postoji trajni, rezidualni defekt, ili može biti upotrijebljen i za akutni psihotičan mah, koji je prošao bez ikakva ostatka; jesu li različiti klinički oblici shizofrenije varijante iste bolesti ili posebna stanja; treba li u shizofreniju uključiti i stanja bez pozitivnih simptoma; postoji li čvrsto razgraničenje između shizofrenije i afektivne psihoze (depresije). Kraepelin je još 1896. godine opisao bolest i dao joj ime *dementia praecox*, zbog ranog javljanja i loše prognoze. On ju je po lošoj prognozi razlikovao od manično-depresivne bolesti. E. Bleuler joj mijenja ime 1911. godine u „schizophrenia“ (shizofrenija, grč. *schizo* = cijepam + *fren* = duša, razum; označujući rascjep između mišljenja, emocija i ponašanja). Kao osnovni poremećaj smatra se gubitak asocijacija u misaonom tijeku, osiromašenje i neprimjerenost afekta, ambivalencija (pojava suprotnih osjećaja u isto vrijeme) i autizam, te određeni stalni defekt ličnosti. Kako se ti simptomi ne mogu precizno odrediti, u različitim ustanovama različito se dijagnosticira shizofrenija. Zadnjih godina ulažu se naponi u standardizaciju dijagnostičkog postupka. Predložen je niz različitih kriterija, no među njima ima malo podudarnosti. Stoga se očekivanja više okreću prema istraživanjima molekularne genetike i neurokemije. Mnoga stanja teško je razlikovati

od shizofrenije i do konkretne dijagnoze može se doći samo pozornom i temeljitom obradom, te promatranjem u duljem vremenskom periodu (Thaller i sur., 2004).

1.2.2.5. Liječenje

Liječenje se bazira na antipsihoticima prve linije, kao što su klorpromazin i haloperidol. Oni su djelotvorni u akutnoj fazi u 90% slučajeva, dovode do iščezavanja pozitivnih simptoma, i to u pravilu uslijedi tijekom četiri tjedna terapije. Uglavnom ih se može davati oralno, ali zbog negativizma i lošije suradnje s bolesnikom, nužna je parenteralna primjena. Bolesnici koji dobro reagiraju na lijek u prvoj psihotičnoj epizodi moraju uzimati lijekove i do godinu dana, uz postupno smanjivanje doze. Ako dolazi do čestih recidiva bolesti ili nepotpune remisije, onda se lijek mora primjenjivati vrlo dugo, ponekad i doživotno. Dugotrajno liječenje nosi sa sobom i ozbiljan rizik nuspojava, od kojih su najteže tardivna diskinezija, parkinsonizam i maligni neuroleptički sindrom. U slučaju depresivnog raspoloženja korisna je i primjena litija i antidepresiva uz antipsihotike, kao i primjena anksiolitika u početnim fazama terapije, ako je pacijent vrlo anksiozan, napet, psihomotorno uzbuđen. Primjena elektrokonvulzivne terapije još je uvijek vrlo diskutabilna, ali se većina terapeuta slaže da je nužna u slučajevima kad bolesnik ne reagira na primijenjenu medikamentnu terapiju, u slučajevima kad postoji i depresivna komponenta bolesti, ili kad je riječ o katatonom uzbuđenju koje se na drugi način ne može riješiti. Tu su i psihološke i socijalne aktivnosti, poput obiteljske terapije, te razne kognitivne i bihevioralne tehnike (Thaller i sur., 2004).

1.3. Povezanost BDNF-a sa psihičkim poremećajima

Psihički poremećaji jedne su od najtežih bolesti sadašnjice, jer na specifičan način onesposobljavaju čovjeka u vođenju normalnog funkcionalnog života i zbog toga predstavljaju veliki problem u društvu. Takve bolesti karakterizirane su neuroanatomskim i biokemijskim promjenama, te znanstvenici predlažu da uzrok tome može biti neadekvatan razvitak mozga tijekom ranog razvoja. Različite promjene u genskoj ekspresiji i/ili serumskoj razini specifičnih čimbenika rasta implicirane su u etiologiju, simptome i progresiju nekih psihičkih poremećaja. Pošto čimbenici rasta imaju veliki utjecaj i kontrolu nad stanicama u embrionalnoj i postnatalnoj fazi rasta, promjene u njihovoj ekspresiji mogu modificirati sam razvoj mozga. Takve rane promjene na mozgu kasnije se mogu vidjeti u neuroanatomskoj i biokemijskoj fluktuaciji. Galvez-Contreras i sur. ističu kako su promjene u čimbenicima rasta, poput BDNF-a, NGF-a, epidermalnog faktora rasta (EGF), neuregulina-1 (NRG-1), vaskularnog čimbenika rasta (VEGF), povezane s patogeneom i kliničkim manifestacijama nekih psihičkih poremećaja, poput shizofrenije, poremećaja raspoloženja, anksioznog

poremećaja i drugih. Prema tome, neke od tih signalnih molekula mogle bi biti korisne kao biomarkeri navedenih bolesti. Promjene u serumskoj koncentraciji čimbenika rasta posebice su povezane s progresijom i težinom bolesti. Studije su pokazale da NRG-1 može poslužiti kao relativno specifičan marker za shizofreniju. Osim što SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) NRG-1 gena pozitivno korelira sa smanjenom pažnjom i kognitivnim deficitom u shizofrenih pacijenata, također je dokazana smanjena koncentracija neuregulina-1 u plazmi kod pacijenata s prvom shizofrenom epizodom i s kroničnom shizofrenijom, dok se značajno smanjenje nije uočilo kod pacijenata s bipolarnim poremećajem i velikim depresivnim poremećajem (Galvez-Contreras i sur., 2016; Wang R i sur., 2015). S druge pak strane, kod pacijenata koji boluju od velikog depresivnog poremećaja uočeno je značajno smanjenje koncentracije NGF-a u usporedbi sa zdravim kontrolama. Postoji mogućnost da je interferon- γ (IFN- γ) kemijski posrednik koji dovodi do te redukcije, pošto je kod IFN- γ „knockout“ miševa došlo do razvoja anksioznosti i depresivnog ponašanja koje je povezano s redukcijom NGF-a. Također, smanjene razine NGF-a povezane su sa suicidalnim ponašanjem u bolesnika (Galvez-Contreras i sur., 2016). Na ovu tematiku postoji još puno istraživanja, no zbog kompleksnosti samog mozga, pa tako i psihičkih poremećaja, još je dugi put do konkretnih dokaza i primjene u praksi. U ovom radu pažnja će biti usmjerena na BDNF, kao jedan od mogućih biomarkera za shizofreniju i veliki depresivni poremećaj.

1.3.1. BDNF i veliki depresivni poremećaj

U zadnjih petnaestak godina pronalazi se sve više dokaza o značajnoj ulozi moždanog neurotrofnog čimbenika i njegovoj genskoj regulaciji u patofiziologiji depresije. Smanjene razine BDNF-a pronađene su u mozgu suicidalnih i depresivnih pacijenata, posebice u regijama hipokampusa, prefrontalnog korteksa i amigdale, koje su kod takvih bolesnika atrofirane. U krvi pacijenata koji boluju od depresije također je pronađena smanjena razina BDNF-a, a ona se može povisiti odgovarajućom antidepresivnom terapijom (Sakata, 2014). Postoje dokazi i o korelaciji niske razine ovog čimbenika sa psihotičnim simptomima, težinom kliničke manifestacije bolesti i trajanjem depresivnih epizoda, dok drugi autori ističu kako je visoka koncentracija BDNF-a povezana s težinom i trajanjem prve depresivne epizode (Galvez-Contreras i sur., 2016). Stres je potentan rizični čimbenik za depresiju, a povezan je s redukcijom BDNF-a, što je dokazano na životinjskim modelima i ljudima također. Uzrok takve povezanosti je u aktivaciji HHA-osi (hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlijezda). Stres aktivira HHA-os čime se pojačava sekrecija kortizola, a u visokim koncentracijama kortizol može suprimirati produkciju BDNF-a (Kimpton, 2012). BDNF ekspresija dobro je regulirana

preko najmanje devet promotora. Svaki od tih promotora regulira ekspresiju proteina specifično s obzirom na stanicu i regiju u kojoj se ona nalazi, te drugačije reagira na stres, neuronalnu aktivnost i antidepresivno liječenje. Stres reducira aktivnost BDNF promotora IV i VI preko epigenetskih procesa koji uključuju pojačanu metilaciju histona H3 na položaju 27 gdje je smješten lizin (H3K27). Takva metilacija rezultira smanjenom transkripcijom BDNF-gena. Promotor IV najbolje je proučavani promotor koji je ovisan o neuronalnoj aktivnosti. On reagira na neuronalnu aktivnost na način da pojačava transkripciju BDNF-a, posebice u korteksu i hipokampusu. Ova saznanja pridonose hipotezi o aktivnosti-ovisnoj ekspresiji BDNF-a. Povećana neuronalna aktivnost inducirana obogaćenom okolinom (fizička aktivnost, mentalna i senzorna stimulacija, socijalne interakcije) i/ili lijekovima, pozitivno regulira ekspresiju BDNF-a u hipokampusu i korteksu. To pak rezultira povećanom neuronalnom aktivnošću, čime se zatvara krug pozitivno-povratne sprege koji može održavati pozitivno stanje uma. Nasuprot tome, bilo kakvo ometanje ekspresije BDNF-a, epigenetskim procesima, stresom, smanjenom neuronalnom aktivnošću, dovelo bi do smanjenja same neuronalne aktivnosti, a time i do smanjenja o aktivnosti-ovisne BDNF ekspresije. Taj krug smanjene neuronalne aktivnosti i reducirane BDNF ekspresije može rezultirati depresijom (Sakata, 2014). Genetskom analizom dokazana je i značajnost SNP Val66Met BDNF gena. Ovaj polimorfizam negativno djeluje na pakiranje i sekreciju proteina. Neke studije upućuju na to da je ova genska promjena povezana s višim rizikom suicida, emocionalnom ranjivošću na stresan život i atrofijom prefrontalnog korteksa. Također se smatra da se ovim polimorfizmom može predvidjeti odgovor na terapiju i incidencija remisije, no postoje i kontradiktorni rezultati. Prema tome, uloga Val66Met polimorfizma u patofiziologiji depresije je kompleksna i vrlo vjerojatno uključuje i interakciju s drugim genetskim i okolišnim rizičnim čimbenicima (Galvez-Contreras i sur., 2016; Kimpton, 2012). Različiti oblici liječenja depresije (antidepresivi, EKT) povišuju razinu BDNF-a, a zabilježen je i direktan antidepresivan učinak BDNF-a infuzijom u hipokampus na životinjskim modelima. Antidepresivi djeluju na način da induciraju acetilaciju histona u promotorskim regijama BDNF gena, što dovodi do pojačane transkripcije i produkcije proteina. Osim toga, neki antidepresivi ubrzano pojačavaju fosforilaciju TrkB receptora u prefrontalnom korteksu i hipokampusu, već jedan sat nakon administracije lijeka. Taj proces ne odvija se indukcijom BDNF gena, već se fosforilacijom receptora aktiviraju signalne kaskade koje posljedično induciraju transkripciju gena uključenih u neurogenezu i rast neurona, uključujući indukciju ostalih čimbenika rasta kako i samog BDNF-a. Sve to na kraju rezultira pozitivnim neurotropnim učinkom. Studije su pokazale da je koncentracija BDNF-a u serumu i/ili plazmi

povišena kod bolesnika koji su na dugoročnoj terapiji antidepresivima, naspram onih koji ne primaju terapiju. Također, to povišenje ne događa se kod pacijenata koji su rezistentni na terapiju. Drugi pak dokazi upućuju na prediktivnu vrijednost BDNF-a u odgovoru na terapiju. Ako ne dođe do povišenja koncentracije u periferiji tijekom prvog tjedna terapije, znači da bolesnik vrlo vjerojatno neće reagirati na terapiju i neće ući u remisiju. Od značaja je i to da su kod suicidalnih depresivnih pacijenata pronađene značajno niže koncentracije BDNF-a u plazmi, nego kod onih koji nisu bili skloni suicidu. Prema tome, koncentracija BDNF-a u serumu ili plazmi može poslužiti kao marker za klinički odgovor na terapiju ili poboljšanje simptoma, ali ne koristi se u svrhu dijagnosticiranja depresije (Sakata, 2014; Lee i Kim, 2010).

1.3.2. BDNF i shizofrenija

U shizofrenih pacijenata utvrđena je redukcija koncentracije BDNF-a i NGF-a u cerebrospinalnoj tekućini već od prve psihotične epizode. *Post mortem* studijama dokazana je smanjena razina BDNF mRNA i proteina u prefrontalnom korteksu. Što se tiče periferne koncentracije BDNF-a, dosadašnja istraživanja pokazala su različite rezultate ovisno o vrsti biološkog uzorka koji je korišten (serum ili plazma), fazi bolesti, spolu te primjeni farmakoterapije. Unatoč tome, većina rezultata ide u prilog smanjenim razinama BDNF-a u serumu shizofrenih bolesnika, a neki također ukazuju na jasnu korelaciju s negativnim i katatonim simptomima. Već spomenuti Val66Met polimorfizam BDNF gena ima svoj učinak i kod shizofrenije. Negativnim utjecajem na ekspresiju proteina regulira transmisiju signala, sinaptičku lokalizaciju BDNF-a i grananje dendrita u hipokampusu. Time je ovaj SNP povezan s lošijom neurokognitivnom funkcijom, neuroticizmom i introverzijom kod shizofrenih pacijenata (Galvez-Contreras i sur., 2016). Suprotno većini istraživanja, Gama i sur. došli su do rezultata koji ukazuju na povišenu koncentraciju BDNF-a kod kronične shizofrenije. Povišena razina BDNF-a može biti znak kliničkog poboljšanja, a tome ide u prilog i to što su pacijenti uključeni u istraživanje bili u fazi remisije te su bolovali od shizofrenije već godinama. Značajni neurodegenerativni procesi možda su aktivniji u ranijoj fazi bolesti (5-10 godina), pa su takve povišene razine BDNF-a pronađene kod uznapredovale dugogodišnje shizofrenije ili rezultat reakcije na oštećeno tkivo, ili je kronična faza bolesti razdoblje smanjene metaboličke agresije prema mozgu. S obzirom na to, povišene razine BDNF-a mogu biti rezultat samog napredovanja shizofrenije, ili posljedica dugotrajne terapije antipsihoticima (Gama i sur., 2007). Za adekvatnu funkciju neurotrofina nije potrebno samo povisiti razinu BDNF-a, nego i prilagoditi udio funkcionalnog i skraćenog TrkB receptora.

Omjer ta dva oblika receptora može biti koristan indikator stvarnog funkcioniranja BDNF-a. Sukladno tome, povećanje funkcionalnog i smanjenje udjela skraćenog, nefunkcionalnog oblika receptora moguće je buduće terapijsko sredstvo s ciljem poboljšanja BDNF signalizacije u psihotičnih pacijenata. Istraživanje je pokazalo da bolesnici s povećanim udjelom funkcionalnog receptora bolje reagiraju na terapiju antipsihoticima (Martinez-Cengotitabengoa i sur., 2015). Pošto se kod čak 50% shizofrenih pacijenata mogu naći depresivni simptomi, proučavan je i odnos serumskih biomarkera i depresivnih simptoma kod shizofrenije. Depresivno raspoloženje kod shizofrenih bolesnika povezano je s dugim periodima hospitalizacije, slabim odgovorom na terapiju, lošim socijalnim i kognitivnim vještinama te visokom učestalosti relapsa. S obzirom na to da i depresija i shizofrenija uzrokuju redukciju razine BDNF-a, pretpostavka je bila da će njihova povezanost rezultirati još nižim razinama, no rezultati istraživanja ukazali su na suprotno. Iznenadujuće, osobe s težim depresivnim simptomima imale su više razine BDNF-a. Uzrok tome je opet ili kronična uznapredovala faza bolesti, ili visoka dnevna doza lijekova (Noto i sur., 2011). Zaključno, BDNF bi mogao koristiti kao biomarker kognitivnog deficita i kao prediktor kliničke prognoze kod shizofrenije, ali prilikom interpretacije rezultata mora se uzeti u obzir faza bolesti, terapija i drugi čimbenici koji utječu na njegovu koncentraciju.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je izmjeriti i usporediti koncentracije BDNF-a u serumu psihijatrijskih bolesnika oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja. Rijetki psihički poremećaji imaju specifičan dijagnostički laboratorijski test, pa tako i ova dva poremećaja koja se katkada veoma teško razlikuju te ih nije lako dijagnosticirati samo na temelju kliničkih simptoma i anamneze. Svrha ovog istraživanja je nastojanje da se pronađe objektivna molekula koja bi mogla pridonijeti lakšoj dijagnozi i probiru psihijatrijskih bolesnika. Moždani neurotrofni čimbenik dobar je kandidat, jer postoje brojni literaturni podaci koji pokazuju njegovu značajnu ulogu u patofiziologiji i shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja. Zbog tih razloga, korisno je istražiti mogući doprinos BDNF-a u diferencijalnoj dijagnostici tih dvaju poremećaja.

Opći ciljevi:

1. Izmjeriti koncentraciju BDNF-a u serumu pacijenata koji boluju od shizofrenije
2. Izmjeriti koncentraciju BDNF-a u serumu pacijenata koji boluju od velikog depresivnog poremećaja
3. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu te dvije skupine pacijenata

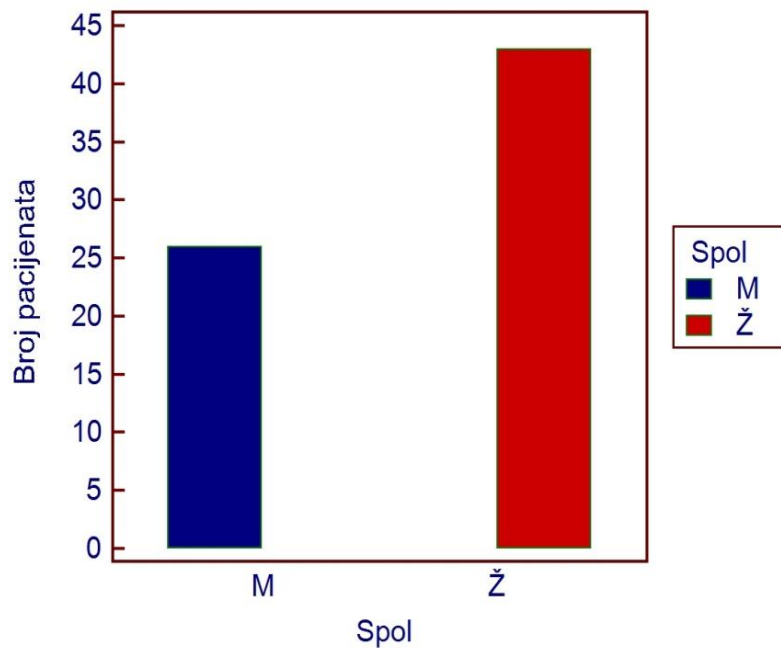
Specifični ciljevi:

1. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu muških i ženskih ispitanika
2. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu s obzirom na dob ispitanika
3. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu bolesnika koji nisu započeli farmakoterapiju (u daljnjem tekstu NeFarm bolesnici)
4. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu bolesnika koji su na farmakoterapiji (u daljnjem tekstu Farm bolesnici)
5. Usporediti koncentracije BDNF-a u serumu ispitanika s polimorfizmom SERT-a (serotoninski transporter)

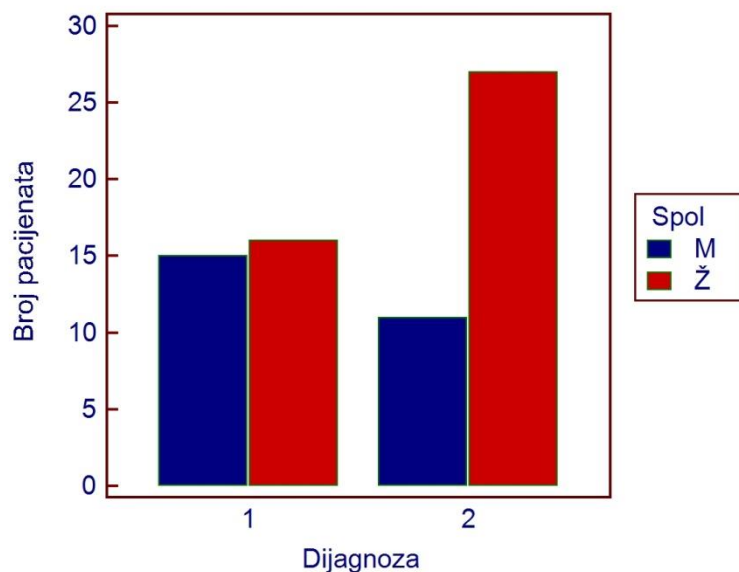
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i materijali

U istraživanje su bili uključeni pacijenti Klinike za psihijatriju KBC-a Sestre milosrdnice. Od ukupno 69 ispitanika, njih 31 boluje od velikog depresivnog poremećaja, a 38 od shizofrenije. Uključeni ispitanici različite su životne dobi (u rasponu od 19 do 80 god.), a pripadnost po spolu nije ujednačena (Slika 1.). Ženskih ispitanica (N = 43) značajno je više od muških ispitanika (N = 26) (Slika 2.). Jedini osobni podaci uzeti od ispitanika bili su dob i spol. Također je zabilježeno jesu li pojedini pacijenti tek zaprimljeni u bolnicu i do sad nisu bili na terapiji (NeFarm bolesnici), ili su već na terapiji (Farm bolesnici). Kod onih pacijenata kod kojih je već napravljena molekularna analiza polimorfizma SERT-a, napravljena je i usporedba koncentracije BDNF-a kod različitih genotipova. Uzorci seruma skupljali su se u više navrata kroz 2016. godinu te pohranili smrzavanjem. Datumi uzorkovanja i pohranjivanja uzoraka bili su sljedeći: 15. veljače 2016. skupljeno je 26 uzoraka, 5. srpnja 2016. 22 uzorka, 13. srpnja 2016. 3 uzorka i 4. listopada 2016. 18 uzoraka.



Slika 1. Podjela ispitanika prema spolu



Slika 2. Podjela ispitanika prema spolu i dijagnozi
(dijagnoza 1 - veliki depresivni poremećaj; dijagnoza 2 - shizofrenija)

Svim ispitanicima vađena je krv iz kubitalne vene, ujutro, natašte, 12 sati nakon zadnjeg obroka. Uzorkovanje venske krvi vršilo se u standardnim plastičnim serumskim epruvetama (Greiner Bio-one, Austrija) bez antikoagulansa. Nakon zgrušavanja, krv se centrifugirala na sobnoj temperaturi, uz centrifugalnu silu od 2000xg, 10 minuta. Odvojeni serum je potom alikvotiran u plastične mini epruvete (Eppendorf, Njemačka) volumena 1,5 mL te pohranjen u zamrzivač na -20°C do provođenja analize. Za analizu polimorfizma SERT ranije su uzimani uzorci krvi u epruvetama s EDTA antikoagulansom (Greiner Bio-one, Austrija) iz kojih je izolirana DNA iz leukocita.

3.2. Metode

3.2.1. Laboratorijske metode

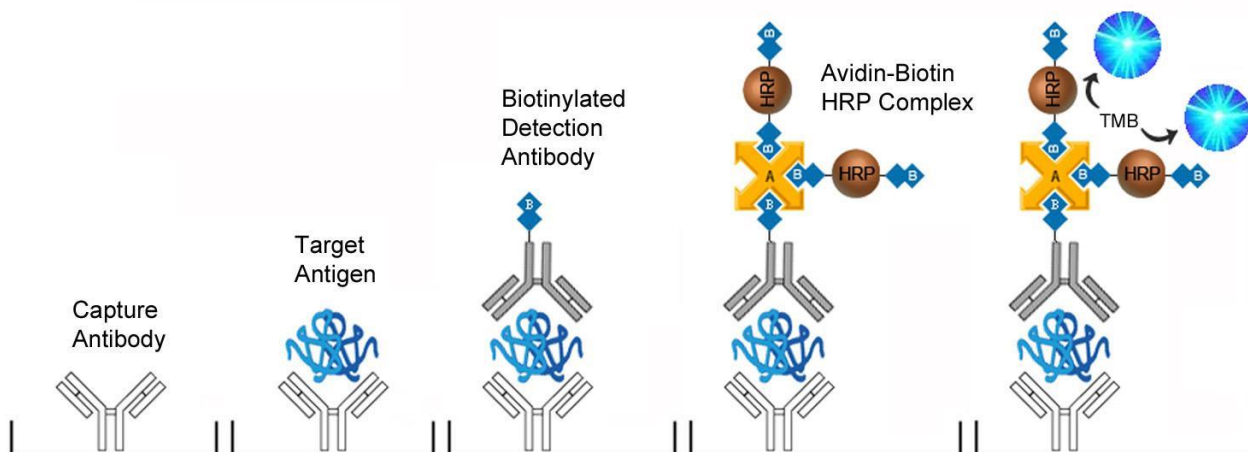
Načelo metode:

Koncentracija BDNF-a u serumu određena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom. ELISA je enzimoimunokemijska metoda koja se temelji na specifičnoj reakciji antigen-protutijelo. Karakterizira je osjetljivost, reproducibilnost i jednostavnost izvedbe. Nakon što nastane kompleks antigen-protutijelo, enzim kojim je obilježeno protutijelo katalizira reakciju u kojoj se supstrat prevodi u obojeni produkt te se mjeri intenzitet obojenja. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji antigena (Štraus i sur., 1997).

Reakcija se temelji na nekompetitivnom sendvič ELISA principu. Analit (antigen u pacijentovu uzorku) reagira s vezanim protutijelom vezanim za čvrstu fazu, pri čemu nastaje kompleks analit – protutijelo. Nakon ispiranja dodaje se obilježeno detekcijsko protutijelo (reagens enzimom obilježenog protutijela) u suvišku, koji reagira s prvim kompleksom. Tako nastaje sendvič (čvrsti nosač – vezano protutijelo – analit – detekcijsko protutijelo). Nakon ponovnog ispiranja i dodatka odgovarajućeg supstrata nastaje obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski (Dodig, 2015).

Određivanje koncentracije BDNF-a izvedeno je u Kliničkom zavodu za kemiju KBC-a Sestre milosrdnice, pomoću reagens kita tvrtke LifeSpan BioSciences, Inc., SAD.

Human BDNF ELISA Kit, odobren samo za istraživačke, a ne i za dijagnostičke svrhe, je reagens kit namijenjen za kvantitativno *in vitro* mjerenje koncentracije BDNF-a u serumu, plazmi i supernatantu staničnih kultura. Ovaj test funkcionira na sendvič ELISA principu. Na svih 96 jažica mikrotitarske pločice prethodno su imobilizirana specifična protutijela koja vežu BDNF. Pipetiranjem standarda i uzoraka u jažice, dolazi do vezanja BDNF-a iz uzoraka za imobilizirano protutijelo. Aspiracijom viška tekućine uklanja se nevezani antigen te se dodaje biotinizirano detekcijsko protutijelo koje se veže za vezani antigen. Nevezano biotinizirano protutijelo se ispire i dodaje se avidin-biotin-peroksidaza kompleks (ABC kompleks) koji se veže za biotin i služi za amplifikaciju signala, odnosno povećava osjetljivost reakcije. Ispire se nevezani ABC kompleks i dodaje se supstrat tetrametilbenzidin (TMB), koji stupa u reakciju s hren-peroksidazom te nastaje obojeni produkt plave boje. Dodatkom sumporne kiseline prekida se reakcija i plava boja odmah se pretvara u žutu. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Nepoznate koncentracije BDNF-a iz uzoraka određuju se pomoću kalibracijske krivulje načinjene koristeći poznate standarde. Vrijednosti apsorbancije uzoraka omogućuju određivanje koncentracije iz kalibracijske krivulje, gdje se uzorcima poznatih apsorbancija pridružuje odgovarajuća koncentracija.



Slika 3. Princip sendvič ELISA metode

(preuzeto sa: <https://www.lsbio.com>, pristupljeno: 9.8.2017.)

POSTUPAK:

1. Prije izvođenja analize potrebno je sve uzorke i reagensne termostatirati na sobnoj temperaturi, bez dodatnog zagrijavanja, te ih dobro promiješati (izbjegavati stvaranje mjehurića).
2. Dodati po 100 μL standarda ili uzorka u svaku jažicu mikrotitarske pločice, prekriti navlakom i inkubirati 90 minuta na 37°C .
3. Aspirirati tekućinu, ne ispirati.
4. Dodati po 100 μL otopine biotiniziranog detekcijskog protutijela, prekriti navlakom, nježno protresti i inkubirati 1 sat na 37°C .
5. Aspirirati i isprati 3 puta puferom za ispiranje. Dopustiti da svako pranje traje 1-2 minute prije ispiranja. Nakon zadnjeg pranja dobro aspirirati i istresti tekućinu.
6. Dodati po 100 μL otopine ABC kompleksa, prekriti navlakom i inkubirati pola sata na 37°C .
7. Aspirirati i isprati 5 puta, kako je opisano u 5. koraku.
8. Dodati po 90 μL TMB supstrata, prekriti navlakom i inkubirati 25-30 minuta na 37°C . Mikrotitarska pločica ovaj puta mora biti zaštićena od svjetla, te se prati promjena boje. Boja se razvija proporcionalno s količinom vezanog BDNF-a iz uzorka ili standarda. Otopina standarda s visokom koncentracijom antigena bit će jače plavo obojena.

9. Dodati po 100 μL otopine sumporne kiseline koja služi za zaustavljanje reakcije. Plava boja odmah prelazi u žutu. Ako se promjena boje ne odvija uniformno, lagano protresti mikrotitarsku pločicu. Kiselina se treba dodavati u jažice istim redoslijedom kao i supstrat.
10. Očitati apsorbanciju na automatskom čitaču mikrotitarske pločice, fotometrijski na 450 nm.

Prilikom rukovanja s uzorcima, pripreme standarda, reagensa, pufera za ispiranje i samog izvođenja analize treba se pridržavati uputa proizvođača koje su detaljno opisane u priručniku. Mjerno područje je od 31,2-2000 pg/mL, a osjetljivost je manja od 31,2 pg/mL. Koncentracije antigena u uzorcima okvirno trebaju biti poznate prije izvođenja analize, a ako ispadaju iz mjernog područja, uzorke je potrebno razrijediti u odgovarajućem omjeru. U ovom slučaju razrjeđivanje uzoraka nije bilo potrebno. Koncentracija BDNF-a u serumu izražava se u ng/mL.

3.2.2. Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2007, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v.12.5.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Korištenjem deskriptivne statistike dobiveni su podaci o aritmetičkoj sredini, njezinom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, varijanci, standardnoj devijaciji, medijanu i njegovom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, minimumu i maksimumu te interkvartilnom rasponu (25-75 P). Normalna distribucija podataka ispitivana je D'Agostino-Pearsonovim testom, na temelju kojeg se opredjeljujemo za parametrijske ili neparametrijske testove za uspoređivanje skupova podataka. Svi su rezultati interpretirani u odnosu na razinu značajnosti $P = 0,05$.

Za uspoređivanje varijabli koristio se u-test koji je inačica studentovog t-testa za nezavisne uzorke, samo što se u ovom slučaju ne razmatraju mali uzorci ($n \leq 30$), već veliki uzorci ($n > 30$). Studentov t-test za nezavisne uzorke uspoređivanjem aritmetičkih sredina dvaju uzoraka uspoređuje aritmetičke sredine (očekivanja) populacija iz kojih su uzorci odabrani. Razmatraju se uzorci čija je varijabla razdijeljena po zakonu normalne razdiobe, a pretpostavka je da su varijance populacija iz kojih su uzorci odabrani jednake, što se provjerava F-testom.

Za ispitivanje korelacije između varijabli koje su normalno distribuirane računao se Pearsonov koeficijent korelacije s pridruženom statističkom značajnosti P. Koeficijent korelacije može poprimiti vrijednost između -1 i 1, a što je ona bliža nuli, to je korelacija slabija. Ako se jedna varijabla povećava povećavanjem druge, korelacija će biti pozitivna, a ako se jedna varijabla smanjuje dok se druga povećava, korelacija će biti negativna. Koeficijent korelacije tumačen je prema Coltonu (Tablica 1.).

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu

Koeficijent korelacije (r)	Povezanost
0 do $\pm 0,25$	Nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	Slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	Umjereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do ± 1	Dobra do izvrsna povezanost

Za grafički prikaz rezultata koristili su se histogrami frekvencija (Slike 4. i 5.), dijagrami rasprostiranja (Slike 6. i 7.) te box and whisker dijagrami (Slike 8. do 11.). U box and whisker dijagramu centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartila, središnja zelena linija u kvadratu predstavlja medijan, narančasti kvadratić srednju vrijednost, a plava linija povezuje srednje vrijednosti različitih grupa ispitanika. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene *outside* vrijednosti, koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona, te *far out* vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

4.1.1. Deskriptivna statistika

Statistički obrađeni rezultati mjerenja u dvije skupine bolesnika, skupine koja boluje od velikog depresivnog poremećaja i skupine koja boluje od shizofrenije, prikazani su u tablicama 2 i 3. Opisani su parametri svakog statističkog skupa koji obuhvaćaju mjere centralne tendencije (aritmetičku sredinu, medijan, raspon između 25. i 75. percentila) i mjere rasipanja (varijanca i standardna devijacija). Uz to su prikazane minimalne i maksimalne vrijednosti varijabli te P-vrijednosti dobivene D'Agostino-Pearsonovim testom kojim je ispitana normalna distribucija podataka. Pošto su P-vrijednosti veće od nivoa signifikantnosti (0,05), znači da varijable (koncentracija BDNF-a i godine ispitanika) slijede Gaussovu normalnu razdiobu. Prema tome, opredjeljujemo se za parametrijsku statistiku za uspoređivanje skupova podataka. Raspodjela ispitanika prema dobi prikazana je na slikama 4 i 5, gdje se pomoću histograma frekvencija grafički prikazuje normalna razdioba podataka. Po zakonu normalne razdiobe također je raspodijeljena koncentracija BDNF-a kod Farm bolesnika, te pacijenata kojima je određen polimorfizam SERT-a, dok je NeFarm bolesnika bilo premalo da se statistički zaključi jesu li podaci normalno raspodijeljeni. U istraživanje je bilo uključeno 12 novih pacijenata oboljelih od shizofrenije i samo 4 nova pacijenta oboljela od velikog depresivnog poremećaja, te se zbog toga nije mogla provesti usporedba te grupe ispitanika.

Tablica 2. Podaci deskriptivne statistike za skupinu bolesnika s velikim depresivnim poremećajem

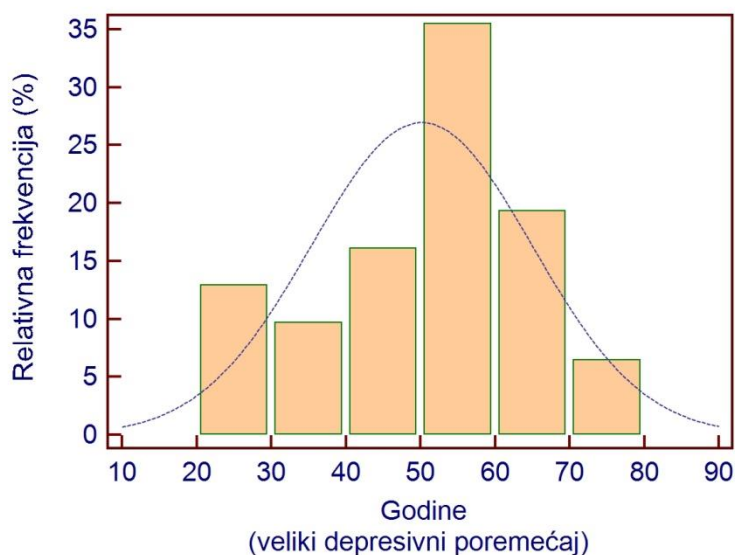
	N	\bar{x}	95% CI	σ^2	SD	M	95% CI	Min	Max	25 - 75 P	P
BDNF (ng/ml)	31	34,7	30,6 - 38,8	125,76	11,21	35,9	29,8 - 39,6	8,7	51,4	27,0 - 44,1	0,5563
Godine	31	50,2	44,7 - 55,6	219,01	14,80	53,0	47,0 - 58,4	21,0	75,0	44,3 - 59,8	0,3009

N - broj uzoraka (pacijenata) ; \bar{x} - aritmetička sredina; 95% CI - 95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan; σ^2 - varijanca; SD - standardna devijacija, M - medijan, Min - minimum, Max - maksimum, 25-75 P - raspon između 25. i 75. percentila, P - vjerojatnost normalne distribucije

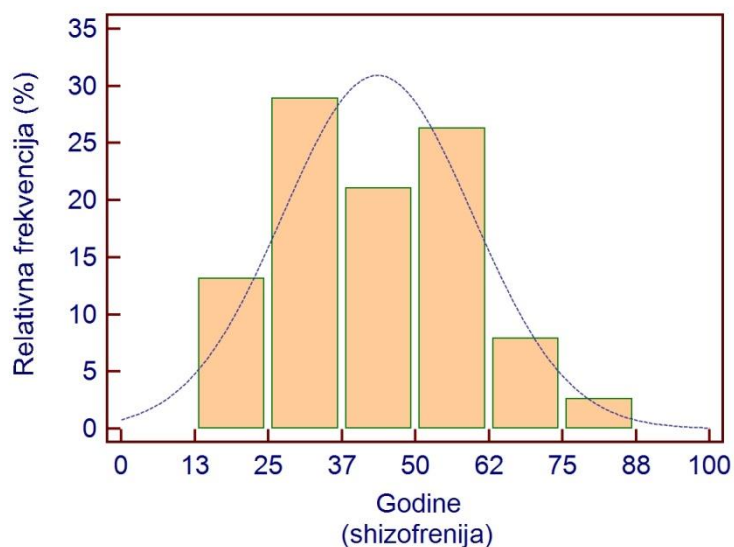
Tablica 3. Podaci deskriptivne statistike za skupinu bolesnika sa shizofrenijom

	N	\bar{x}	95% CI	σ^2	SD	M	95% CI	Min	Max	25 - 75 P	P
BDNF (ng/ml)	38	34,3	30,1 - 38,6	167,94	12,9	32,7	26,3 - 41,3	11,9	62,6	24,9 - 45,3	0,2688
Godine	38	43,6	38,3 - 48,9	259,82	16,1	39,5	35,5 - 51,5	19,0	80,0	31,0 - 58,0	0,3664

N - broj uzoraka (pacijenata) ; \bar{x} - aritmetička sredina; 95% CI - 95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan; σ^2 - varijanca; SD - standardna devijacija, M - medijan, Min - minimum, Max - maksimum, 25-75 P - raspon između 25. i 75. percentila, P - vjerojatnost normalne distribucije



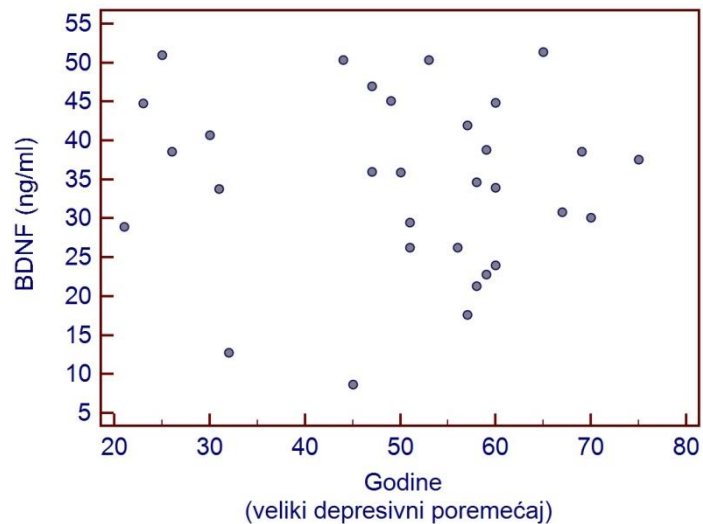
Slika 4. Raspodjela ispitanika oboljelih od velikog depresivnog poremećaja prema dobi



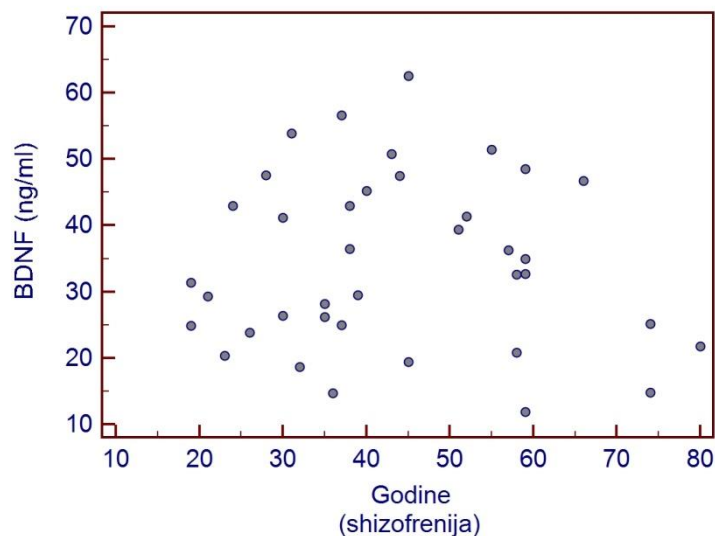
Slika 5. Raspodjela ispitanika oboljelih od shizofrenije prema dobi

4.1.2. Ispitivanje korelacije

Pearsonovim koeficijentom korelacije ispitivana je korelacija normalno distribuiranih varijabli, odnosno ispitivala se povezanost godina (starosti) i koncentracije BDNF-a. Rezultati su pokazali da nema značajne korelacije između tih dviju varijabli ni kod depresivnih ($r = -0,07379$; $P = 0,6932$), ni kod shizofrenih bolesnika ($r = -0,06586$; $P = 0,6944$). Ti rezultati prikazani su i grafički pomoću dijagrama rasprostiranja (Slike 6. i 7.).



Slika 6. Korelacija između koncentracije BDNF-a i starosti pacijenata oboljelih od velikog depresivnog poremećaja ($r = -0,07379$; $P = 0,6932$)

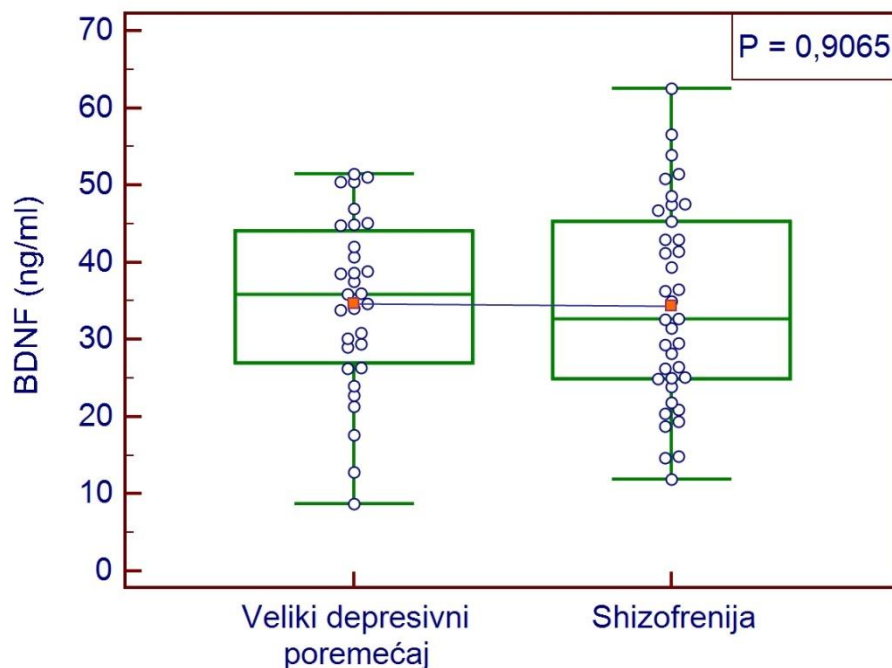


Slika 7. Korelacija između koncentracije BDNF-a i starosti pacijenata oboljelih od shizofrenije ($r = -0,06586$; $P = 0,6944$)

4.1.3. Statističko testiranje

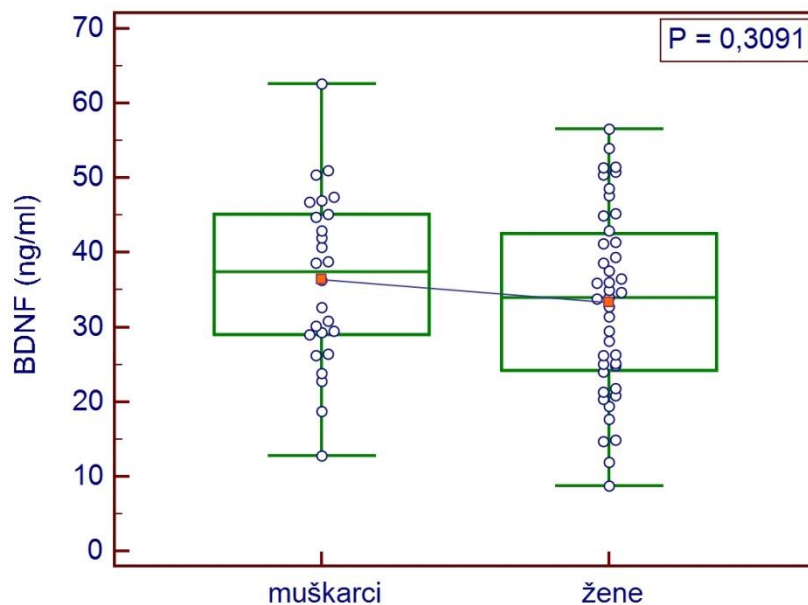
Dvostranim (dvosmjernim ili *two-tailed*) testom ispitivala se jednakost koncentracije BDNF-a kod različitih skupina ispitanika. Studentov t-test za nezavisne uzorke koristi se za testiranje hipoteze da je razlika između srednjih vrijednosti dva uzorka jednaka nuli (nul-hipoteza). Kada izračunavanjem test statistike dobijemo P-vrijednost koja je manja od 0,05, tada se odbacuje nul-hipoteza i zaključuje da se srednje vrijednosti značajno razlikuju. Dvostrani test koristi se kada razlika između srednjih vrijednosti može biti i pozitivna i negativna, odnosno srednja vrijednost jednog uzorka može biti veća ili manja od srednje vrijednosti drugog uzorka. Prije samog t-testa izvodi se F-test kojim se provjerava jesu li varijance uzoraka jednake. Ako je P-vrijednost F-testa manja od 0,05, varijance uzoraka nisu jednake te se treba koristiti t-test s korekcijom za nejednake varijance (Welch test).

Glavni cilj bila je usporedba koncentracije BDNF-a kod pacijenata oboljelih od velikog depresivnog poremećaja i pacijenata oboljelih od shizofrenije. P-vrijednost F-testa za ispitivanje jednakosti varijanci je 0,419, što znači da možemo pretpostaviti da su varijance uzoraka jednake te možemo nastaviti s t-testom. Dobivena P-vrijednost t-testa od 0,9065 nije manja od nivoa signifikantnosti, što znači da nema statistički značajne razlike između izmjerenih vrijednosti ove dvije skupine ispitanika (Slika 8.).

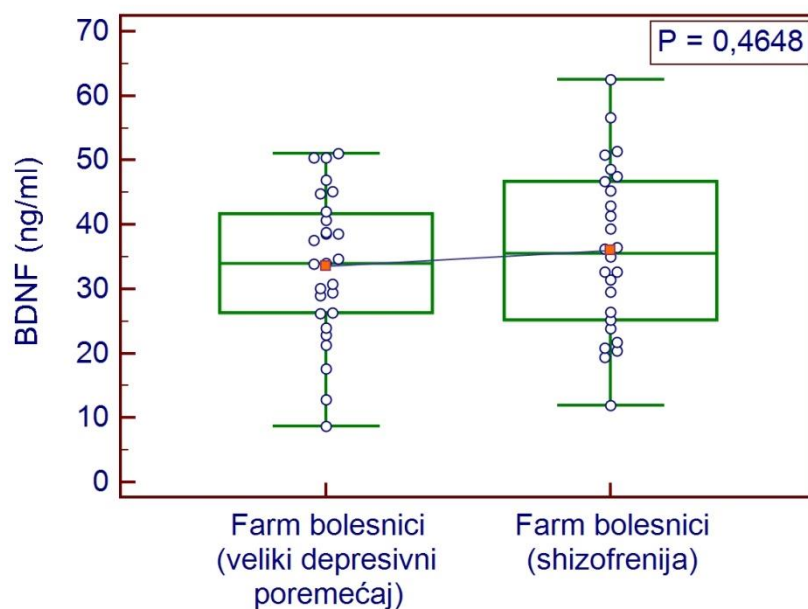


Slika 8. Usporedba koncentracije BDNF-a u serumu pacijenata oboljelih od velikog depresivnog poremećaja i pacijenata oboljelih od shizofrenije

Usporedbom dobivenih rezultata kod muškaraca i žena također nije dobivena statistički značajna razlika ($P = 0,3091$) (Slika 9.), kao ni usporedbom Farm bolesnika koji već primaju lijekove ($P = 0,4648$) (Slika 10.).

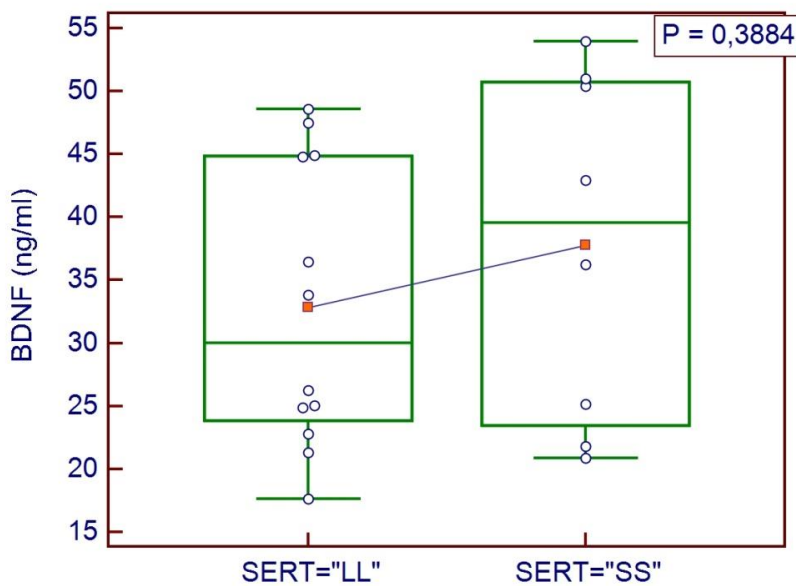


Slika 9. Usporedba koncentracije BDNF-a u serumu muških i ženskih ispitanika



Slika 10. Usporedba koncentracije BDNF-a u serumu Farm bolesnika koji već primaju lijekove

Nekim pacijentima već je u ranijem istraživanju bila napravljena molekularna analiza SERT-a, pa su ti podaci iskorišteni u svrhu provjere je li polimorfizam tog transportera povezan s različitom koncentracijom BDNF-a. Uspoređivani su pacijenti genotipa LL (homozigoti za L – *long* alel) i genotipa SS (homozigoti za S – *short* alel). Naoko, prema aritmetičkim sredinama i medijanu, dalo bi se zaključiti da je koncentracija BDNF-a nešto viša u pacijenata sa SS genotipom, no rezultati t-testa pokazali su da ta razlika nije statistički značajna ($P = 0,3884$) (Slika 11.).



Slika 11. Usporedba koncentracije BDNF-a u serumu pacijenata s različitim SERT genotipom

4.2. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nema značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u serumu pacijenata oboljelih od velikog depresivnog poremećaja i pacijenata oboljelih od shizofrenije. Drugim riječima, koncentracije su veoma slične u obje skupine pacijenata, što znači da u ovom pogledu određivanje BDNF-a nema diferencijalno dijagnostičku vrijednost. Redukcija BDNF-a u serumu i plazmi dokazana je kod pacijenata s depresijom (Lee i Kim, 2010) i shizofrenijom (Ikeda i sur., 2008), kao i kod mnogih drugih psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti: bipolarnog poremećaja (Palomino i sur., 2006), Huntingtonove bolesti (Ciammola i sur., 2007), Alzheimerove bolesti (Yasutake i sur., 2006) i autizma (Hashimoto i sur., 2006). To nam ukazuje da niska razina BDNF-a nije specifična za određeni psihički poremećaj, što bi moglo ograničiti uporabu određivanja koncentracije BDNF-a u serumu/plazmi kao specifičnog dijagnostičkog biljega. Zapravo bi serumska koncentracija BDNF-a mogla poslužiti kao biljeg neuropatološke osjetljivosti koja dovodi do različitih poremećaja.

Drugi problem predstavlja pitanje u kojoj mjeri uopće koncentracija BDNF-a u krvi (serumu ili plazmi) reflektira onu u mozgu. Unatoč tome što je dokazano da BDNF može prijeći krvno-moždanu barijeru saturabilnim transportnim sustavom visokog kapaciteta u oba smjera (Pan i sur., 1998) i unatoč pozitivnoj korelaciji koja je pronađena između serumskih i kortikalnih razina BDNF-a (Karege i sur., 2002), kao i između razina u krvi i hipokampusu (Klein i sur., 2011), još je uvijek nejasno u kojoj mjeri je ta korelacija točna, jer su ostala tkiva u periferiji također izvor BDNF-a. Zadnjih godina, BDNF je pronađen i u perifernom živčanom sustavu kao i ostalim organima, poput ovarija, pluća, srca i skeletnih mišića (Balkowiec i Katz, 2000). U krvi, BDNF je većinom pohranjen u trombocitima, ali se tamo ne sintetizira (Fujimura i sur., 2002; Pliego-Rivero i sur., 1997). Prema tome, također postoji i razlika u razinama BDNF-a u serumu i plazmi. U serumu je koncentracija nešto viša zbog otpuštanja iz trombocita tijekom zgrušavanja. Treba imati na umu da trombociti pohranjuju BDNF iz različitih izvora, pa tako i živčanih i endotelnih stanica, i time na neki način služe u regulaciji homeostaze pohranjujući BDNF za otpuštanje u periodima povećane potrebe (Fujimura i sur. 2002). Prema svemu navedenom, serumske razine BDNF-a vjerojatno predstavljaju integriranu kompoziciju iz različitih izvora i dinamika u promjenama tih razina ne mora biti usko povezana s onima u središnjem živčanom sustavu (Sartorius i sur., 2009).

Gledano s metodološkog aspekta, na rezultate ovog istraživanja mogla je utjecati i pohrana uzoraka. Studije su pokazale da je pohrana seruma, ali ne i pune krvi, na -20°C povezana sa značajnim smanjenjem koncentracije BDNF-a (Trajkovska i sur., 2007). Nepouzdanosti doprinosi i to što su se u svrhe ovog istraživanja uzorci skupljali u dužem vremenskom periodu u više navrata. Bus i sur. nedavno su utvrdili osam nezavisnih čimbenika koji utječu na koncentraciju BDNF-a: vrijeme uzimanja uzorka, period pohrane uzorka, konzumiranje hrane prije uzorkovanja, podrijetlo pacijenta, dob, spol, pušenje i konzumacija alkohola (Jevtović i sur., 2011).

Unatoč brojnim istraživanjima o uključenosti BDNF-a u patofiziologiju psihičkih poremećaja, malo je radova koji se bave temom usporedbe ove dvije skupine pacijenata. Mogući razlog tome je i to što se kod velikog broja shizofrenih pacijenata pojavljuje depresija kao komorbiditet, čime se te bolesti jako isprepliću te je teško zaključiti koja od te dvije bolesti zapravo utječe na razinu BDNF-a. Noto i sur. proveli su istraživanje na shizofrenim pacijentima sa i bez depresivnih simptoma uz pretpostavku da će kod pacijenata s depresivnim simptomima biti još niža koncentracija BDNF-a, pošto je dokazana redukcija kod obje bolesti. Zanimljivo, rezultati su se pokazali drugačijima, na što je vjerojatno utjecalo kronično stanje bolesnika i dugotrajna terapija u visokim dozama. To nam ukazuje na snažan utjecaj faze bolesti i terapije na rezultate.

Pošto usporedbom ova dva uzorka pacijenata nije pronađena razlika u razinama BDNF-a, sljedeće što se je uspoređivalo bile su razine BDNF-a kod muških i ženskih ispitanika, ne bi li pronašli razliku između te dvije skupine. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike između te dvije skupine ispitanika. Trajkovska i sur. svojim istraživanjem pokazali su da je koncentracija BDNF-a u punoj krvi značajno viša kod žena, nego kod muškaraca (Trajkovska i sur., 2007), dok druga istraživanja nisu pokazala značajnu razliku po spolu bilo u plazmi, bilo u serumu (Lommatzsch i sur., 2005; Ziegenhorn i sur., 2007). Također, serumske razine BDNF-a nisu bile normalno distribuirane, što znači da studije koje uključuju male uzorke pacijenata i koriste parametrijsku statistiku možda daju krive rezultate (Ziegenhorn i sur., 2007). Time i ovo istraživanje, koje isto tako uključuje manji broj pacijenata i pokazuje normalnu distribuciju varijabli gubi na važnosti, te se preporučuju daljnja istraživanja na većem broju pacijenata.

Zbog dokazanog utjecaja faze bolesti i terapije na rezultate, cilj je bio usporediti i serumske razine BDNF-a kod NeFarm i Farm bolesnika. Premali broj pacijenata koji su tek zaprimljeni

u bolnicu i nisu do sad bili na terapiji (NeFarm bolesnici) onemogućio je provedbu statističke analize, dok kod onih koji su već na terapiji (Farm bolesnici) nije pronađena statistički značajna razlika. Postoji mogućnost da terapija djeluje na način da balansira razine BDNF-a, pa je kod tih bolesnika teško uočiti razliku. Tome ide u prilog i više razine BDNF-a koje su dokazane kod dugogodišnjih bolesnika, te kod onih koji primaju visoku dnevnu dozu terapije (Gama i sur., 2007; Pedrini i sur., 2011). S druge pak strane, kod uključivanja onih pacijenata kojima je tek dijagnosticirana bolest teško je pravilno interpretirati rezultate, jer ne postoji sigurnost u to koliko dugo bolest već zapravo traje i koliko dugo takvi pacijenti čekaju prije nego se prvi puta obrate liječniku.

Kao i mnoge druge molekule u ljudskom tijelu, starenje smanjuje i razine BDNF-a. Zbog značajne uloge BDNF-a u razvoju mozga i pamćenju, s godinama kapacitet učenja i pamćenja slabi (<https://examinedexistence.com>). Unatoč tome, u ovom istraživanju kao i u većini prethodnih nije pronađena korelacija između starosti i koncentracije BDNF-a. Pacijenti uključeni u istraživanje su različite životne dobi i normalno distribuirani, no vjerojatno dob ne utječe u toj mjeri na razinu BDNF-a u periferiji da bi se pokazalo statistički značajnim.

Uspoređivanjem koncentracije BDNF-a kod pacijenata sa i bez polimorfizma serotoninskog transportera naoko se uočavala razlika, no nije se pokazala statistički značajnom. Ipak, vidljivo je da je kod osoba genotipa SS srednja vrijednost razine BDNF-a nešto viša, nego kod onih LL genotipa. S alel povezuje se sa smanjenom ekspresijom i funkcijom SERT-a, čime su osobe sa SS genotipom sklonije depresivnom i suicidalnom ponašanju, slabijem odgovoru na antidepresive i imaju veći potencijal za razvoj nuspojava. Zbog toga je bilo za očekivati da su kod tih pacijenata razine BDNF-a niže, no rezultati to nisu pokazali. Zaključujemo da je razlog tome ili terapija kojoj su ti pacijenti podvrgnuti, a koja povisuje razine BDNF-a, ili premali broj pacijenata uključenih u istraživanje (pacijenata s genotipom SS bilo je samo 8). Preporuka je ponoviti istraživanje na većem broju bolesnika kojima je određen polimorfizam SERT-a, uključujući i heterozigote, te kod takvih usporediti koncentracije BDNF-a.

Danas još uvijek ne postoje specifični biomarkeri za svaki pojedini psihijatrijski poremećaj, umjesto toga kombinacija različitih biomarkera za probir mogla bi koristiti u unaprjeđenju dijagnostike i kliničkog praćenja psihijatrijskih pacijenata. Trenutačni dokazi upućuju na to da kombinirani serološki probir koji uključuje EGF, FGF, NGF, IGF-1 i BDNF može poslužiti u kategorizaciji težine simptoma kod shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Na sličan način

NGF, IGF-1 i BDNF u kombinaciji mogu funkcionirati kao markeri težine simptoma kod velikog depresivnog poremećaja, dok EGF i eritropoetin (EPO) mogu koristiti zajedno u procjeni kliničkog poboljšanja (Galvez-Contreras i sur., 2016).

Iako ovim radom nije dokazana značajna razlika u koncentracijama BDNF-a kod bolesnika oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja, preporučuju se daljnja istraživanja u tom smjeru kako bi se pronašla objektivna molekula ili kombinacija njih, koja bi doprinijela lakšem probiru i dijagnostici psihijatrijskih bolesnika. Značajnost toga je i u samoj težini psihičkih poremećaja, koji predstavljaju veliki problem u društvu. Mnoge psihičke bolesti i poremećaji još se uvijek ne mogu jedinstveno etiološki ili patogenetski klasificirati, već se klasifikacija temelji na opisu karakterističnih simptoma i tijeka bolesti. Zbog niza različitih klasifikacijskih kriterija među kojima ima malo podudarnosti, danas se teži novim saznanjima u području molekularne genetike i neurokemije.

5. ZAKLJUČCI

1. Nije pronađena statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji BDNF-a između pacijenata oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja.
2. Ne postoji statistički značajna razlika između serumske koncentracije BDNF-a kod žena i kod muškaraca. Međutim, pripadnost po spolu nije ujednačena.
3. Nije pronađena povezanost između serumske koncentracije BDNF-a i životne dobi.
4. Nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u serumu Farm bolesnika koji se već liječe, zbog mogućeg utjecaja terapije.
5. Postoji razlika u serumskoj koncentraciji BDNF-a između pacijenata s genotipom SS i onih s LL genotipom za serotonininski transporter, ali nedovoljna da bi se statistički dokazala. Također, mali je broj ispitanika kojima je određen polimorfizam SERT-a.
6. Rezultati pokazuju da određivanje serumske koncentracije BDNF-a kod ove dvije skupine pacijenata nema diferencijalno dijagnostičku važnost, no preporučuje se ponoviti slično istraživanje na većem broju ispitanika i u bolje kontroliranim uvjetima.

6. LITERATURA

- Balkowiec A, Katz DM. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci*, 2000, 20: 7417–7423.
- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, 2004, 22(3): 123-131.
- Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L i sur. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144: 574-7.
- Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 151-152.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T i sur. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis & Haemostasis*, 2002, 87: 728–734.
- Galvez-Contreras AY, Campos-Ordonez T, Lopez-Virgenc V, Gomez-Plascencia J, Ramos-Zuniga R, Gonzalez-Perez O. Growth factors as clinical biomarkers of prognosis and diagnosis in psychiatric disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 32: 85-96.
- Gama CS, Andrezza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett*, 2007, 420: 45–48.
- Gass P, Hellweg R. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker for affective disorders?. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2010, 13: 1–4.
- Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y i sur. Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, 30: 1529-31.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev*, 2004, 45: 104-114.

Human BDNF ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F2402, radna uputa proizvođača Life Span Biosciences, SAD, 2016, <https://www.lsbio.com/elisakits/human-bdnf-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f2402/2402>, pristupljeno: 9.8.2017.

Ikeda Y, Yahata N, Ito I, Nagano M, Toyota T, Yoshikawa T i sur. Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor in patients with chronic schizophrenia. *Schizophr Res*, 2008, 101: 58-66.

Jevtović S, Karlović D, Mihaljević-Peješ A, Šerić V, Vrkić N, Jakšić N. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF): The severity and symptomatic dimensions of depression. *Psychiatr Danub*, 2011, 23: 363-369.

Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*, 2002, 328: 261–264.

Ke X, Ding Y, Xu K, He H, Zhang M, Wang D, Deng X, Zhang X, Zhou C, Liu Y, Ning Y, Fan N. Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor decreased in chronic ketamine abusers. *Drug Alcohol Depend*, 2014, 142: 290–294.

Kimpton J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. *Psychiatr Danub*, 2012, 24: 169-171.

Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011, 14: 347–353.

Koutsouleris N, Meisenzahl EM, Borgwardt S, Riecher-Rössler A, Frodl T, Kambitz J, Köhler Y, Falkai P, Möller HJ, Reiser M, Davatzikos C. Individualized differential diagnosis of schizophrenia and mood disorders using neuroanatomical biomarkers. *BRAIN*, 2015, 138: 2059–2073.

Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig*, 2010, 231-235.

Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K i sur. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*, 2005, 26: 115–123.

Major Depression (Unipolar Depression),

<https://www.psycom.net/depression.central.major.html#statistics>, pristupljeno: 9.8.2017.

Martinez-Cengotitabengoa M, MacDowell KS, Alberich S, Diaz FJ, Garcia-Bueno B, Rodriguez-Jimenez R, Bioque M, Berrocoso E, Parellada M, Lobo A, Saiz PA, Matute C, Bernardo M, Gonzalez-Pinto A, Leza JC, FLAMM-PEPs. BDNF and NGF Signalling in Early Phases of Psychosis: Relationship With Inflammation and Response to Antipsychotics After 1 Year. *Schizophr Bull*, 2016, 42: 142–151.

Murray PS, Holmes PV. An Overview of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Implications for Excitotoxic Vulnerability in the Hippocampus. *Int J Pept*, 2011, ID 654085.

Noto CS, Gadelha A, Belangero SI, Smith MAC, de Aguiar BW, Panizzuti B, Mari JdJ, Gamae CS, Bressana RA, Brietzke E. Association of biomarkers and depressive symptoms in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2011, 505: 282-285.

Önger ME, Delibas B, Türkmen AP, Erener E, Altunkaynak BZ, Kaplan S. The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug Discov Ther*, 2016, 10: 285-291.

Palomino A, Vallejo-Illarramendi A, González-Pinto A, Aldam A, González Gómez C, Mosquera F i sur. Decreased levels of plasma BDNF in first episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res*, 2006, 86: 321–322.

Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood–brain barrier. *Neuropharmacology*, 1998, 37: 1553–1561.

Pedrini M, Chendo I, Grande I, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS, Lersch C, Walz J, Kauer-Sant’anna M, Kapczinski F, Gama CS. Serum brain-derived neurotrophic factor and clozapine daily dose in patients with schizophrenia: a positive correlation. *Neurosci Lett*, 2011, 491: 207–210.

Pinheiro KAT, Pinheiro RT, Coelho FMdC, da Silva RA, Quevedo LA, Schwanz CC, Wiener CD, Manfro GG, Giovenardi M, Lucion AB, de Souza DO, Portela LV, Oses JP. Serum NGF, BDNF and IL-6 Levels in Postpartum Mothers As Predictors of Infant Development: The Influence of Affective Disorders. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94581.

- Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakoulopoulos X, Glover V i sur. Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54: 207–209.
- Sakata K. Brain-Derived Neurotrophic Factor for Depression Therapeutics. *Austin J Pharmacol Ther*, 2014, 2(1): 10.
- Sartorius A, Hellweg R, Litzke J, Vogt MA i sur. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry*, 2009, 42: 270–276.
- Schizophrenia, <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml>, pristupljeno 9.8.2017.
- Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb, Medicinska naklada, 1997, str. 176-177.
- Thaller V i sur. Psihijatrija – suvremene osnove za studente i praktičare. Zagreb, Naklada CSCAA, 2004, str. 76-108.
- Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P i sur. Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res Bull*, 2007, 73: 143–149.
- Wang R, Wang Y, Hu R, Chen X, Song M, Wang X. Decreased plasma levels of neureglin-1 in drug naïve patients and chronic patients with schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2015, 606: 220-4.
- What is BDNF and what does it do?, <https://examinedexistence.com/what-is-bdnf-and-what-does-it-do/>, pristupljeno: 9.8.2017.
- Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: Comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2006, 256: 402-6.
- Ziegenhorn AA, Schulte-Herbruggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M i sur. Serum neurotrophins – a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging*, 2007, 28: 1436–1445.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1. Sažetak

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) jest čimbenik rasta koji ima veliku ulogu u preživljavanju, rastu i diferencijaciji živčanih stanica u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Potiče neurogenezu i plastičnost neurona te ostale procese koji doprinose poboljšanoj funkciji hipokampusa, što ima veliki utjecaj na memoriju i učenje. Osim toga, ima značajan učinak na morfologiju dendrita i razvoj aksona. U zadnja tri desetljeća sve je veći broj dokaza o njegovoj uključenosti u patofiziologiju mnogih psihijatrijskih bolesti i poremećaja, pa tako i shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja. Snižene razine BDNF-a pronađene su u krvi pacijenata oboljelih od navedenih bolesti. Psihički poremećaji rezultat su genetskog nasljeđa i utjecaja okoline, te zbog svoje kompleksnosti predstavljaju veliki problem u društvu. Cilj ovog rada je izmjeriti i usporediti koncentracije BDNF-a u serumu psihijatrijskih bolesnika oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja, s nastojanjem da se pronađe objektivna molekula koja bi poslužila kao biomarker, te kako bi se istražio mogući doprinos BDNF-a u diferencijalnoj dijagnostici tih dvaju poremećaja. U istraživanje je bilo uključeno 69 pacijenata Klinike za psihijatriju KBC-a Sestre milosrdnice, od kojih 31 boluje od velikog depresivnog poremećaja, a 38 od shizofrenije. Ispitanici su različite životne dobi, a pripadnost po spolu je neujednačena (veći broj ženskih ispitanica). Koncentracija BDNF-a u serumu određena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom pomoću gotovog reagens kita, čija se reakcija temelji na nekompetitivnom sendvič principu. Statističkim računalnim programom (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) vršila se statistička obrada dobivenih podataka. Normalna distribucija varijabli ispitivana je D'Agostino-Pearsonovim testom, na temelju kojeg smo se opredijelili za parametrijske testove za uspoređivanje skupova podataka. Rezultati su pokazali da nema značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u serumu ove dvije skupine pacijenata, što bi značilo da u ovom pogledu određivanje BDNF-a nema diferencijalno dijagnostičku vrijednost. Osim toga, uspoređivane su i vrijednosti između muških i ženskih ispitanika, bolesnika koji su na terapiji (Farm bolesnici), bolesnika s određenim polimorfizmom SERT-a, te se ispitivala povezanost razine BDNF-a i dobi ispitanika. Ni jedno od ovih ispitivanja nije dalo statistički značajan rezultat. Unatoč tome, preporuka je ponoviti slično istraživanje na većem broju ispitanika i u bolje kontroliranim uvjetima.

7.2. Summary

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a growth factor, which has a major role in survival, growth and differentiation of neurons in central and peripheral nervous systems. Its positive influence on neurogenesis and neuronal plasticity has a big effect on learning and memory. Furthermore, BDNF was also recognised as a significant factor in the growth of axons and dendrite formation. Increasing evidence over the last three decades has indicated that the pathophysiology of many psychiatric diseases and disorders, including schizophrenia and major depressive disorder, involve brain-derived neurotrophic factor. Reduced BDNF levels have been observed in the blood of patients suffering from these diseases. Psychological disorders are a result of genetic and environmental influences, and due to their complexity they represent a big problem in society. The aim of this study is to measure and compare BDNF concentrations in serum of psychiatric patients suffering from schizophrenia and major depressive disorder, with the intention of finding an objective molecule that would serve as a biomarker, and to investigate the possible BDNF contribution to differential diagnosis of these two disorders. This study included 69 patients, of which 31 are suffering from major depressive disorder and 38 from schizophrenia, and which are treated at the Psychiatric Clinic of University Hospital Centre „Sestre milosrdnice“. Examinees differ by age and sex, but there are many more female participants. Serum BDNF concentration is determined by ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method using the ready-made reagent kit, in which the reaction is based on noncompetitive sandwich principle. A computer statistical program (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) was used for the statistical analysis. Normal distribution of variables was tested using D'Agostino-Pearson test, that lead us to using parametric testing for data comparison. The results have shown that there is no significant difference in the serum BDNF concentration in these two groups of patients, meaning that from this point of view, measuring BDNF levels has no differential diagnostic value. Beside that, the comparisons of values between male and female examinees, patients that are on therapy (Pharm patients), patients with determined SERT polymorphism have been done, and the correlation of BDNF levels and age has also been tested. Neither one of these investigations has given us a statistically significant result. Nevertheless, it would be of interest to further explore this issue on a larger sample size and in more controlled environmental conditions.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

ABC kompleks – avidin-biotin-peroksidaza kompleks

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

DSM – dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje

EGF – epidermalni faktor rasta

EKT – elektrokonvulzivna terapija

ELISA – enzimoimunokemijska metoda (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPO – eritropoetin

Farm bolesnici – bolesnici koji su na farmakoterapiji

FGF – čimbenik rasta fibroblasta

GABA – gamaaminomaslačna kiselina

HHA-os – os hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlijezda

HRP – hren-peroksidaza

IFN- γ – interferon gama

IGF-1 – čimbenik rasta sličan inzulinu

KBC – klinički bolnički centar

MAOI – inhibitori monoaminooksidaze

NeFarm bolesnici – bolesnici koji nisu započeli farmakoterapiju

NF- κ B – nuklearni faktor κ B

NGF – živčani čimbenik rasta (engl. *nerve growth factor*)

NRG-1 – neuregulin-1

NT-3 – neurotrofin-3

NT-4/5 – neurotrofin-4/5

PI3K – fosfatidil-inozitol-3-kinaza

PLC – fosfolipaza C

SERT – serotoniniski transporter

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SSRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

TMB – tetrametilbenzidin

TNF- α – faktor tumorske nekroze alfa

Trk – tropomiozin receptor-kinaza

VEGF – vaskularni čimbenik rasta

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

MOŽDANI NEUROTROFNI ČIMBENIK (BDNF) U PSIHIJATRIJSKIH BOLESNIKA OBOLJELIH OD SHIZOFRENIJE I VELIKOG DEPRESIVNOG POREMEĆAJA

Karolina Novački

SAŽETAK

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) jest čimbenik rasta koji ima veliku ulogu u preživljavanju, rastu i diferencijaciji živčanih stanica u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Potiče neurogenezu i plastičnost neurona te ostale procese koji doprinose poboljšanoj funkciji hipokampusa, što ima veliki utjecaj na memoriju i učenje. Osim toga, ima značajan učinak na morfologiju dendrita i razvoj aksona. U zadnja tri desetljeća sve je veći broj dokaza o njegovoj uključenosti u patofiziologiju mnogih psihijatrijskih bolesti i poremećaja, pa tako i shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja. Snižene razine BDNF-a pronađene su u krvi pacijenata oboljelih od navedenih bolesti. Psihički poremećaji rezultat su genetskog nasljeđa i utjecaja okoline, te zbog svoje kompleksnosti predstavljaju veliki problem u društvu. Cilj ovog rada je izmjeriti i usporediti koncentracije BDNF-a u serumu psihijatrijskih bolesnika oboljelih od shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja, s nastojanjem da se pronađe objektivna molekula koja bi poslužila kao biomarker, te kako bi se istražio mogući doprinos BDNF-a u diferencijalnoj dijagnostici tih dvaju poremećaja. U istraživanje je bilo uključeno 69 pacijenata Klinike za psihijatriju KBC-a Sestre milosrdnice, od kojih 31 boluje od velikog depresivnog poremećaja, a 38 od shizofrenije. Ispitanici su različite životne dobi, a pripadnost po spolu je neujednačena (veći broj ženskih ispitanica). Koncentracija BDNF-a u serumu određena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom pomoću gotovog reagens kita, čija se reakcija temelji na nekompetitivnom sendvič principu. Statističkim računalnim programom (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) vršila se statistička obrada dobivenih podataka. Normalna distribucija varijabli ispitivana je D'Agostino-Pearsonovim testom, na temelju kojeg smo se opredijelili za parametrijske testove za uspoređivanje skupova podataka. Rezultati su pokazali da nema značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u serumu ove dvije skupine pacijenata, što bi značilo da u ovom pogledu određivanje BDNF-a nema diferencijalno dijagnostičku vrijednost. Osim toga, uspoređivane su i vrijednosti između muških i ženskih ispitanika, bolesnika koji su na terapiji (Farm bolesnici), bolesnika s određenim polimorfizmom SERT-a, te se ispitivala povezanost razine BDNF-a i dobi ispitanika. Ni jedno od ovih ispitivanja nije dalo statistički značajan rezultat. Unatoč tome, preporuka je ponoviti slično istraživanje na većem broju ispitanika i u bolje kontroliranim uvjetima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: moždani neurotrofni čimbenik (BDNF), shizofrenija, veliki depresivni poremećaj, biomarker, diferencijalna dijagnostika

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) IN PSYCHIATRIC PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA AND MAJOR DEPRESSIVE DISORDER

Karolina Novački

SUMMARY

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a growth factor, which has a major role in survival, growth and differentiation of neurons in central and peripheral nervous systems. Its positive influence on neurogenesis and neuronal plasticity has a big effect on learning and memory. Furthermore, BDNF was also recognised as a significant factor in the growth of axons and dendrite formation. Increasing evidence over the last three decades has indicated that the pathophysiology of many psychiatric diseases and disorders, including schizophrenia and major depressive disorder, involve brain-derived neurotrophic factor. Reduced BDNF levels have been observed in the blood of patients suffering from these diseases. Psychological disorders are a result of genetic and environmental influences, and due to their complexity they represent a big problem in society. The aim of this study is to measure and compare BDNF concentrations in serum of psychiatric patients suffering from schizophrenia and major depressive disorder, with the intention of finding an objective molecule that would serve as a biomarker, and to investigate the possible BDNF contribution to differential diagnosis of these two disorders. This study included 69 patients, of which 31 are suffering from major depressive disorder and 38 from schizophrenia, and which are treated at the Psychiatric Clinic of University Hospital Centre „Sestre milosrdnice“. Examinees differ by age and sex, but there are many more female participants. Serum BDNF concentration is determined by ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method using the ready-made reagent kit, in which the reaction is based on noncompetitive sandwich principle. A computer statistical program (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) was used for the statistical analysis. Normal distribution of variables was tested using D'Agostino-Pearson test, that lead us to using parametric testing for data comparison. The results have shown that there is no significant difference in the serum BDNF concentration in these two groups of patients, meaning that from this point of view, measuring BDNF levels has no differential diagnostic value. Beside that, the comparisons of values between male and female examinees, patients that are on therapy (Pharm patients), patients with determined SERT polymorphism have been done, and the correlation of BDNF levels and age has also been tested. Neither one of these investigations has given us a statistically significant result. Nevertheless, it would be of interest to further explore this issue on a larger sample size and in more controlled environmental conditions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 11 figures, 3 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), schizophrenia, major depressive disorder, biological marker, differential diagnosis

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.