

Povezanost Val66Met i C270T polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) i koncentracije BDNF-a u plazmi s depresijom, težinom simptoma i odgovorom na terapiju

Crneković, Juraj

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:968411>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

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



Juraj Crneković

**Povezanost Val66Met i C270T polimorfizama
gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)
i koncentracije BDNF-a u plazmi s depresijom,
težinom simptoma i odgovorom na terapiju**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za molekularnu medicinu u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Švob Štrac i komentorstvom prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

Od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Dubravki Švob Štrac na velikoj i nesebičnoj pomoći pri izradi ovoga rada. Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na usmjeravanju i pomoći kod pisanja. Veliko hvala dr. sc. Luciji Tudor i dr. sc. Matei Nikolac Perković na pomoći i ugodnom razgovoru tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mojoj obitelji na pomoći i potpori tijekom obrazovanja, a prijateljima i najboljem V2 na odličnom društvu. Zbog vas sve vježbe su prošle brže, a svaki ispit se položio lakše.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Veliki depresivni poremećaj	1
1.1.1. Patofiziologija depresije	4
1.1.2. Liječenje depresije	6
1.2. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)	12
1.2.1. BDNF na periferiji	15
1.3. BDNF u depresiji	17
1.3.1. Polimorfizmi gena <i>BDNF</i>	18
2. Obrazloženje teme	22
3. Materijali i metode	23
3.1. Zdravi ispitanici	23
3.2. Ispitanici s depresijom	23
3.3. Etički aspekti istraživanja	24
3.4. Prikupljanje sociodemografskih i kliničkih podataka	24
3.5. Procjena težine simptoma depresije	24
3.6. Obrada uzoraka krvi	24
3.6.1. Postupak izdvajanja plazme siromašne trombocitima iz uzoraka pune krvi	25
3.6.2. Izdvajanje genomske DNA iz krvi	26
3.7. Genotipizacija polimorfizama <i>BDNF</i> gena	28
3.8. Određivanje koncentracije BDNF-a u plazmi	31
3.9. Statistička obrada podataka	34
4. Rezultati i rasprava	35
4.1. Demografski i klinički podaci ispitanika	35
4.2. Koncentracija BDNF-a u plazmi	40
4.3. <i>BDNF</i> Val66Met polimorfizam	43
4.4. <i>BDNF</i> C270T polimorfizam	51
5. Zaključci	56
6. Popis kratica, oznaka i simbola	57
7. Literatura	60
8. Sažetak	65
9. Prilozi	67

1. Uvod

1.1 Veliki depresivni poremećaj

Veliki depresivni poremećaj (MDD, engl. *major depressive disorder*) je poremećaj raspoloženja karakteriziran simptomima depresivnog raspoloženja, gubitka interesa i uživanja te smanjenja energije i umora, koji uzrokuje značajnu nesposobnost normalnog svakodnevnog funkcioniranja pojedinca. Depresiji se pridružuju i ostali simptomi koji uključuju oslabljenu koncentraciju i pažnju, smanjeno samopouzdanje i samopoštovanje, osjećaj bezvrijednosti ili prekomjerne i neprikladne krivnje i bespomoćnosti, sumorne i pesimistične poglede na budućnost, ponavljajuća razmišljanja o samoozljeđivanju, smrti ili suicidu, promjene u apetitu i spavanju, psihomotornu agitaciju ili retardaciju, te smanjene energije i umor. S depresijom se povezuju određene sociodemografske karakteristike poput nižeg stupnja obrazovanja, češće maloljetničke trudnoće, bračnih problema, lošije kvalitete braka, nestabilnog zaposlenja, neuspjeha na poslu, nižih primanja kao i povišen rizik od raznih sekundarnih bolesti te rani mortalitet zbog fizičkih poremećaja i suicida (Kessler i Bromet, 2013; Svjetska zdravstvena organizacija, 2019).

Razlikujemo depresivne epizode (MDE, engl. *major depressive episode*) od velikog depresivnog poremećaja (MDD) zbog potencijalno različite etiologije. Depresivne epizode se javljaju u depresiji, ali su moguće i u drugim bolestima poput bipolarnog poremećaja gdje su značajno perzistentnije nego kod ne bipolarne depresije (Kessler i Bromet, 2013). Depresivna epizoda karakterizirana je periodom depresivnog raspoloženja ili smanjenog interesa za svakodnevne aktivnosti kroz period od dva tjedna. Depresivne epizode se mogu dalje podijeliti ovisno o tome imaju li simptome aksioznosti (6A80.0), panične napadaje (6A80.1), ako su perzistentne (6A80.2), ako imaju melankolične simptome poput anhedonije, terminalne insomnije itd. (6A80.3) i ako imaju sezonalna obilježja (6A80.4). Ostali depresivni poremećaji povezani s trudnoćom klasificiraju se zasebno. Dijagnoze velikog depresivnog poremećaja podjeljene su prema tome je li dijagnosticirana prva depresivna epizoda ili su depresivne epizode ponavljane. Obije osnovne podjele zatim imaju sedam dodatnih podjela ovisno o težini depresivne epizode, prisutnosti psihotičnih simptoma i remisijskom stanju (Mimica i sur., 2004; Svjetska zdravstvena organizacija, 2019).

Psihijatrijske bolesti predstavljaju 22,8 % globalnog tereta bolesti od kojih najveći utjecaj ima depresija s najznačajnijim godinama života prilagođenim za nesposobnost (DALY, engl.

disability-adjusted life years) od svih mentalnih i neuroloških bolesti kao i od svih poremećaja ovisnosti (Collins i sur., 2011; Cipriani i sur., 2018). Životni rizik morbidnosti, koji predstavlja izračun spojenih informacija životne prevalencije i predviđanja budućih pojava depresije, iznosi 29,9 %, dvanaestomjesečna prevalencija iznosi 8,6 %, dok doživotna prevalencija iznosi 16,6 %, što čini depresiju jednom on najprevalentnijih bolesti. Dob početka depresije ima relativno ravnomjernu raspodjelu u svim dobnim skupinama čime se značajno razlikuje od većine mentalnih poremećaja koji se češće javljaju u ranijoj životnoj dobi (Kessler i sur., 2012). Ukupni broj osoba oboljelih od depresije iznosi oko 350 milijuna ljudi u svijetu koji, uz sniženi standard življena uzrokovan bolešću, samo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) dovode do oko 210 milijardi dolara troškova godišnje (Cipriani i sur., 2018). Dob početka prve depresivne epizode je najvjerojatnija u ranim i srednjim dvadesetim godinama života uz veoma široku raspodjelu te značajnu vjerojatnost nastanka i u kasnoj adolescenciji ili u kasnijoj odrasloj dobi. Incidencija depresivnih poremećaja poput MDD-a je viša u razvijenim zemljama pa je bolest dobila i naziv „bolest obilja“ (Kessler i Bromet, 2013). Većina mentalnih poremećaja uključuje razvojne procese tako da intervencija u najranijim mogućim stadijima osigurava najbolji mogući ishod. Stoga bi systemske intervencije za pomoć najosjetljivijima trebale predstavljati primarnu zaštitu oboljelih od daljnjeg pogoršanja bolesti (Collins i sur., 2010). Studije koje su tijekom 3 godine pratile premorbidne biljege depresije u populacijskom uzorku nedepresivnih pojedinaca pokazale su da ženski spol, niža razina obrazovanja, manja društvena potpora, financijski problemi i loše epizodno pamćenje upućuju na povišeni rizik nastanka depresije (McIntyre i sur, 2013). Većina psihijatrijskih poremećaja je češća kod žena nego kod muškaraca (Kessler i sur., 2012). Žene pokazuju dvostruko veći rizik od depresije nego muškarci, a rizik se povezuje s određenim sociodemografskim karakteristikama poput razvedenog bračnog statusa, iako prevalencija depresije uglavnom pada s dobi (Kessler i Bromet, 2013). Simptomatologija depresije različita je između spolova te trenutni dijagnostički kriteriji mogu dovesti do češćih neispravnih dijagnoza u muškaraca. Naime, muškarci češće pokazuju simptome poput ljutnje, iritabilnosti i simptomatskog korištenja supstanci, dok žene češće pate od hipersomnije, povučenosti i motoričkih problema. Novije studije upućuju da, ako se uzmu u obzir i kriteriji češći kod muškaraca, razlike u učestalosti depresije između spolova više nisu značajne (Kaufman i sur., 2016).

Sama depresija opisana je na različite načine, ali većina pristupa ne opisuje dobro sve simptome koji se mogu javiti tijekom bolesti, dok su mnogi simptomi međusobno oprečni. Zbog takve

heterogenosti same bolesti razmatraju se opisi koji se ne osnivaju na sindromima već se bolest proučava kao neprimjerena prilagodba na prijašnja iskustva i stres. Takvom shvaćanju pridonosi poznavanje često oprečnih vegetativnih simptoma (smanjeni apetit i nesanica kod nekih, a pojačani apetit i hipersomnija kod drugih pacijanata). Slično, i psihomotorna retardacija i agitacija, obje se mogu naći kod istog pacijenta u različitim razdobljima. Zbog tako različite simptomatologije depresiju je bolje promatrati kao kroničan doživljaj tuge uvjetovan različitim povijesnim i okolišnim čimbenicima (Kanter i sur., 2008). Značajni problem koji se javlja u depresiji su kognitivni poremećaji koji uglavnom uključuju probleme s koncentracijom i odlučivanjem te pojavom negativne pristranosti pri interpretaciji društvenih događaja. Kognitivni deficiti su konzistentni, ponovljivi, nespecifični i klinički značajni te imaju mali do srednji učinak na simptome depresije (McIntyre i sur., 2013).

Težina depresije određuje se primjenom različitih ljestvica za ocjenjivanje težine depresije. Ljestvice poput Hamiltonove ocjenske ljestvice za depresiju (HAMD, engl. *Hamilton Depression Rating Scale*) i Montgomery-Åsbergove ocjenske ljestvice za depresiju (MADRS, engl. *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*) često se koriste za procjenu simptoma depresivnih bolesnika. Psihijatrijske ocjenske ljestvice slične su psihologijskim testovima, ali su jednostavnije za primjenu zato što u većini slučajeva ne zahtijevaju norme i interpretaciju psihologa (Mimica i sur., 2004).

HAMD ljestvica spada među najupotrebljivije skale za depresiju i često se koristi za procjenu rezultata liječenja. HAMD ljestvicu dijelimo na HAMD-21 i HAMD-17 kod kojih broj označava broj pitanja u upitniku, pri čemu se verzija sa 17 pitanja češće upotrebljava. Duža HAMD-21 verzija osim 17 pitanja kojima se procjenjuje težina depresije ima i dodatna 4 pitanja kojima se određuje tip depresije. Ljestvica primarno određuje glavne simptome depresije: depresivno raspoloženje, osjećaj krivnje i suicidalne tendencije. Težina simptoma određuje se prema konačnom zbroju bodova koji se za HAMD-17 ljestvicu klasificira kao blaga depresija ukoliko je zbroj između 8 i 18 bodova, srednje teška depresiju ukoliko je zbroj između 18 i 25 bodova ili teška depresija za vrijednosti zbroja iznad 25 bodova (Hamilton, 1960; Mimica i sur., 2004). Ljestvica se nalazi u Prilogu 1.

MADRS ljestvica razvila se kasnije te joj je cilj bio odrediti promjene simptoma depresije. MADRS ljestvica je osjetljivija na promjene te se zato češće koristi u farmakološkim studijama i za praćenje učinka antidepressivne terapije. Prednost prema HAMD ljestvici pokazuje u praćenju odgovora na farmakoterapiju i bolje obuhvaća atipične simptome depresije, dok

HAMD ljestvica bolje prati vegetativne simptome (Hamilton, 1960). Razvijena je iz CPRS (engl. *Comprehensive Psychopathological Rating Scale*) ljestvice koja se sastojala od 65 pitanja. MADRS ljestvica se sastoji od 10 pitanja u kojima se prisutnost svakog simptoma ocjenjuje s brojevima od 1 do 6. Pitanja uključuju samo dijagnostički najznačajnije parametre kako bi ljestvica imala odgovarajuću osjetljivost (Montgomery i Asberg, 1979). Dio istraživanja koristi MADRS ljestvicu zbog bolje dosljednosti od ostalih ljestvica za depresiju. (Buttenschøn i sur., 2015) Zbroj bodova na ljestvici ukazuje na blagu depresiju za vrijednosti između 7 i 19 bodova, srednje tešku depresiju za vrijednosti između 20 i 34 bodova i tešku depresiju za vrijednosti iznad 35 bodova (Montgomery i Asberg, 1979; Mimica i sur., 2004). Ljestvica se nalazi u Prilogu 2.

1.1.1. Patofiziologija depresije

Patofiziologija MDD-a pokušava se objasniti pomoću više različitih teorija, ali niti jedna ne uspijeva objasniti sve simptome depresije. Neurokemijske promjene su nađene kod većine oboljelih te su definirane kao posljedice nenormalne funkcije odgovarajućih neuralnih mreža (McIntyre i sur., 2013). Utvrđeno je da se rizik za razvoj depresije može genetski naslijediti od roditelja sklonih depresiji. Mehanističkim istraživanjima bolesti otkriveno je više mogućih puteva nastanka depresije, koji uključuju poremećaj neurotransmisije, disregulaciju osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA, engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), disfunkciju neurotrofnih čimbenika, neuroinflamacija, metaboličke poremećaje te disregulacija mikrobioma (Tian i sur., 2022).

Genetska podloga

Depresiju je teško istraživati zbog nedostatka jasnog konsenzusa o neuropatologiji, kao i nedostatka rijetkih obiteljskih genetskih uzročnika ili prevalentnih gena koji bi upućivali na visok rizik oboljenja. Prijašnja istraživanja pojedinih gena u depresiji često pokazuju značajnu genetsku podlogu na relativno malim uzorcima, ali njih često nije moguće replicirati. S druge strane, cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS, engl. *genome wide association studies*), koje se provode na velikom broju uzoraka, često ne nalaze značajnu povezanost pojedinih genskih polimorfizama s kompleksnim bolestima poput depresije, zbog stroge korekcije za višestruka testiranja, nejasnih kriterija za dijagnozu depresije, značajne heterogenosti bolesti i utjecaja brojnih okolišnih čimbenika, poput raznolikih stresora, koji utječu na epigenetičku plastičnost. Stoga do sada većina istraživanih gena ne pokazuje jaku povezanost s rizikom

razvoja depresije već predstavlja potencijalan dio kompleksne patofiziologije depresije (Krishnan i Nestler, 2010; Border i sur., 2019).

Istraživani modeli depresije upućuju na postojanje genetske podloge u razvoju depresivnog poremećaja, no utvrđen je jači utjecaj okolišnih čimbenika na patofiziologiju depresije, osim u najtežim slučajevima (Kanter i sur., 2008). Procjenjuje se da se depresija nasljeđuje u oko 40 % slučajeva, te su istraživani različiti geni kandidati, poput gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, engl. *brain-derived neurotrophic factor*), gvanin nukleotid-vezajući protein-3 (GNB3) i metilen tetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), čija je povezanost s depresijom potvrđena u meta-analizama. Nadalje, GWAS su otkrile mnoge nove potencijalne mete poput gena za protein piccolo (presinaptički terminalni neuralni protein) ili metabotropni glutamatni receptor-7 (GRM7), koji se trebaju potvrditi na animalnim modelima (Krishnan i Nestler, 2010).

Poremećaji neurotransmisije

Monoaminska hipoteza je najstarija hipoteza koja je nastojala objasniti patofiziologiju depresije. Iako se u depresiji uglavnom proučavao serotoninški sustav, poznata je uključenost i ostalih monoaminskih neurotransmitera kao što su noradrenalin, dopamin, melatonin i drugi (Tian i sur., 2022). Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) regulira mnoge fiziološke procese poput tjelesne temperature, sna, apetita, boli i motorne aktivnosti, ali i ostale moždane funkcije poput kognicije i raspoloženja. Raširena raspodjela serotoninških neurona omogućuje regulaciju procesa koji zahtijevaju koordinaciju različitih dijelova mozga. Veliki broj serotoninških neurona u hipokampusu i prefrontalnom korteksu povezuje se s učenjem i pamćenjem, kao i procesima prostorne navigacije, radne memorije, pažnje, donošenja odluka i formiranja društvenih veza. Receptori za serotonin podijeljeni su u 7 skupina koji se razlikuju u strukturi, djelovanju i lokalizaciji. Svi 5-HT receptori su receptori povezani s G proteinima koji utječu na unutarstanične mehanizme, osim 5-HT₃ receptora koji su o ligandu ovisni ionski kanali (Švob Štrac i sur., 2016).

Neurotrofni čimbenici

Nakon opsežnih studija pokazalo se da promjene u neurotransmisiji nisu dovoljne kako bi se objasnile sve promjene koje nalazimo u depresiji. Tijekom potrage za novim mogućim mehanizmima patofiziologije depresije, teorije o neuralnoj plastičnosti i deficitima neurotrofnih čimbenika, posebice BDNF-a, pokazale su se kao mogući odgovor. Uočeno je smanjeno hipokampalno BDNF signaliziranje u određenim stanjima vezanim za depresiju, antidepressivni

učinak eksperimentalno povišenog hipokampalnog BDNF-a i smanjene koncentracije hipokampalnog BDNF-a u *post-mortem* uzorcima depresivnih pacijenata (Krishnan i Nestler, 2010). Ranije spomenuti premorbidni biljeg loše epizodne memorije upućuje na povezanost abnormalnosti hipokampalne memorije koja je u značajnoj mjeri kontrolirana BDNF-om i kliničke pojave depresije (McIntyre i sur, 2013). Osim neurotrofina i drugi čimbenici rasta bi mogli biti uključeni u depresiju poput čimbenika rasta fibroblasta (FGF, engl. *fibroblast growth factor*), vaskularnog endotelialnog čimbenika rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) i vaskularnog faktora rasta (VGF, engl. *vascular growth factor*). Modulacijom signaliziranja stresa ovi čimbenici rasta se povezuju sa smanjenom hipokampalnom neurogenezom, atrofijskim promjenama i kognitivnom i hipokampalnom atrofijom. No, neurogeneza i ostale neurotrofne promjene poput dendritičke proliferacije i maturacije regulirani su najviše pomoću neurotrofnih čimbenika poput BDNF-a, ali i neuralnog čimbenika rasta (NGF, engl. *nerve growth factor*), neurotrofina-3 (NT-3), i neurotrofina-4/5 (NT-4/5). Razumijevanje funkcija ostalih čimbenika rasta predstavlja nova moguća područja istraživanja uključujući ekstrapokampalno trofično signaliziranje i ostale unutarstanične signalne puteve koji bi mogli imati farmakoterapijsku primjenu (Krishnan i Nestler, 2010).

1.1.2. Liječenje depresije

Prva linija liječenja depresije uključuje primjenu farmakoterapije i nefarmakološke terapije. Nefarmakološke terapije su kompleksne multikomponentne intervencije za liječenje depresije koje uključuju kognitivno bihevioralnu terapiju, neuropatsku terapiju, biološku terapiju, psihoterapiju, fizičku aktivnost kao i druge intervencije. Neinvazivne stimulacije mozga poput Izravne transkranijalne stimulacije strujama i transkranijalne magnetske stimulacije također se koriste za liječenje depresije. Nefarmakološke terapije smanjuju simptome depresije uz poboljšani učinak antidepresiva kod srednje do teške depresije i smanjenje relapsa bolesti nakon liječenja. Nefarmakološka terapija se može koristiti kao monoterapija kod subkliničke do srednje teške depresije, a koristi se ovisno o mogućnostima i potrebama pacijenta. Relativna učinkovitost nefarmakoloških intervencija nešto je niža od farmakološke terapije, s manje dokaza o učinkovitosti kliničkog odgovora i remisije, ali uz manje nuspojave od terapije antidepresivima (Farah i sur., 2016; Irwin i sur., 2023).

Antidepresivi su raznolika skupina lijekova koja se koristi za liječenje depresije te se mogu podijeliti u više grupa kao što su triciklički antidepresivi (TCA, engl. *tricyclic antidepressants*), inhibitori monoamino oksidaze (MAOI, engl. *monoamine oxidase inhibitors*), selektivni

inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI, engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*), inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (SNRI, engl. *serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors*), antagoniste 5-HT₂ receptora i inhibitore ponovne pohrane serotonina (SARI, engl. *serotonin antagonist and reuptake inhibitors*), inhibitore ponovne pohrane noradrenalina i dopamina (NDRI, engl. *norepinephrine and dopamine reuptake inhibitors*), noradrenalinske i specifične serotonergičke antidepresive (NaSSA, engl. *noradrenaline and specific serotonergic antidepressants*) i multimodalne antidepresive (MMA, engl. *multimodal agent*). Glavna primarna aktivnost antidepresiva povezuje se s inhibicijom transporta ili metabolizmom neurotransmitera ili s njihovim djelovanjem na pojedine receptore (Tian i sur., 2022).

Prva linija liječenja su selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI) i inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (SNRI) koji su bili među prvim lijekovima za psihijatrijske bolesti. Inhibicijom ponovnog unosa monoamina, primarno 5-HT, u presinaptički neuron povećava se koncentracija monoaminskih neurotransmitera unutar sinaptičke pukotine čime postižu antidepresivni učinak modulacijom različitih procesa u središnjem živčanom sustavu (Dale i sur., 2015). Među mogućim pozitivnim učincima psihotropnih lijekova spada i aktivacija BDNF-om posredovanog signaliziranja, a time i svi lijekovi s djelovanjem na neurotrofinski sustav, bilo izravno ili neizravno, mogu imati antidepresivni učinak (Boulle i sur., 2012). Novi antidepresivi ciljaju djelovati na više sustava istovremeno kao što su antidepresivi koji istovremeno djeluju i na serotoninske receptore i na prijenosnike (transportere) ili antidepresivi koji inhibiraju više prijenosnika istovremeno (Bang-Andersen i sur., 2011; Dale i sur., 2015).

Biokemijski učinak antidepresivi postižu za nekoliko minuta do sati, no klinički antidepresivni učinak postiže se tek nakon nekoliko tjedana. Tako velika razlika između biokemijske aktivnosti i kliničkog učinka ukazuje na postojanje nekog sporog događaja ili procesa potrebnog za nastanak antidepresivnog učinka. Jedan od mogućih događaja koji bi odgovarali ovom opisu je neuralna plastičnost. Smatra se da antidepresivni lijekovi poboljšavaju plastičnost u dijelovima mozga što omogućava reprogramiranje neuralnih mreža koje su dovele do nastanka depresije (Casarotto i sur., 2022). Neuralna plastičnost je regulirana na mnogo razina, uključujući i epigenetičke modifikacije *BDNF* gena poput regulacije njegove transkripcije. Epigenetičke promjene dovode do značajnih kliničkih promjena koje mogu dovesti do razvoja patofizioloških stanja uključujući i depresiju. Postoje naznake da

antidepresivi, uz to što djeluju na pojedine receptore ili prijenosnike, značajno utječu i na epigenetičke modifikacije u neuronima (Boulle i sur., 2012; Björkholm i Monteggia, 2016). Učinak antidepresiva na neurotrofinski sustav može se uočiti i na periferiji, gdje dolazi do normalizacije koncentracije BDNF-a u plazmi kod depresivnih bolesnika nakon dugotrajne terapije (Sagud i sur., 2016; Buttenschøn i sur., 2015).

Ostali mogući mehanizmi koji objašnjavaju odgođeno djelovanje antidepresiva uključuju moguću potrebu za akumulacijom mikromolarnih koncentracija u središnjem živčanom sustavu koja omogućuje vezanje za tropomiozin receptor kinaza B (engl. *tropomyosin receptor kinase B*, TrkB) receptore za koje se veže BDNF i poticanje plastičnosti koja dovodi do olakšanja simptoma depresije. Smatra se da alosteričkim vezanjem za TrkB receptor antidepresivi povećavaju osjetljivost receptora na prisutnost BDNF-a, a time i vjerojatnost vezanja BDNF-a na receptor (Casarotto i sur., 2022).

Nakon terapije antidepresivima oko 50 % oboljelih od depresije doživi značajno smanjenje simptoma, dok oko 33 % svih slučajeva depresije predstavlja rezistentnu depresiju koja se dijagnosticira ako su se barem dvije terapije različitim antidepresivima pokazale neučinkovitima (Tian i sur., 2022). Nakon četiri terapije antidepresivima prosječna kumulativna remisija iznosi samo 56 % (Dale i sur., 2015).

Najčešća nuspojava većine antidepresiva je mučnina uz pojavu nesanice, pojačanog znojenja, umora, ali su moguće i teže nuspojave poput produljenja tzv. QT intervala, seksualne disfunkcije ili pojačanih suicidalnih misli (Kirino, 2012). Zamjena SSRI-a s vortiokestinom može biti korisna kod dijela pacijenata koja ima seksualnu disfunkciju kao nuspojavu antidepresivne terapije (Jacobsen i sur., 2015).

Nekoliko domena kognitivne funkcije smanjeno je tijekom simptomatske depresije kao i tijekom remisije, kao što su izvršne funkcije, pažnja, memorija, brzina procesuiranja i psihomotorne sposobnosti. Meta-analiza Rosenblata i sur. (2015) pokazala je da u kognitivnoj disfunkciji koja se javlja za vrijeme remisije antidepresivi imaju pozitivan učinak na memoriju i na psihomotornu brzinu pri čemu su najveći utjecaj imali vortiooksetin i duloksetin, dok je vortiooksetin imao najjači učinak na psihomotornu brzinu, kao i na izvršnu i kognitivnu kontrolu.

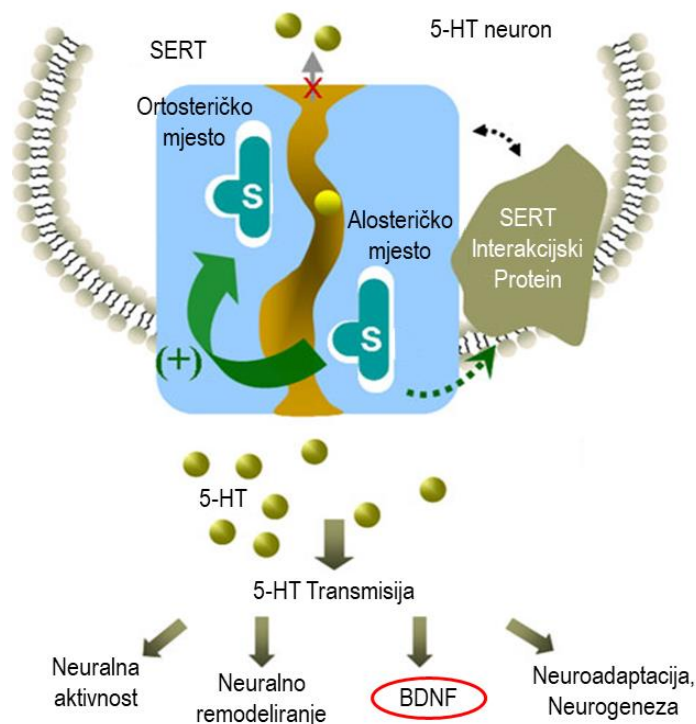
Terapija depresije može, osim antidepresiva, koristiti i adjuvantnu terapiju poput atipičnih antipsihotika koji djeluju na mezolimbicko dopaminergičko signaliziranje, a koje je pojačano kod depresije i poremećaja ovisnosti (Dale i sur., 2015). Naime, pokazano je da kod miševa

podložnih depresiji dolazi do pojačane aktivnosti ventralnog tegmentalnog područja i pojačanog oslobađanja BDNF-a (Krishnan i Nestler, 2010). S druge strane, infuzija BDNF-a izravno u srednji mozak štakora, koji je bogat dopaminergičkim neuronima, dovodi do pojačanog lučenja serotonina i noradrenalina u više dijelova mozga i posljedično do antidepresivnog učinka (Youssef i sur., 2018).

Vortiooksetin i escitalopram, antidepresivi istraživani u ovom radu, pokazuju veću učinkovitost i bolju podnošljivost od ostalih antidepresiva. Zbog boljeg učinka i smanjenog broja nuspojava ovi se lijekovi povezuju s boljim kliničkim ishodima (Cipriani i sur., 2018).

Escitalopram

Escitalopram spada među najkorištenije antidepresive zbog relativno boljeg odgovora na terapiju uz minimalno prekidanje terapije (Cipriani i sur., 2018). Ovaj antidepresiv, odobren 2001. godine, pripada u farmakoterapijskoj skupini psihoanaleptika te je selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina (SSRI). Koristi se za liječenje MDD-a i anksioznih poremećaja (MediateLy, 2022).



Slika 1. Model antidepresivnog djelovanja inhibitora prijenosnika serotonina (SERT). SERT prenosi serotonin iz sinapse natrag u presinaptički neuron. Escitalopram (S) inhibira ponovni unos serotonina što dovodi do pojačane serotoninske transmisije koja potiče neuralne promjene kao i otpuštanje BDNF-a. (Preuzeto i prilagođeno iz Zhong i sur., 2012)

Uobičajena dnevna doza iznosi 10 mg jednom dnevno, s time da se doza može povećati maksimalno do 20 mg dnevno. Antidepresivni odgovor postiže se za 2 do 4 tjedna. Nakon povlačenja simptoma potrebno je liječenje tijekom najmanje 6 mjeseci radi konsolidacije antidepresivnog odgovora. Djelotvornost escitaloprama dokazana je u periodu od 8 tjedana u tri od četiri dvostruko slijepe, placebo kontrolirane kliničke studije uz potvrdu smanjenja pojave relapsa u skupini koja je nastavila uzimanje escitaloprama (Mediatelly, 2022). Potencijal pojave interakcije escitaloprama je nizak uz odgovarajuću tolerabilnost i relativno blage i privremene nuspojave, najčešće mučnine, nesаницe i pojačanog znojenja. Simptomi ustezanja nakon prekida terapije su blaži nego kod ostalih antidepresiva. Zbog svih navedenih pozitivnih karakteristika escitalopram je dobro prihvaćen kod pacijenata uz visoki kontinuitet terapije (Kirino, 2012).

Escitalopram se veže sa slabim afinitetom za mnoge receptore, ali svoje glavne kliničke učinke postiže vezanjem za serotoninski prijenosnik (serotoninski transporter, SERT). Veže se visoko selektivno s visokim afinitetom i ovisno o dozi za primarno ortosteričko vezno mjesto na SERT-u koje dovodi do inhibicije transporta 5-HT te s 1000 puta slabijim afinitetom za alosteričko mjesto SERT-a za koje se smatra da stabilizira i produljuje vrijeme vezanja escitaloprama na primarnom mjestu (Slika 1.) (Kirino, 2012). Inhibicijom SERT-a povećava se koncentracija 5-HT u sinapsi što dovodi do pojačane serotonergičke transmisije koja se smatra odgovornom za antidepresivno djelovanje. Modulacijom serotonina escitalopram djeluje neizravno i na druge neurotransmitterske sustave poput dopaminskog i glutamatnog sustava. Smatra se da escitalopram dovodi do jake inhibicije SERT-a što omogućuje dovoljno visoke razine 5-HT-a za desenzitizaciju 5-HT_{1A} autoreceptora, a time i veću učinkovitost i brži početak neuroadaptivnog djelovanja i otpuštanje BDNF-a. Neurogeneza se značajno povećava već nakon 2 tjedna terapije (Zhong i sur., 2012; Mediatelly, 2022).

Vortioksetin

Vortioksetin, odobren 2014. godine, spada u farmakoterapijsku skupinu psihoanaleptika te postiže svoj antidepresivni učinak izravnom modulacijom aktivnosti serotoninskih receptora i inhibicijom prijenosnika serotonina (SERT) (Dale i sur., 2015; Mediatelly, 2022).

Vortioksetin je u predkliničkim ispitivanjima pokazao značajni antidepresivni i anksiolitički učinak na animalnim modelima prisilnog testa plivanja i testa suspenzije repa kao i u testovima društvenih interakcija i paradigmi uvjetovanog straha (Bang-Andersen i sur., 2011), uz povećanje kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja (Dale i sur., 2015; Mediatelly, 2022). Naime,

vortioksetin djeluje i na kognitivne simptome uz poboljšanje dijela simptoma procesorske memorije (McIntyre i sur., 2013). Djelotvornost vortioksetina dokazana je i smanjenjem simptoma bolesnika na MADRS i HAMD ljestvicama u dvostruko slijepim, placebom kontroliranim kliničkim studijama u trajanju od 6 i 8 tjedana (Mediatelly, 2022).

Početna doza vortioksetina je 10 mg jednom dnevno kod odraslih osoba mlađih od 65 godina. Ovisno o individualnom odgovoru bolesnika, doza se može povećati do maksimalno 20 mg ili smanjiti na minimalno 5 mg vortioksetina jednom dnevno. Nakon povlačenja depresivnih simptoma preporučuje se nastavak liječenja u trajanju od najmanje 6 mjeseci radi konsolidacije antidepresivnog odgovora (Mediatelly, 2022).

Vortioksetin je ciljano razvijen kao blokator ionskih kanala ovisnih o ligandu (5-HT₃ receptor) i prijenosnika za serotonin (SERT), te kao aktivator receptora povezanih s G proteinima (5-HT_{1A} receptor). Razvoj ovakvih multimodalnih lijekova (lijekovi koji djeluju na dvije mete iz različitih ciljnih skupina) omogućuje aditivne i sinergističke učinke (Dale i sur., 2015).

Vortioksetin djeluje kao antagonist za serotoninse receptore 5-HT₃, 5-HT₇, 5-HT_{1D}, kao djelomični agonist receptora 5-HT_{1B}, kao agonist receptora 5-HT_{1A}, te inhibira SERT. Osim djelovanja na navedene mete, vortioksetin ima i blagi učinak na veliki broj ostalih receptora, ali se smatra da terapijske doze nisu dovoljno velike da bi se putem njih postigao značajni učinak. Inhibicija SERT-a vortioksetinom značajno je manja od ostalih SSRI-a te pri terapijskim dozama iznosi oko 40%. Unatoč nižoj inhibiciji SERT-a vortioksetin postiže antidepresivni učinak preko kompleksnog učinka na mnoge 5-HT receptore (Sagud i sur., 2016). Zbog tako kompleksnog djelovanja na živčani sustav, učinak vortioksetina je značajno brži od djelovanja SSRI-a (Bang-Andersen i sur., 2011; Švob Štrac i sur., 2016). Djelovanjem na navedene 5-HT receptore i SERT, vortioksetin modulira neurotransmisiju ne samo serotoninuskog sustava, već time posredno i aktivnost noradrenalinuskog, dopaminskog, histaminskog, acetilkolinuskog, GABA i glutamatnog sustava (Dale i sur., 2015; Švob Štrac i sur., 2016).

Istovremeni učinak na SERT i na 5-HT_{1A} receptor uzrokuje brzu desenzitizaciju somatodendritičkih 5-HT_{1A} autoreceptora uz istovremenu aktivaciju postsinaptičkih 5-HT_{1A} heteroreceptora dovodeći do jačih antidepresivnih i anksiolitičkih učinaka (Bang-Andersen i sur., 2011; Kaufman i sur., 2016). Naime, desenzitizacijom, a time i inhibicijom, presinaptičkih 5-HT_{1A} receptora omogućuje se značajno jače izlučivanje 5-HT koje stariji antidepresivi nisu mogli postići. Antagonizam 5-HT₃ receptora vortioksetinom također povećava izvanstanične

razine 5-HT postignute inhibicijom SERT-a i može doprinjeti pozitivnim učincima na raspoloženje i kognitivne simptome kod depresivnih pacijenata (Bang-Andersen i sur., 2011; Dale i sur., 2015). Umjeren antagonistički učinak vortiokestina na 5-HT_{1B} receptore povezuje se s jačim učinkom serotonina kao i ostalih neurotransmitora, ali i sa smanjenim oslobađanjem acetilkolina, dok antagonističko djelovanje vortiokestina na 5-HT₇ receptore u kombinaciji s inhibicijom SERT-a ostvaruje antidepresivni učinak (Bang-Andersen i sur., 2011; Švob Štrac i sur., 2016). Zbog kompleksnog djelovanja vortiokestina koje uključuje inhibiciju SERT-a kao i djelovanje na 5-HT receptore očekujemo jači učinak na cirkulirajući BDNF od starijih antidepresiva. Terapija vortiokestinom značajno povećava koncentraciju BDNF-a u plazmi uzrokovanu pojačanom serotoninskom transmisijom pod utjecajem 5-HT₄, 5-HT₆ i 5-HT₇ receptora koja dovodi do viših koncentracija *BDNF* mRNA i pojačanog oslobađanja BDNF-a. (Sagud i sur., 2016; Dvojkovic i sur., 2021) Ispitivanje vortiokestina na štakorima izloženim kroničnom nepredvidivom umjerenom stresu potvrđuje povećanje koncentracije BDNF-a u hipokampusu kao i prokognitivno i antidepresivno djelovanje nakon 3 tjedna terapije (Lu i sur., 2018).

1.2. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)

BDNF je mali signalni protein koji spada među neurotrofne čimbenike rasta odgovorne za diferencijaciju neurona, formaciju sinapsa, preživljavanje, potporu i funkcionalnost neurona, moždanu neurotransmisiju, proliferaciju, dugoročnu potencijaciju i sinaptički rast u središnjem živčanom sustavu. BDNF se povezuje s regulacijom neuronalne aktivnosti poput neuralne plastičnosti ovisne o aktivnosti i razvojnih procesa, kao i regulacije neuralnih procesa u odrasloj dobi (Thoenen, 1995; Tudor i sur., 2018).

Učinak BDNF-a ovisi o dva različita receptora koji aktiviraju različite signalne puteve unutar neurona. Jedan od receptora je neselektivni pan-neurotrofinski receptor p75 koji ima niski afinitet za BDNF i mogu ga aktivirati svi neurotrofini. Unutarstanična aktivnost ovisi o ligandima vezanim za receptor i vrsti stanice na kojoj se p75 receptor nalazi te uglavnom ima proapoptosko djelovanje koje uključuje smanjenje neuralne duljine, supresiju migracije stanica, smanjenje granjanja dendrita i nastanak dugoročne depresije (LTD, engl. *long-term depression*). Drugi receptor za BDNF je tropomiozin receptor kinaza B (TrkB) koji veže s visokim afinitetom BDNF i NT4/5. TrkB receptor potiče preživljavanje neurona i odgovoran je za pravilan razvoj središnjeg živčanog sustava kod svih kralježnjaka, a abnormalnosti u njegovoj signalizaciji predstavljaju rizik za pojavu mnogih psihijatrijskih i neuroloških bolesti.

Djelovanje putem TrkB receptora uključuje rast neurona, stimulaciju migracije stanica, poticanje grananja dendrita i dugoročne potencijacije (LTP, engl. *long-term potentiation*) (Boulle i sur., 2012; Gejl i sur., 2019; Almeida i sur., 2021).

TrkB receptori se mogu nalaziti presinaptički i postsinaptički čime BDNF može utjecati i na oslobađanje neurotransmitera kao i na postsinaptički odgovor. BDNF svoju glavnu funkciju ostvaruje preko TrkB receptora čime se potiče retrogradno povećanje koncentracije neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini, prvenstveno u glutamatergičnim neuronima (Thoenen, 1995), kao i rast i funkcionalne promjene 5-HT neurona u mozgu odraslih (Tian i sur., 2022). TrkB receptor ima barem tri unutarstanične signalne kaskade: mitogen-aktivirani protein kinazni (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase* ili ERK, engl. *extracellular signal-regulated kinase*) put povezan s aktivacijom Ras (engl. *rat sarcoma virus*) proteina koji potiče neuralnu diferencijaciju i rast; fosfatidilinozitol-3 kinazni put (PI3K)/povezan s AKT-mTOR signalizacijom (AKT, engl. *protein kinase B*; mTOR, engl. *mammalian target of rapamycin*) koji potiče preživljavanje i fosfolipaza C-gamma (PLC γ , engl. *phospholipase C - γ*) put povezan s aktivacijom protein kinaze C koja potiče neuralnu plastičnost i neurotransmisiju (Boulle i sur., 2012; Björkholm i Monteggia, 2016).

BDNF ima visok stupanj ekspresije u limbičkim strukturama i moždanoj kori gdje igra ulogu u LTP-u i neurogenezi, što ga povezuje s procesima učenja, nastanka memorije i regulacije raspoloženja (Boulle i sur., 2012; Covaceuszach i sur., 2022), kao i regulacije straha i odgovora na stres. BDNF ima modulatornu funkciju dopaminskog, serotoniniskog i glutamatnog sustava čime regulira sintezu, metabolizam, neuralnu aktivnost i oslobađanje neurotransmitera (Tudor i sur., 2018). Zbog tako širokog učinka u središnjem živčanom sustavu, BDNF ima vrlo strogo kontrolirane signalne puteve, te sve promjene u funkcionalnosti proteina ukazuju na mogućnost razvoja abnormalnih promjena povezanih s bolešću (Boulle i sur., 2012).

Humani BDNF kodiran je BDNF genom koji je dugačak preko 70 kb te se nalazi na kratkom kraku kromosoma 11 unutar regije p13-14 (Tudor i sur., 2018). BDNF gen kompleksne je strukture s raznolikom regulacijom eksona što ukazuje na specifičnu staničnu i moždanu raspodjelu. Humani *BDNF* gen sastoji se od jedanaest netranslatiranih eksona s devet neovisnih promotora povezanih s kodirajućim eksonima čime nastaju različiti transkripti, a time i različite varijante glasničke RNA (mRNA, engl. *messenger ribonucleic acid*). Kodirajući 3' ekson IX kodira za proBDNF protein i dva poliadenilacijska mjesta odgovorna za nastanak kratke ili duge varijante (Boulle i sur., 2012; Björkholm i Monteggia, 2016). Poremećena BDNF

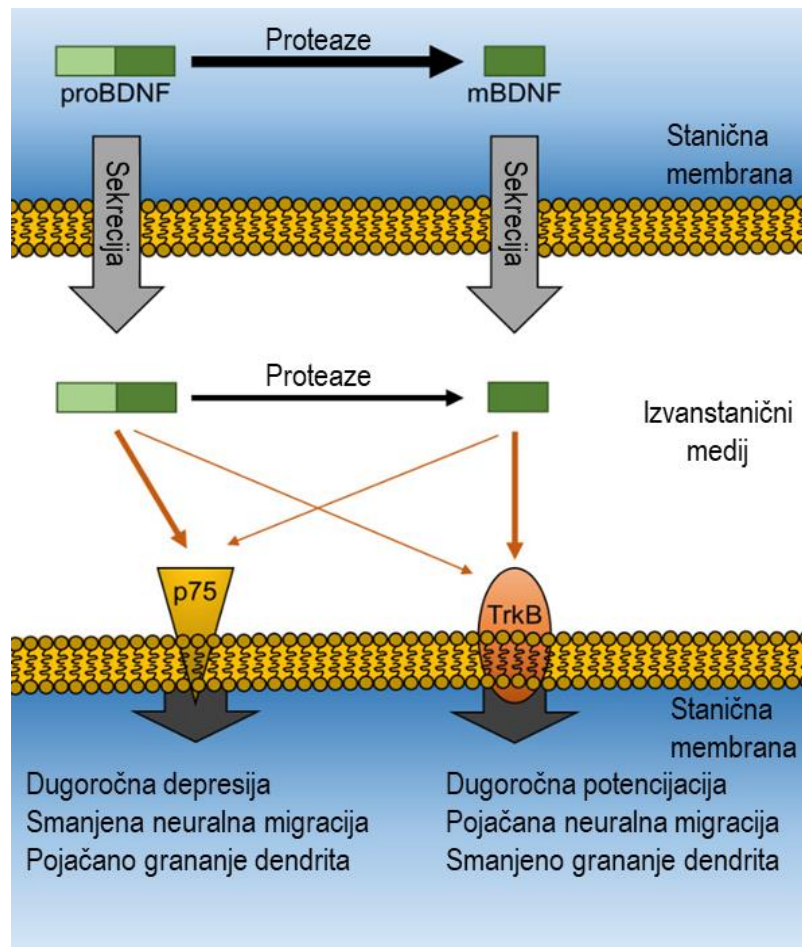
signalizacija povezuje se nastankom i načinom progresije različitih neuroloških i psihijatrijskih bolesti (Boulle i sur., 2012).

Humani *BDNF* gen je pod ekspresijskom kontrolom devet promotora koji omogućuju alternativna spajanja transkripta (Toledo-Rodriguez i sur., 2010), što upućuje na vremensku i tkivnu regulaciju *BDNF* gena važnu za specifičnu modulaciju sinaptičke plastičnosti i nastanka novih veza između dendrita. Regulacija značajno ovisi o promotorima na *BDNF* genu koji različito reagiraju na stimulanse i signale (Boulle i sur., 2012; Björkholm i Monteggia, 2016). Među promotorima farmakološki je najzanimljiviji promotor *BDNF-6* na 5'-netranslatiranoj regiji koja sadrži visoku koncentraciju CpG-a te pokazuje regulaciju preko hormona stresa i unutar kojeg djeluju antidepresivi i inhibitori DNA metiltransferaze (Toledo-Rodriguez i sur., 2010).

Nakon transkripcije i translacije, najprije unutar endoplazmatskog retikuluma nastaje prekursor preproBDNF kojem se zatim uklanja signalni peptid (Yoshida i sur., 2012). Nakon uklanjanja signalnog peptida *BDNF* možemo naći u dva oblika, kao protein proBDNF koji se jače veže za p75 receptor, ili kao mBDNF (engl. *mature BDNF*) koji nastaje iz proBDNF-a i koji se jače veže za TrkB (Slika 2). Naime, mBDNF nastaje iz proBDNF-a pod utjecajem unutar- i izvanstaničnih proteinaza kao što su unutarstanične furin/proprotein konvertaze ili pomoću izvanstaničnih proteaza kao što su plazmin i matriksna metalopeptidaza-9 (MMP-9) (Boulle i sur., 2012; Yoshida i sur., 2012). Propeptid vezan za proBDNF ima funkciju intramolekularnog šaperona koji osigurava pravilnu konformaciju proteina u oksidativnim uvjetima (Covaceuszach i sur., 2022). Pretvorba proBDNF-a u zreli mBDNF se uglavnom događa unutarstanično i u manjoj mjeri izvanstanično (Almeida i sur., 2021).

BDNF se sintetizira uglavnom u tijelu i dendritima neurona te se izlučuje i presinaptički i postsinaptički ovisno o signalu (Björkholm i Monteggia, 2016). Omjer proBDNF-a i mBDNF-a u sinaptičkoj pukotini regulira tkivni plasminogeni aktivator koji na taj način regulira sinaptičku plastičnost zbog suprotnih učinaka proBDNF-a i mBDNF-a. Učinak *BDNF*-a također ovisi i o ekspresiji odgovarajućih receptora p75 i TrkB na neuronima (Boulle i sur., 2012). Moguće je da depresivni pacijenti imaju selektivno smanjene koncentracije mBDNF-a čime je pojačan proapoptotički učinak proBDNF-a (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010). Oba receptora mogu u manjoj mjeri biti aktivirani i pomoću drugog oblika *BDNF*-a, odnosno p75 receptor se može aktivirati i pomoću mBDNF-a, dok se TrkB receptor može aktivirati i pomoću proBDNF-a, međutim njihovi učinci su značajno slabiji te manje značajni (Almeida i sur., 2021).

BDNF se u središnjem živčanom sustavu pretežno sintetizira tijekom normalnih fizioloških uvjeta, pri čemu je njegova mRNA regulirana neuralnom aktivnošću i hormonalnim signalima. Suprotno tome, u perifernom živčanom sustavu dolazi do sinteze BDNF-a ovisno o razvojnim potrebama tkiva i senzornih organa. BDNF se izlučuje i konstitutivno i ovisno o aktivnosti, odnosno pod utjecajem živčanih signala. Otpušteni BDNF ima ograničenu i specifičnu funkciju kao retrogradni modulator u sinapsi te pojačava spontanu sinaptičku aktivnost na neuronima koji nose Trk receptore (Thoenen, 1995).



Slika 2. Funkcionalne uloge izoformi BDNF-a. Pretvaranje proBDNF-a u mBDNF se uglavnom odvija unutar stanice. Obje izoforme se izlučuju i djeluju na p75 ili na TrkB receptore. Učinci dva moguća regulatorna puta su suprotni. (Preuzeto i prilagođeno iz Almeida i sur., 2021)

1.2.1. BDNF na periferiji

BDNF sintetiziraju i drugi organski sustavi i stanice poput kardiovaskularnog sustava, beta stanica gušterače kao i adipoznog tkiva (Tudor i sur., 2018). Također, BDNF možemo naći u krvi, gdje se konstitutivno najviše veže i skladišti u trombocitima (oko 99 %), dok se samo mala količina BDNF-a nalazi u plazmi. S obzirom da je BDNF u središnjem živčanom sustavu teško

je mjeriti, često se koriste periferni uzorci krvi. Koncentracije BDNF-a u serumu najviše su povezane s vremenom koagulacije, dok koncentracije u plazmi najviše ovise o strategiji centrifugiranja i korištenom antikoagulansu. Koncentracija BDNF-a u serumu je obično viša od one u plazmi s obzirom da tijekom procesa koagulacije trombociti otpuštaju uskladišteni BDNF, dok u plazmi nema dodatnog otpuštanja BDNF-a iz trombocita. Stoga koncentracije BDNF-a u serumu i plazmi predstavljaju dvije različite mjere BDNF-a (Gejl i sur., 2019; Almeida i sur., 2021).

Zbog tkivno specifične ekspresije BDNF-a, promjene razina BDNF-a u pojedinim djelovima mozga nisu nužno vidljive u perifernim uzorcima krvi (Boulle i sur., 2012). Postoje naznake da BDNF može dvosmjerno prolaziti krvno-moždanu barijeru pomoću aktivnog transporta s obzirom da koncentracija BDNF-a u serumu prati razine u središnjem živčanom sustavu u životinjskim modelima, iako se neka istraživanja s time ne slažu (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010; Björkholm i Monteggia, 2016). Trombociti, koji skladište najviše BDNF-a, ne mogu prolaziti krvno-moždanu barijeru što upućuje na mogući veći značaj „slobodnog“ BDNF-a u plazmi koji bi točnije mogao odražavati promjene BDNF-a u središnjem živčanom sustavu. Kako bi se dobila najtočnija vrijednost BDNF-a u plazmi pojedine studije preporučaju dodatno centrifugiranje kako bi nastala plazma siromašna trombocitima. Apsolutne vrijednosti BDNF-a u serumu ili u plazmi uglavnom nisu usporedive, s obzirom na veliku raznolikost protokola koji se koriste u istraživanjima te su jedino usporedbe relativnih razina BDNF-a prihvatljive (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010; Gejl i sur., 2019).

Smatra se da se koncentracije BDNF-a mijenjaju pod utjecajem stresa. Naime, smanjenje koncentracije BDNF-a i ekspresije mRNA *BDNF-a* u hipokampusu povezuje se s pojačanom aktivacijom HPA osi u uvjetima povećanog stresa (Almeida i sur., 2021). Također, pušenje se povezuje sa smanjenom koncentracijom BDNF u krvi. Taj učinak je najvjerojatnije posredovan nikotinom, pod čijim kroničnim utjecajem dolazi do smanjenja količine *BDNF* mRNA u mozgu. Pušenje se povezuje s epigenetički posredovanom smanjenom ekspresijom BDNF-a zbog pojačane metilacije CpG otoka unutar određenih promotora u genu *BDNF* (Toledo-Rodriguez i sur., 2010). Fizička aktivnost može također značajno utjecati na koncentraciju BDNF-a u serumu i plazmi. Naime, pokazano je da pojedinci više kardiorespiratorne sposobnosti postižu brže oslobađanje cirkulirajućeg BDNF-a uslijed vježbom inducirane obnove skeletnih mišića. Ove činjenice potrebno je uzeti u obzir kod uzimanja uzoraka krvi zbog mogućeg utjecaja fizičke aktivnosti na koncentraciju BDNF-a (Gejl i sur., 2019).

1.3. BDNF u depresiji

Prema neurotrofnoj teoriji depresije, depresija je uzrokovana disfunkcijom neuralnih mreža pod utjecajem stresa koji izaziva smanjenje razine neurotrofnih čimbenika i atrofiju limbičkog sustava. Naime, post-mortem istraživanja s ciljem proučavanja neuropatologije depresije na uzorcima mozga uglavnom su našla blagu atrofiju kortikalnih i hipokampalnih regija poput smanjene veličine neurona, smanjenog broja glija stanica i gustoće dendrita, te neurotrofnih čimbenika (Krisnan i Nestler, 2010), uključujući i BDNF (Boulle i sur., 2012). Istraživanja na heterozigotnim BDNF null (BDNF+/-) miševima nisu našli utjecaj smanjenja od ~50% BDNF-a na pojavu i simptomatologiju depresije, iako je smanjena koncentracija BDNF-a u prednjem mozgu i hipokampusu bila povezala sa smanjenim učinkom antidepresiva (Björkholm i Monteggia, 2016).

Istraživanja na životinjama poput izravnih injekcija BDNF-a u srednji mozak ili hipokampus miševa potvrdila su antidepresivni učinak BDNF-a, koji se povezuje s aktivacijom mitogen aktivirane protein kinaze (MAPKK, engl. *mitogen-activated protein kinase*) preko TrkB receptora koji dalje djeluje preko ERK kinaze (Björkholm i Monteggia, 2016; Casarotto i sur., 2022).

Snižena koncentracija BDNF-a i smanjeno BDNF signaliziranje u depresiji vraća se na početne koncentracije uslijed terapije antidepresivima (Buttenschön i sur., 2015), iako promjene u koncentraciji BDNF-a nisu uvijek značajne, vjerojatno zbog varijacija u dozama antidepresiva, duljini tretmana i područjima mozga koji su istraživani (Casarotto i sur., 2022). Na životinjskim modelima utvrđeno je i da konvulzivni napadaji induciraju ekspresiju *BDNF* mRNA u limbičkom sustavu. Takvi postupci sličili su već postojećim terapijama za depresiju poput elektrokonvulzivne terapije (ECT), za koju je naknadno otkriveno da pojačava ekspresiju BDNF-a i TrkB receptora (Björkholm i Monteggia, 2016).

Navedena istraživanja uputila su na ključnu ulogu BDNF-a u patogenezi depresije, pri čemu BDNF-om regulirana neuroplastičnost omogućuje reorganizaciju postojećih neuralnih mreža uz odgovarajuće aktivnosti vanjskog i unutarnjeg okruženja koje dovode do antidepresivnog učinka (Björkholm i Monteggia, 2016; Casarotto i sur., 2022).

Uočeno je da i periferna koncentracija BDNF-a može biti smanjena u patološkim stanjima poput depresije, post-traumatskog stresnog poremećaja (PTSP), bipolarnog poremećaja,

shizofrenije, Alzheimerove demencije i drugih poremećaja, kao i pod utjecajem visoke razine stresa (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010).

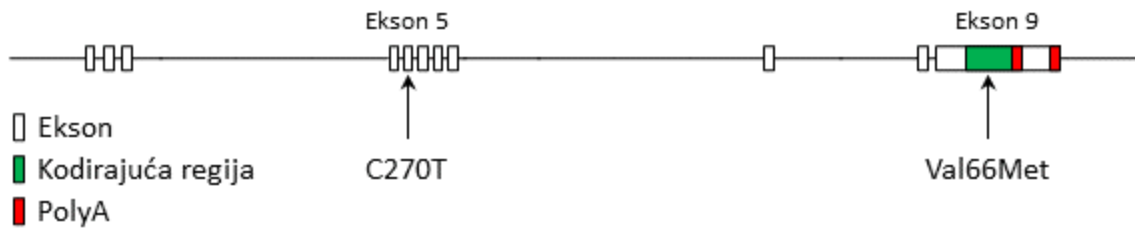
Iako postoje oprečni podaci o povezanosti koncentracije perifernog BDNF-a s pojavom depresije te s težinom simptoma (Almeida i sur., 2021), većina istraživanja pokazala je da je koncentracija BDNF-a smanjena i u serumu i u plazmi depresivnih bolesnika. U uzorcima periferne krvi uzetim *post-mortem* osobama oboljenih od depresije utvrđene su također snižene koncentracije BDNF-a (Sagud i sur., 2016; Tian i sur., 2022). Smatra se da je periferni BDNF uglavnom snižen tijekom akutnih depresivnih epizoda te da se vraća na normalne razine nakon postizanja remisije (Almeida i sur., 2021). Meta-analizom potvrđeno je da je koncentracija BDNF-a u serumu i plazmi značajno manja u depresivnih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike. Takva promjena koncentracije u periferiji povezana je s promjenama BDNF sustava u mozgu koje nalazimo u *post-mortem* uzorcima mozga depresivnih osoba (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010; Yoshida i sur., 2012; Youssef i sur., 2018) i žrtvama suicida (Boulle i sur., 2012; Youssef i sur. 2018).

BDNF također predstavlja mogući biomarker u određivanju težine oboljenja u depresiji, s obzirom da su pacijenti s težim oblicima depresije pokazivali značajno manje koncentracije BDNF-a u krvi, međutim nije bila nađena veza između težine simptoma, kvalitete života i društvenog funkcioniranja kod istih bolesnika (Yoshida i sur., 2012). Međutim, promjene nakon antidepresivne terapije uočljive su u plazmi gdje dolazi do povećanja koncentracije BDNF-a, dok takva promjena u serumu nije uočena (Sagud i sur., 2016). Nadalje, *BDNF* mRNA uglavnom je snižena u leukocitima depresivnih pacijenata te se vraća na normalne razine nakon terapije antidepresivima što upućuje na moguće epigenetičke promjene *BDNF* gena (Boulle i sur., 2012). Također se smatra da brzodjelujući antidepresivi dovode do pojačanja autofosforilacije TrkB receptora što rezultira u pojačanom izlučivanju BDNF-a i njegovom boljem vezivanju za receptor što dodatno aktivira signalne puteve TrkB receptora. Dodatni učinci antidepresiva uključuju aktivaciju fosfolipaze PLC γ i ERK kinaze, koje predstavljaju nove moguće mete u liječenju depresije (Casarotto i sur., 2022).

1.3.1. Polimorfizmi gena *BDNF*

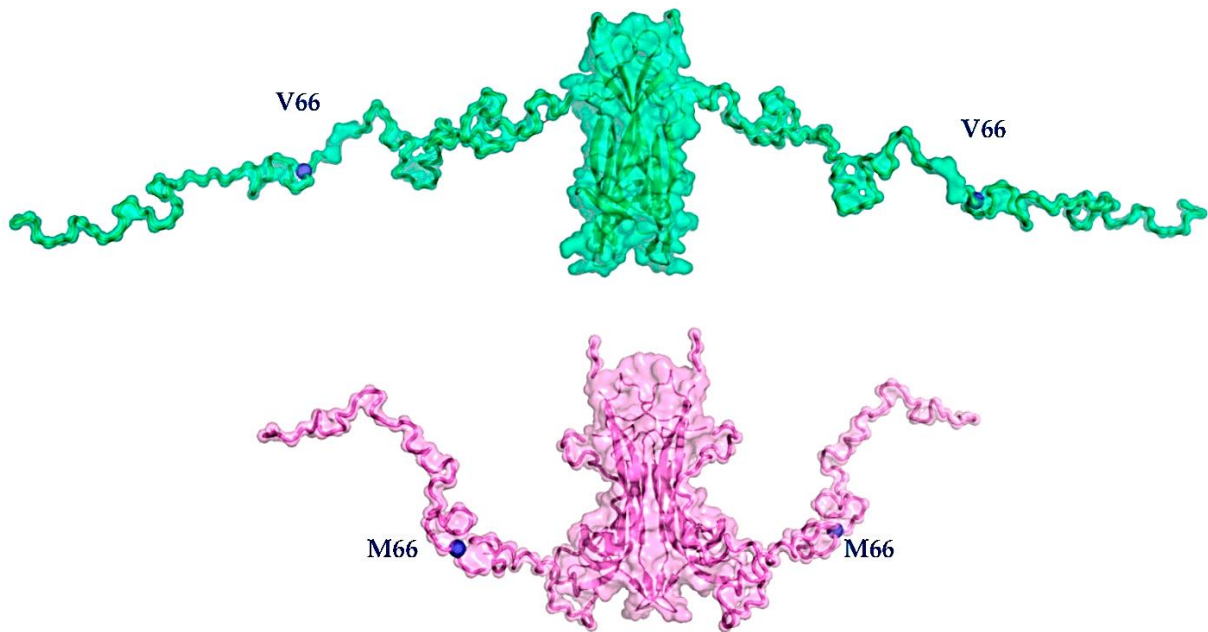
Proučavanjem *BDNF* gena otkriveno je više stotina polimorfizama jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*). Ovaj rad istražuje dva takva polimorfizma, Val66Met (rs6265) i C270T (rs56164415) (Slika 3.) (Gene: *BDNF*, 2022).

BDNF



Slika 3. Položaj istraženih polimorfizama unutar *BDNF* gena.

BDNF Val66Met polimorfizam (rs6265, G196A) jedan je od najčešćih polimorfizama *BDNF* gena, koji je visoko prevalentan u Europi i SAD-u (Almeida i sur., 2021), a kod kojeg dolazi do nekonzervativne supstitucije valina (Val) u metionin (Met) na kodonu 66 unutar prodomene proBDNF proteina. Ovaj SNP se povezuje s promjenama u procesuiranju, prijenosu i unutarstaničnom skladištenju proBDNF-a, a time i s manjim izlučivanjem zrelog mBDNF-a ovisne o aktivnosti, zbog njegove smanjene sposobnosti pakiranja iz Golgijevog aparata u sekretorne vezikule (Tudor i sur., 2018). Učinak ovog polimorfizma se može uočiti u napravljenom savijanju proteina (Slika 4.) koje dovodi do gubitka funkcije mBDNF proteina. Takve konformacijske promjene uočene su i u *in vitro* pokusima gdje je proBDNF s Val66Met polimorfizmom imao izmijenjenu konformaciju koja se povezuje sa smanjenim unutarstaničnim prijenosom i izmijenjenim učinkom proBDNF-a na fiziološke procese (Covaceuszach i sur., 2022). Istraživanja pokazuju da i nosioci samo jednog Met alela imaju lošiji prijenos BDNF-a u distalne dendrite koji dovodi do smanjenje raspodjele BDNF-a u neuronima i u konačnici do smanjenog oslobađanja mBDNF-a ovisnog o aktivnosti. Postoji više mogućih puteva koji bi mogli biti odgovorni za pojavu poremećaja koji se povezuju s ovim polimorfizmom poput lošijeg vezanja za p75 receptor, slabije funkcije sortilina, Huntingtin vezanog proteina-1 (HAP1, engl. *Huntingtin-associated protein 1*), sortilin-ovisnog Vps10p-domena sadržavajućeg receptora 2 (SorCS2, engl. *Sortilin related VPS10 domain containing receptor 2*) kao i promijenjenog unutarstaničnog signaliziranja (Covaceuszach i sur., 2022). Iako postoji mnogo mogućih mehanizama pomoću kojih bi *BDNF* Val66Met polimorfizam mogao doprinjeti patofiziologiji depresije, dio studija ipak ne nalazi značajnu povezanost ovog polimorfizma s depresijom (Huuhka i sur., 2007).



Slika 4. Zeleni model predstavlja proBDNF (divlji tip), dok ružičasti model predstavlja proBDNF s Val66Met mutacijom. Položaj mutacija prikazan je plavim točkama. (Preuzeto iz Covaceuszach i sur., 2022)

Polimorfizmi *BDNF* gena pokazali su kao značajan čimbenici u LTP funkciji neurona u hipokampusu homozigota i heterozigota kod kojih je količina *BDNF* mRNA bila smanjena do 50%, što dovodi do značajnih poremećaja u središnjem živčanom sustavu (Thoenen, 1995), uključujući i depresiju (Schumacher i sur., 2005). *BDNF* Val66Met polimorfizam povezuje se s kognitivnim promjenama stvaranja i uklanjanja memorije, dva procesa koja BDNF regulira u hipokampusu (Boulle i sur., 2012). Kod mladih nosioca ovog polimorfizma uočeno je volumetrijsko smanjenje hipokampusa koje se povezuje s deficitima memorije (Covaceuszach i sur., 2022). Također se povezuje s razvojem mnogih neurodegenerativnih i psihijatrijskih bolesti, a posebice s stresom u mladosti koji utječe na razvoj depresije (Almeida i sur., 2021). Istraživanje Youssefa i sur. (2018) utvrdilo je da smanjena koncentracija BDNF-a u nosioca Met alela utječe na povećan rizik suicidalnog ponašanja posebice kod depresivnih pacijenata i kod onih koji su doživjeli stres u ranoj mladosti. Meta-analiza pokazala je da Met alel marginalno povećava rizik od depresije u muškaraca, ali ne i kod žena. Haplotipska analiza ukazuje na mogući utjecaj pojedinih kombinacija SNP-ova *BDNF-a* na patogenezu depresije. Tako na primjer, kombinacija biljega rs988748-(GT)_n-rs6265 pokazuju nominalno značajnu povezanost s depresijom (Schumacher i sur., 2005). Pojedine studije povezuju Met alel s boljim odgovorom na terapiju antidepresivima (Krishnan i Nestler, 2010), iako ga druga istraživanja povezuju sa

smanjenim antidepresivnim odgovorom zbog slabijeg izlučivanja BDNF-a kod Met/Met homozigota (Björkholm i Monteggia, 2016). Pušenje se povezuje s epigenetičkim promjenama pri čemu je DNA metilacija povećana na *BDNF* promotoru IV uzrokujući smanjenu ekspresiju BDNF-a, ali samo kod Val/Val homozigota (Toledo-Rodriguez i sur., 2010). *BDNF* Val66Met polimorfizam se povezuje i s shizofrenijom, pri čemu se patološke promjene povezuju s poremećenim razinama DNA metilacije na CpG otocima gena *BDNF* u frontalnom korteksu oboljelih od shizofrenije, pri čemu je smanjenje DNA metilacije *BDNF* gena primjećeno u frontalnom korteksu nosioca Met alela (Bouille i sur., 2012).

BDNF C270T polimorfizam (rs56164415) nalazi se u 5'-netranslatiranoj regiji *BDNF* gena. Povezan je s promjenom u ekspresiji BDNF-a zbog utjecaja na promotor za koji se smatra da veže histon H4 transkripcijski faktor (engl. *histone H4 transcription factor*) i ZIC3 (engl. *zinc finger of the cerebellum 3*) protein što može dovesti do kvantitativne neravnoteže BDNF-a u pojedinim dijelovima mozga (Xu i sur., 2017; Pivac i sur., 2022). *BDNF* C270T polimorfizam nije bio značajno povezan s depresijom (Huuhka i sur., 2007), ali je značajno bio povezan s neurodegenerativnim bolestima poput shizofrenije, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze (ALS, engl. *amyotrophic lateral sclerosis*) (Xu i sur., 2017). *BDNF* C270T polimorfizam značajno je povezan s pojavom Alzheimerove bolesti, ali nedostaje povezanost polimorfizma s depresijom povezanom s Alzheimerovom bolešću (Borroni i sur., 2009). Povezanost *BDNF* C270T polimorfizma sa shizofrenijom nađena je u dijelu istraživanja, ali novije meta analize ne nalaze značajnu povezanost. Smatra se da nosioci T alela ovog polimorfizma lakše razviju psihotične simptome (Watanabe i sur., 2013). Nađena je povezanost boljeg odgovora pacijenata nosioca CC genotipa *BDNF* C270T polimorfizma s psihotičnim simptomima i kasnijom pojavom depresije na ECT (Huuhka i sur., 2007). Nije utvrđena povezanost depresije i *BDNF* C270T polimorfizma, kao niti povezanost pušačkog statusa i *BDNF* C270T polimorfizma u depresivnih ispitanika (Pivac i sur., 2022). Haplotipskom analizom nije uočena povezanost rs56164415 i rs6265 polimorfizama zbog njihove značajne udaljenosti (Tudor i sur., 2018).

2. Obrazloženje teme

Veliki depresivni poremećaj jedna je od najzastupljenijih neuropsihijatrijskih bolesti s velikim utjecajem na život pojedinca. Raznoliki simptomi od depresivnog raspoloženja do poremećaja spavanja i ostalih smetnji dovode bolesnika do osobne i socijalne disfunkcije. Iako postoje terapije depresije, one imaju ograničenu učinkovitost i potencijal razvoja nuspojava, a činjenica da je veliki dio kompleksne patofiziologije bolesti nepoznanica onemogućuje razvoj učinkovitijih i sigurnijih metoda liječenja za kojima postoji rastuća potreba (Kessler i Bromet, 2013). Istraživanja upućuju na postojanje određenih genetskih i okolišnih čimbenika rizika za razvoj depresije. Među proteinima koji su našli središnje mjesto u istraživanju depresije je i BDNF sa svojim djelovanjem na neuralnu plastičnost. Genske varijacije kao što su *BDNF* C270T (rs56164415) i Val66Met (rs6265) polimorfizmi koji utječu na ekspresiju ili procesiranje BDNF-a predstavljaju neke od mogućih meta istraživanja i identifikacije pojedinaca s povećanim rizikom razvoja depresije (Krishnan i Nestler, 2010; Björkholm i Monteggia, 2016). S obzirom da su smanjene koncentracije BDNF-a u određenim moždanim regijama, kao i u krvi, utvrđene u oboljelih od depresije (Almeida i sur., 2021), BDNF predstavlja potencijalni biomarker depresije, koji može uputiti na moguće patološke promjene u mozgu povezane s razvojem depresije. Antidepresivi koji primarno služe liječenju depresije djeluju putem vrlo širokog raspona receptora i signalnih molekula čijom modulacijom postižu svoj učinak. Stariji lijekovi poput escitaloprama djeluju pretežno na serotoninski sustav i to inhibicijom ponovne pohrane serotonina (Kirino, 2012). Noviji lijekovi poput vortiooksetina imaju multimodalno djelovanje, te uz inhibiciju ponovne pohrane serotonina, djeluju i na serotoninske receptore, ali i druge sustave, uključujući i BDNF (Bang-Andersen i sur., 2011).

Cilj ovog rada je istražiti povezanost BDNF sustava s razvojem depresije, težinom depresivnih simptoma i učinkom antidepresivnih lijekova. U tu svrhu specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) potvrditi prijašnja otkrića o smanjenju koncentracije BDNF-a u plazmi oboljelih od depresije te njenoj povezanosti s težinom depresivnih simptoma
- 2) istražiti moguću povezanost Val66Met i C270T polimorfizama *BDNF* gena sa koncentracijom BDNF-a u plazmi, razvojem depresije i težinom depresivnih simptoma
- 3) istražiti učinak antidepresiva escitaloprama i vortiooksetina na promjene koncentracija BDNF-a u plazmi i usporediti njihovu učinkovitost u liječenju depresivnih ispitanika
- 4) istražiti moguću povezanost *BDNF* Val66Met i C270T polimorfizama i koncentracije BDNF-a u plazmi s antidepresivnim učinkom escitaloprama i vortiooksetina.

3. Materijali i metode

3.1. Zdravi ispitanici

Zdravi ispitanici bili su dobrovoljni darivatelji krvi koji su inicijalno testirani na dobro opće stanje te su bez značajne medicinske povijesti kao dio kriterija prihvatljivosti za darivanje krvi. Uzorke krvi zdravih kontrolnih ispitanika prikupilo je zdravstveno osoblje Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu tijekom rutinskih postupaka darivanja krvi. Kontrolnu skupinu činilo je 120 zdravih odraslih osoba hrvatskog podrijetla, bijele rase i bez somatskih i psihičkih poremećaja. Među ispitanicima bila su zastupljena oba spola (73 muškaraca, 47 žena), te široki raspon dobi (od 23 do 61 godine), a ispitanici nisu bili u srodstvu. Kriteriji isključenja bili su: (1) korištenje bilo kakvih lijekova, (2) ovisnost o alkoholu, drugim supstancama ili njihova zlouporaba, (3) povijest psihijatrijskih bolesti, nedavne infekcije ili upale.

3.2. Ispitanici s depresijom

Depresivne ispitanike činilo je 119 ispitanika kojima je dijagnozu postavio psihijatar prema kriterijima u sklopu službenih klasifikacija MKB-10 i DSM-5. Ispitanici su bili liječeni stacionarno ili ambulantno u Klinici za psihijatriju Vrapče ili u Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog Centra (KBC) Zagreb.

Kriteriji uključanja bili su: (1) dijagnoza prve depresivne epizode ili depresivne epizode u sklopu povratnog depresivnog poremećaja, (2) bolesnici stariji od 18 godina, (3) bolesnici koji su najmanje mjesec dana bez terapije antidepresivima ili do sada neliječeni bolesnici.

Kriteriji isključenja bili su: (1) prisustvo psihotičnih simptoma uključujući i depresivnu epizodu s psihotičnim elementima, (2) infekcije respiratornog trakta, (3) liječenje triptofanom, gospinom travom, stabilizatorima raspoloženja, antipsihoticima, hormonskom nadomjesnom terapijom i opioidnim analgeticima unatrag mjesec dana, svakodnevno uzimanje benzodiazepina, a terapija fluoksetinom trebala je biti isključena najmanje 6 tjedana prije uključanja u studiju, (4) rezistencija na dosadašnje liječenje, (5) dijagnoza drugih komorbidnih psihotičnih pojava, bipolarnog afektivnog poremećaja, ovisnosti o alkoholu i drogama, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, poremećaja hranjenja, demencije i drugih neurodegenerativnih bolesti, teške somatske bolesti, nedovoljno kontrolirane arterijske hipertenzije, dijabetesa i bolesti štitne žlijezde, (6) psihoterapija izuzev uobičajene potpore koja

je inače sastavni dio svakog psihijatrijskog pregleda i koji je bio jednak u obje skupine ispitanika.

3.3. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je uključilo samo osobe koje su potpisale informirani pristanak za sudjelovanje. Istraživanje je u potpunosti provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb, Hrvatskog instituta za transfuzijsku medicinu, Etičkog povjerenstva Klinike za psihijatriju Vrapče i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.4. Prikupljanje sociodemografskih i kliničkih podataka

Svi ispitanici prošli su prije uzorkovanja krvi inicijalni razgovor kojim se utvrdila njihova podobnost za sudjelovanje u studiji. Dobrovoljnim darivateljima krvi prikupljeni su demografski i klinički podaci: (1) spol, (2) dob i (3) navike pušenja. Osobama oboljelim od depresije prikupljeni su podaci: (1) dob, (2) spol, (3) broj epizoda depresije, (4) broj pokušaja suicida i (5) navike pušenja.

3.5. Procjena težine simptoma depresije

Klinička procjena težine depresivnih simptoma određena je korištenjem ocjenskih ljestvica za depresiju. Postavljanje dijagnoze kod psihičkih bolesti kao što je depresija temelji se na kliničkoj slici te se zato, u svakodnevnom kliničkom radu, koriste ocjenske ljestvice za depresiju kojima se postiže objektivnija procjena psihičkog stanja bolesnika. Ocjenske ljestvice možemo podijeliti na samoocjenske upitnike gdje bolesnik sam odgovara na postavljena pitanja vezana za svoje simptome i ocjenske ljestvice pomoću kojih psihijatar provodi intervju s bolesnikom. Procjena težine simptoma koju odredi psihijatar smatra se objektivnijom ocjenom simptoma bolesti. Ljestvice korištene za procjenu simptoma depresije su Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (HAMD-17) i Montgomery-Åsbergova ocjenska ljestvica za depresiju (MADRS).

3.6. Obrada uzoraka krvi

Uzorci krvi svih ispitanika prikupljeni su od osoba koje su bile natašte, u prijepodnevnim satima te su uzorci bili obrađeni unutar 24 sata za daljnje analize.

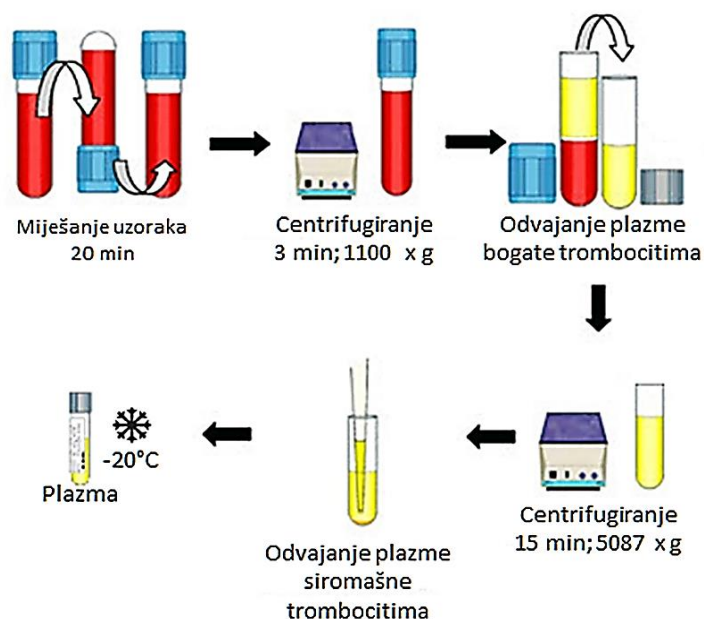
3.6.1. Postupak izdvajanja plazme siromašne trombocitima iz uzoraka pune krvi

Oprema:

- Centrifuga Sorvall Legend RT (Marshall Scientific, SAD)
- BD Vacutainer® epruvete za prikupljanje krvi s antikoagulantnom otopinom limunske kiseline, natrijeva citrata i dekstroze (ACD, engl. *acid-citrate-dextrose*) zapremnine 12 ml (Becton, Dickinson and Company, SAD)
- Plastične epruvete zapremnine 12 ml (Greiner Bio One, Austrija)
- Mikropipete (Eppendorf, SAD)

Postupak:

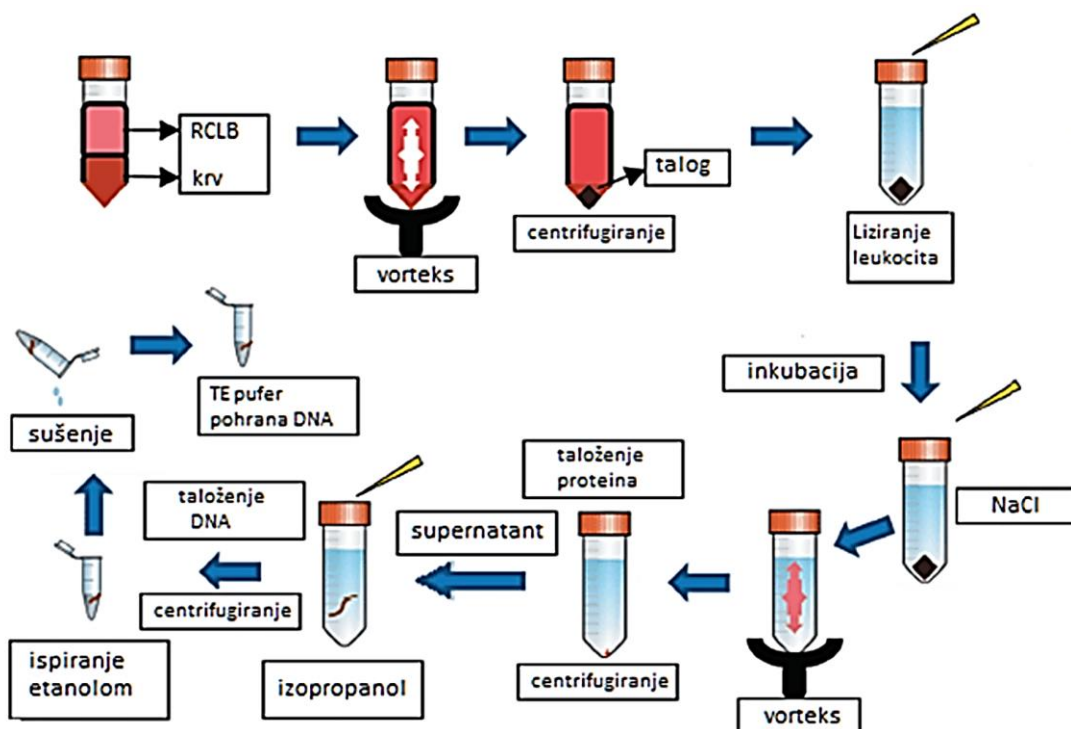
Ispitanicima je uzet uzorak krvi (8 ml) u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer®) s 2 ml konzervansa (antikoagulansa) koji sadrži limunsku kiselinu, natrij citrat i dekstrozu (ACD, engl. acid citrate dextrose). Svakom ispitaniku uzorak krvi je uzet pri prvom pregledu kada je osoba bila natašte. Uzorkovanje je napravljeno u prijepodnevnim satima tijekom uobičajenih laboratorijskih testova, a uzorci krvi dostavljeni su i obrađeni unutar 24 sata na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju. Serijom centrifugiranja iz pune krvi prvo je izdvojena plazma (3 min na 1100g), a zatim iz plazme trombociti (15 min na 5087g) kako bi se dobila plazma siromašna trombocitima. Plazma i preostali dio krvi s leukocitima za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) pohranjeni su na -20°C za daljnje analize (Slika 5.).



Slika 5. Postupak izdvajanja plazme siromašne trombocitima. (preuzeto iz Nikolac Perkovic, 2015)

3.6.2. Izdvajanje genomske DNA iz krvi

Genomska DNA izdvojena je iz krvnih mononuklearnih stanica metodom izoljavanja (Slika 6.) osnovanom na metodi koju je uspostavio Miller sa suradnicima (Miller i sur., 1988). Ova metoda izolacije genomske DNA temelji se na uklanjanju proteina iz staničnog lizata razgradnjom pomoću enzima proteinaze K i izoljavanjem preostalih proteina. Izoljavanje je postupak, gdje povećanjem koncentracije soli, povećavamo ionsku jakost otopine čime smanjujemo interakcije između hidrofilnih aminokiselina u proteinima i vode te povećavamo protein-protein interakcije koje dovode do agregacije i taloženja proteina. Nakon izdvajanja proteina iz vodene otopine, DNA se taloži pomoću izopropanola. DNA je dobro topljiva u polarnim otapalima poput vode, a dodatkom slabije polarnih otapala, poput izopropanola, smanjujemo polarne interakcije i potičemo ionske interakcije između fosfatnih skupina molekule DNA i kationa kao što je Na^+ u otopini. Nastanak novih stabilnih veza smanjuje topljivost DNA što dovodi do njezinog taloženja.



Slika 6. Postupak izolacije DNA metodom izoljavanja. (preuzeto iz Nikolac Perkovic, 2015)

Kemikalije:

- Pufer za liziranje eritrocita (RCLB, engl. *red cell lysis buffer*): 10mM Tris (Trizma® base, Sigma-Aldrich, SAD), 5 mM MgCl_2 (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); pH 7,6

- Pufer SE: 75 mM NaCl, 25mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma-Aldrich, SAD); pH 8
- NaCl (Kemika, Hrvatska): 5 M otopina
- Proteinaza K (TaKaRa Bio, Japan): 20 mg/ml
- Natrijev dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) (Sigma-Aldrich, SAD): 10 %-tna otopina
- Etanol (Kemika, Hrvatska): 96 %-tna i 70 %-tna otopina
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer TE (Sigma-Aldrich, SAD): 10 mM Tris (Trizma® base, Sigma-Aldrich, SAD), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, SAD); pH 7,6

Oprema:

- Valjkasta mješalica Tube Roller RS-TR 5/10 (PHOENIX Instruments, Njemačka)
- Vortex mješalica (Eppendorf, SAD)
- Eppendorf mikroeprovete 1,5 ml (Eppendorf, SAD)
- Mikropipete različitih volumena (Eppendorf, SAD)
- Eppendorf 5415R Microcentrifuge (Eppendorf, SAD)
- Termoblok Termomixer Compact (Eppendorf, SAD)

Postupak:

Nakon odmrzavanja, uzorci krvi miješani su 20 minuta na valjkastoj mješalici, nakon čega je iz svakog uzorka izdvojeno 300 µl krvi koji su prebačeni u zasebne Eppendorf mikroeprovete od 1,5 ml. Uzorcima krvi dodano je po 900 µl RCLB-a kako bi se lizirali eritrociti. Uzorci su dobro promješani pomoću vorteks mješalice i ostavljeni 10 minuta na ledu. Nakon liziranja eritrocita uzorci su centrifugirani (13000g, 2 min, 4°C) pri čemu lizirani eritrociti ostaju u supernatantu, a leukociti u talogu. Supernatant je odličen, a talog se dodatno pročišćava resuspendiranjem u RCLB-u (900 µl) i ponovnim centrifugiranjem (13000g, 2 min, 4°C). Talog se ispire RCLB-om 3 do 4 puta do odgovarajuće čistoće te se na čisti talog dodaje 300 µl SE pufera i 30 µl 10 %-tnog SDS-a. Uzorci se lagano promješaju okretanjem mikroeprovete, a zatim se svakom uzorku doda 1,5 µl proteinaze K. Uzorci se zatim inkubiraju u grijaćem bloku 2 sata na 56°C što dovodi do liziranja leukocita.

Nakon inkubacije uzorcima je dodana 1/3 volumena uzorka 5 M NaCl (≈200 µl) i svaki uzorak je promješan na vorteks mješalici 10 sekundi. Centrifugiranjem uzoraka (13000g, 5 min, sobna

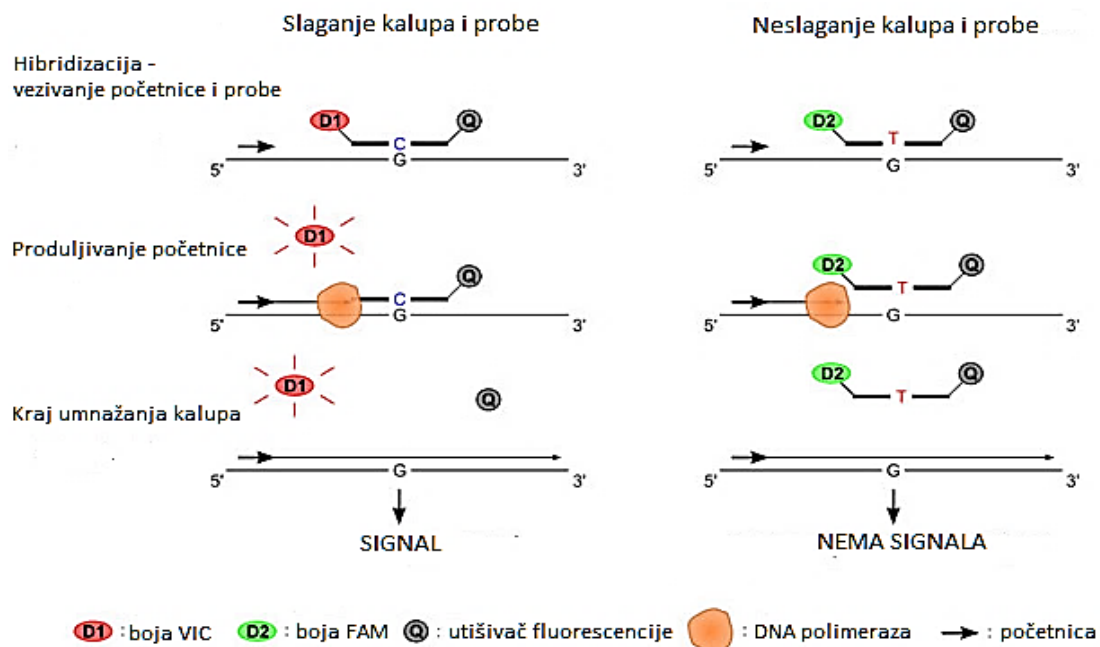
temperatura) genomska DNA ostaje otopljena u supernatantu, a preostali stanični dijelovi budu istaloženi. Supernatant je prebačen u novu sterilnu Eppendorf mikroeprevetu te su mu dodana 2 volumna udjela hladnog izopropanola ($\approx 800 \mu\text{l}$) i uzorak je lagano promješšan. Tijekom ovog koraka dolazi do taloženja DNA te je ona vidljiva u obliku netopivog spleta. Centrifugiranjem 2 min na 13000g, talog se spušta na dno mikroeprevete. Supernatant je odliven, a talog se dodatno ispire dodatkom 400 μl 75 %-tnog etanola i centrifugiranjem 2 min na 13000g pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, supernatant je odliven, a mikroeprevete su dodatno osušene prislanjanjem na papir i sušenjem 20 minuta s otvorenim poklopcem u digestoru. Osušeni talog se otapa u 100 μl TE pufera preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se DNA u potpunosti otopila. Nakon toga uzorci su pohranjeni na $+4^{\circ}\text{C}$ ili -20°C .

3.7. Genotipizacija polimorfizama *BDNF* gena

Ovaj rad istražuje 2 polimorfizma gena *BDNF*:

- Val66Met (rs6265)
- C270T (rs56164415)

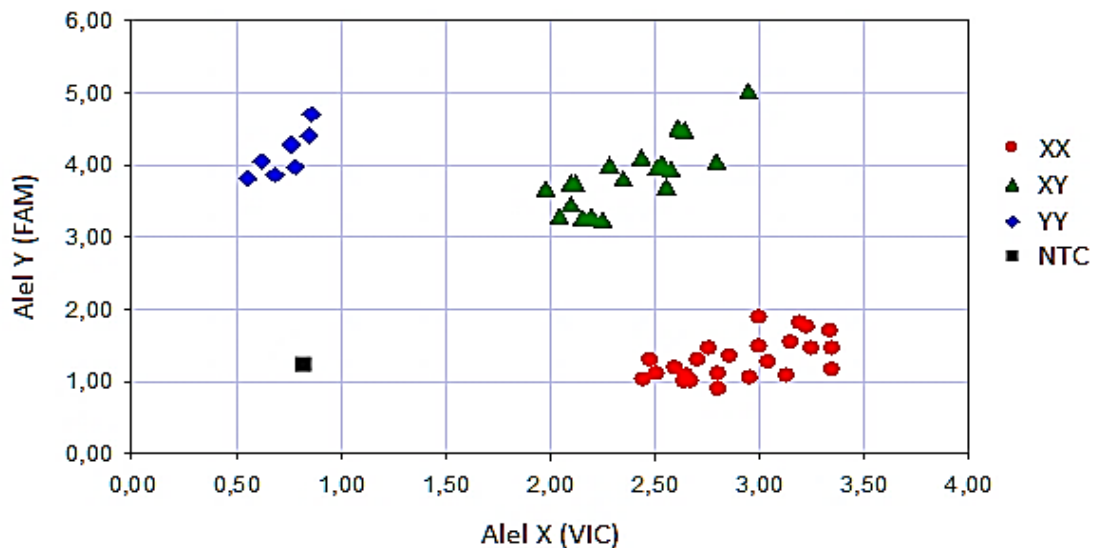
Metoda genotipizacije pomoću komercijalnog kompleta tvrtke Applied Biosystems® (SAD) temelji se na hibridizaciji fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba i njima komplementarnih polimorfnih mjesta na genomskoj DNA (Slika 7.).



Slika 7. Shematski prikaz metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*). (preuzeto iz Nikolac Perkovic, 2015)

Svaka od dviju proba u reakcijskoj smjesi na 5' kraju obilježena je fluorescentnom bojom VIC ili FAM te se specifično veže za samo jedan alel. Obije probe na 3' kraju imaju vezan utišivač fluorescencije (NFQ, engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže za komplementarni slijed na molekuli DNA koja služi kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). Utišivač i boja vezane na probu nalaze se na takovoj udaljenosti koja omogućuje utišivaču da spriječi fluorescenciju boje. Tijekom lančane reakcije polimerazom dolazi do produljavanja početnica vezanih na molekulu kalup DNA termostabilnom DNA polimerazom koja istovremeno cijepa vezane probe. Razgradnjom probe, boja više nije pod utjecajem utišivača i počinje fluorescirati što bilježimo uređajem kao signal. Signalom određujemo genotip određivanjem vrste i mjerenjem jačine signala. Fluorescencija jedne boje upućuje na prisutnost samo jednog alela odnosno homozigotnost, dok fluorescencija obje boje upućuje na prisutnost oba alela odnosno heterozigotnost.

Uređaj bilježi početnu razinu fluorescencije u reakcijskoj smjesi prije početka reakcije umnažanja genomske DNA, a po završetku bilježi konačnu razinu fluorescencije. Računalni program daje prikaz fluorescencije za svaku fluorescentnu boju u svakom uzorku, a konačan rezultat prikazuje razinu fluorescencije za svaku boju i njihov grafički prikaz (Slika 8.).



Slika 8. Primjer grafičkog prikaza rezultata genotipizacije metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). (preuzeto iz Nikolac Perkovic, 2015)

Osi x i y nose vrijednost jačine fluorescentnog signala. Probe konstruirane za alel X obilježene su fluorescentnom bojom VIC, a za alel Y bojom FAM. Crveni krugovi označavaju homozigote za alel X, plavi rombovi homozigote za alel Y, a zeleni trokuti heterozigote. Oznaka NTC (crni kvadrat) označuje negativnu kontrolu bez kalupa DNA.

Kemikalije:

- Komercijalno dostupni kompleti (Applied Biosystems®, SAD):
 - TaqMan® mješavina početnica i proba (engl. TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay) za polimorfizam Val66Met (rs6265)
 - Pristupni broj za Applied Biosystems®: C__11592758_10 (rs6265)
 - TaqMan® mješavina početnica i proba (engl. TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay) za polimorfizam C270T (rs56164415)
 - Pristupni broj za Applied Biosystems®: C__89097201_10 (rs56164415)
- Otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems®, SAD): TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju (engl. TaqMan® Genotyping Master Mix)

Oprema:

- Mikropipete različitih volumena (Eppendorf, SAD)
- ABI Prism7000 Real time PCR System Apparatus (Applied Biosystems®, SAD)

Postupak:

Određivanje genotipa s obzirom na spomenute polimorfizme napravljeno je metodom PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*) korištenjem komercijalno dostupnih TaqMan® mješavina početnica i proba (Applied Biosystems®, SAD), koje sadrže specifične početnice, TaqMan® sonde obilježene fluorescentnom bojom VIC ili FAM i reakcijski pufer. TaqMan® otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems®, SAD) sadrži termostabilnu DNA-polimerazu, deoksiribonukleotide i pufer koji osigurava optimalne uvjete za aktivnost DNA-polimeraze. Reakcijska smjesa se dobiva mješanjem ispitivanog uzorka, TaqMan® mješavina početnica i proba i TaqMan® otopina za genotipizaciju. Ukupni volumen korištene reakcijske smjese za genotipizaciju bio je 10 µl. Točan sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije tijekom genotipizacije prikazani su u Tablici 1. i Tablici 2. Genotipizacija uzoraka provedena je pomoću uređaja ABI Prism7300 Real time PCR System Apparatus (Applied Biosystems®, SAD).

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR).

Sastojak reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji / μl
TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju	2 x	1 x	5,0
TaqMan® mješavina početnica i proba	40 x	1 x	0,25
Genomska DNA razrijeđena u deH ₂ O	oko 1,8 ng/ μL	oko 0,8 ng/ μL ¹	4,75

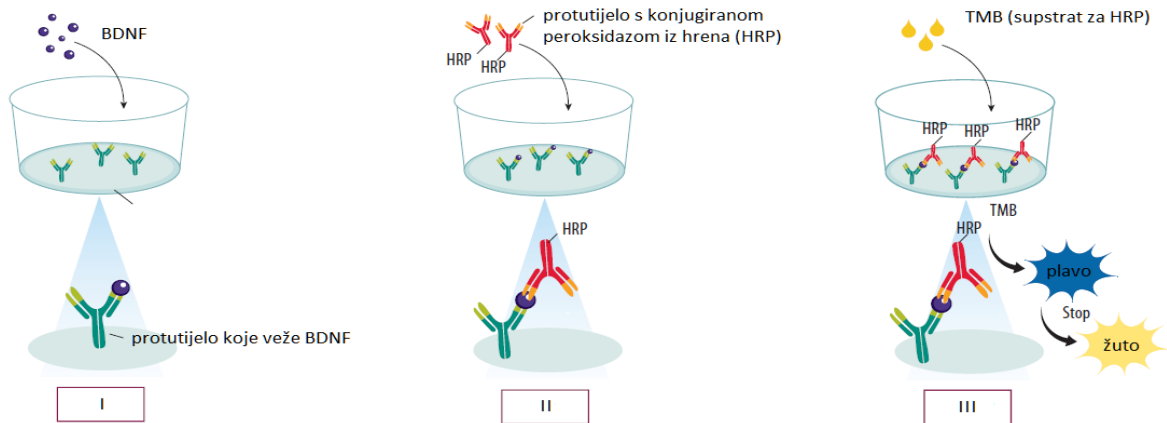
¹ 1-20 ng genomske DNA po reakcijskoj smjesi

Tablica 2. Uvjeti reakcije za genotipizaciju metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR).

Faze reakcije	Temperatura	Vrijeme
Početni korak	95°C	10 min
	55 ciklusa	
Denaturacija	92°C	15 s
Vezivanje i produljivanje početnica	60°C	60 s

3.8. Određivanje koncentracije BDNF-a u plazmi

Koncentracija BDNF-a u plazmi određena je komercijalno dostupnim ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kompletom tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada). Navedeni komplet odabran je jer u literaturi (Yoshida i sur., 2012) pokazano da vrlo uspješno detektira mBDNF u plazmi, ali ne i proBDNF. Komplet sadrži rekombinantni BDNF eksprimiran u *Sf21* stanicama i protutijela koja prepoznaju navedeni protein. Osjetljivost ovog ELISA kompleta, odnosno minimalna koncentracija BDNF-a koja se može odrediti, iznosi 20 pg/ml dok raspon testa iznosi od 62,5 do 4000 pg/ml. Time je moguće kvantitativno odrediti BDNF u plazmi. Princip testa temelji se na vezanju željenog proteina za monoklonsko protutijelo koje je imobilizirano na mikropločici nakon čega se na nastali kompleks veže drugo monoklonsko protutijelo konjugirano s enzimom (Slika 9.). Nakon serije ispiranja kojima se uklanja višak nevezanog protutijela, dodatkom supstratne otopine dolazi do razvoja boje čiji je intenzitet proporcionalan količini proteina vezanog za imobilizirano protutijelo.



Slika 9. Postupak određivanja koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi pomoću komercijalno dostupnog kompleta za enzimski povezanu imunoapsorpcijsku analizu.

(Preuzeto i prilagođeno od R&D Systems, Inc.) (preuzeto iz Nikolac Perkovic, 2015)

I. Vezivanje BDNF-a iz plazme na monoklonska protutijela kojima je presvučena mikropločica; **II.** Vezivanje protutijela s konjugiranom peroksidazom iz hrena na postojeći kompleks imobiliziranog protutijela i BDNF-a; **III.** Dodavanje supstrata tetrametilbenzidina (TMB) čijom oksidacijom, pomoću peroksidaze iz hrena, nastaje žuto obojenje koje je proporcionalno količini vezanog BDNF-a iz plazme

Kemikalije:

- Komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada) – Quantikine® ELISA Human BDNF Imuoassay:
 - Mikropločica: Polistirenska mikropločica s 96 jažica presvučenim mišjim monoklonskim protutijelom koje veže BDNF
 - BDNF standard: liofilizirani rekombinantni humani protein BDNF
 - BDNF konjugat (engl. *BDNF conjugate*): mišje monoklonalno protutijelo koje veže BDNF konjugirano s peroksidazom iz hrena
 - Razrijeđivač kompleta RD1S (engl. *assay diluent RD1S*): puferirana proteinska baza
 - Kalibrirajuća otopina za razrijeđivanje RD6P (engl. *calibration diluent RD6P*): životinjski serum
 - Pufer za ispiranje: 25x koncentriran
 - Reagens za obojenje A (engl. *color reagent A*): stabilizirani vodikov peroksid
 - Reagens za obojenje B (engl. *color reagent B*): stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin
 - Otopina za zaustavljanje reakcije (engl. *stop solution*): 2M sumporna kiselina

Oprema:

- Mikropipete različitih volumena (Eppendorf, SAD)
- Thermolab Labsystem Multiskan EX Microplate Reader (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Postupak:

Koncentracija BDNF-a u plazmi određena je komercijalno dostupnim ELISA kompletom tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada) prema uputama proizvođača. Uzorci plazme dodatno su centrifugirani 10 minuta na 10000g (4°C) prije određivanja koncentracije BDNF-a kako bi se uklonili mogući ostaci trombocita. Uzorci su, nakon centrifugiranja, razrijeđeni 4 puta koristeći kalibrirajuću otopinu za razrijeđivanje RD6P koja je dio ELISA kompleta. Koncentracija BDNF-a određivana je na mikropločici s 96 jažica presvučenim monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže BDNF iz uzoraka plazme. Svakoj jažici prvo je dodano 100 µl razrijeđivača kompleta RD1S, a zatim po 50 µl uzoraka plazme ili po 50 µl prethodno pripremljenih razrijeđenih BDNF standarda. Razrijeđenja standarda pripremljena su sukladno seriji razrijeđenja danoj u Tablici 3.

Standardi i uzorci plazme dodani su u jažice u duplikatima. Kao negativna kontrola u dvije jažice dodano je 50 µl kalibrirajuće otopine za razrijeđivanje RD6P. Mikropločica je zatim prekrivena adhezivnom folijom i ostavljena 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon prve inkubacije, svakoj jažici dodano je 100 µl BDNF konjugata i mikropločica je ostavljena 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon druge inkubacije, jažice su isprane 3 puta s po 400 µl razrijeđenog pufera za ispiranje po jažici te su isprane jažice dobro posušene dekantiranjem. Ispranim jažicama dodano je 200 µl supstratne otopine koja nastaje mješanjem reagensa za obojenje A i B u jednakom omjeru. Mikropločica se zatim ponovo inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon treće inkubacije, jažicama dodajemo otopinu za zaustavljanje reakcije i unutar 30 minuta izmjerimo apsorbanciju uzoraka na ELISA čitaću (Thermolab Labsystem Multiskan EX Microplate Reader, SAD) pri 450 nm, uz korekciju pri 570 nm. Koncentracija BDNF-a u pojedinim uzorcima određena je prema uputama proizvođača koristeći poznate koncentracije BDNF standarda.

Tablica 3. Priprema standardnih otopina BDNF-a.

Standardni niz	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Koncentracija proteina BDNF (pg/ml)	4000	2000	1000	500	250	120	62,5

3.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata napravljena je pomoću statističkog programa GraphPadPrism v6. Razina značajnosti α postavljena je na 0,05 i svi korišteni testovi su bili dvosmjerni. Raspodjela kategoričkih podataka, kao što su frekvencije genotipova i alela, uspoređena je između pojedinih skupina Fisherovim egzaktnim testom ili χ^2 -testom koji se također koristio za provjeru odstupanja raspodjele genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Kategorički podaci su uspoređivani unutar kontingencijskih tablica u kojim je prikazana apsolutna vrijednost broja ispitanika i postotni udio u ukupnom ispitivanom uzorku.

D'Agostino & Pearson omnibus test normalnosti korišten je za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih kvantitativnih parametara (demografski, kliničkih, laboratorijskih) Parametri koji nemaju normalnu razdiobu prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon između 25. i 75. percentile, dok su parametri s normalnom raspodjelom prikazani kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

Nezavisni podaci raspodijeljeni po normalnoj razdiobi uspoređivani su parametrijskim Studentovim t-testom, dok su nezavisni podaci koji nisu bili raspodijeljeni po normalnoj razdiobi uspoređivani neparametrijskim Mann-Whitney U testom ako su uspoređivane dvije skupine ili neparametrijskom Kruskal-Wallisovom ANOVA-om ako su uspoređivane tri ili više skupina. Nakon Kruskal-Wallisove ANOVA-e, u slučaju značajne razlike između skupina, napravljena je post-hoc analiza Dunnovim testom višestrukih uspoređba kako bi se odredila značajna razlika između pojedinih skupina. Zavisni podaci raspodijeljeni po normalnoj razdiobi uspoređivani su parametrijskim parnim Studentovim t-testom dok su zavisni podaci koji nisu bili raspodijeljeni po normalnoj razdiobi uspoređivani neparametrijskim Wilcoxonovim testom ako su uspoređivane dvije skupine. Povezanost broja bodova na pojedinim ljestvicama i koncentracije BDNF-a u plazmi određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) koji se primjenjuje kod nenormalne razdiobe podataka.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Demografski i klinički podaci ispitanika

Istraživanje je obuhvatilo 120 kontrolnih ispitanika i 119 ispitanika s depresijom.. Demografski podaci ispitanika prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Demografski podaci svih ispitanika

		Ispitanici podijeljeni prema dijagnozi		Statistika
		Kontrola (N=120)	Depresija (N=119)	
Spol N (%)	Muškarci	73 (60,83 %)	41 (34,45 %)	P < 0,0001; Fisher's exact test
	Žene	47 (39,17 %)	78 (65,55 %)	
Dob (godine)		42,00 (33,00; 50,75)	50,00 (34,00; 56,00)	P = 0,0071; U = 5701; Mann-Whitney test
Pušenje N (%)	Pušači	42 (35,00 %)	42 (35,29 %)	P = 1,0000; Fisher's exact test
	Nepušači	78 (65,00 %)	77 (64,71 %)	

Raspodjela osoba po spolu značajno se razlikovala između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom (P < 0,0001: Fisher's exact test). Muškarci prevladavaju u kontrolnoj skupini, dok žene u skupini ispitanika s depresijom. Veći udio žena u uzorku ispitanika s depresijom očekivan je zbog češće incidencije depresije kod žena (Kessler i Bromet, 2013). Ograničenje istraživanja je nedostatak odgovarajuće sparenih uzoraka kontrolnih ispitanika i ispitanika s depresijom zbog mogućeg utjecaja spola na razvoj depresije. Između skupina postoji također značajna razlika u dobi (P = 0,0071; Mann-Whitney test). Ispitanici s depresijom su bili stariji od kontrolne skupine, no ne očekuje se značajni učinak na rezultate s obzirom da su prijašnje studije odredile da je incidencija depresije relativno ravnomjerno raspodijeljena po dobi (Kessler i Bromet, 2013). Raspodjela osoba prema pušačkom statusu na pušače i nepušače nije se značajno razlikovala između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom (P = 1,0000; Fisher exact test). Ovaj rezultat je suprotan očekivanom jer su prethodna istraživanja koja su uspoređivala ispitanike bez psihijatrijskih poremećaja i depresivne ispitanike utvrdila da ispitanici s depresijom imaju dvostruko veću vjerojatnost da postanu pušači (Pivac i sur., 2022). Osim toga što imaju veći rizik da postanu pušači, pacijenti s depresijom također imaju

veću vjerojatnost razvoja ovisnosti o nikotinu i relapsa te niže stope izliječenja ovisnosti od nedePRESIVNIH pojedinaca (Pivac i sur., 2022).

Tablica 5. Klinički podaci osoba oboljelih od depresije

		Broj ispitanika
Broj epizoda	Prva	77 (64,71 %)
	Ponavljane	42 (35,29 %)
Pokušaj suicida	Da	8 (6,72 %)
	Ne	110 (92,44 %)
	Nepoznato	1 (0,84 %)
Terapija	Vortiooksetin	60 (50,42 %)
	Escitalopram	59 (49,58 %)
		Broj bodova na ljestvici
HAMD ljestvica	Prije terapije	22,00 (19,00; 22,00)
	Poslije terapije	9,000 (5,000; 15,00)
MADRS ljestvica	Prije terapije	26,00 (22,00; 30,00)
	Poslije terapije	10,00(5,000; 19,00)

Tablica 5 prikazuje kliničke podatke ispitanika s depresijom. Skupina ispitanika s depresijom sastojala se od 77 ispitanika s prvom epizodom depresije i 42 ispitanika s ponavljanim epizodama depresije. Studije pokazuju da je životna prevalencija depresije dva do tri puta veća od dvanaestomjesečne prevalencije što upućuje da između trećine do polovine pacijenata oboljelih od depresije ima ponavljajuće epizode depresije (Kessler i Bromet, 2013). U ovoj studiji 35% ispitanika imalo je ponavljajuće epizode depresije, što odgovara ovom omjeru.

U skupini ispitanika s depresijom, 110 ispitanika nije pokušalo počinuti suicid, dok je 8 ispitanika pokušalo počinuti suicid, a za jednog ispitanika nema podataka. Uzorak ispitanika s depresijom sastojao sa od malog broja ispitanika koji su pokušali suicid, što nije bilo dovoljno za daljnu statističku analizu.

Skupina ispitanika s depresijom liječena je jednim od dva antidepresiva, vortiooksetinom ili escitalopramom. Skupina depresivnih bolesnika liječenih vortiooksetinom sastojala se od 60

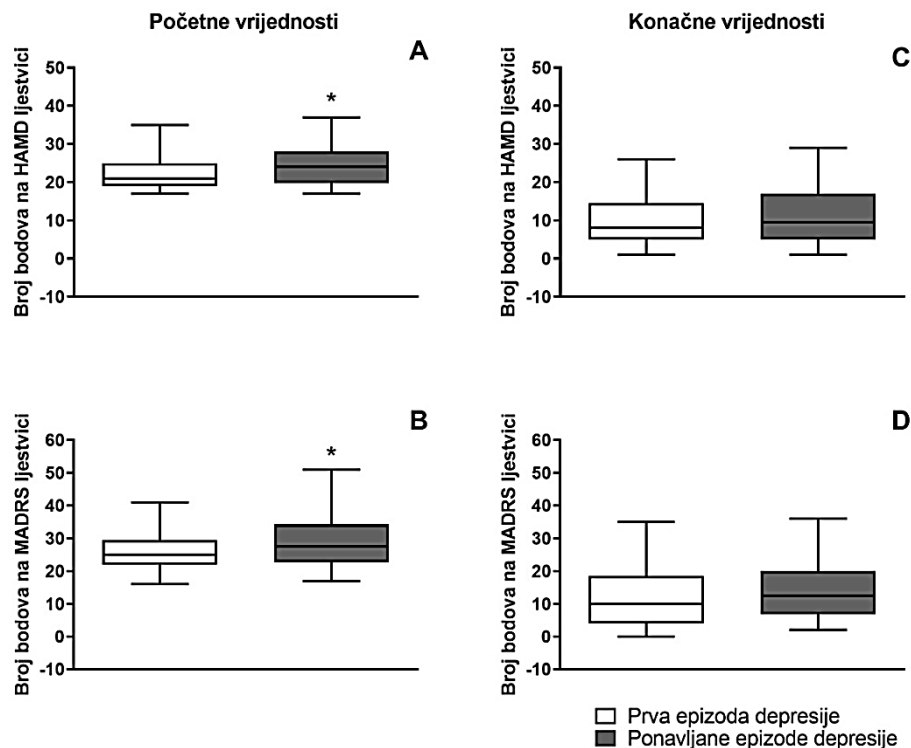
ispitanika od kojih je većina liječena dozom od 10 mg. Skupina depresivnih bolesnika liječenih escitalopramom sastojala se od 59 ispitanika od kojih je većina liječena dozom od 10 mg.

Tablica 6. Povezanost broja depresivnih epizoda s težinom kliničkih simptoma procijenjenom HAMD i MADRS ljestvicama na početku i nakon 4 tjedna antidepresivne terapije

Ispitanici podjeljeni po broju epizoda				
		Prva epizoda	Ponavljane epizode	Statistika
		(N = 77)	(N = 42)	
HAMD ljestvica	Prije terapije	21,00 (19,00; 25,00)	24,00 (19,75; 28,00)	<u>P = 0,0314;</u> U = 1232; Mann-Whitney test
	Poslije terapije	8,000 (5,000; 14,50)	9,500 (5,000; 17,00)	P = 0,3558; U = 1451; Mann-Whitney test
	Prije terapije	25,00 (22,00; 29,50)	27,50 (22,75; 34,25)	<u>P = 0,0476;</u> U = 1262; Mann-Whitney test
	Poslije terapije	10,00 (4,000; 18,50)	12,50 (6,750; 20,00)	P = 0,2078; U = 1390; Mann-Whitney test

Ispitanici s ponavljanim epizodama imali su na početku terapije statistički značajno više vrijednosti težine kliničkih simptoma procijenjenih HAMD ljestvicom (P = 0,0314; Mann-Whitney test) i MADRS ljestvicom (P = 0,0476; Mann-Whitney test) od ispitanika s prvom epizodom depresije. Težina kliničkih simptoma nakon 4 tjedna antidepresivne terapije nije se značajno razlikovala između ispitanika s prvim ili ponavljajućim epizodama depresije kada je procijenjena HAMD ljestvicom (P = 0,3558; Mann-Whitney test) i MADRS ljestvicom (P = 0,2078; Mann-Whitney test). Svi podaci su prikazani u Tablici 6. i na Slici 10. Vrijednost na HAMD ljestvici bila je značajno viša kod ispitanika s ponavljanim epizodama depresije što se razlikuje od prijašnjih rezultata (Sun i sur., 2022), iako je navedena studija provodila ispitivanje na značajno manjem uzorku. Broj bodova na MADRS ljestvici je također bio značajno viši kod ispitanika s ponavljanim epizodama depresije prije početka terapije u odnosu na ispitanike s prvom epizodom depresije što odgovara podacima iz literature (Buttenschøn i sur., 2015).

Nedostatak razlike u broju bodova na HAMD i MADRS ljestvicama nakon 4 tjedna antidepresivne terapije upućuje na jednako uspješno liječenje kod obje skupine depresivnih ispitanika neovisno o broju prijašnjih epizoda.

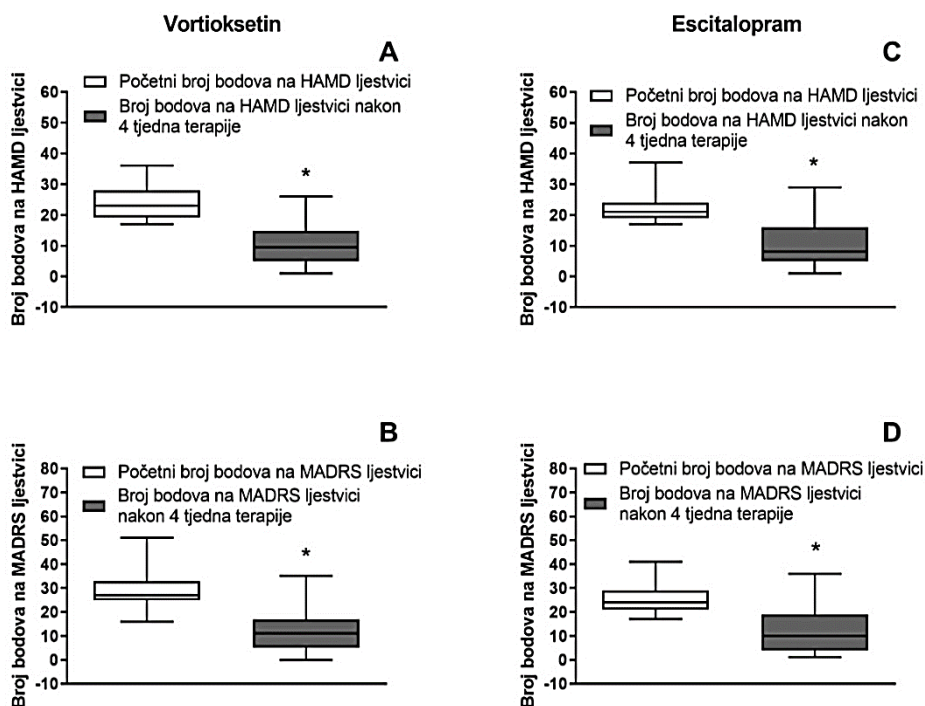


Slika 10. Grafčki prikaz težine kliničkih simptoma procijenjene HAMD (A i C) i MADRS (B i D) ljestvicama prije (lijevo) i nakon 4 tjedna antidepresivne terapije (desno) u ispitanika s prvom i ponavljanim epizodama depresije

Parnim Student t testom utvrđeno je da postoji značajna razlika u broju bodova na HAMD ljestvici određenih prije i nakon 4 tjedna terapije vortiooksetinom ($P < 0,0001$; $t = 12,99$; $df = 59$). Wilcoxonovim testom je utvrđeno da postoji značajna razlika u broju bodova na MADRS ljestvici određenih prije i nakon 4 tjedna terapije vortiooksetinom ($P < 0,0001$; $W = -1574$). Wilcoxonov test je utvrdio da postoji značajna razlika u broju bodova na HAMD ljestvici ($P < 0,0001$; $W = -1708$) i na MADRS ljestvici ($P < 0,0001$; $W = -1647$) određenih prije i nakon 4 tjedna terapije escitalopramom. Rezultati upućuju da je escitalopram učinkovit antidepresiv. Vrijednosti kliničke težine depresije određene MADRS ljestvicom su manji za 14 bodova nakon 4 tjedna terapije escitalopramom što odgovara podacima prijašnjih istraživanja. Ukupan broj bodova na MADRS ljestvici iznosio je manje od 12 bodova što odgovara remisiji upućujući da je više od polovice pacijenata ušlo u remisiju (Kirino, 2012). Svi podaci su prikazani u Tablici 7. i na Slici 11.

Tablica 7. Utjecaj antidepresivne terapije na težinu kliničkih simptoma procijenjenu HAMD i MADRS ljestvicama

Antidepresivna terapija	Vrijeme određivanja parametra		Statistika	
	Prije terapije	Nakon 4 tjedna terapije		
Vortiooksetin	Broj bodova na HAMD ljestvici	23,87 ± 4,969	10,53 ± 6,868	$P < 0,0001$; $t = 12,99$; parni Student t test
	Broj bodova na MADRS ljestvici	27,00 (25,00; 32,75)	11,00 (5,000; 17,00)	$P < 0,0001$; $W = -1574$; Wilcoxonov test
Escitalopram	Broj bodova na HAMD ljestvici	21,00 (19,00; 24,00)	8,000 (5,000; 16,00)	$P < 0,0001$; $W = -1708$; Wilcoxonov test
	Broj bodova na MADRS ljestvici	24,00 (21,00; 29,00)	10,00 (4,000; 19,00)	$P < 0,0001$; $W = -1647$; Wilcoxonov test



Slika 11. Grafički prikaz utjecaja antidepresivne terapije na težinu kliničkih simptoma procijenjenih HAMD (A i C) i MADRS (B i D) ljestvicama (lijevo vortiooksetin, desno escitalopram)

Neovisno o lijeku korištenom u terapiji obje skupine pacijenata sa depresijom su imale značajno smanjenje depresivnih simptoma, odnosno broja bodova na HAMD i MADRS ljestvicama.

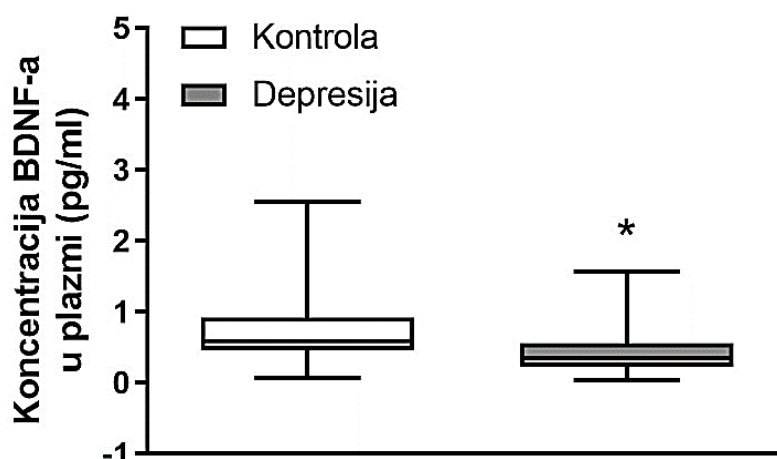
4.2. Koncentracija BDNF-a u plazmi

Svim ispitanicima određena je koncentracija BDNF-a u plazmi primjenom ELISA metode. Tijekom sakupljanja uzoraka korištene su epruvete s ACD antikoagulansom zbog prijašnjih dokaza da heparin može utjecati na izmjerenu koncentraciju BDNF-a u plazmi. Uvjeti centrifugiranja isto mogu značajno utjecati na koncentraciju BDNF-a u plazmi zbog različitih koncentracija zaostalih trombocita te je zato provedeno dodatno centrifugiranje kako bi se dobila plazma siromašna trombocitima (Bocchio-Chiavetto i sur., 2010; Gejl i sur., 2019).

Koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika prikazane su u Tablici 8. Utvrđeno je da postoji značajna razlika između skupina ($P < 0,0001$; Mann-Whitney test), odnosno utvrđena je značajno manja koncentracija BDNF-a u plazmi kod depresivnih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima (Sagud i sur., 2016).

Tablica 8. Koncentracija BDNF-a u plazmi svih ispitanika

	Ispitanici podijeljeni prema dijagnozi		Statistika
	Kontrola (N=120)	Depresija (N=119)	
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,5950 (0,4500; 0,9250)	0,3400 (0,2200; 0,5500)	$P < 0,0001$; U = 3811; Mann-Whitney test



Slika 12. Grafički prikaz koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika

Korelacija broja bodova na HAMD ljestvici s koncentracijom BDNF-a u plazmi svih depresivnih ispitanika nije nađena ($r = 0,1635$; $p = 0,0756$; Spearmanova korelacija), kao niti korelacija broja bodova na MADRS ljestvici s koncentracijom BDNF-a u plazmi svih depresivnih ispitanika ($r = 0,1233$; $p = 0,1817$; Spearmanova korelacija).

Nedostatak korelacije upućuje da ne postoji povezanost težine simptoma depresije i koncentracije BDNF-a u plazmi. Literatura daje oprečne rezultate o korelaciji koncentracije BDNF-a u krvi i simptoma depresije, gdje dio istraživanja nalazi korelaciju broja bodova HAMD ljestvice i koncentracije BDNF-a u serumu (Shimizu i sur., 2003), dok dio studija nije utvrdilo korelaciju između broja bodova HAMD ljestvice i koncentracije BDNF-a u plazmi (Sagud i sur., 2016), kao niti između broja bodova MADRS ljestvice i koncentracije BDNF-a u serumu (Buttenschøn i sur., 2015).

Koncentracija BDNF-a u plazmi prije i nakon 4 tjedna antidepresivne terapije prikazana je u Tablici 9.

Tablica 9. Povezanost broja depresivnih epizoda s koncentracijom BDNF-a u plazmi na početku i nakon 4 tjedna antidepresivne terapije

		Ispitanici podjeljeni po broju epizoda		Statistika
		Prva epizoda (N = 77)	Ponavljane epizode (N = 42)	
BDNF koncentracija u plazmi (pg/ml)	Prije terapije	0,3270 (0,2075; 0,4910)	0,3995 (0,2160; 0,7330)	P = 0,2013; U = 1387; Mann-Whitney test
	Poslije terapije	0,3660 (0,2085; 0,5725)	0,4300 (0,1965; 0,8900)	P = 0,1787; U = 1375; Mann-Whitney test

Početna ($P = 0,2013$; Mann-Whitney test) i konačna (nakon 4 tjedna antidepresivne terapije) ($P = 0,1781$; Mann-Whitney test) koncentracija BDNF-a u plazmi ne razlikuju se značajno između skupina ispitanika s prvom epizodom depresije i ponavljanim epizodama depresije. Ponavljane epizode povezuju se s pojavom jačih kognitivnih deficita kao što je smanjena funkcija deklarativne memorije, koja je surogat biljeg hipokampalne funkcije, te se smanjuje otprilike 2-3 % nakon svake depresivne epizode, sve do četiri depresivne epizode (McIntyre i sur., 2013).

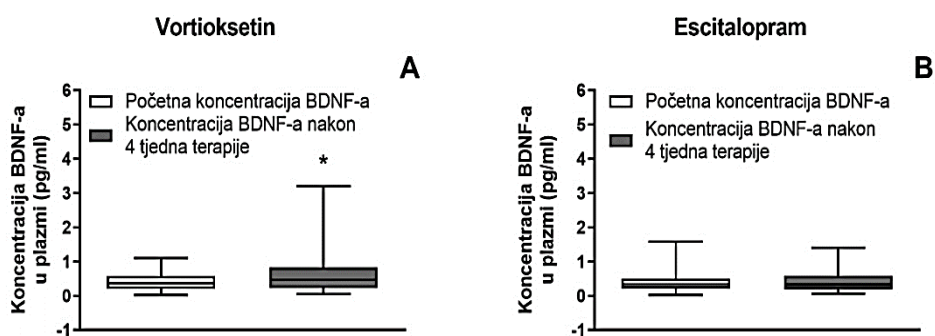
Najveći pad u volumenu hipokampusa najčešće je za vrijeme prve depresivne epizode, a nakon postizanja remisije najznačajniji čimbenik u smanjenju hipokampalne funkcije je trajanje zadnje depresivne epizode. (McIntyre i sur., 2013) Rezultati našeg istraživanja ne ukazuju na statističko smanjenje koncentracije BDNF-a u plazmi kod pacijenata s ponavljanim epizodama depresije u odnosu na ispitanike s prvom depresivnom epizodom. Periferni BDNF ima kompleksnu regulaciju tako da je moguće da periferne vrijednosti BDNF-a ne odražavaju precizno koncentraciju u hipokampusu pacijenta. Nedostatak razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi između ispitanika s prvom epizodom i ponavljanim epizodama prije početka terapije i nakon 4 tjedna odgovara podacima iz prijašnjih studija (Sagud i sur., 2016).

Tablica 10. Utjecaj antidepresivne terapije na koncentraciju BDNF-a u plazmi

Antidepresivna terapija	Vrijeme određivanja parametra	Statistika		
		Prije terapije	Nakon 4 tjedna terapije	
Vortiooksetin	Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,3690 (0,2065; 0,5808)	0,4525 (0,2250; 0,8268)	$P = 0,0174$; $W = 642,0$; Wilcoxonov test
Escitalopram	Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,3410 (0,2180; 0,5000)	0,3310 (0,1920; 0,5870)	$P = 0,4785$; $W = -190,0$; Wilcoxonov test

Utjecaj antidepresivne terapije vortiooksetinom i escitalopramom na koncentraciju BDNF-a u plazmi prije i nakon 4 tjedna terapije prikazan je u Tablici 10 i na slici 13. Wilcoxonov test utvrdio je da postoji značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi određene prije i nakon 4 tjedna terapije vortiooksetinom ($P = 0,0174$; $W = 642,0$). Ispitanici su imali značajno veću koncentraciju BDNF-a u plazmi nakon 4 tjedna terapije s vortiooksetinom u odnosu na koncentraciju BDNF-a u plazmi prije početka terapije. Ovaj rezultat odgovara prijašnjim istraživanjima koji su našli značajno više vrijednosti BDNF-a u krvi nakon terapije vortiooksetinom (Sagud i sur., 2016). Wilcoxonovim testom je utvrđeno da ne postoji značajna razlika i u koncentraciji BDNF-a u plazmi određenih prije i nakon 4 tjedna terapije escitalopramom ($P = 0,4785$; $W = -190,0$). Rezultati upućuju da escitalopram nije imao značajni učinak na koncentraciju BDNF-a u plazmi. Dio prethodnih istraživanja uočio je pad koncentracije BDNF-a u serumu nakon terapije antidepresivima iako je većina studija našla

povećanje koncentracije BDNF-a nakon terapije (Buttenschøn i sur., 2015). Neka od prijašnjih istraživanja čak su pokazala da kronična terapija escitalopramom dovodi do smanjenja razina BDNF-a u prefrontalnom korteksu i značajno smanjuje BDNF signalizaciju nakon 3 tjedna terapije (Zhong i sur., 2012). Dobiveni rezultati u našem istraživanju upućuju na nedostatak učinka escitaloprama na koncentraciju BDNF-a u plazmi. Terapija vortiksetinom je značajno povisila koncentraciju BDNF-a u plazmi, dok escitalopram nije doveo do promjena u koncentraciji BDNF-a u plazmi. Promjene u vrijednostima koncentracije BDNF-a u krvi nakon antidepresivne terapije su nekonzistentne u prethodnim studijama (Buttenschøn i sur., 2015) te povezanost depresije i koncentracije BDNF-a u serumu ili plazmi zahtijeva daljnja istraživanja.



Slika 13. Grafički prikaz utjecaja antidepresivne terapije na koncentraciju BDNF-a u plazmi (A) vortiksetin (B) escitalopram.

4.3. *BDNF* Val66Met polimorfizam

Učestalost genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma (Tablica 11.) u skladu je s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (HWE, engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*) i u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanika s depresijom.

Tablica 11. Dobivene i očekivane frekvencije za genotipove *BDNF* Val66Met polimorfizma

Genotipovi <i>BDNF</i> Val66Met SNP-a		AA	AG	GG	Statistika
Kontrola	Dobiveno	7 (5,83 %)	32 (26,67 %)	81 (67,50 %)	P = 0,1267;
	Očekivano	4,4 (3,67 %)	37,2 (31,00 %)	78,4 (65,33 %)	χ^2 -test
Depresija	Dobiveno	4 (3,36 %)	30 (25,21 %)	85 (71,43 %)	P = 0,5091;
	Očekivano	3,0 (2,52 %)	31,9 (26,81 %)	84 (70,59 %)	χ^2 -test

Frekvencije manje učestalog alela za u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s depresijom bile su malo više od očekivanih 20%, ali nije utvrđeno značajno odstupanje od HWE (Tudor i sur., 2018). Raspodjela genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma značajno se ne razlikuje ($P = 0,6142$; χ^2 -test) između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom (Tablica 12. i Slika 14). Raspodjela pojedinih alela *BDNF* Val66Met polimorfizma također značajno se ne razlikuje ($P = 0,4007$; Fisher's exact test) između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom.

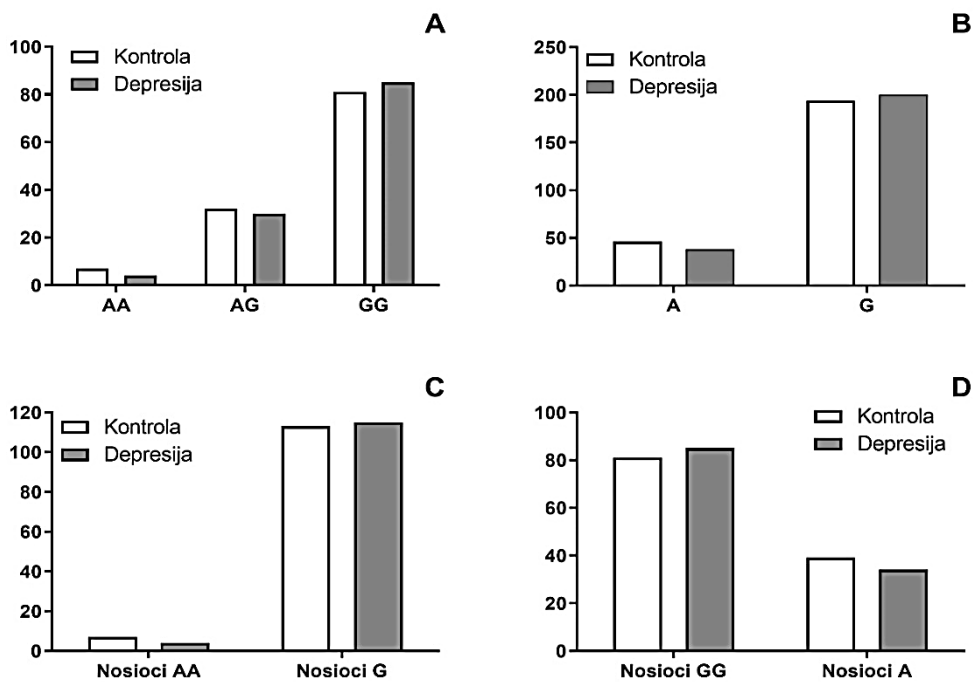
Tablica 12. Brojnost i učestalost genotipova i alela *BDNF* Val66Met polimorfizma u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> Val66Met SNP	Genotipovi			Aleli	
	AA	AG	GG	A	G
Kontrola (N = 120)	7 (5,83 %)	32 (26,67 %)	81 (67,50 %)	46 (19,17 %)	194 (80,83 %)
Depresija (N = 119)	4 (3,36 %)	30 (25,21 %)	85 (71,43 %)	38 (15,97 %)	200 (84,03 %)
Statistika	$\chi^2 = 0,9749$; $df = 2$; $P = 0,6142$; χ^2 -test			$P = 0,4007$; Fisher's exact test	

Tablica 13. Brojnost i učestalost homozigotnih nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela G i homozigotnih nosioca genotipa GG u odnosu na nosioce alela A za *BDNF* Val66Met polimorfizam u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> Val66Met SNP	Nosioci		Nosioci	
	AA	G	GG	A
Kontrola (N = 120)	7 (5,83 %)	113 (94,17 %)	81 (67,50 %)	39 (32,50 %)
Depresija (N = 119)	4 (3,36 %)	115 (96,64 %)	85 (71,43 %)	34 (28,57 %)
Statistika	$P = 0,5391$; Fisher's exact test		$P = 0,5748$; Fisher's exact test	

Usporedba homozigotnog nosioca genotipa AA i nosioca alela G ($P = 0,5391$; Fisher's exact test) i homozigotnog nosioca genotipa GG i nosioca alela A ($P = 0,5748$; Fisher's exact test) *BDNF* Val66Met polimorfizma nije pokazala značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom (Tablica 13. i Slika 14.). Ispitanici s depresijom i kontrolni ispitanici su imali približno jednak odnos homozigotnih genotipova i suprotnog alela što potvrđuje da su varijante ovog polimorfizma jednako raspodijeljene među ispitanicima.



Slika 14. Raspodjela genotipova (A) i alela (B), nosioca genotipa AA naspram alela G (C) i nosioca genotipa GG naspram alela A (D) za *BDNF* Val66Met polimorfizam u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika s depresijom

Koncentracija BDNF-a u plazmi za svaki genotip *BDNF* Val66Met polimorfizma u kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 14. i na Slici 15. Statistička obrada podataka pokazala je da *BDNF* Val66Met polimorfizam utječe na koncentraciju BDNF-a u plazmi u kontrolnoj skupini s obzirom da je nađena razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između različitih genotipova ($P = 0,0127$; Kruskal-Wallis test). Post-hoc analizom pomoću Dunn-ovog testa utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između genotipova AG i GG ($P = 0,0116$). Koncentracija BDNF-a u plazmi u kontrolnoj skupini se značajno razlikovala između dva genotipa *BDNF* Val66Met polimorfizma zbog značajno više koncentracije BDNF-a u plazmi kod ispitanika s GG genotipom nego kod ispitanika s AG genotipom. Smanjena koncentracija BDNF-a u plazmi je očekivana kod nosioca AG genotipa zbog nastanka heterodimera proBDNF-a koji se teže izlučuje (Covaceuszach i sur., 2022). Nedostatak razlike

između genotipova AA i GG upućuje na potencijalno kompleksnu regulaciju koncentracije BDNF-a u krvi. Također zbog malog broja nosioca genotipa AA moguće je da učinak genotipa nije uočen.

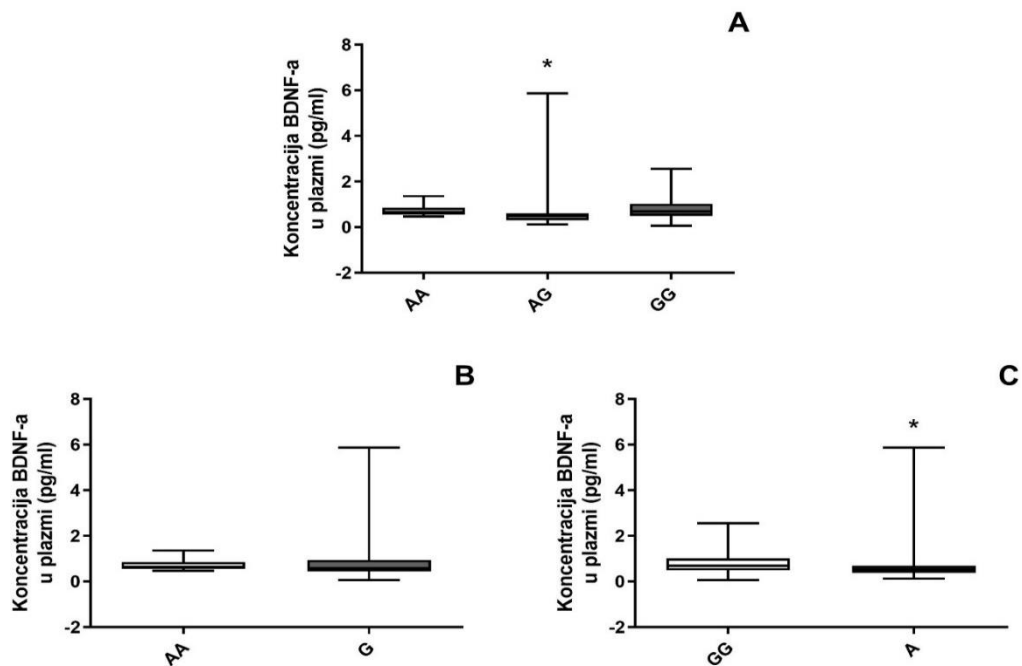
Tablica 14. Povezanost genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma i koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika kontrolne skupine

Genotipovi <i>BDNF</i> Val66Met	AA	AG	GG	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,6500 (0,5500; 0,8500)	0,4900 (0,3000; 0,6075)	0,6900 (0,4850; 1,020)	<u>P = 0,0127;</u> Kruskal-Wallis test

Nadalje u kontrolnoj skupini utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između nosioca alela A i nosioca homozigotnog genotipa GG *BDNF* Val66Met polimorfizma (P = 0,0128; U = 1137; Mann-Whitney U test), ali nije nađena statistički značajna razlika između nosioca alela G i nosioca homozigotnog genotipa AA (P = 0,5513; U = 341,0; Mann-Whitney U test) što je prikazano u Tablici 15. i Slici 15. Rezultati upućuju na povezanost A alela *BDNF* Val66Met polimorfizma i koncentracije BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika.

Tablica 15. Koncentracija BDNF-a u plazmi u nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela G i nosioca genotipa GG u odnosu na nosioce alela A za *BDNF* Val66Met polimorfizam u kontrolnoj skupini ispitanika

<i>BDNF</i> Val66Met SNP	Nosioci		Nosioci	
	AA	G	GG	A
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,6500 (0,5500; 0,8500)	0,5800 (0,4350; 0,9350)	0,6900 (0,4850; 1,020)	0,5100 (0,3700; 0,6900)
Statistika	P = 0,5513; U = 341; Mann-Whitney U test		<u>P = 0,0128;</u> U = 1137; Mann-Whitney U test	



Slika 15. Grafički prikaz koncentracija BDNF-a u plazmi u kontrolnih ispitanika nosioca različitih genotipova (A) i nosioca homozigotnih genotipa naspram nosioca suprotnog alela (B i C) za *BDNF* Val66Met polimorfizam

Statistički značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između nosioca genotipova AG i GG, kao i viša koncentracija BDNF-a u plazmi kod nosioca genotipa GG u odnosu na nosioce alela A u kontrolnoj skupini upućuje na mogući utjecaj Met varijante *BDNF* Val66Met polimorfizma na koncentraciju BDNF-a u plazmi. Pokazano je da nosioci Met alela imaju smanjenu količinu BDNF-a u središnjem živčanom sustavu što se povezuje s povećanim rizikom od depresije (Youssef i sur., 2018).

Koncentracije BDNF-a u plazmi i broj bodova na HAMD i MADRS ljestvicama u skupini depresivnih bolesnika za svaki genotip *BDNF* Val66Met polimorfizma prikazani su u Tablici 16. Statističkom obradom podataka nije utvrđena značajna nađena razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između depresivnih nosioca različitih genotipova ($P = 0,1121$; Kruskal-Wallis test). Također nije nađena razlika u broju HAMD bodova između nosioca različitih genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma depresivnih ispitanika prije ($P = 0,2820$; Kruskal-Wallis test) i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije ($P = 0,3906$; Kruskal-Wallis test). Nadalje nije nađena razlika u broju MADRS bodova između nosioca različitih genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma u depresivnih ispitanika prije ($P = 0,1679$; Kruskal-Wallis test) i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije ($P = 0,3642$; Kruskal-Wallis test).

Nije uočena značajna povezanost između *BDNF* Val66Met polimorfizma i koncentracije BDNF-a u plazmi, te broja bodova na HAMD i MADRS ljestvicama prije i nakon 4 tjedna antidepressivne terapije u ispitanika sa depresijom. To je u skladu s prethodno primijećenim nedostatkom povezanosti broja bodova na MADRS ljestvici i koncentracije BDNF-a u serumu s genotipom *BDNF* Val66Met polimorfizma (Buttenschøn i sur., 2015).

Tablica 16. Koncentracija BDNF-a u plazmi i broj bodova na HAMD i MADRS ljestvicama prije i 4 tjedna nakon antidepressivne terapije u depresivnih nosioca različitih genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma

Genotipovi				
<i>BDNF</i> Val66Met SNP-a	AA	AG	GG	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml) prije terapije	0,3500 (0,0950; 0,6650)	0,3050 (0,1425; 0,4325)	0,4000 (0,2250; 0,6300)	P = 0,1121; Kruskal-Wallis test
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml) nakon 4 tjedna terapije	0,3365 (0,1403; 0,4885)	0,3770 (0,2728; 0,5900)	0,3910 (0,2055; 0,7870)	P = 0,7108; Kruskal-Wallis test
Broj bodova na HAMD ljestvici prije terapije	27,50 (21,00; 29,50)	20,00 (19,00; 25,00)	22,00 (19,00; 25,00)	P = 0,2820; Kruskal-Wallis test
Broj bodova na HAMD nakon 4 tjedna terapije	14,50 (10,25; 15,00)	9,000 (5,750; 15,25)	9,000 (5,000; 14,50)	P = 0,3906; Kruskal-Wallis test
Broj bodova na MADRS ljestvici prije terapije	33,50 (27,75; 34,75)	24,00 (22,00; 30,00)	26,00 (21,50; 30,00)	P = 0,1679; Kruskal-Wallis test
Broj bodova na MADRS nakon 4 tjedna terapije	17,00 (11,00; 24,50)	10,00 (6,750; 17,25)	10,00 (4,00; 19,50)	P = 0,3642; Kruskal-Wallis test

Statističkom obradom podataka nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi između nosioca alela G i genotipa AA *BDNF* Val66Met polimorfizma ($P = 0,7677$; $U = 209,0$; Mann-Whitney U test), ali je nađena statistički značajna razlika između depresivnih nosioca alela A i genotipa GG ($P = 0,0383$; $U = 1094$; Mann-Whitney U test). Statističkom obradom podataka pokazalo se da *BDNF* Val66Met polimorfizam nije povezan sa brojem bodova HAMD i MADRS ljestvice prije i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije. Usporedbe nosioca pojedinih alela i odgovarajućih genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma prikazane su u Tablicama 17. i 18.

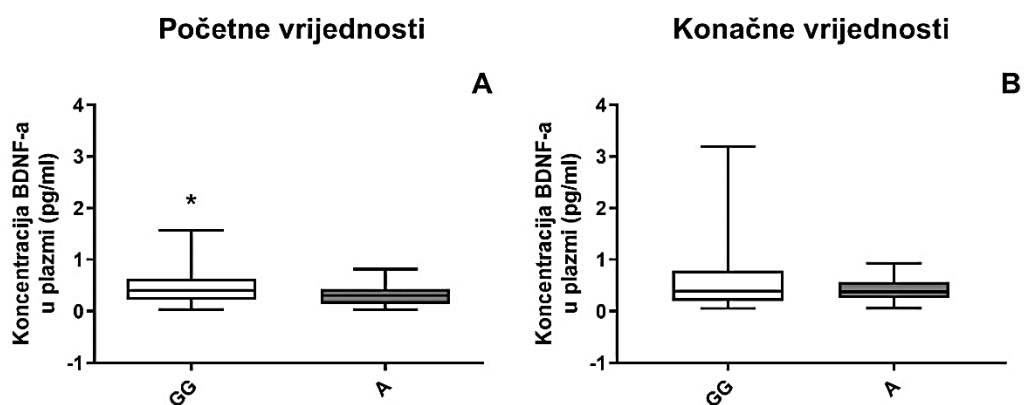
Tablica 17. Koncentracija BDNF-a u plazmi i broj bodova na HAMD i MADRS ljestvicama prije i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije u nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela G za *BDNF* Val66Met polimorfizam u skupini ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> Val66Met SNP	Nosioci AA	Nosioci G	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi prije terapije (pg/ml)	0,3500 (0,0950; 0,6650)	0,3400 (0,2200; 0,5500)	$P = 0,7677$; $U = 209,0$; Mann-Whitney U test
Koncentracija BDNF-a u plazmi nakon 4 tjedna terapije (pg/ml)	0,3365 (0,1403; 0,4885)	0,3880 (0,2100; 0,7190)	$P = 0,4376$; $U = 175,5$; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici prije terapije	27,50 (21,00; 29,50)	22,00 (19,00; 25,00)	$P = 0,1679$; $U = 135,0$; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici nakon 4 tjedna terapije	14,50 (10,25; 15,00)	9,000 (5,000; 15,00)	$P = 0,2004$; $U = 141,5$; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS ljestvici prije terapije	33,50 (27,75; 34,75)	26,00 (22,00; 30,00)	$P = 0,0676$; $U = 106,5$; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS ljestvici nakon 4 tjedna terapije	17,00 (11,00; 24,50)	10,00 (5,000; 18,00)	$P = 0,1656$; $U = 134,5$; Mann-Whitney U test

Jedina utvrđena razlika u skupini ispitanika s depresijom je u koncentraciji BDNF-a u plazmi kada se uspoređuju nosioci alela A i genotipa GG *BDNF* Val66Met polimorfizma (Slika 16). Očekuje se najveća razlika između tih dviju skupina zbog učinka A alela na prijenos i otpuštanje BDNF-a (Covaceuszach i sur., 2022). Sve ostale razlike između nosioca homozigitnih genotipova i nosioca alela *BDNF* Val66Met polimorfizma nisu bile statistički značajne.

Tablica 18. Koncentracija BDNF-a u plazmi i broj bodova na HAMD i MADRS ljestvicima prije i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije u genotipa GG u odnosu na nosioce alela A za *BDNF* Val66Met polimorfizam u skupini ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> Val66Met SNP	Nosioci GG	Nosioci A	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi prije terapije (pg/ml)	0,4000 (0,2250; 0,6300)	0,3050 (0,1425; 0,4325)	<u>P = 0,0383</u> ; U = 1094; Mann-Whitney U test
Koncentracija BDNF-a u plazmi nakon 4 tjedna terapije (pg/ml)	0,3910 (0,2055; 0,7870)	0,3770 (0,2550; 0,5728)	P = 0,6765; U = 1374; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici prije terapije	22,00 (19,00; 25,00)	21,00 (19,00; 27,00)	P = 0,7678; U = 1395; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici nakon 4 tjedna terapije	9,000 (5,000; 14,50)	9,000 (6,000; 15,00)	P = 0,4376; U = 1313; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS ljestvici prije terapije	26,00 (21,50; 30,00)	25,50 (22,00; 31,25)	P = 0,9474; U = 1434; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS ljestvici nakon 4 tjedna terapije	10,00 (4,00; 19,50)	10,00 (7,000; 18,25)	P = 0,5586; U = 1345; Mann-Whitney U test



Slika 16. Grafički prikaz koncentracije BDNF-a u plazmi prije (A) i 4 tjedna nakon (B) antidepressivne terapije u depresivnih nosioca genotipa GG i nosioca alela A *BDNF* Val66Met polimorfizma

4.4. *BDNF* C270T polimorfizam

Učestalost genotipova *BDNF* C270T polimorfizma (Tablica 19.) u skladu je s HWE i u kontrolnoj skupini i u ispitanika s depresijom. Frekvencije manje učestalog alela za *BDNF* C270T polimorfizam u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika sa depresijom bile su više od očekivanih 6%, ali nije utvrđeno statistički značajno odstupanje od HWE (Tudor i sur., 2018).

Tablica 19. Dobivene i očekivane frekvencije za genotipove *BDNF* C270T polimorfizma

Genotipovi		CC	CT	TT	Statistika
<i>BDNF</i> C270T SNP-a					
Kontrola	Dobiveno	104 (86,67 %)	15 (12,5 %)	1 (0,83 %)	P = 0,5810; χ^2 -test
	Očekivano	103,6 (86,33 %)	15,8 (13,17 %)	0,6 (0,50 %)	
Depresija	Dobiveno	103 (88,03 %)	14 (11,97 %)	0 (0,00 %)	P = 0,4912; χ^2 -test
	Očekivano	103,4 (88,38 %)	13,2 (11,28 %)	0,4 (0,34 %)	

Učestalost opaženih genotipova i alela *BDNF* C270T polimorfizma u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s depresijom prikazana je u Tablici 20. i na Slici 17. Raspodjela genotipova *BDNF* C270T polimorfizma značajno se ne razlikuje (P = 0,6061; χ^2 -test) između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom. Raspodjela pojedinih alela *BDNF* C270T polimorfizma također se značajno ne razlikuje (P = 0,7715; Fisher's exact test) između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom.

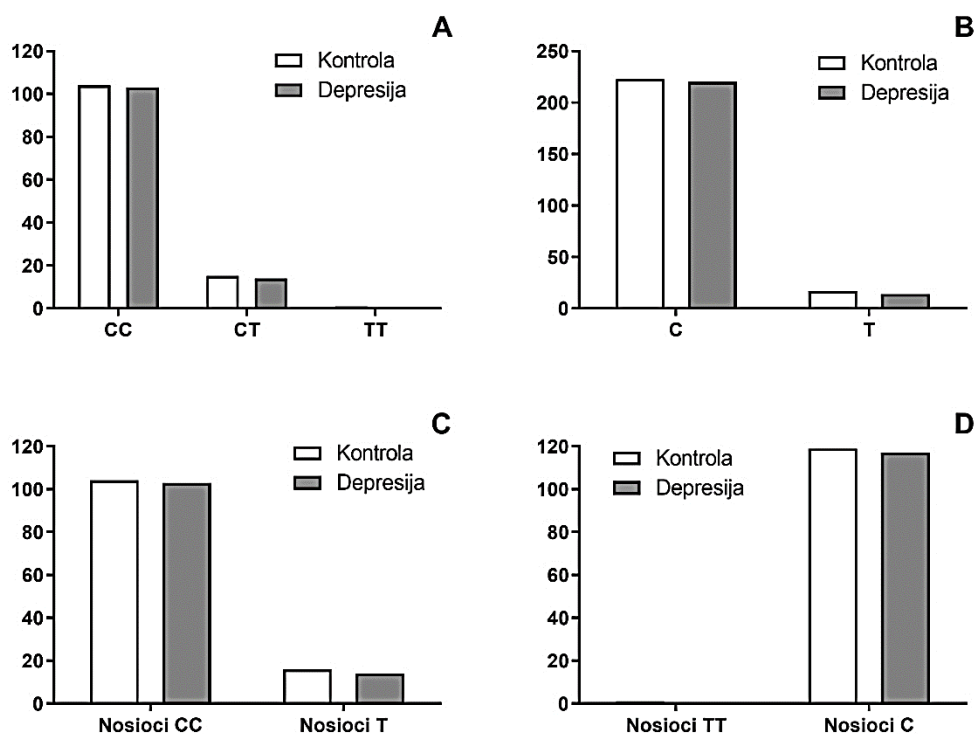
Tablica 20. Brojnost i učestalost genotipova i alela *BDNF* C270T polimorfizma u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> C270T SNP	Genotipovi			Aleli	
	N (%)	CC	CT	TT	C
Kontrola (N = 120)	104 (86,67%)	15 (12,50%)	1 (0,83%)	223 (92,92%)	17 (7,08%)
Depresija (N = 117)	103 (88,03%)	14 (11,97%)	0 (0%)	220 (94,02%)	14 (5,98%)
Statistika	$\chi^2 = 1,001$; df = 2; P = 0,6061; χ^2 -test			P = 0,7115; Fisher's exact test	

Usporedba homozigotnih nosioca genotipa CC i nosioca alela T (P = 0,8459; Fisher's exact test) i homozigotnih nosioca genotipa TT i nosioca alela C (P = 1,0000; Fisher's exact test) *BDNF* C270T polimorfizma nije pokazala značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine ispitanika s depresijom (Tablica 21. i Slika 17.) Niti jedan ispitanik s depresijom nije imao genotip TT za *BDNF* C270T polimorfizam. Ovakvi rezultati su česti kod rijetkih genotipova te povećavaju rizik od nastanka analitičkih pogrešaka i smanjuju značajnost rezultata (Schumacher i sur., 2005). Daljnja istraživanja ovog polimorfizma zahtijevaju veće uzorke.

Tablica 21. Brojnost i učestalost nosioca genotipa CC u odnosu na nosioca alela T i nosioca genotipa TT u odnosu na nosioce alela C za *BDNF* C270T polimorfizam u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s depresijom

<i>BDNF</i> C270T SNP	Nosioce		Nosioce	
	CC	T	TT	C
Kontrola (N = 120)	104 (86,67%)	16 (13,33%)	1 (0,83%)	119 (99,17%)
Depresija (N = 117)	103 (88,03%)	14 (11,97%)	0 (0%)	117 (100%)
Statistika	P = 0,8459; Fisher's exact test		P = 1,0000; Fisher's exact test	



Slika 17. Raspodjela genotipova (A) i alela (B), nosioca genotipa CC naspram nosioca alela T (C) i nosioca genotipa TT naspram nosioca alela G (D) za *BDNF* C270T polimorfizam u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika s depresijom

Koncentracije BDNF-a u plazmi za svaki genotip *BDNF* C270T polimorfizma u kontrolnoj skupini prikazane su u Tablici 22. Statističkom obradom podataka pokazalo se da *BDNF* C270T polimorfizam ne utječe na koncentraciju BDNF-a u plazmi u kontrolnoj skupini s obzirom da nije nađena razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi između nosioca različitih genotipova *BDNF* C270T polimorfizma ($P = 0,0773$; Kruskal-Wallis test).

Tablica 22. Povezanost različitih genotipova *BDNF* C270T polimorfizma sa koncentracijom BDNF-a u plazmi kontrolnih ispitanika

Genotipovi				
<i>BDNF</i> C270T SNP-a	CC	CT	TT	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,5850 (0,4550; 0,8950)	0,6200 (0,3600; 1,060)	1,790*	$P = 0,0773$; Kruskal-Wallis test

* jedina vrijednost

Kao što je prikazano u Tablici 23, statistička obrada podataka pokazala je da se nosioci alela T i homozigotnog genotipa CC *BDNF* C270T polimorfizma ne razlikuju u koncentraciji BDNF-a u plazmi ($P = 0,8289$; $U = 803,5$; Mann-Whitney U test). Nije bilo moguće odrediti razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi između nosioca genotipa TT i nosioca alela C, jer je samo jedan ispitanik bio TT homozigot.

Tablica 23. Koncentracija BDNF-a u plazmi nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela T i nosioca genotipa TT u odnosu na nosioce alela C za *BDNF* C270T polimorfizam u kontrolnoj skupini

<i>BDNF</i> C270T SNP	Nosioci		Nosioci	
	CC	T	TT	C
Koncentracija BDNF-a u plazmi (pg/ml)	0,5850 (0,4550; 0,8950)	0,6750 (0,3700; 1,075)	1,790*	0,5900 (0,4500; 0,9100)
Statistika	P = 0,8289; U = 803,5; Mann-Whitney U test		N/A	

* jedina vrijednost

Sve usporedbe podataka za *BDNF* C270T polimorfizam u skupini depresivnih ispitanika su bile usporedbe nosioca alela T i genotipa CC. Statističkom obradom podataka pokazalo se da *BDNF* C270T polimorfizam u depresivnih ispitanika nije povezan sa koncentracijom BDNF-a u plazmi ($P = 0,0737$; $U = 508,0$; Mann-Whitney U test), brojem bodova na HAMD ljestvici prije ($P = 0,6451$; $U = 665,5$; Mann-Whitney U test) i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije ($P = 0,4204$; $U = 576,5$; Mann-Whitney U test), te brojem bodova na MADRS ljestvici prije ($P = 0,9254$; $U = 709,5$; Mann-Whitney U test) i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije ($P = 0,5643$; $U = 651,5$; Mann-Whitney U test). Nedostatak TT homozigota u skupini depresivnih bolesnika dopušta samo usporedbu nosioca alela T i nosioca homozigotnog genotipa CC što predstavlja ograničenje istraživanja, te upućuje na nužnost korištenja većih uzoraka u budućim istraživanjima.

Razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi i broju bodova na HAMD i MADRS ljestvicima prije i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije između depresivnih nosioca genotipa CC i nosioca alela T za *BDNF* C270T polimorfizam prikazane su u Tablici 24.

Tablica 24. Razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi i broju bodova na HAMD i MADRS ljestvicima prije i 4 tjedna nakon antidepresivne terapije između depresivnih nosioca genotipa CC i nosioca alela T za *BDNF* C270T polimorfizam

<i>BDNF</i> C270T SNP	Nosioci CC	Nosioci T	Statistika
Koncentracija BDNF-a u plazmi prije terapije (pg/ml)	0,3200 (0,2000; 0,5000)	0,4800 (0,3150; 0,7375)	P = 0,0737; U = 508,0; Mann-Whitney U test
Koncentracija BDNF-a u plazmi nakon 4 tjedna terapije (pg/ml)	0,3370 (0,1980; 0,6160)	0,4520 (0,2940; 0,8188)	P = 0,1389; U = 544,0; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici prije terapije	22,00 (19,00; 25,00)	22,50 (19,75; 25,00)	P = 0,6451; U = 665,5; Mann-Whitney U test
Broj bodova na HAMD ljestvici nakon 4 tjedna terapije	9,000 (5,000; 15,00)	10,00 (6,000; 17,00)	P = 0,4204; U = 576,5; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS ljestvici prije terapije	26,00 (22,00; 30,00)	27,00 (21,75; 29,25)	P = 0,9254; U = 709,5; Mann-Whitney U test
Broj bodova na MADRS nakon 4 tjedna terapije	10,00 (5,000; 17,00)	11,50 (4,500; 23,25)	P = 0,5643; U = 651,5; Mann-Whitney U test

5. Zaključci

Istraživanje je potvrdilo hipotezu prema kojoj oboljeli od depresije imaju značajno niže koncentracije BDNF-a u plazmi u usporedbi s kontrolnom skupinom, što upućuje na BDNF kao potencijalni biomarker depresije. Ispitanici s ponavljanim epizodama depresije imali su težu kliničku sliku procijenjenu HAMD i MADRS ljestvicama od ispitanika s prvom epizodom depresije, iako nije postojala razlika u koncentraciji BDNF-a između ovih dviju skupina. Nakon 4 tjedna antidepresivne terapije razlika u težini kliničke slike više nije postojala što pokazuje učinkovitost terapije neovisno o broju ponovljenih epizoda depresije. Povezanost između broja bodova na HAMD i MADRS ljestvicama s koncentracijom BDNF-a u plazmi depresivnih ispitanika nije uočena, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja i upućuje da koncentracija BDNF-a u plazmi nije učinkovita za praćenje težine depresivnih simptoma.

Antidepresivi vortiooksetin i escitalopram, pokazali su podjednaku učinkovitost u liječenju depresije, što je vidljivo u smanjenju broja bodova na HAMD i MADRS ljestvicama nakon 4 tjedna terapije. Za razliku od escitaloprama, vortiooksetin je povišio koncentraciju BDNF-a u plazmi depresivnih ispitanika, što upućuje na jedinstven multimodalni mehanizam djelovanja vortiooksetina. Iako BDNF u plazmi nije potencijalni biljeg ranog antidepresivnog odgovora nakon 4 tjedna, mogao bi biti povezan s kasnijim antidepresivnim učincima vortiooksetina.

Raspodjela genotipova, alela i nosioca za *BDNF* Val66Met i C270T polimorfizme nije se značajno razlikovala između ispitanika s depresijom i kontrolnih ispitanika, upućujući da ovi polimorfizmi nisu čimbenici rizika za razvoj depresije. Više bazalne koncentracije BDNF-a u plazmi utvrđene su u nosioca GG genotipa u uspoređi s nosiocima alela A *BDNF* Val66Met polimorfizma, upućujući da ovaj polimorfizam utječe na koncentraciju BDNF-a u plazmi.

No, *BDNF* Val66Met polimorfizam nije bio povezan s težinom simptoma depresije, kao ni s koncentracijom BDNF-a u plazmi u ispitanika s depresijom nakon 4 tjedna antidepresivne terapije, upućujući da nije povezan s težinom bolesti i odgovorom na terapiju. Nije utvrđena niti povezanost *BDNF* C270T polimorfizma s koncentracijom BDNF-a u plazmi, težinom bolesti i odgovorom na terapiju, pri čemu je nedostatak TT genotipa ograničio istraživanje.

Utvrđeno smanjenje koncentracije BDNF-a u plazmi depresivnih pacijenata, kao i njen porast nakon 4 tjedna terapije vortiooksetinom upućuju na BDNF kao potencijalni periferni biomarker depresije i moguću terapijsku metu u liječenju ove složene bolesti. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja BDNF-a na većem broju ispitanika, kao i nakon dugotrajne antidepresivne terapije.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

5-HT – 5-hidroksitriptamin, serotonin

AKT – engl. *protein kinase B*

ALS – Amiotrofična lateralna skleroza (engl. *amyotrophic lateral sclerosis*)

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

CPRS – engl. *Comprehensive Psychopathological Rating Scale*

DALY – Godine života prilagođene na nesposobnost (engl. *disability-adjusted life years*)

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina

DSM-5 – Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, peto izdanje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*)

ECT – Elektrokonvulzivna terapija (engl. *electroconvulsive therapy*)

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERK – engl. *extracellular signal-regulated kinase*

FGF – Čimbenika rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

GABA – Gamma-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-amino butyric acid*)

GNB3 – Gvanin nukleotid-vezajući protein-3

GRM7 – metabotropni glutamatni receptor-7

GWAS – Genomske asocijacijske studije (engl. *genome-wide association study*)

HAMD – Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (engl. *Hamilton Depression Rating Scale*)

HAP1 – Huntingtin vezani protein-1 (engl. *huntingtin-associated protein 1*)

HPA – Hipotalamus-hipofiza os (engl. *hypothalamus-pituitary axis*)

HWE – Hardy-Weinbergova ravnoteža (engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*)

kb – Kilobaza

LTD – Dugoročna depresija (engl. *long-term depression*)

LTP – Dugoročna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)

MADRS – Montgomery-Åsbergova ljestvica za depresiju (engl. *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*)

MAOI – Inhibitori monoamin oksidaze (engl. *monoamine oxidase inhibitors*)

MAPK – Mitogen-aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MAPKK – Mitogen aktivirane protein kinaza kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

mBDNF – Zreli BDNF (engl. *mature BDNF*)

MDD – Veliki depresivni poremećaj (engl. *major depressive disorder*)

MDE – Depresivna epizoda (engl. *major depressive episode*)

MKB-10 – 10. revizija Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih zdravstvenih problema

MMA – Multimodalni antidepresivi (engl. *multimodal agent*)

MMP-9 – Matriksna metalopeptidaza-9

mRNA – Glasnička RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MTHFR – Metilen tetrahidrofolat reduktaza

mTOR – engl. *mammalian target of rapamycin*

NaSSA – Noradrenalinski i specifični serotonergički antidepresivi (engl. *noradrenaline and specific serotonergic antidepressants*)

NDRI – Inhibitori ponovne pohrane noradrenalina i dopamina (engl. *norepinephrine and dopamine reuptake inhibitors*)

NFQ – Utišivač fluorescencije (engl. *nonfluorescent quencher*)

NGF - Neuralni faktor rasta (engl. *nerve growth factor*)

NT – Neurotrofin

PCR – Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PLC γ – Fosfolipaza C-gamma (engl. *phospholipase C - γ*)

PTSP – Posttraumatski stresni poremećaj

qPCR – PCR u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

Ras – engl. *rat sarcoma virus*

RCLB – Pufer za liziranje eritrocita (engl. *red cell lysis buffer*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SARI – Antagonisti 5-HT₂ receptora i inhibitori ponovne pohrane serotonina (engl. *serotonin antagonist and reuptake inhibitors*)

SDS – Natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SERT – Serotoninski prijenosnik (transporter)

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

SNRI – Inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (engl. *serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors*)

SorCS2 – Sortilin-ovisni Vps10p-domena sadržavajuć receptor 2 (engl. *Sortilin related VPS10 domain containing receptor 2*)

SSRI – Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

TCA – Triciklički antidepresivi (engl. *tricyclic antidepressants*)

TrkB – Tropomiozin receptor kinaza B (engl. *tropomyosin receptor kinase B*)

VEGF – Vaskularnog endotelialnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

VEGF – Vaskularnog faktora rasta (engl. *vascular growth factor*)

ZIC3 – engl. *zinc finger of the cerebellum 3*

7. Literatura

Almeida FB, Barros HMT, Pinna G. Neurosteroids and Neurotrophic Factors: What Is Their Promise as Biomarkers for Major Depression and PTSD? *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 1758

Bang-Andersen B, Ruhland T, Jørgensen M, Smith G, Fredriksen K, Jensen KG et al. Discovery of 1-[2-(2,4-dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J Med Chem*, 2011, 54(9), 3206-3221

Björkholm C, Monteggia LM. DNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*, 2016, 102, 72-79

Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nilsen MG, Placentino A et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: A replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry*, 2010, 11, 763-773

Border R, Johnson EC, Evans LM, Smolen A, Berley N, Sullivan PF et al. No Support for Historical Candidate Gene or Candidate Gene-by-Interaction Hypotheses for Major Depression Across Multiple Large Samples. *Am J Psychiatry*, 2019, 176(5), 376-387

Borroni B, Grassi M, Archetti S, Costanzi C, Bianchi M, Caimi L et al. DNF genetic variations increase the risk of Alzheimer's disease-related depression. *J Alzheimers Dis*, 2009, 18(4), 867-875

Boulle F, van den Hove DLA, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J et al. Epigenetic regulation of the *BDNF* gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(6), 584-596

Buttenschøn HN, Foldager L, Elfving B, Poulsen PH, Uher R, Mors O. Neurotrophic factors in depression in response to treatment. *J Affect Disord*, 2015, 183, 287-294

Casarotto P, Umemori J, Castrén E. BDNF receptor TrkB as the mediator of the antidepressant drug action. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15, 1032224

Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*, 2018, 391(10128), 1357-1366

Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS et al. Grand challenges in global mental health. *Nature*, 2011, 475(7354), 27-30

Covaceuszach S, Peche LY, Konarev PV, Grdadolnik J, Cattaneo A, Lamba D. Untangling the Conformational Plasticity of V66M Human proBDNF Polymorphism as a Modifier of Psychiatric Disorder Susceptibility. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12), 6596

Dale E, Bang-Andersen B, Sánchez C. Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochem Pharmacol*, 2015, 95(2), 81-97

Dvojkovic A, Nikolac Perkovic M, Sagud M, Nedic Erjavec G, Mihaljevic Peles A, Svob Strac D et al. Effect of vortioxetine vs. escitalopram on plasma BDNF and platelet serotonin in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 105, 110016

Farah WH, Alsawas M, Mainou M, Alahdab F, Farah MH, Ahmed AT et al. Non-pharmacological treatment of depression: a systematic review and evidence map. *Evid Based Med*, 2016, 21(6), 214-221

Gejl AK, Enevold C, Bugge A, Andersen MS, Nielsen CH, Andersen LB. Associations between serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and influence of storage time and centrifugation strategy. *Sci Rep*, 2019, 9(1), 9655

Gene: BDNF ENSG00000176697, 2022., http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000176697, pristupljeno 2.2.2023

Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1960, 23(1), 56-62

Huuhka K, Anttila S, Huuhka M, Leinonen E, Rontu R, Mattila K et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphisms G196A and C270T are not associated with response to electroconvulsive therapy in major depressive disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2007, 257(1), 31-35

ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics (Version:01/2023). <http://id.who.int/icd/entity/1563440232>, pristupljeno 29.1.2023

Irwin CL, Coelho PS, Kluwe-Schiavon B, Silva-Fernandes A, Gonçalves ÓF, Leite J et al. Non-pharmacological treatment-related changes of molecular biomarkers in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Health Psychol*. 2023, 23(3), 100367

Jacobsen PL, Mahableshwarkar AR, Chen Y, Chrones L, Clayton AH. Effect of Vortioxetine vs. Escitalopram on Sexual Functioning in Adults with Well-Treated Major Depressive Disorder Experiencing SSRI-Induced Sexual Dysfunction. *J Sex Med*, 2015, 12(10), 2036-2048

Kanter JW, Busch AM, Weeks CE, Landes SJ. The Nature of Clinical Depression: Symptoms, Syndromes, and Behavior Analysis. *Behav Anal*, 2008, 31(1), 1-21

Kaufman J, DeLorenzo C, Choudhury S, Parsey RV. The 5-HT_{1A} receptor in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2016, 26(3), 397-410

Kessler RC, Bromet EJ. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*, 2013, 34, 119-138

Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res*, 2012, 21(3), 169-184

Kirino E. Escitalopram for the management of major depressive disorder: a review of its efficacy, safety, and patient acceptability. *Patient Prefer Adherence*, 2012, 6, 853-861

Krishnan V, Nestler EJ. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry*, 2010, 167(11), 1305-1320

Lu Y, Ho CS, McIntyre RS, Wang W, Ho RC. Effects of vortioxetine and fluoxetine on the level of Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) in the hippocampus of chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Brain Res Bull*, 2018, 142, 1-7

McIntyre RS, Cha DS, Soczynska JK, Woldeyohannes HO, Gallagher LA, Kudlow P et al. Cognitive deficits and functional outcomes in major depressive disorder: determinants, substrates, and treatment interventions. *Depress Anxiety*, 2013, 30(6), 515-527

Mediatelly baza lijekova. 2022., <https://mediatelly.co/hr>, pristupljeno 19.2.2023

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16(3), 1215

Mimica N, Folnegović-Šmalc V, Uzun S, Makarić G. Suvremena klasifikacija depresije i mjerni instrumenti. *Medicus*, 2004, 13, 19-29

Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry*, 1979, 134, 382-389

- Nikolac Perkovic M. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u demenciji. Doktorska disertacija, 2015, 1-217
- Pivac N, Nedic Erjevac G, Sagud M, Nikolac Perkovic M, Tudor L, Uzun S et al. The association between BDNF C270T genetic variants and smoking in patients with mental disorders and in healthy controls. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2022, 113, 110452
- Rosenblat JD, Kakar R, McIntyre RS. The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systemic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015, 19(2), pyv082
- Sagud M, Nikolac Perkovic M, Vuksan-Cusa B, Maravic A, Svob Strac D, Mihaljevic Peles A et al. A prospective, longitudinal study of platelet serotonin and plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in major depression: effects of vortioxetine treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016, 233(17), 3259-3267
- Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB et al. Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry*, 2005, 58(4), 307-314
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, 2003, 54(1), 70-75
- Sun J, Chen L, He J, Du Z, Ma Y, Wang Z et al. Altered Brain Function in First-Episode and Recurrent Depression: A Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Front Neurosci*, 2022, 16, 876121
- Švob Štrac D, Pivac N, Mück-Šeler D. The serotonergic system and cognitive function. *Transl Neurosci*, 2016, 7(1), 35-49
- Telles-Correia D, Marques JG. Melancholia before the twentieth century: fear and sorrow or partial insanity? *Front Psychol*, 2015, 6, 81
- Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 1995, 270(5236), 593-598
- Tian H, Hu Z, Xu J, Wang C. The molecular pathophysiology of depression and the new therapeutics. *MedComm*, 2022, 3, e156

- Toledo-Rodriguez M, Lotfipour S, Leonard G, Perron M, Richer L, Veillette S et al. Maternal Smoking During Pregnancy Is Associated With Epigenetic Modifications of the Brain-Derived Neurotrophic Factor-6 Exon in Adolescent Offspring. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 153B(7), 1350-1354
- Tudor L, Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Svob Strac D, Nedic Erjavec G, Uzun S et al. Genetic Variants of the Brain-Derived Neurotrophic Factor and Metabolic Indices in Veterans With Posttraumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry*, 2018, 9, 637
- Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T. Association of the BDNF C270T polymorphism with schizophrenia: updated meta-analysis. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2013, 67(2), 123-125
- Xu L, Tian D, Li J, Chen L, Tang L, Fan D. The Analysis of Two BDNF Polymorphisms G196A/C270T in Chinese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9, 135
- Yoshida T, Ishikawa M, Niitsu T, Nakazato M, Watanabe H, Shiraishi T et al. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS One*, 2012, 7(8), e42676
- Youssef MM, Underwood MD, Huang YY, Hsiung SC, Liu Y, Simpson NR et al. Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2018, 21(6), 528-538
- Zhong H, Haddjeri N, Sánchez C. Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter--a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology (Berl)*, 2012, 219(1), 1-13

8. Sažetak

Veliki depresivni poremećaj čest je psihijatrijski poremećaj, no njegova kompleksna patofiziologija i velika heterogenost predstavljaju zapreku u utvrđivanju čimbenika rizika i razvoju boljih terapijskih pristupa. Farmakološka terapija depresije zasniva se velikim dijelom na primjeni antidepresiva. Escitalopram djeluje kao inhibitor ponovne pohrane serotonina, dok vortioksetin pripada multimodalnim lijekovima koji uz inhibiciju SERT-a djeluje i na druge mete, poput 5-HT receptora.

Prema neurotrofinskoj teoriji, manjak BDNF-a, koji je bitan za neuralnu plastičnost u pojedinim moždanim regijama, igra ključnu ulogu u nastanku depresije i odražava se također i u uzorcima krvi. U *BDNF* genu nalazi se više polimorfizama, uključujući Val66Met i C270T polimorfizam, koji se povezuju s promjenama u ekspresiji i procesuiranju BDNF-a, kao i s razvojem različitih psihijatrijskih bolesti, uključujući i depresiju.

Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi, te *BDNF* Val66Met i C270T polimorfizama s razvojem depresije, težinom depresivnih simptoma i učinkom antidepresivnih lijekova.

Istraživanje je potvrdilo sniženu koncentraciju BDNF-a u plazmi depresivnih bolesnika. Ispitanici s ponavljanim epizodama depresije imali su težu kliničku sliku od ispitanika sa prvom epizodom depresije, no ona se nije značajno razlikovala nakon 4 tjedna antidepresivne terapije. I vortioksetin i escitalopram, pokazali su se kao učinkoviti antidepresivni lijekovi, ali je samo vortioksetin povisio koncentraciju BDNF-a u plazmi. *BDNF* Val66Met polimorfizam, za razliku od C270T polimorfizma, utjecao je na bazalnu koncentraciju BDNF-a u plazmi, ali niti jedan nije bio povezan sa razvojem depresije, težinom simptoma i odgovorom na terapiju. Potrebna su daljnja istraživanja BDNF-a na većem broju ispitanika, kao i nakon dugotrajne antidepresivne terapije.

Summary

Major depressive disorder is a common psychiatric disorder; however its complex pathophysiology and large heterogeneity, hinder the determination of risk factors and development of better therapeutic approaches. Pharmacological therapy of depression is largely based on the use of antidepressants. Escitalopram functions as a selective serotonin reuptake inhibitor, while vortioxetine belongs to a new group of multimodal drugs, which, besides SERT inhibition, affects other targets, including 5-HT receptors.

According to the neurotrophin theory, lack of BDNF, which is essential for brain neural plasticity, plays a key role in development of depression and is reflected in blood samples. Several *BDNF* gene polymorphisms, including Val66Met and C270T, are associated with changes in BDNF expression and processing, and development of various psychiatric diseases, including depression.

We aimed to investigate the association of BDNF plasma concentrations, *BDNF* Val66Met and C270T polymorphisms with the development of depression, severity of depressive symptoms and effect of antidepressant drugs.

Findings confirmed decreased plasma BDNF concentration in depressed patients. Subjects with repeated depression episodes had more severe clinical picture than patients with a first depression episode, but it was not significantly different after 4 weeks of antidepressant therapy. Both vortioxetine and escitalopram proved to be effective antidepressant drugs, but only vortioxetine increased BDNF plasma concentration. *BDNF* Val66Met polymorphism, in contrast to C270T polymorphism, affected basal plasma BDNF concentration, but none of them was associated with development of depression, severity of symptoms, and therapy response. Further BDNF studies are needed using larger number of participants, as well as long-term antidepressant therapy.

9. Prilozi

Prilog 1. Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (HAM-D-17) (Mimica i sur., 2004)

1. Depresivno raspoloženje (tuga, beznadnost, bespomoćnost, bezvrijednost)

0 – Nije prisutno

1 – Ovakvo emocionalno doživljavanje iskazano je samo na izravni upit

2 – Govorno izražava i bez upita

3 – Emocionalno doživljavanje iskazuje neverbalno tj. zaključuje se iz ponašanja, izrazom lica, držanjem tijela, glasom i sklonošću plaču

4 – Bolesnik gotovo isključivo govori o tome u svojoj spontanoj verbalnoj i neverbalnoj komunikaciji

2. Osjećaj krivnje

0 – Nije prisutan

1 – Samopredbacivanje, osjeća da je iznevjerio okolinu

2 – Osjećaj krivnje ili stalno razmišljanje o proteklim greškama i propustima

3 – Sadašnju bolest smatra kaznom. Sumanutosti krivnje

4 – Čuje optuživačke ili prijeteće glasove i/ili prisutnost vidnih halucinacija prijetećeg sadržaja

3. Samoubilački porivi (suicid)

0 – Nisu prisutni

1 – Osjećaj da život nema vrijednosti, da nije vrijedan življenja

2 – Želja za smrću ili bilo koje misli o mogućoj smrti

3 – Samoubilačke misli ili geste

4 – Pokušaj suicida

4. Smetnje usnivanja

0 – Bez teškoća kod usnivanja

1 – Žali se na povremene teškoće kod usnivanja koje traju dulje od pola sata

2 – Žali se na svakodnevne teškoće kod usnivanja

5. Smetnje spavanja (prosnivanja)

0 – Nisu prisutne

1 – Bolesnik se žali na nemir i isprekidan san

2 – Buđenje tijekom noći – svako ustajanje iz kreveta dobiva ocjenu 2 (osim u svrhu mokrenja)

6. Jutarnje smetnje spavanja

0 – Nema teškoća

1 – Budi se rano ujutro, ali ponovo zaspi

2 – Ne može ponovo zaspati ako rano ustane iz kreveta (budi se rano bez ponovnog usnivanja)

7. Rad i aktivnosti

0 – Nema teškoća

1 – Osjeća se nesposobnim, umornim ili slabim kod radnih i slobodnih aktivnosti

2 – Gubitak zanimanja za rad i aktivnost – bilo da je izravno iskazano od strane pacijenta, ili indirektno u nedostatku agilnosti, u neodlučnosti i kolebljivosti (osjećaj da se mora prisiljavati na rad ili aktivnost)

3 – Skraćenje vremena potrošenog na aktivnosti ili smanjenje produktivnosti. U bolnici: ocjena 3 je za slučaj kada bolesnik nije u stanju provoditi najmanje tri sata na dan u aktivnostima (bolnička zanimanja ili slobodne aktivnosti i hobiji) izuze dužnosti na odjelu

4 – Prestanak rada zbog sadašnje bolesti. U bolnici: ocjena 4 je ako se bolesnik ne uključuje ni u kakve aktivnosti osim svojih dužnosti na odjelu, ili ako bolesnik ne ispunjava dužnosti na odjelu bez pomoći

8. Usporenost (psihomotorna inhibicija)

Pitanja nisu potrebna: ocjene su rezultat promatranja (Usporenost misli i govora; smetnje u sposobnosti koncentracije; smanjena motorička aktivnost)

0 – Uredan govor i mišljenje

1 – Blaga usporenost kod pregleda (razgovora)

2 – Očita usporenost kod pregleda (razgovora)

3 – Pregled/razgovor izrazito otežan

4 – Stupor

9. Agitacija

- 0 – Nije prisutna
 - 1 – Uznemirenost
 - 2 – Igra se rukama, kosom i slično
 - 3 – Kreće se unakolo, ne može mirno sjediti
 - 4 – Lomi ruke, grize nokte, čupa kosu, grize usnice
-

10. Anksioznost – psihička (psihički strah)

- 0 – Nije prisutna
 - 1 – Unutarnja napetost i razdražljivost
 - 2 – Zabrinutost oko sitnica
 - 3 – Izraz ustrašenosti u govoru i licu
 - 4 – Izražava strah i bez upita
-

11. Anksioznost – somatska (tjelesni strah)

(Fiziološke popratne pojave anksioznosti, kao što su: gastrointestinalne: suha usta, flatulencija, probavne smetnje, proljev, grčevi, eruktacija; kardiovaskularne: lupanje srca, glavobolje; respiratorne: hiperventilacija, uzdisanje; urinarne: češće mokrenje; znojenje)

- 0 – Nije prisutna
 - 1 – Neznatna
 - 2 – Umjerena
 - 3 – Jaka
 - 4 – Onesposobljuje bolesnika
-

12. Gastrointestinalni simptomi

- 0 – Nisu prisutni
 - 1 – Nedostatak apetita, ali jede bez nagovaranja
 - 2 – Jede samo uz nagovaranje i nuđenje
-

13. Opći tjelesni simptomi

- 0 – Nisu prisutni
 - 1 – Osjećaj težine ili boli u udovima, leđima, glavi. Gubitak tjelesne snage i lako zamaranje
 - 2 – Svaki od gornjih simptoma ako je jako izražen
-

14. Genitalni simptomi

(kao što je gubitak libida, menstrualni poremećaji)

- 0 – Nisu prisutni
 - 1 – Umjereni
 - 2 – Jako izraženi
-

15. Hipohondrijski simptomi

- 0 – Nisu prisutni
 - 1 – Pojačano tjelesno samopromatranje
 - 2 – Zabrinutost za svoje zdravlje
 - 3 – Česte pritužbe na smetnje, traženje pomoći itd.
 - 4 – Hipohondrijske sumanutosti
-

16. Gubitak tjelesne težine

(Osoblje gubitak težine bilježi redovito kod tjednog mjerenja promjena u tjelesnoj težini)

- 0 – Manje od pola kilograma gubitak tjelesne težine u jednom tjednu
 - 1 – Više od pola kilograma, ali manje od kilograma gubitak tjelesne težine u tjedan dana
 - 2 – Više od kilograma tjelesne težine izgubljeno tijekom tjedan dana
-

17. Uvid u bolest

- 0 – Uviđa (potvrđuje) da je depresivan i bolestan
 - 1 – Uviđa bolest, ali je pripisuje lošoj prehrani, klimi, prenapornome radu, infekciji, potrebi za odmorom itd.
 - 2 – Potpuno negira bolest
-

HAM-D-17 ukupni rezultat:

Prilog 2. Montgomery-Åsbergova ljestvica za depresiju (MADRS) (Mimica i sur., 2004)

1. Uočljiva žalost

Predstavlja žalost, malodušnost i očaj (izraženije od uobičajenog prolaznog lošeg raspoloženja) što se odražava u govoru, izrazu lica i držanju tijela. Ocijeniti prema težini i nesposobnosti da se raspoloži.

0 – Odsutnost žalosti

1

2 – Izgleda malodušno, ali se raspoloži bez teškoća

3

4 – Izgleda žalosno i nesretno glavninu vremena

5

6 – Izgleda mizerno čitavo vrijeme. Ekstremno očajan

2. Iskazana žalost

Predstavlja iskazanu žalost bez obzira na to odražava li se ona na izgled ili ne. Uključuje malodušnost i osjećaj bespomoćnosti i beznadnosti. Ocijeniti prema intenzitetu, trajanju i prema tome u kolikoj je mjeri iskazano da događaji mogu utjecati na raspoloženje.

0 – Povremena žalost ovisna o okolnostima

1

2 – Tužan, ali se raspoloži bez teškoća

3

4 – Sveobuhvatan osjećaj žalosti ili potištenosti. Raspoloženje se još uvijek mijenja pod utjecajem izvanjskih okolnosti.

5

6 – Kontinuirana ili nepromijenjiva tuga, mizernost i očaj.

3. Unutrašnja napetost (anksioznost)

Predstavlja osjećaje nejasne nelagodnosti, razdražljivosti, unutrašnjeg nemira, duševne napetosti koja se razvija u panični strah ili tjeskobu. Ocijeniti prema intenzitetu, učestalosti, trajanju, potrebnom stupnju tješjenja da bi došlo do smirenja.

0 – Miran. Samo prolazna unutrašnja napetost

1

2 – Povremena razdražljivost i nejasna nelagoda

3

4 – Kontinuiran osjećaj unutrašnje napetosti ili intermitentne (povremeno popuštajuće) panike koju bolesnik može kontrolirati samo uz veći napor

5

6 – Strah i tjeskoba koji ne popuštaju. Preplavljujuća panika

4. Smetnje spavanja

Predstavljaju skraćeno trajanje ili dubinu spavanja u usporedbi s bolesnikovim normalnim ritmom kada je dobro.

0 – Spava kao i obično

1

2 – Blage teškoće kod usnivanja ili malo skraćeno, plitko ili isprekidano spavanje

3

4 – Spavanje skraćeno ili isprekidano za najmanje 2 sata

5

6 – Manje od dva ili tri sata spavanja

5. Smanjeni apetit

Predstavlja osjećaj gubitka apetita u usporedbi sa stanjem kada je bolesnik dobro. Ocijeniti prema gubitku želje za hranom ili prema potrebi za prisiljavanjem samog sebe na jelo.

0 – Normalan ili pojačani apetit

1

2 – Neznatno smanjen apetit

3

4 – Bez apetita. Hrana je bez okusa

5

6 – Potrebna prisila na hranu, odbija hranu

6. Teškoće koncentracije

Predstavlja raspon od teškoća sabiranja misli do onesposobljavajućeg gubitka koncentracije. Ocijeniti prema intenzitetu, učestalosti i stupnju nastale onesposobljenosti.

0 – Bez teškoća koncentracije

1

2 – Povremene teškoće sabiranja misli

3

4 – Teškoće u koncentraciji i zadržavanju misli što samnjuje sposobnosti čitanja ili konverzacije

5

6 – Nesposobnost čitanja ili razgovaranja bez velikih teškoća

7. Umor (malaksalost, tromost)

Predstavlja poteškoću započinjanja svakodnevne aktivnosti ili usporenosti kod njihova izvođenja

0 – Teškoće u počinjanju aktivnosti gotovo da ne postoje. Nema usporenosti

1

2 – Teškoće u počinjanju aktivnosti

3

4 – Teškoće u počinjanju jednostavnih rutinskih aktivnosti, koje izvodi uz napor

5

6 – Potpuna malaksalost. Nesposobnost da se bilo što učini bez pomoći

8. Nemogućnost emocionalnog doživljavanja

Predstavlja subjektivno iskustvo smanjenog interesa za okolinu ili aktivnosti koje obično pružaju užitak. Smanjena je sposobnost odgovarajućeg emocionalnog reagiranja prema okolnostima ili ljudima.

0 – Normalno zanimanje za okolinu i ljude

1

2 – Smanjena sposobnost uživanja u uobičajenim interesima

3

4 – Gubitak zanimanja za okolinu. Gubitak zanimanja za prijatelje i znanace

5

6 – Osjećaj emocionalne paralize. Nesposobnost osjećaja ljutnje, boli ili užitka i potpuni ili čak bolni nedostatak emocija prema bližoj rodbini ili prijateljima

9. Pesimističke misli

Predstavlja misli o krivnji, inferiornosti, grižnji savjesti, grešnosti, kajanju i propasti.

0 – Bez pesimističkih misli

1

2 – Povremeno ideje o neuspjehu, grižnji savjesti i samooptuživanju

3

4 – Kontinuirano samooptuživanje ili definitivne, ali još uvijek racionalne, ideje o krivnji ili grijehu. Sve izraženiije pesimističko gledanje na budućnost

5

6 – Sumanute misli propasti, kajanja ili nepopravljivog grijeha. Apsurdno i nepokolebljivo samooptuživanje

10. Suicidalne misli

Predstavljaju osjećaj da život nije vrijedan življenja, da bi prirodna smrt dobro došla, suicidalne misli i pripreme za suicid. Pokušaji suicida sami po sebi ne trebaju utjecati na ocjene.

0 – Uživa život ili ga uzima kakav jest

1

2 – Umoran od života. Prolazne misli o suicidu

3

4 – Bolje bi bilo biti mrtav. Suicidalne misli su česte, a suicid se smatra mogućim rješenjem, ali uz odsutnost određenih planova ili namjera.

5

6 – Eksplicitni planovi za suicid ako se pruži mogućnost. Aktivne priprema za suicid

Ukupni MADRS rezultat:

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Povezanost Val66Met i C270T polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) i koncentracije BDNF-a u plazmi s depresijom, težinom simptoma i odgovorom na terapiju

Juraj Crneković

Sažetak

Veliki depresivni poremećaj čest je psihijatrijski poremećaj, no njegova kompleksna patofiziologija i velika heterogenost predstavljaju zapreku u utvrđivanju čimbenika rizika i razvoju boljih terapijskih pristupa. Farmakološka terapija depresije zasniva se velikim dijelom na primjeni antidepresiva. Escitalopram djeluje kao inhibitor ponovne pohrane serotonina, dok vortiooksetin pripada multimodalnim lijekovima koji uz inhibiciju SERT-a djeluje i na druge mete, poput 5-HT receptora.

Prema neurotrofinskoj teoriji, manjak BDNF-a, koji je bitan za neuralnu plastičnost u pojedinim moždanim regijama, igra ključnu ulogu u nastanku depresije i odražava se također i u uzorcima krvi. U *BDNF* genu nalazi se više polimorfizama, uključujući Val66Met i C270T polimorfizam, koji se povezuju s promjenama u ekspresiji i procesuiranju BDNF-a, kao i s razvojem različitih psihijatrijskih bolesti, uključujući i depresiju.

Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi, te *BDNF* Val66Met i C270T polimorfizama s razvojem depresije, težinom depresivnih simptoma i učinkom antidepresivnih lijekova.

Istraživanje je potvrdilo sniženu koncentraciju BDNF-a u plazmi depresivnih bolesnika. Ispitanici s ponavljanim epizodama depresije imali su težu kliničku sliku od ispitanika sa prvom epizodom depresije, no ona se nije značajno razlikovala nakon 4 tjedna antidepresivne terapije. I vortiooksetin i escitalopram, pokazali su se kao učinkoviti antidepresivni lijekovi, ali je samo vortiooksetin povišio koncentraciju BDNF-a u plazmi. *BDNF* Val66Met polimorfizam, za razliku od C270T polimorfizma, utjecao je na bazalnu koncentraciju BDNF-a u plazmi, ali niti jedan nije bio povezan sa razvojem depresije, težinom simptoma i odgovorom na terapiju. Potrebna su daljnja istraživanja BDNF-a na većem broju ispitanika, kao i nakon dugotrajne antidepresivne terapije.

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

Rad sadrži: 70 stranica, 17 grafička prikaza, 24 tablica i 52 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: depresija, Val66Met i C270T polimorfizmi, BDNF koncentracija, escitalopram, vortiooksetin, HAMD, MADRS

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Švob Štrac**, *izvanredni profesor, viša znanstvena suradnica* Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocijenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, *izvanredni profesor, viša znanstvena suradnica* Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Dr. sc. Matea Nikolac Perković, *docent, znanstvena suradnica* Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The association of Val66Met and C270T polymorphisms in the gene coding for brain derived neurotrophic factor (BDNF) and BDNF plasma concentration with depression, severity of symptoms and treatment response

Juraj Crneković

Summary

Major depressive disorder is a common psychiatric disorder; however its complex pathophysiology and large heterogeneity, hinder the determination of risk factors and development of better therapeutic approaches. Pharmacological therapy of depression is largely based on the use of antidepressants. Escitalopram functions as a selective serotonin reuptake inhibitor, while vortioxetine belongs to a new group of multimodal drugs, which, besides SERT inhibition, affects other targets, including 5-HT receptors.

According to the neurotrophin theory, lack of BDNF, which is essential for brain neural plasticity, plays a key role in development of depression and is reflected in blood samples. Several *BDNF* gene polymorphisms, including Val66Met and C270T, are associated with changes in BDNF expression and processing, and development of various psychiatric diseases, including depression.

We aimed to investigate the association of BDNF plasma concentrations, *BDNF* Val66Met and C270T polymorphisms with the development of depression, severity of depressive symptoms and effect of antidepressant drugs.

Findings confirmed decreased plasma BDNF concentration in depressed patients. Subjects with repeated depression episodes had more severe clinical picture than patients with a first depression episode, but it was not significantly different after 4 weeks of antidepressant therapy. Both vortioxetine and escitalopram proved to be effective antidepressant drugs, but only vortioxetine increased BDNF plasma concentration. *BDNF* Val66Met polymorphism, in contrast to C270T polymorphism, affected basal plasma BDNF concentration, but none of them was associated with development of depression, severity of symptoms, and therapy response. Further BDNF studies are needed using larger number of participants, as well as long-term antidepressant therapy.

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

Thesis includes: 70 pages, 17 figures, 24 tables i 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: depression, *BDNF* Val66Met and C270T polymorphisms, BDNF concentration, escitalopram, vortioxetine, HAMD, MADRS

Mentor: **Dubravka Švob Štrac Ph.D**, Associate Professor, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb.

Lidija Bach-Rojecky Ph.D, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky Ph.D**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Dubravka Švob Štrac Ph.D, Associate Professor, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb.

Matea Nikolac Perković, Ph.D, Assistant Professor, Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb.

The thesis was accepted: July 2023.