

Korelacija terapijskoga odgovora s promjenama nalaza 1H-MRS u liječenju depresije

Kalembur, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:068774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petra Kalember

**Korelacija terapijskoga odgovora s
promjenama nalaza 1H-MRS
u liječenju depresije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petra Kalember

**Korelacija terapijskoga odgovora s
promjenama nalaza 1H-MRS
u liječenju depresije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Poliklinici Neuron.

Voditelj rada:

Prof. dr. sc. Neven Henigsberg

Mentoru, prof. dr. sc. Nevenu Henigsbergu, zahvaljujem na stručnim savjetima i podršci u izradi ovog rada.

Prof. dr. sc. Milanu Radošu i dr. sc. Peri Hrabaču zahvaljujem na pomoći tijekom istraživanja.

Zahvaljujem svim djelatnicima Poliklinike Neuron u pomoći pri provođenju ovog istraživanja.

Zahvaljujem svim ispitanicima koji su sudjelovali u ovom istraživanju.

Ovaj doktorski rad je izrađen uz potporu Hrvatske zaklade za znanost projekt IP-CORONA-2020-12-5588 i uz potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost (projekt “ Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi”; GA KK01.1.1.01.0007, financiranog od strane Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj).

SADRŽAJ:

1. Uvod i svrha rada.....	1
1.1 Depresija.....	1
1.2 Klinička procjena težine depresije	2
1.3 Liječenje depresivnog poremećaja	3
1.3.1 Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina	3
1.3.2 Vrijeme postizanja terapijskog odgovora u liječenju depresije	3
1.4 Prediktori i rani znaci terapijskog odgovora	4
1.5 Razlike u terapijskom odgovoru s obzirom na spol	4
1.6 Kolin i funkcije mozga.....	5
1.7 Amigdala kod depresivnog poremećaja	7
1.8 Prepoznavanje terapijskog odgovora metodama neuroslikovnog prikaza mozga	7
1.9 Protonska spektroskopija magnetskom rezonancijom (1H-MRS).....	8
1.10 Neurometaboliti u praćenju promjena putem 1H-MRS	10
1.10.1 Kolin (Cho) u 1H-MRS spektru.....	11
1.11 Razina kolina u amigdali kod depresije	13
1.12 Kolin kod depresivnog poremećaja u drugim ROI	13
2. Hipoteza.....	15
3. Ciljevi rada	16
3.1 Opći cilj istraživanja.....	16
3.2 Specifični ciljevi istraživanja	16
4. Ispitanici i metode	17
4.1 Ispitanici u istraživanju	17
4.2 Spektroskopija magnetskom rezonancijom.....	18
4.3 Izračun veličine uzorka	18
4.4 Metode analize podataka.....	19
4.5 Očekivani znanstveni doprinos	21
5. Rezultati.....	22
5.1 Opći odgovor na terapiju antidepresivima	22
5.2 Rezultati psihometrijskih testova	23
5.2.1 Povezanost ocjenskih ljestvica MADRS i HAM-D.....	29
5.2.2 Druge osobitosti uzorka od mogućeg utjecaja na težinu depresije i terapijski odgovor	30
5.3 Područja od interesa (ROI) i metaboliti u istraživanju.....	32
5.4 Primarna analiza – povezanost razine kolina u amigdali s težinom depresije	34

5.4.1	Varijable u istraživanju od utjecaja na MADRS.....	36
5.4.2	Povezanost razine Cho i MADRS.....	37
5.4.3	Vrijeme istraživanja	37
5.4.4	Individualne varijacije u razini Cho.....	38
5.4.5	LMM s longitudinalnim tijekom MADRS i razina Cho u Amyg.....	40
5.4.6	REML analiza	43
5.5	Povezanost težine depresije mjerene putem MADRS s promjenama razina Cho po pojedinim ROI.....	48
5.6	Povezanost razina Cho u amigdali s drugim neurometabolitima na kraju istraživanja50	
5.7	Promjene neurometabolita po pojedinim ROI	52
5.7.1	Dorzolateralni prefrontalni korteks.....	52
5.7.2	Prednji cingularni korteks	61
5.7.3	Bazalni gangliji	71
5.7.4.	Hipokampus	81
5.7.5.	Amigdala.....	91
5.8	Razlike u distribucijama razina neurometabolita	101
6.	Rasprava	105
6.1	Ograničenja istraživanja.....	105
6.1.1	Reprezentativnost uzorka.....	105
6.1.2	Razlike u analitičkom pristupu između pojedinih istraživanja.....	107
6.1.3	Pogreške u razvrstavanju bolesnika s dobrim terapijskim odgovorom	108
6.2	Prisutnost komorbidne simptomatike i nepoznat longitudinalni tijek.....	108
6.3	Razjašnjenje uloge Cho kao moderatora ili medijatora u depresivnom poremećaju	108
6.4	Neurobiološka osnova promjene razina 1H-MRS kolina u mozgu.....	109
6.5	Razine neurometabolita s obzirom na spol	111
6.6	Kontinuitet 1H-MRS istraživanja u depresiji.....	111
6.7	Mogući razlozi nepodudarnosti istraživanja u prepoznavanju bioloških markera..	114
6.8	Mogućnosti poboljšanja prepoznavanja bioloških markera putem 1H- MRS	115
6.9	Utvrđivanje točnije specifičnosti i osjetljivosti metode putem translacijskih istraživanja.	115
7.	Zaključak	116
8.	Sažetak.....	118
9.	Abstract.....	120
10.	Popis literature	122
11.	Životopis	139

Popis oznaka i kratica:

1H-MRS	protonska spektroskopija magnetskom rezonancijom
ACC	prednji cingularni korteks
AdoMet	S-adenozilmetionin
AMYG	amigdala
BDNF	moždani neurotrofni čimbenik (engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BG	bazalni gangliji
CHESS	selektivna sekvenca kemijskog pomaka (engl: <i>CHEmical Shift Selective</i>)
Cho	kolin
Cr	kreatin
DLPFC	dorzolateralni prefrontalni korteks
DSM-IV	Dijagnostički i statistički priručnik Američke psihijatrijske udruge, IV revizija
DSM-IV-R	Dijagnostički i statistički priručnik Američke psihijatrijske udruge, IV revizija, privremeno revidirana
DSM-V	Dijagnostički i statistički priručnik Američke psihijatrijske udruge, V revizija
DTI	difuzijska traktografska metoda MR snimanja (engl. <i>Diffusion Tensor Imaging</i>)
EEG	elektroencefalogram
fMRI	funkcijska magnetska rezonancija
fNIRS	funkcionalna blisko-infracrvena spektroskopija (engl. <i>functional near-infrared spectroscopy</i>)

GABA	gama-aminomaslačna kiselina
Gln	glutamin
Glx	kompleks glutamina i glutamata
Glu	glutamat
GPC	glicerofosforilkolin
HAM-D	Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju
HAM-D17	Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju sa 17 čestica
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i>)
LMM	linearni mješoviti model (engl. <i>Linear Mixed-Effects Model</i>)
M	aritmetička sredina
MADRS	Montgomery-Åsbergova ocjenska ljestvica za depresiju
MAO-A	monoaminooksidaza A
MI	mioinozitol
M.I.N.I.	Mini međunarodni neuropsihijatrijski intervju
MKB-10	Međunarodna klasifikacija bolesti Svjetske zdravstvene organizacije, 10 revizija
MKB-11	Međunarodna klasifikacija bolesti Svjetske zdravstvene organizacije, 11 revizija
MR	magnetska rezonancija
MRS	spektroskopija magnetskom rezonancijom
NAA	N-acetil aspartat
PC	fosfatidilkolin
PCr	fosfokreatin
PET	pozitronska emisijska tomografija
ppm	1 dio na 10^6 dijelova (engl. <i>parts per million</i>)

RF	radiofrekventni
ROI	regija interesa (<i>engl. region of interest</i>)
SAM	S-adenozilmetionin
SD	standardna devijacija
SERT	serotoninski transporter
SIPPS	selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina
S/N	omjer signala i šuma (<i>engl. signal to noise ratio</i>)
SSRS	selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina (<i>engl. selective serotonin reuptake inhibitor</i>)
TE	vrijeme odjeka (<i>engl. time echo</i>)

1. Uvod i svrha rada

Osnovna namjena rada bila je doprinijeti znanstvenim spoznajama o objektivnom vrednovanju težine depresije te prepoznati moguće korelate i prediktore terapijskog odgovora u liječenju depresije. S obzirom da se učinak antidepresivne terapije uobičajeno klinički prepoznaje tek nakon oko 4-6 tjedana, rezultati rada bi mogli ne samo doprinijeti pojašnjenju etiologije depresivnog poremećaja, nego imati i izravnu primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Naročito je problem suicidalnost koja se javlja kod depresije, tako da bi rano prepoznavanje učinkovitosti terapije doprinijelo ne samo bržem izlječenju i subjektivnom smanjenju proživljavanja tegoba, nego bi bilo i od izravne koristi u smanjenju mortaliteta bolesnika koji boluju od depresivnog poremećaja.

Nisu poznati periferni biokemijski parametri koji bi omogućili objektivno prepoznavanje i praćenje težine depresivnog poremećaja. Dodatna je poteškoća što bi takvo vrednovanje trebalo provesti višekratno i u što kraćem vremenskom razdoblju dok se postiže terapijski odgovor na antidepresive, pa neuroradiološke ionizirajuće metode nisu metoda izbora. Jedina neinvazivna i neionizirajuća radiološka metoda kojom bi bili dostupni dublji dijelovi mozga je spektroskopija magnetskom rezonancijom. U ovom istraživanju je primijenjena spektroskopija magnetskom rezonancijom s ciljem prepoznavanja neurometabolita koji bi bili korelati ili mogući prediktori terapijskog odgovora.

1.1 Depresija

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, depresija je na četvrtom mjestu najučestalijih bolesti. Depresija se javlja od ranog djetinjstva do starije dobi. Najčešći simptomi depresivnog poremećaja su sniženo raspoloženje, gubitak interesa, bezvoljnost, manjak energije, osjećaj krivnje i smanjeno samopouzdanje i samopoštovanje, oslabljena koncentracija i otežano pamćenje, te anksioznost, poremećaj sna i apetita. U dijelu bolesnika dolazi do suicidalnih promišljanja, a oko 15% bolesnika i počini samoubojstvo. Polovina bolesnika u remisiji ponovno doživi recidiv. Oko $\frac{3}{4}$ bolesnika s dvije ili više epizoda depresije dožive recidiv¹.

1.2 Klinička procjena težine depresije

MADRS i HAM-D su dvije najčešće ocjenske ljestvice koje se primjenjuju u procjeni težine depresije.

U definiciji pojedinih simptoma depresije i u ukupnoj ocjeni njene težine nije ujednačen stav niti kod do sada uobičajeno korištenih klasifikacija, a niti kod onih koje su sada u uporabi, uključujući DSM-IV, DSM-IV-R, DSM-V, MKB-10 i MKB-11.

HAM-D17 ocjenska ljestvica koja se sastoji od 17 čestica i ima raspon od 0 do 52. Ukupni rezultat od 0 do 7 se smatra normalnom, odnosno predstavlja nedostatak depresivnih simptoma. Rezultat od 8 do 13 ukazuje na blagu depresiju, rezultat od 14 do 18 ukazuje na umjerenu depresiju, rezultat od 19 do 22 ukazuje na tešku depresiju, a rezultati veći od 23 ukazuju na izrazito tešku depresiju². HAM-D ocjenska ljestvica je najčešće korištena ljestvica za procjenu depresije³.

MADRS je ocjenska ljestvica koju provodi educirana stručna osoba i koja se sastoji od 10 čestica. Svaka čestica se procjenjuje u rasponu od 0 do 6, te se ukupni rezultat kreće od 0 do 60; veći rezultati ukazuju na izraženije depresivne simptome. Ukupni rezultat od 0 do 6 ukazuje na nedostatak depresivnih simptoma, odnosno normalu, rezultat od 7 do 19 ukazuje na blagu depresiju, rezultat od 20 do 34 ukazuje na umjerenu depresiju, rezultati veći od 35 ukazuju na tešku depresiju⁴.

Do sada nisu uspostavljene konačne vrijednosti MADRS rezultata za procjenu remisije depresije. Jedno istraživanje je, uzimajući u obzir izrazito usku definiciju remisije, došlo do MADRS vrijednosti od ≤ 4 . Nešto manje stroge definicije remisije, dovode do MADRS vrijednosti ≤ 9 za remisiju². Većina istraživanja primjenjuje MADRS vrijednost od ≤ 7 koristeći nešto šire definicije remisije.

MADRS ocjenska ljestvica u odnosu na HAM-D17 ima nešto višu unutarnju dosljednost. MADRS ljestvica ima i visoku razinu diskriminacije u procjeni težine depresije⁵. Neka istraživanja procjenjuju da MADRS, u usporedbi s HAM-D17, ima veću osjetljivost na promjenu depresije tijekom terapije⁶, međutim druga istraživanja ne dolaze do istog zaključka⁷.

1.3 Liječenje depresivnog poremećaja

Depresivni poremećaj najčešće se liječi psihofarmakoterapijom i psihoterapijskim metodama ili njihovom kombinacijom. U svakodnevnoj kliničkoj praksi liječenje farmakoterapijskim metodama daleko je češće, a težište primjene psihoterapijskih metoda kao metode izbora su lakši oblici depresivnog poremećaja.

Od farmakoterapijskih metoda najčešće se primjenjuju antidepresivi iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SIPPS). Kliničko poboljšanje, u pravilu, slijedi tek 3-4 tjedna nakon primjene antidepresiva. Terapijski odgovor na antidepresivnu terapiju postiže se kod 50% bolesnika⁸.

1.3.1 Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina su u uporabi, kao antidepresivna terapija, dugi niz godina. Do sada je pokazano, na animalnim modelima, kao i na randomiziranim, placebo kontroliranim kliničkim istraživanjima na ljudima, njihova učinkovitost, neškodljivost i dobra podnošljivost^{9,10,11,12,13,14}. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SIPPS) dovode do povećanja koncentracije serotonina u dijelovima mozga koji primaju serotonergičku inervaciju. Na animalnom modelu je pokazano kako kod štakora, koji su nakon rođenja bili odvojeni od majke, dolazi do poremećaja serotonergičkih, noradrenergičkih i dopaminergičkih sustava u onim dijelovima mozga za koje se smatra da imaju značajnu ulogu u nastanku depresije¹⁵. Istraživanja su pokazala da je amigdala jedan od osnovnih centara reakcije na strah, a posljedično tome je dokazano da ima značajnu ulogu u depresivnom poremećaju^{16,17,18,19}.

1.3.2 Vrijeme postizanja terapijskog odgovora u liječenju depresije

Terapija antidepresivima u liječenju depresivnog poremećaja pokazuje kliničko poboljšanje tek nakon 3-4 tjedna primjene dok je kod dijela pacijenata potrebna promjena antidepresivne terapije zbog neučinkovitosti. Kod oko 40 % bolesnika se ne opaža terapijski odgovor pri primjeni antidepresiva. Smatra se da je antidepresiv potrebno primjenjivati 4-8 tjedana prije nego što se razmotri mogućnost promjene antidepresiva²⁰. Nakon postignutog poboljšanja, doza održavanja primjenjuje se tijekom 6 mjeseci do godinu dana.

S obzirom na značajno razdoblje između početka liječenja i postizanja terapijskog učinka, ne samo da se produžuje trajanje tegoba bolesnika, nego se izravno produžuje i razdoblje većeg suicidalnog rizika.

1.4 Prediktori i rani znaci terapijskog odgovora

Uzimajući u obzir tegobne simptome proživljavanja bolesti za samog bolesnika i prevalenciju depresije u populaciji, broj istraživanja kojima se pokušao prepoznati terapijski odgovor su po brojnosti veća nego kod drugih psihijatrijskih poremećaja i uglavnom su se u početku svodila na kliničke znakove i istraživanja herediteta, a kasnije na genetska istraživanja i prepoznavanja prediktora neuroslikovnim prikazom mozga.

Od kliničkih prediktora ustanovljeni rizici za postojanje bolesti su promjena raspoloženja u obiteljskoj anamnezi²¹, s time da hereditet doseže čak 37%²², postojanje drugih psihijatrijskih bolesti te rani početak bolesti²³.

Do sada ustanovljeni genetski uvjetovani čimbenici od utjecaja na terapijski odgovor obuhvaćaju od farmakokinetičkih čimbenika citokrom P450, 2D6 i 2C19, a od farmakodinamskih BDNF, 5-HTP 2A receptor i podjedinicu beta 3 G proteina, premda još postoje dvojbe o kliničkom značaju u poboljšanju terapijskog odgovora osnovanih na genetskim čimbenicima²⁴.

1.5 Razlike u terapijskom odgovoru s obzirom na spol

Depresija je češća kod žena nego kod muškaraca, no vrlo se malo zna o razlozima koji dovode do tih razlika.

Razlika u terapijskom odgovoru također postoji, ali je slabo istražena.

S pretpostavkom da je razina Cho povezana s terapijskim ishodom, Cho bi mogao biti jedan od mogućih posrednika ili posljedica razlika po spolu, s obzirom da se pokazalo da estrogeni dovode do porasta PC. Kod čak 77% muškaraca i 80% žena u postmenopauzalnom razdoblju s deficitarnim unosom Cho došlo je do razvoja masne jetre (vrednovano putem 1H-MRS) i mišićnih oštećenja, dok je kod žena u premenopauzalnoj dobi taj postotak bio daleko manji (44%)²⁹.

Nedostatne spoznaje o razlikama po spolu i neizravni pokazatelj moguće posredne uloge Cho koje dovode do tih razlika bili su razlog da se u ovom istraživanju posebna pozornost usmjeri i na istraživanje spolnih razlika u razinama neurometabolita u terapijskom odgovoru.

1.6 Kolin i funkcije mozga

Četiri su najznačajnije uloge Cho u mozgu: (1) prekursor je acetilkolina, (2) uključen je u transport lipida, (3) esencijalni je sastojak membranskih fosfolipida²⁵ i (4) Cho je uključen u metabolizam metilnih skupina, prekursor je u sintezi donorne molekule S-adenozilmetionina (SAM) koji je uključen u postupke metilacije²⁶ u tijelu.

Premda su ukupne zalihe kolina u mozgu velike (>20 $\mu\text{mol/g}$), razina slobodnog kolina je mala. Prema nekim procjenama čak je 90% kolina sastojak membranskih fosfolipida, a 9% je vezano na hidrofilne metabolite uključujući fosfokolin i glicerofosfokolin²⁷.

De novo sinteza Cho sudjeluje s malim udjelom te se smatra da većina sinteze Cho ovisi o transportu kroz krvno-moždanu barijeru, a izvori Cho u uobičajenoj prehrani su mlijeko, jaja, jetra životinjskog porijekla i orašasto voće²⁸. Vrlo malo se zna o minimalnom unosu Cho prehranom. Poznato je da deficit nije letalan, ali se pokazalo da je deficit Cho u prehrani povezan s masnom promjenom jetre i oslabljenom mišićnom funkcijom²⁹.

Do većine spoznaja o ulozi kolina u liječenju depresije došlo se posredno, usporedbom farmakodinamskih aktivnosti agonističkog i antagonističkog djelovanja na kolinergičke receptore i praćenjem njihovih ekvivalenata u funkcionalnim, bihevioralnim i kongnitivnim promjenama.

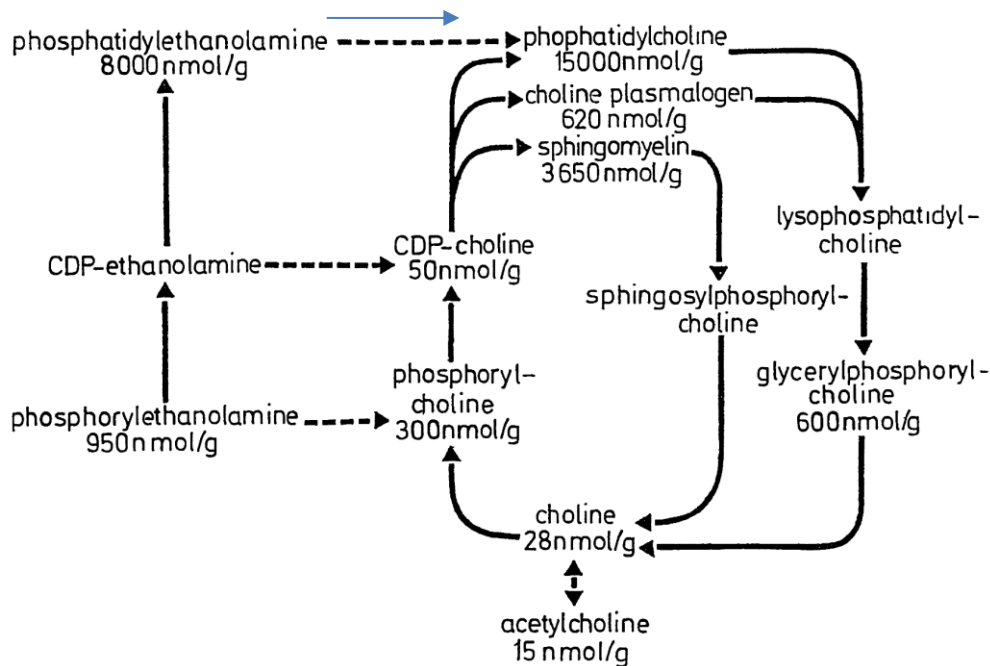
Neka istraživanja upućuju na povezanost kolina i BDNF-a, jer se, na animalnim modelima, dodavanjem kolina u prehrani, pokazalo povećanje BDNF-a u hipokampusu i korteksu³⁰, pa je pretpostavljen utjecaj Cho na neuroplastičnost, uz dodatni učinak na poboljšanje kognitivnih funkcija. Moguće je da ove promjene nastaju i posredovanjem acetilkolina čije stvaranje ovisi o raspoloživosti Cho³¹.

Razine kolina posredno utječu na razinu serotonina i to putem fosfatidilkolina (PC)³² koji povećava aktivnost triptofan hidroksilaze, koji je limitirajući enzim u sintezi serotonina³³.

Termin „lecitin“ nekad se koristi za opis svih molekula koje za sastojak imaju PC. Dijetalna suplementacija kolinom tijekom gestacije i laktacije kod štakora, dovela je do povećane razine serotonina u hipokampusu kod potomaka³⁴, što upućuje na mogući značaj kolina tijekom ranog neuralnog razvoja. Utjecaj Cho na serotonin mogao bi uključivati epigenetske mehanizme, jer se pokazalo da deficit Cho mijenja metilaciju promotora DNA gena povezanih sa serotonergičkom transmisijom, kao što su SERT i MAO-A³⁵.

Glicerofosforilkolin (GPC, nekada se u literaturi navodi i kao glicerofosfokolin), koji zajedno s fosforilkolinom čini veći dio Cho vrha na 1H-MRS suplementacijom poboljšava memoriju i

pažnju kod bolesnika s blagim kognitivnim poremećajem, usporava kognitivnu degradaciju i dovodi do poboljšanja izvršnih funkcija u usporedbi s placebo^{36,37}. Animalna istraživanja upućuju na neuroprotektivni učinak GCP-a i na ulogu u smanjenju opsega oksidativnog stresa nakon ishemije³⁸. Pozitivni učinak GCP-a pokazao se u poboljšanju oporavka i boljom funkcionalnom rehabilitacijom kod bolesnika nakon CVI^{39,40}. S obzirom da je produkt razgradnje PC, i GPC predstavlja izvor u anabolizmu acetilkolina i sintezi fosfolipida⁴¹.



Grafikon 1. Metabolizam kolina kvantificiran u mozgu štakora (prema Kewitz i dr.⁴²).

Plavom strelicom označen je put koji se uobičajeno smatra sintezom *de novo* koja vrlo malim dijelom sudjeluje u ukupnoj produkciji Cho

Slobodni Cho od značaja je za enzimatske reakcije oksidacije, fosforilacije, acetilacije i može utjecati na preusmjeravanje nekih od osnovnih metaboličkih puteva. Za funkciju mozga od posebnog su značaja acetilacija Cho u sintezi acetilkolina i fosforilacija koja je prvi korak u sintezi PC.

Od dva endogena puta, u mozgu je značajan onaj putem CDP-kolina, a sinteza CDP-kolina u produkciji PC je limitirajući faktor u ovom metaboličkom putu.

PC je glavni sastojak fosfolipida. U katabolizmu fosfolipida najznačajniji je put razgradnje PC u GPC.

Cho je najznačajniji dijetalni izvor labilnih metilnih skupina za S-adenozilmetionin (AdoMet). AdoMet je najznačajniji metilni donor u metilaciji histona i DNK. Citotoksični

učinak histona povezuje se s upalnim procesima⁴³, a metilacija DNK izravno ili neizravno utječe na smanjenu gensku ekspresiju⁴⁴.

1.7 Amigdala kod depresivnog poremećaja

Amigdala je limbička struktura koja ima ulogu u modulaciji emocionalnog i socijalnog ponašanja i u memoriji, a promjene njene strukture i funkcije povezane su s afektivnim poremećajima^{45,46,47}.

Amigdala dobiva serotonergičku inervaciju te ima nekoliko podtipova serotonergičkih receptora što objašnjava njenu reaktivnost na primjenu antidepresivne terapije^{48,49,50,51}. Pokazana je i povezanost polimorfizama gena za transport serotonina s aktivnosti amigdale i njenom povezanosti s drugim regijama⁵². Istraživanje primjene SIPPSS neposredno na amigdalnu, primjenom mikroinjekcije, pokazalo je njihovo anksiolitičko djelovanje koje je značajno u liječenju depresije gdje je anksioznost jedan od čestih simptoma te bolesti⁵³. Istraživanja su do sada dokazala ulogu amigdale u reakciji na strah, uz značajnu ulogu kod depresivnog poremećaja^{54,55,56}. Drugačija je reaktivnost amigdale kod doživljavanja tuđe tuge ili straha kod osoba koje boluju od depresije ili su trenutačno u remisiji, u odnosu na osobe koje nikada nisu bolovale od afektivnog poremećaja^{57,58,59,60,61,62}. Čini se mogućim postojanje razvojne uvjetovanosti u proživljavanju tuđe emocionalne reaktivnosti⁶³, jer su istraživanja koja su kod istovjetnih metodologija uključivala djecu i adolescente koji boluju od depresije i anksioznih poremećaja pokazala drugačije rezultate^{64,65,66}.

1.8 Prepoznavanje terapijskog odgovora metodama neuroslikovnog prikaza mozga

Početna istraživanja neuroslikovnim metodama prikaza mozga uključivala su EEG.

Tehnološkim razvojem radioloških metoda, a naročito MR, suvremene metode prepoznavanja terapijskog odgovora uključivale su volumetrijske metode, fMRI, DTI i MRS.

Elektrofiziološka istraživanja pokazala su sniženje nižih frekvencija na polisomnografiji, promjene u REM fazi spavanja u smislu smanjene latencije REM faze i povećanu učestalost i produženje REM faze spavanja⁶⁷.

Ne-ionizirajuće radiološke metode doimaju se jedinim načinom za prepoznavanje bioloških markera u mozgu, bilo da se radi o praćenju terapijskog odgovora ili prediktivnoj ulozi

procjene rizika za ponovni nastanak depresivnog poremećaja. Ionizirajući radiološki postupci nisu metoda izbora zbog potrebe češćih ponavljanja mjerenja, pogotovo ako se radi o praćenju poboljšanja unutar iste depresivne epizode.

Od ostalih metoda terapijski odgovor se pokušao prepoznati molekularnim studijama putem SPECT-a, PET-a i fNIRS-a, no za sada izostaju metode koje bi bile dovoljno pouzdane da bi se koristile u kliničkom praćenju stanja bolesnika⁶⁸.

1.9 Protonska spektroskopija magnetskom rezonancijom (1H-MRS)

1H-MRS je jedina radiološka neinvazivna metoda s neškodljivom mogućnosti uporabe višekratnih mjerenja u kraćem vremenskom razdoblju.

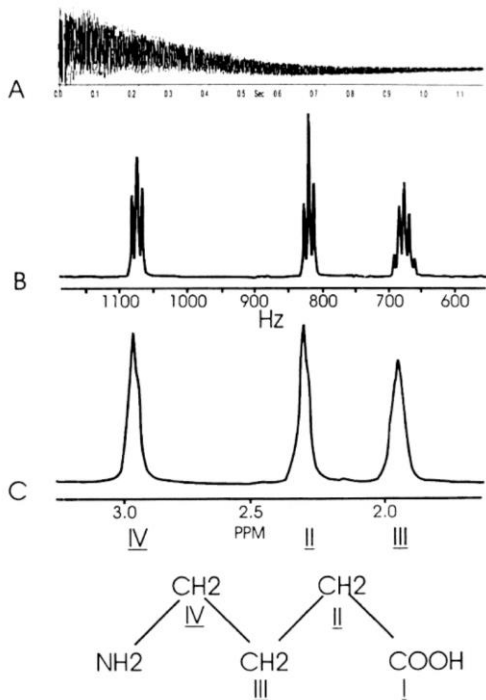
Osnovna prednost u korištenju ove metode je što ispitanik nije izložen zračenju, što omogućuje ponovljeno provođenje pretrage u kraćem vremenskom razdoblju.

Najčešće metode 1H-MRS su PRESS (eng. point resolved spectroscopy) i STEAM (stimulated echo acquisition mode). Metode se razlikuju s obzirom na omjer signala i šuma (eng. signal to noise ratio, S/N) i usporedbi širine vrha spektra na polovici njegovog maksimuma (eng. full width – half maximum, FWHM), s time da je prednost PRESS metode izraženija kod signala vode, nego kod NAA vrha, koji se uobičajeno uzimaju kao standardi kod utvrđivanja S/N i FWHM⁶⁹, no STEAM omogućuje kraće vrijeme odjeka (eng. echo time, TE).

Razlika u vrhovima u 1H-MRS spektru predstavlja pomak uzrokovan kemijskom strukturom molekule (eng. chemical shift), budući da se rezonantne frekvencije protona razlikuju s obzirom na kemijsku strukturu molekule unutar koje se proton nalazi jer gustoća okolnih elektrona predstavlja štit od utjecaja vanjskog magnetskog polja. Jedinica mjere ovih pomaka s obzirom na okolnu kemijsku strukturu je ppm (dio u odnosu na milijun, eng. parts per million), a u naravi predstavljaju normaliziranu vrijednosti frekvencije izražene u Hz. Vrhovi koji se mogu mjeriti unutar 1H-MRS spektra relativno su specifični za molekule i kemijske skupine od kojih se molekula sastoji.

U načelu je osnova 1H-MRS tehnologije okvirno podudarna kemijskoj spektrometriji i sastoji se od mjerenja radiofrekventnog (RF) odgovora na radiofrekventni impuls. Povratni RF signali uobičajeno su poznati kao FID i predstavljaju smanjenje signala tijekom vremena, a brojni zasebni FID koji su prikupljeni u istom mjerenju, kasnije budu zajednički analizirani Fourierovom transformacijom⁷⁰. Vrijednosti na apscisi izraženi u ppm ne ovise o snazi magnetskog polja, odnosno vrhovi koji odgovaraju određenoj molekuli prikazani su na istoj

poziciji, no FWHM i S/N se značajno poboljšavaju s većom snagom magnetskoj polja, ali su pozicije na apscisi komparabilne između MR uređaja različite snage magnetskog polja. Vrijednosti na ordinati su arbitrarne, tako da visina vrha predstavlja smislenu vrijednost tek kada se dovede u omjer s referentnom vrijednošću (u slučaju ovog istraživanja to je Cr). Primjer izvornog i pretvorenog spektroskopskog signala prikazan je na grafikonu.



Grafikon 2. Primjer ^1H -MRS spektroskopske analize signala GABA, prema Novotny et al.⁷⁰

A) 128 FID analizirano u 10 mM otopine GABA 8.5 T spektrometrom; B) spektar nakon Fourierove transformacije s jedinicama na apscisi u Hz koji C) transformacijom u ppm omogućuje simulaciju signala GABA koja se postiže *in vivo*

Stručnost radiologa i radioloških tehničara od presudnog su značaja za kvalitetu mjerenja, budući da na jasnoću i prepoznatljivost vrhova unutar ^1H -MRS spektra utječe čitav niz čimbenika kao što je optimizacija magnetskog polja (eng. *shimming*), uključujući globalnu optimizaciju mozga i lokaliziranu optimizaciju unutar prostorne jedinice koja se analizira (eng. *voxel*), tzv. *J-coupling* (budući da se neke molekule prikazuju u multipljetima, npr. CH_3 i CH kod laktata), potiskivanje signala vode i lipida (poput CHESSE metode za potiskivanje signala vode koji bi inače bio višestruko veći od signala samih metabolita) i korekcije nepoželjnih strujnih protoka (eng. *eddy current*) koje mogu deformirati glavno magnetsko polje i uzrokovati distorzije vrhova u spektru. Ova i druga brojna podešavanja obavljaju se

prije provođenja samog snimanja (eng. preprocessing) ili u sklopu obrade signala nakon snimanja (eng. postprocessing).

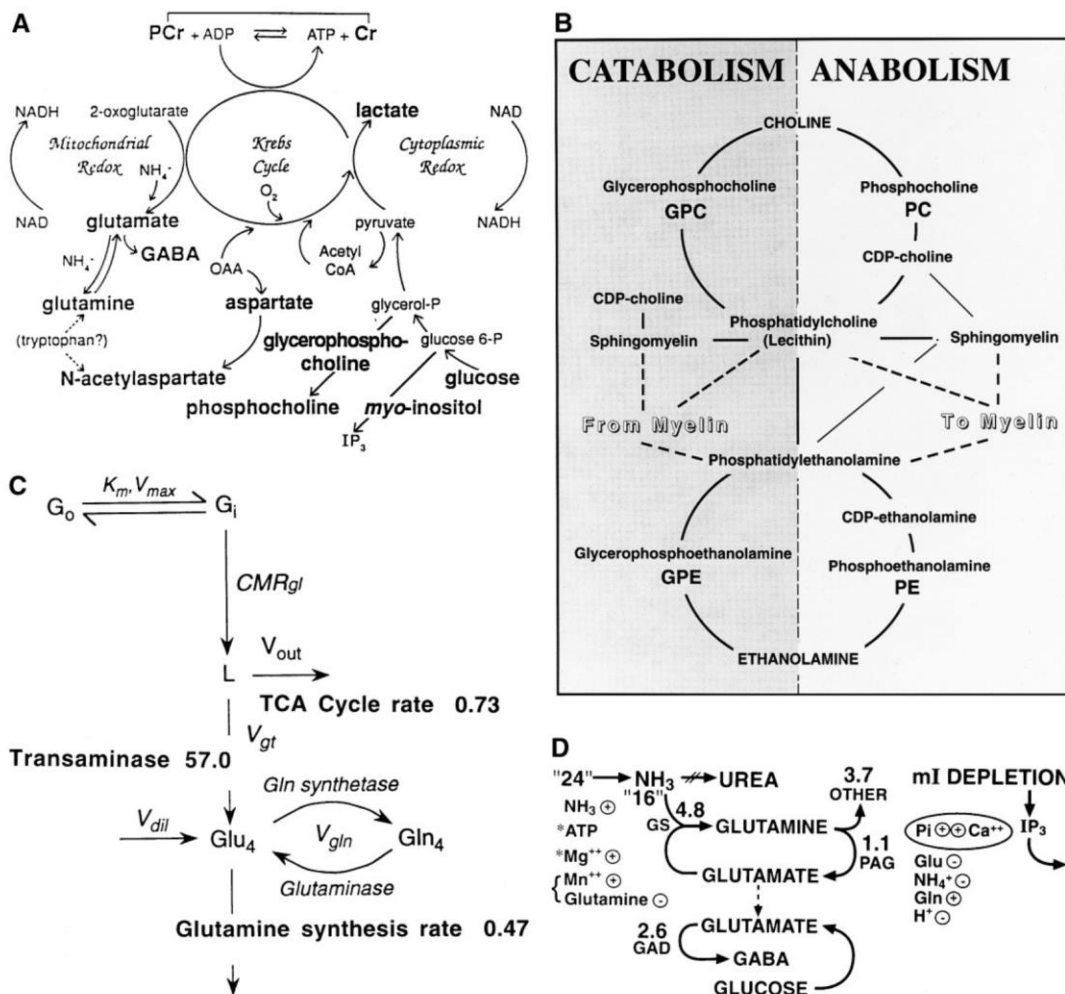
1.10 Neurometaboliti u praćenju promjena putem 1H-MRS

Osnovni neurometaboliti čija se razina uobičajeno pratila u istraživanjima depresivnog poremećaja putem 1H-MRS su N-acetil aspartat (NAA), kolin (Cho), kreatin (Cr) i fosfokreatin (PCr) zajedno, glutamat (Glu), mioinozitol (MI) i laktat.

NAA je relativno neaktivna aminokiselina koja ima svoju ulogu u neuralnom razvoju i mijelinizaciji. Nalazi se pretežno u neuronima pa se njegova razina tradicionalno smatra pokazateljem neuralne gustoće i održanja neurona.

Razina kreatina je relativno nepromjenjiva tijekom vremena te se koristi kao unutarnji standard za usporedbu. Glutamat, kao ekscitatorni neurotransmiter, nakon oslobađanja u sinapsu, prelazi u glutamin (Gln). Budući da dolazi do značajnog preklapanja vrhova glutamata i glutamina, oni se analiziraju kao jedan vrh-Glx⁷¹.

Neurometaboliti mjereni MRS dio su heterogenih neurometaboličkih puteva (Grafikon 3).



Grafikon 3. Neurometaboliti s dijelom metaboličkog puta u koji su uključeni (prema Ross i Bluml⁷²). Slike A. i B. odnose se na metabolite izravno mjerljive putem 1H-MRS.

1.10.1 Kolin (Cho) u 1H-MRS spektru

Kolin (Cho) je prekursor neurotransmitera acetilkolina i membranskih lipida: fosfatidilkolina i sfingomijelina. Rezonancija kolina je izraženija u bijeloj tvari. Signal koji se magnetskom rezonancijom dobiva od kolina čine, većinom glicerofosfokolin i fosfokolin, metaboliti kolina koji se nalaze u citosolu. Vrh kolina na spektroskopskom nalazu smatra se biomarkerom metabolizma membranskih fosfolipida. Glicerofosfokolin je katabolit, a fosfokolin prekursor fosfatidilkolina. Fosfatidilkolin je izvor drugog glasnika, diacilglicerola, koji ima značajnu ulogu u provođenju unutarstaničnog signala^{73,74}.

Razgradnja celularnih membrana rezultat je neurodegeneracije, bilo da se radi o akutnim (npr. CVI) i kroničnim bolestima (npr. demencija), što se očituje kao porast vrha Cho u 1H-

MRS spektru. U svakodnevnoj kliničkoj praksi vrh Cho najčešće služi kao pokazatelj aberantnog metabolizma fosfolipida kod nekih malignoma⁷⁵.

Vrh Cho na 3.2 ppm u 1H-MRS spektru primarno se sastoji od u vodi topivih -N(CH₃)₃-sastojaka, kao što su fosfokolin, glicerofosfokolin i kolin^{76,77}. *In vivo* putem 1H-MRS izmjerena razina tih, u vodi topivih, komponenti staničnih membrana uobičajeno se smatra pokazateljem celularne gustoće i pregradnje membrana (eng. turnover)²⁵.

Udio pojedinih molekula u Cho vrhu koji se dobiva provođenjem 1H-MRS nije moguće točno ustanoviti, nego samo procijeniti⁷⁸ da s po 40% u ukupnom udjelu sudjeluju fosforilkolin i glicerofosforilkolin, oko 10% slobodni kolin⁷⁹, neizravno (putem udjela u fosfolipidima mozga) se procjenjuje da manje od 5% otpada na fosfatidilkolin⁸⁰, manje od 5% na sfingomijelin⁸¹, između 0,5% do 1% na acetilkolin⁸². Premda se u literaturi fosfokolin i fosforilkolin navode kao različite molekule u metaboličkom lancu kolina, radi se o sinonimima⁸³ (za obje tvari CAS oznaka je 107-73-3; ChEBI: 18132)

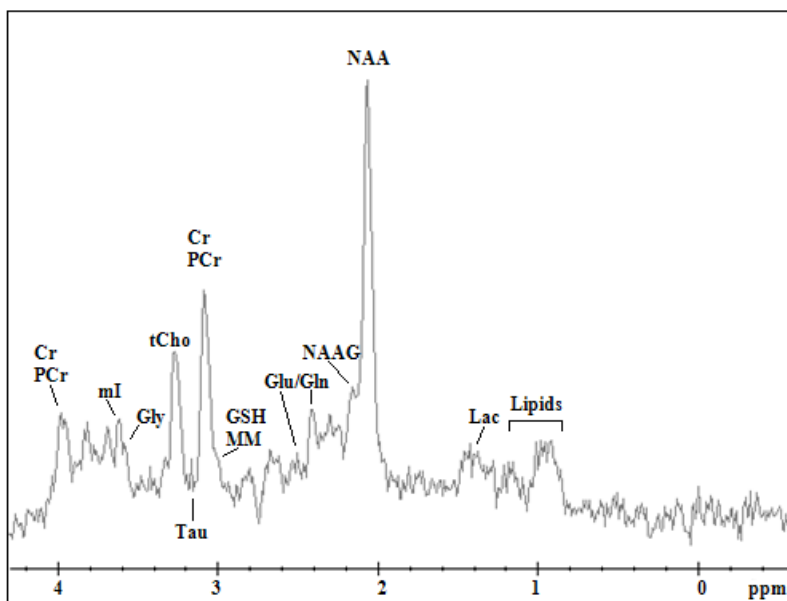
Istraživanja na animalnim modelima su pokazala, a na ljudima je i potvrđeno, kako se koncentracija kolina, koja je tijekom depresije snižena u području hipokampusa, nakon elektrokonvulzivne terapije povisuje⁸⁴.

U istraživanjima u kojima je promatran kolin u depresivnom poremećaju, primijećena je njegova snižena koncentracija koja se može objasniti redukcijom broja, veličine ili gustoće oligodendrocita koje se i, postmortalno, nalazi u mozgu bolesnika koji su bolovali od depresivnog poremećaja^{85,86,87,88}.

U nekim se istraživanjima opisuje povišenje razine kolina kod bolesnika koji boluju od depresije. Čini se da varijacije nastaju ovisno o dijelu mozga gdje se mjeri rezonancija kolina, osobinama ispitanika te tehničkim parametrima koji se primjenjuju^{89,90,91,92}.

Čini se da bi porast razine kolina mogao biti uvjetovan i životnom dobi ispitanika jer je kod djece koja boluju od depresivnog poremećaja, u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu, nađena njegova povećana razina⁹³, kao i kod osoba starije životne dobi^{94,95,96}.

Uobičajene metode 1H-MRS ne omogućuju razdvajanje PC vrha od GPC vrha s obzirom na njihovu relativnu blizinu u 1H-MRS frekvencijskom spektru – Cho je na 3.185 ppm, PC na 3.208 ppm a GPC 3.212 ppm. *Ex vivo* analizama kod uzoraka tumora s većom snagom polja (7 T), uz 31P, 13C i 15N metode MRS i uz modulirane radiofrekventne pulseve uspjelo se postići jasno razdvajanje Cho vrha u sastavne komponente⁹⁷, što je u uobičajenoj kliničkoj praksi značajno za dijagnostiku i praćenje terapijskog odgovora kod onkoloških bolesnika⁹⁸.



Grafikon 4. Primjer 1H-MRS spektra kod zdravog ispitanika kod 3T (prema Kousi et al.⁹⁹). Cho vrh je na 3.185 ppm

1.11 Razina kolina u amigdali kod depresije

Istraživanja koja su promatrala razinu kolina i bila usmjerena na amigdalnu, su malobrojna, s najvećim udjelom onih istraživanja koja su promatrala veći broj ROI, a amigdala je bila samo jedan od njih. Zbog toga u literaturi nedostaje tumačenja o njegovoj mogućoj ulozi kao prediktora, korelata i/ili moderatora/medijatora.

1.12 Kolin kod depresivnog poremećaja u drugim ROI

Najveći udio istraživanja kojima se mjerio Cho putem MRS nisu bila vezana uz provođenje terapije, nego se uglavnom analizirala razlika između bolesne i zdrave populacije. Kolin negativno korelira s dobi¹⁰⁰.

Razine Cho u frontalnom režnju, uključujući ACC i DPFC, bile su niže kod depresivnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike^{101,102,103}. Kod depresije u sklopu bipolarnog poremećaja, kod bolesnika su opažene povišene razine Cho u odnosu na zdrave ispitanike¹⁰⁴. Kod drugih bolesti, kod demencije u sklopu Alzheimerove bolesti razina Cho je povećana i korelira s kognitivnim propadanjem^{105,106}. U strijatumu je zapažena visoka razina Cho u ranoj fazi Huntingtonove bolesti¹⁰⁷. U parijetalnoj bijeloj tvari Cho je povišen kod multiple skleroze, za što autori smatraju da upućuje na razgradnju mijelina¹⁰⁸. U talamusu je kod

shizofrenih bolesnika povećana razina Cho¹⁰⁹. U bazalnim ganglijima (kaudatusu) pokazala se smanjena razina Cho kod opsesivno-kompulzivnog poremećaja¹¹⁰ i kod ADHD-a¹¹¹.

Kao što se ranije pokazalo i kod animalnih modela, suplemetacija Cho u prehrani dovodi do povećane razine Cho signala¹¹².

Jedno od rijetkih terapijskih istraživanja, pokazalo je da ketamin dovodi do porasta kolinergičkih markera¹¹³.

2. Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da postoji povezanost kliničkog terapijskog odgovora kod depresivnih bolesnika s promjenama razine kolina u amigdalama mjerenim ^1H spektroskopijom magnetskom rezonancijom.

3. Ciljevi rada

3.1 Opći cilj istraživanja

Opći je cilj istraživanja istražiti korelate kliničkog terapijskog odgovora kod depresije s parametrima mjerenim putem spektroskopije magnetskom rezonancijom. U provedbi tog cilja istražiti će se povezanost kliničkog terapijskog odgovora nakon primjene selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina kod bolesnika koji boluju od depresije s promjenama parametara mjerenih 1H-spektroskopijom putem magnetske rezonancije u području amigdala, s pretpostavkom najveće promjene omjera kolina u odnosu na kreatin.

3.2 Specifični ciljevi istraživanja

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. Istražiti razliku u omjeru kolina i kreatina u predjelu amigdala putem 1H-MRS između bolesnika koji boluju od depresije kod kojih se opaža terapijski odgovor i bolesnika kod kojih ga nema.
2. Analizirati promjene opažene 1H-MRS s obzirom na postignut klinički terapijski odgovor.
3. Prepoznati simptome depresivnog poremećaja koji su povezani s promjenama parametara mjerenima putem 1H-MRS.

4. Ispitanici i metode

4.1 Ispitanici u istraživanju

U istraživanje su uključeni ispitanici u dobi od 18 do 65 godina, muškog i ženskog spola, koji boluju od velikog depresivnog poremećaja, dijagnosticiranog prema DSM-IV kriterijima¹¹⁴ i prema M.I.N.I. upitniku¹¹⁵.

Ocjena težine depresivne simptomatike provedena je korištenjem Hamiltonove ocjenske ljestvice za depresiju¹¹⁶ (HAM-D) i Montgomery-Åsbergove¹¹⁷ ocjenske ljestvice za depresiju (MADRS).

Istraživanje je provedeno uz prethodno pribavljene suglasnosti Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Poliklinike Neuron.

Uz kliničke pokazatelje težine depresije, kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su sposobnost ispitanika za detaljno razumijevanje svih postupaka istraživanja i prihvaćanje predložene antidepresivne terapije. Kriteriji za isključivanje bili su pozitivna obiteljska anamneza težih psihotičnih poremećaja u obitelji, povijest uzimanja psihoaktivnih tvari, intelektualna insuficijencija, ozbiljni tjelesni komorbidni poremećaji, suicidalni rizik, klinički značajne EKG i/ili laboratorijske abnormalnosti, u anamnezi nedjelotvornost dva ili više antidepresiva različitog načina djelovanja te nedjelotvornost dva ili više SIPPS koji su korišteni dovoljno dugo vremena u odgovarajućoj dozi.

Ispitanicima koji zadovoljavaju sve kriterije za sudjelovanje u istraživanju, kod kojih je bila indicirana primjene antidepresivne terapije, predloženo je sudjelovanje u istraživanju. Prije uključivanja u istraživanje ispitanicima je detaljno obrazložen koncept istraživanja i dan na uvid obrazac informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju. Prije uključivanja u istraživanje svi su bolesnici potpisali obrazac informiranog pristanka.

Odabir bolesnika proveden je u Poliklinici Neuron, Hrvatski institut za istraživanje mozga, iz prigodnog uzorka prema redoslijedu prijema bolesnika po početku istraživanja.

4.2 Spektroskopija magnetskom rezonancijom

Spektroskopija magnetskom rezonancijom se provodila na MR uređaju MAGNETOM Trio Tim System jačine 3T. 1H-MRS pretraga se radila u predjelu lijeve amigdale, lijevog dorzolateralnog prefrontalnog korteksa, lijevog hipokampusa, lijevih bazalnih ganglija, lijevog prednjeg cingularnog korteksa te su analizirani parametri mjerljivi ovom pretragom. Svi ispitanici su napravili pretragu po dva puta. Ispitanici su pretragu napravili na početku istraživanja te osam tjedana nakon početka uzimanja antidepresivne terapije. Ukoliko su pri prvom pregledu imali propisanu antidepresivnu terapiju, ona se postupno ukinula te se pregled napravio nakon što je ispitanik bio tri dana bez terapije. Postupak isključenja antidepresivnog lijeka je učinjen sukladno uobičajenim postupcima promjene antidepresivne terapije. Ispitanik je u to vrijeme uzimao ostalu prepisanu terapiju, imajući na umu kriterije za uključnje. U slučaju pogoršanja stanja ispitanika ili bilo kojeg drugog razloga napuštanja istraživanja prije isteka osam tjedana, ispitanik je bio zamoljen da napravi drugi pregled spektroskopije magnetskom rezonancijom.

MRS snimanje je obuhvaćalo morfološko snimanje mozga pri čemu je kod ispitanika isključen organski uzrok postojanja psihičkih tegoba, te je prikazane regije mozga koje su se istraživale – amigdala, dorzolateralni prefrontalni korteks, hipokampus, bazalni gangliji, prednji cingularni korteks. Voksel veličine 15 x 15 x 15 mm je pozicioniran u regiji mozga koja se istražuje s nastojanjem da se izbjegnju bliske strukture koje bi mogle utjecati na homogenost magnetskog polja. 1H-MRS snimanje je provedeno sa 1500 ponavljanja (TR) i 35 ms TE (vrijeme odjeka, engl. *time echo*), sa 100 prosjeka. Metaboliti koji su praćeni na MRS snimkama su: NAA na 2.02 ppm, Cho na 3.2 ppm, Glx na 2.2 – 2.4 ppm, MI na 3.5 ppm i Cr na 3.03 ppm.

4.3 Izračun veličine uzorka

Uzorak u istraživanju izračunat je na temelju do sada opažene razlike u promjeni omjera kolina i kreatina između ispitanika koji su imali odgovor na antidepresiv i kontrolne skupine bez terapijskog odgovora, koristeći podatke o varijabilitetu iz metodološki najpodudarnijeg istraživanja (Sonawalla i sur. ¹¹⁸).

U tom je istraživanju kod skupine kod koje je postignut terapijski odgovor opažen omjer Cho/Cr na početku istraživanja 0.69 ± 0.16 , a na kraju istraživanja 0.83 ± 0.11 , odnosno opažena je razlika 0.14 ± 0.20 . U skupini kod koje nije opažen terapijski odgovor početna vrijednost Cho/Cr omjera iznosila je 0.74 ± 0.09 , a na kraju istraživanja 0.65 ± 0.19 , odnosno razlika je iznosila -0.09 ± 0.22 .

Steffens i sur. ¹¹⁹ proveli su meta-analizu s ciljem procjene udjela bolesnika kod kojih se postiže terapijski odgovor na primjenu antidepresiva. Ta je meta-analiza pokazala da se kod primjene SIPPS nakon 8 tjedana postiže terapijski odgovor kod 63.2% bolesnika.

Uz primjenu jednosmjernog ANOVA testa, uz uzorak od 57 ispitanika (36 ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom, 21 ispitanik bez terapijskog odgovora), postigla bi se snaga testa ("power") od 90%, uz razinu značajnosti provođenja F-testa od 1%, kada bi razlika u Cho/Cr promjenama između dvije skupine iznosila 0.23 i uz zajedničku standardnu devijaciju skupina od 0.21. U slučaju da provedeno istraživanje pokaže značajnija odstupanja od pretpostavljenog udjela bolesnika kod kojih se postiže povoljan terapijski odgovor, veličina uzorka bit će korigirana sukladno opaženom udjelu bolesnika s pozitivnim terapijskim odgovorom. Zaključno, uzorak u istraživanju iznositi će ≥ 57 , uz početni broj ispitanika usklađen za isključivanje bolesnika iz istraživanja zbog nedostatka krajnje procjene u istraživanju.

4.4 Metode analize podataka

Primarna hipoteza istraživanja statistički je analizirana putem jedne od varijanti linearnog modela (Linear Mixed-Effects Model).

Druge metode statističke analize korištene su kao eksploratorne, kako bi se dobio što bolji uvid u distribuciju pojedinih varijabli i njihovu međusobnu povezanost.

Neke od analiza koriste standardizirane (skalirane) vrijednosti varijabli, s ciljem da se bolje uoče doprinosi pojedinih prediktora varijabilitetu kriterijske varijable. Vrijeme istraživanja, odnosno dan u kojem je rađena procjena stanja ispitanika i ne može biti skalirano, jer su prisutne samo dvije vrijednosti, pa je vrijeme procjene (T) u analizama korišteno kao faktor. Vrijednosti MADRS također nisu transformirane kod analiza, s obzirom da se formalno radi o ordinalnoj skali, no s obzirom na raspon vrijednosti, njen se ukupni zbroj uobičajeno smatra intervalnim.

Primarna analiza provedena je korištenjem LMM modela, s obzirom na prednosti u odnosu na standardni regresijski model u smislu da intercept i koeficijent regresije nisu fiksni za cijeli uzorak ($Y = (\beta_0 + b_0) + (\beta_1 + b_1) \cdot X$). Dodatna prednost LMM modela su manje rigorozni statistički uvjeti u odnosu na linearne modele. Za razliku od standardnih modela linearne regresije, LMM model u analizu uključuje stalne (fixed) i slučajne (random) efekte.

Uz navedeno, bit će provedena analiza s početnom vrijednosti HAM-D (težina depresije), promjenama na HAM-D te dobi ispitanika kao kovarijatama. Povezanost Cho/Cr promjena na 1H-MRS s kliničkim terapijskim odgovorom bit će analizirana metodom multiple regresije, sa Cho/Cr kao zavisnom varijablom i početnom vrijednosti HAM-D, promjenama HAM-D, dobi i spolom ispitanika kao nezavisnim varijablama.

U sklopu deskriptivne statistike, kod varijabli čije su vrijednosti mjerene kontinuiranom skalom prikazane su srednje vrijednosti, standardne devijacije, minimum, maksimum, raspon te 95%-tne granice pouzdanosti. Kod varijabli mjerenima ordinalnim skalama prikazan je medijan, raspon te gornji i donji kvartili. Korelacija dviju varijabli bit će prikazana Pearsonovim ili Spearmanovim koeficijentom korelacije, a u slučajevima kada su analizirane korelacije između više varijabli, a kada je to primjenjivo, analizirani su koeficijentom parcijalne korelacije. Od neparametrijskih testova, analize su provedene Mann Whitney-evil U-testom („Wilcoxon rank-sum test“) i testom po Wilcoxonu za zavisne uzorke („Wilcoxon signed test“).

Kod varijabli čija stvarna (populacijska) distribucija je još nedovoljno poznata ili nedovoljno potvrđena drugim istraživanjima koristili smo neparametrijske testove. Taj pristup uključuje i slučajeve kada rezultati mjerenja odgovaraju uvjetima uporabe parametrijskog testa (kao što je normalnost distribucije i jednak varijabilitet kod skupina). S obzirom na manje zahtjeva za uporabu neparametrijskih testova, s jedne strane su oni otporniji na odstupanja od pretpostavki, ali se uvriježeno smatra da posjeduju manju snagu od njihovih parametrijskih ekvivalenata. S praktične strane to znači da, ukoliko varijabla udovoljava uvjetima za provođenje parametrijskog testa, primjena parametrijskog testa ima veću pretpostavljenu mogućnost prepoznavanja stvarnog efekta, ukoliko on postoji. Prema tome, uporaba neparametrijskih testova je konzervativnija varijanta.

Primarna hipoteza istraživanja vrednovat će se na razini značajnosti od 5%.

4.5 Očekivani znanstveni doprinos

Provedbom istraživanja doprinijet će se prepoznavanju neurodijagnostičkih biomarkera za objektivizaciju vrednovanja težine depresivnog poremećaja i praćenja odgovora na antidepresivnu terapiju, što bi moglo omogućiti bolje praćenje i prepoznavanje tijekom depresivnog poremećaja, relapsa i povrata depresivne simptomatike.

Postojanje uloge kolina kao mogućeg korelata u objektivizaciji težine depresivnog poremećaja moglo bi doprinijeti razjašnjenju neurofiziologije nastanka depresivnog poremećaja i pojašnjenju neurofizioloških mehanizama u oporavku od bolesti. S obzirom da je amigdala primarna regija mozga od interesa u ovom istraživanju, praćenjem promjena razina kolina doprinijet će se i pojašnjenju uloge amigdala u etiologiji depresivnog poremećaja.

5. Rezultati

U istraživanje je uključeno ukupno 59 ispitanika, prosječne dobi od 29.4 godine (SD = 7.4), u rasponu od 18.4 godine do 42.5 godina. U istraživanje je uključeno 36 žena i 23 muškarca. Prosječna dob žena u uzorku bila je 28.7 godina, a muškaraca 30.5 godine. Nije bilo statističke razlike po dobi između muškaraca i žena (Mann-Whitney U = 352, p = .339.).

5.1 Opći odgovor na terapiju antidepressivima

Za vrednovanje terapijskog odgovora korištena je podjela na ispitanike kod kojih je postignut terapijski odgovor (eng. responder) i na one kod kojih nije postignut očekivani terapijski odgovor (eng. non-responder). Pod pojmom pozitivnog terapijskog odgovora podrazumijevalo se smanjenje početnog ukupnog zbroja na MADRS za više od 50%. Takva je podjela, bez obzira na redukciju preciznosti uvođenjem dihotomne varijable, korištena radi mogućnosti usporedbe s do sada objavljenim istraživanjima u kojima su analizirane promjene neurometabolita putem 1H-MRS, a kod kojih je u najvećem dijelu bila korištena upravo takva podjela. Prema kriterijima smanjenja MADRS $\geq 50\%$, pozitivan terapijski odgovor postignut je kod 26 ispitanika (44.1%), a nije postignut kod 33 ispitanika (55.9%). Omjer pozitivnog i negativnog terapijskog odgovora znatno je povoljniji kod muškaraca (11 s pozitivnim terapijskim odgovorom, 12 s negativnim), nego kod žena (15 s pozitivnim terapijskim odgovorom, 21 bez terapijskog odgovora). Takva je razlika podudarna do sada provedenim istraživanjima. Različiti udjeli pozitivnog odgovora po spolu, uz omjer pozitivnog odgovora po spolu koji je također podudaran drugim istraživanjima, dovode do toga da su udjeli po spolu ujednačeni u skupini s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom (Tablica 1.

Tablica 1. Terapijski odgovor po dobi i po spolu

Dob/Spol	N	Negativan ¹	Pozitivan ¹
DOB	59	26.9 (22.6, 35.5)	28.1 (22.8, 36.0)
SPOL	59		
Žene		21 (64%)	15 (58%)
Muškarci		12 (36%)	11 (42%)
Ukupno		33 (100%)	26 (100%)

¹ Medijan (IQR); n (%)

5.2 Rezultati psihometrijskih testova

Psihometrijska evaluacija težine depresivnog poremećaja provedena je korištenjem kliničkih ljestvica za vrednovanje depresije koje se najčešće koriste u istraživanjima depresije: MADRS i HAM-D. Pojedinačne ocjene pojedinih simptoma depresije u svakojoj od njih mjere se ordinalnim skalama, a ukupan se zbroj tradicionalno smatra vrijednostima mjerenim intervalnom skalom.

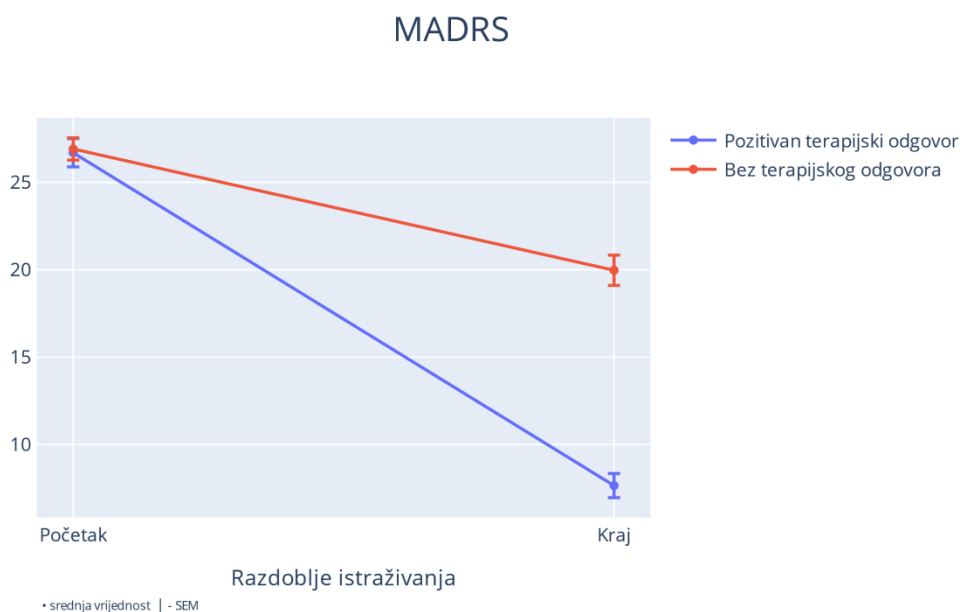
Ukupan zbroj na MADRS skali značajno se razlikovao između početka i kraja istraživanja, odnosno, nakon primjene antidepresivne terapije zapaža se značajno smanjenje intenziteta depresivne simptomatike (Tablica 2.).

Tablica 2. MADRS s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p ¹
	Početak	Kraj	
MADRS			<0.001
<i>N</i>	59	59	
<i>M (SD)</i>	26.8 (3.8)	14.5 (7.6)	
<i>Medijan (IQR)</i>	27.0 (24.5, 29.0)	14.0 (7.0, 20.0)	
<i>Raspon</i>	20, 35	2, 31	

¹ Wilcoxonov test za zavisne uzorke

S obzirom na podjelu ispitanika na one kod kojih je postignut povoljan terapijski odgovor i one kod kojih nije postignut, i u skupini bolesnika kod kojih nije postignut terapijski odgovor postignuto je u prosjeku značajno smanjenje intenziteta depresivne simptomatike, a da kod svakog pojedinog ispitanika nije došlo do takvog poboljšanja da bi doseglo nominalnu razinu pozitivnog terapijskog odgovora (*Grafikon 5.*).



Grafikon 5. Težina depresije procijenjena na MADRS ljestvici s obzirom na vrijeme istraživanja i na terapijski odgovor

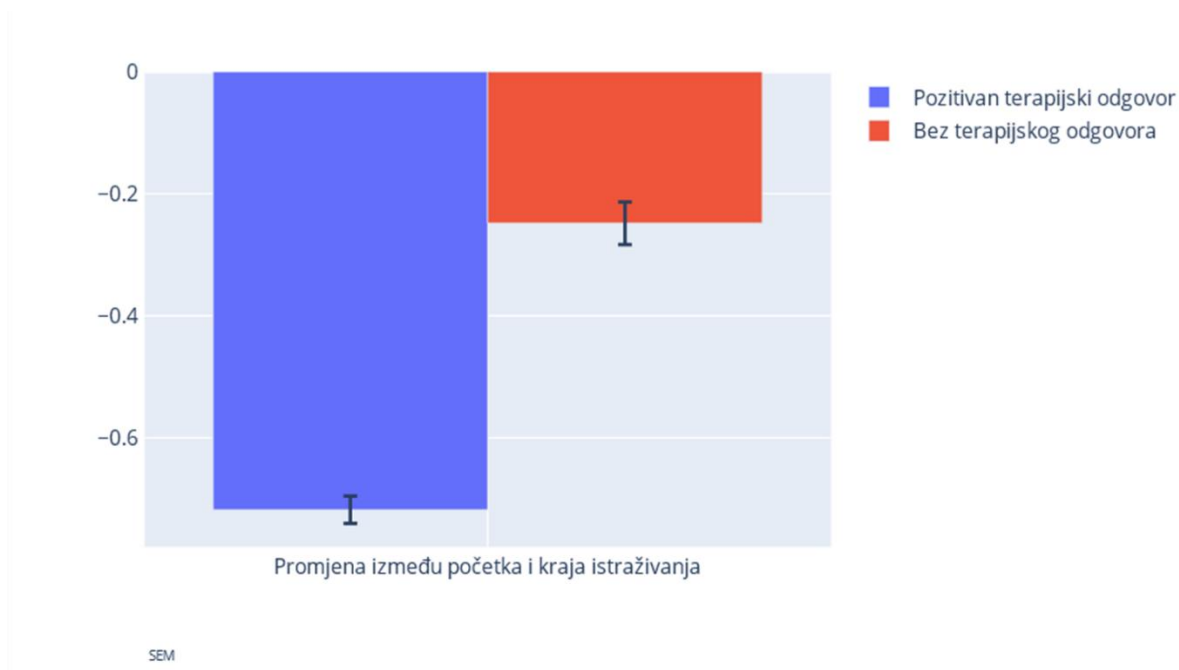
Smanjenje intenziteta depresivne simptomatike bilo je podjednako kod oba spola (Tablica 3.), uz vrlo velike raspone u smanjenju zbroja kod pojedinaca: razlika između najpovoljnijeg i najlošijeg terapijskog odgovora kod muškaraca je bila 27 jedinica na MADRS skali, a kod žena 28 (pozitivne vrijednosti znače da je došlo do pogoršanja depresivne simptomatike, negativne vrijednosti da je došlo do poboljšanja simptomatike).

Tablica 3. Promjena u ukupnom zbroju na MADRS skali između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
MADRS_Ch			0.926
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-11.8 (8.5)	-12.6 (7.4)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-14.0 (-18.0, -5.5)	-13.0 (-17.5, -8.8)	
<i>Raspon</i>	-23.0, 4.0	-26.0, 2.0	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Udio (postotne vrijednosti) razlike zbroja na MADRS (*Grafikon 6.*)u odnosu na početni zbroj doseže oko 65% kod skupine bolesnika koji se vode u skupini s pozitivnim terapijskim odgovorom, a u skupini ispitanika s nedovoljnim terapijskim odgovorom u prosjeku je preko 20%, što upućuje da razlika između dviju skupina nije dihotomna, kao što bi se iz samog naziva podjele ispitanika na „pozitivan“ i „negativan“ terapijski odgovor moglo zaključiti. Takva je dihotomna podjela korištena u radu isključivo radi mogućnosti izravne usporedbe s drugim radovima.



Grafikon 6. Udio promjene MADRS na kraju istraživanja

Težina depresije izražena ukupnim zbrojem na HAM-D ljestvici također se očekivano značajno smanjila nakon primjene antidepresivne terapije. Slično kao i na MADRS, nakon 8 tjedana terapije ukupna težina depresije mjerena HAM-D iznosila je manje od one početne (Tablica 4.).

Tablica 4. HAMD s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ¹
	Početak	Kraj	
HAMD			<0.001
<i>N</i>	59	59	
<i>M (SD)</i>	20.9 (3.0)	11.5 (5.7)	
<i>Medijan (IQR)</i>	21.0 (19.0, 23.0)	11.0 (6.0, 16.0)	
<i>Raspon</i>	16, 28	3, 23	

¹ Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Intenzitet depresivne simptomatike mjerena HAMD smanjio se u prosjeku i kod skupine s pozitivnim terapijskim odgovorom, ali i kod skupine koja je bila bez terapijskog odgovora (Grafikon 7.).



Grafikon 7. Intenzitet depresivne simptomatike mjereno putem HAMD s obzirom na terapijski odgovor

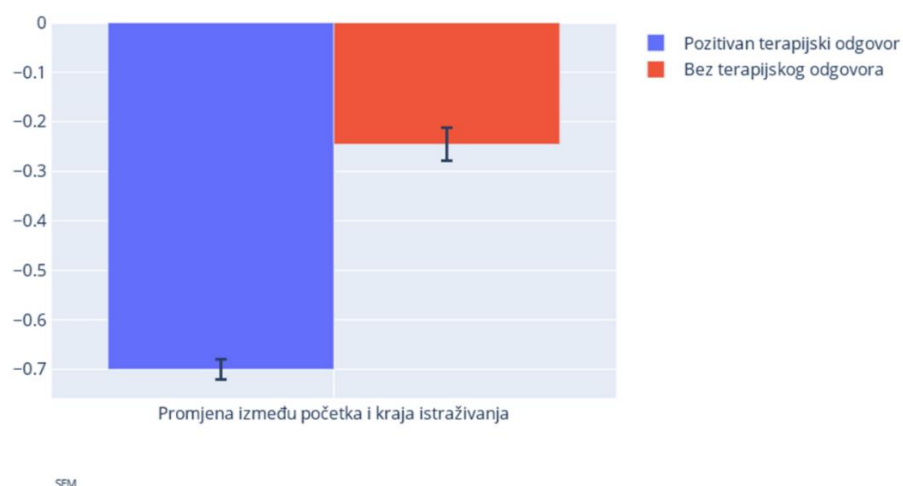
Promjena intenziteta depresije nakon 8 tjedana liječenja na HAM-D ljestvici pokazuje, kao i kod MADRS, da nema značajne razlike u prosječnom smanjenju ukupnog zbroja između muškaraca i žena (Tablica 5.).

Tablica 5. Promjena u ukupnom zbroju na HAM-D skali između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HAMD_Ch			0.988
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-9.1 (6.6)	-9.6 (5.5)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-11.0 (-13.0, -4.0)	-10.0 (-13.2, -6.8)	
<i>Raspon</i>	-19.0, 3.0	-20.0, 1.0	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Poboljšanje simptomatike iskazano udjelom na HAM-D ljestvici sličnih je vrijednosti kao i kod MADRS (Grafikon 8).



Grafikon 8. Udio promjene intenziteta depresivne simptomatike mjerena HAM-D skalom, u odnosu na početnu vrijednost

Na kraju istraživanja intenzitet depresivne simptomatike mjeren HAM-D iznosio je tek oko polovine intenziteta početne simptomatike što je prikazano u Tablica 6.

Tablica 6. Promjena u udjelu promjene na HAM-D skali u odnosu na početni zbroj, s obzirom na spol

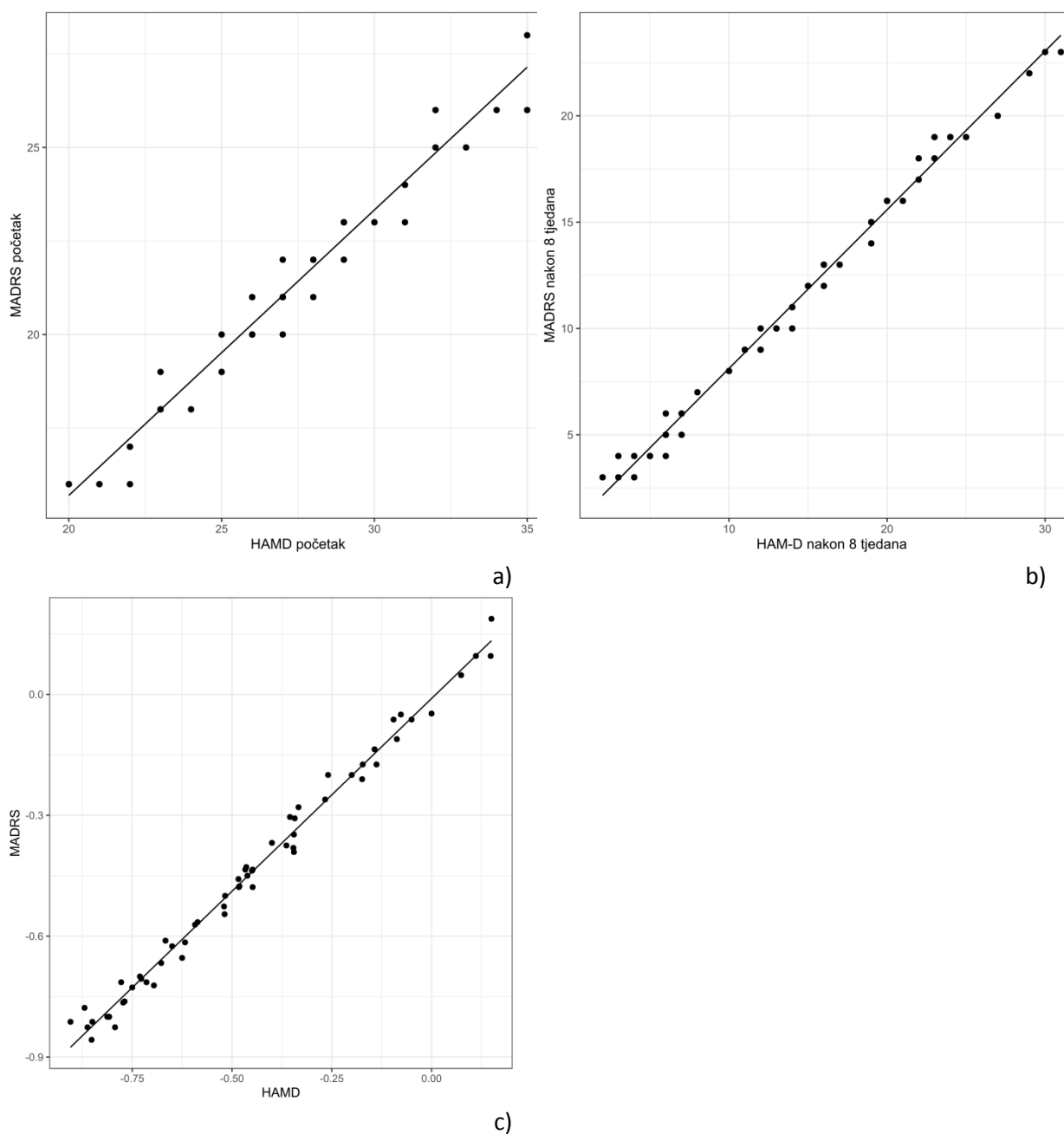
	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HAMD_Ch_Pct			0.624
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-0.5 (0.3)	-0.4 (0.2)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-0.5 (-0.8, -0.2)	-0.4 (-0.7, -0.3)	
<i>Raspon</i>	-0.9, 0.2	-0.8, 0.0	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.2.1 Povezanost ocjenskih ljestvica MADRS i HAM-D

Podudarnost ocjena dviju najčešće korištenih ocjenskih ljestvica za procjenu težine depresije bila je, očekivano, vrlo visoka i na početku ($r = 0.98$, $p < .001$), i na kraju istraživanja ($r = 1.00$, $p < .001$, $N = 59$), što se odrazilo i visoko podudarnim udjelima smanjenja simptoma u odnosu na razinu početne simptomatike kod HAM-D ($r = .99$, $p < .001$, $N = 59$) i kod MADRS ($r = .99$, $p < .001$, $N = 59$), što je prikazano na grafikonu *Grafikon 9*.

Premda je uobičajeno da se ukupni zbrojevi smatraju intervalnim skalama, podudarnost HAM-D mjerena Spearmanovom korelacijom ($r_s = 0.98$, $p < 0.001$, $N = 59$) je istovjetna na početku, na kraju istraživanja ($r_s = 1.00$, $p < .001$, $N = 59$), a i u udjelima poboljšanja postignutima na kraju istraživanja ($r_s = .99$, $p < .001$, $N = 59$).



Grafikon 9. Korelacija ukupnih zbrojeva na HAM-D i MADRS, (a) na početku istraživanja, (b) na kraju istraživanja i (c) u udjelima smanjenja u odnosu na početni zbroj

5.2.2 Druge osobitosti uzorka od mogućeg utjecaja na težinu depresije i terapijski odgovor

Prosječni indeks tjelesne mase u prosjeku se značajno povećao u razdoblju od 8 tjedana primjene antidepresivne terapije (Tablica 7.

Tablica 7. Indeks tjelesne mase

	Razdoblje istraživanja		p ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
BMI	26.7 (23.6, 29.1)	27.0 (23.9, 29.7)	<0.001

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Na početku istraživanja BMI kod žena iznosio je 27.2 (SD=4.37) i bio je u rasponu od 19.05 do 35.21, dok je kod muškaraca prosječni BMI na početku iznosio 25.03 (SD=3.87) i bio je u sličnom rasponu kao i kod žena (18.30 - 35.07). Na kraju istraživanja prosječni BMI kod žena bio je 27.63(SD=4.33), u rasponu od 19.99 do 35.37. I na kraju istraživanja je BMI kod muškaraca bio nešto niži nego kod žena, u prosjeku 25.54 (SD=3,81), u rasponu od 18.9 do 35.46. I kod muškaraca i kod žena povećanje BMI bilo je statistički značajno (p <0.001 u oba slučaja).

Tablica 7. Indeks tjelesne mase s obzirom na spol i vrijeme istraživanja

Spol	N	Razdoblje istraživanja		p ²
		Početak ¹	Kraj ¹	
Žene	36	27.6 (24.1, 30.7)	28.6 (24.3, 30.9)	<0.001
Muškarci	23	25.1 (22.5, 27.0)	25.9 (23.1, 27.5)	<0.001

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Većina ispitanika je u anamnezi je već imala barem jednu depresivnu epizodu (pa se formalno radilo o povratnom depresivnom poremećaju), a benzodiazepine nije uzimala bilo za vrijeme istraživanja, bilo ranije (Tablica 8.).

Tablica 8. Uzimanje benzodiazepina i postojanje depresivne epizode u anamnezi bolesnika

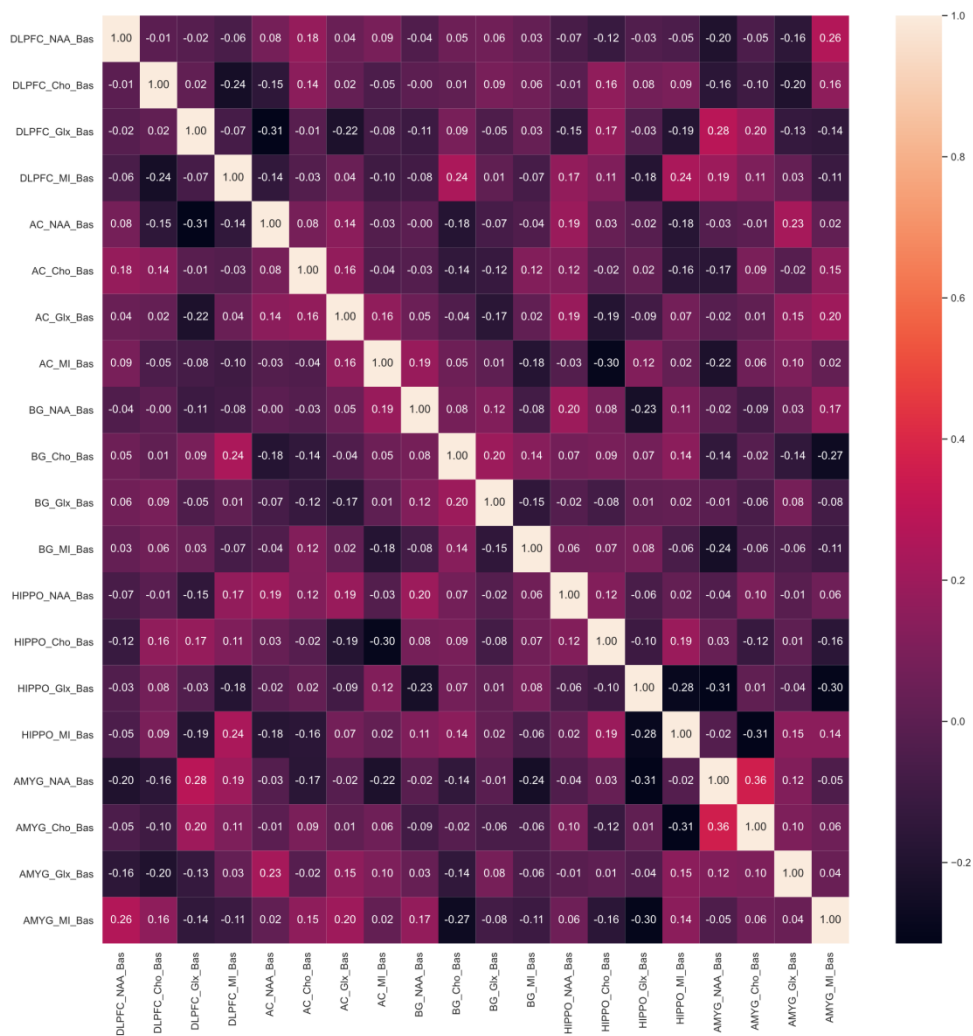
	ŽENE (N) <i>% žena</i>	MUŠKARCI (N) <i>% muškaraca</i>	N <i>% ukupno ispitanika (M + Ž)</i>
Uzimanje benzodiazepina u anamnezi			
Ne	25 64.1%	14 35.9%	39 66.1%
Da	11 55.0%	9 45.0%	20 33.9%
Uzimanje benzodiazepina tijekom istraživanja			
Ne	27 57.4%	20 42.6%	47 79.7%
Da	9 75.0%	3 25.0%	12 20.3%
Prethodna depresivna epizoda			
Ne	26 61.9%	16 38.1%	42 71.2%
Da	10 58.8%	7 41.2%	17 28.8%

Između muškaraca i žena nije bilo značajne razlike u postojanju prethodne depresivne epizode [$\chi^2(1, N = 59) = 1.5501e-31, p < .001$]; u uzimanju benzodiazepina istovremeno uz antidepresiv tijekom istraživanja, [$\chi^2(1, N = 59) = 0.61026, p = 0.4347$]; a niti u ranijem uzimanju benzodiazepina [$\chi^2(1, N = 59) = 0.15733, p = 0.6916$].

5.3 Područja od interesa (ROI) i metaboliti u istraživanju

Korelacija između razine mjerenih metabolita po pojedinim ROI na početku istraživanja prikazana je na *Grafikon 10*. Korelacije između pojedinih metabolita su vrlo male. Mala je povezanost razine metabolita s istim metabolitom u drugim ROI.

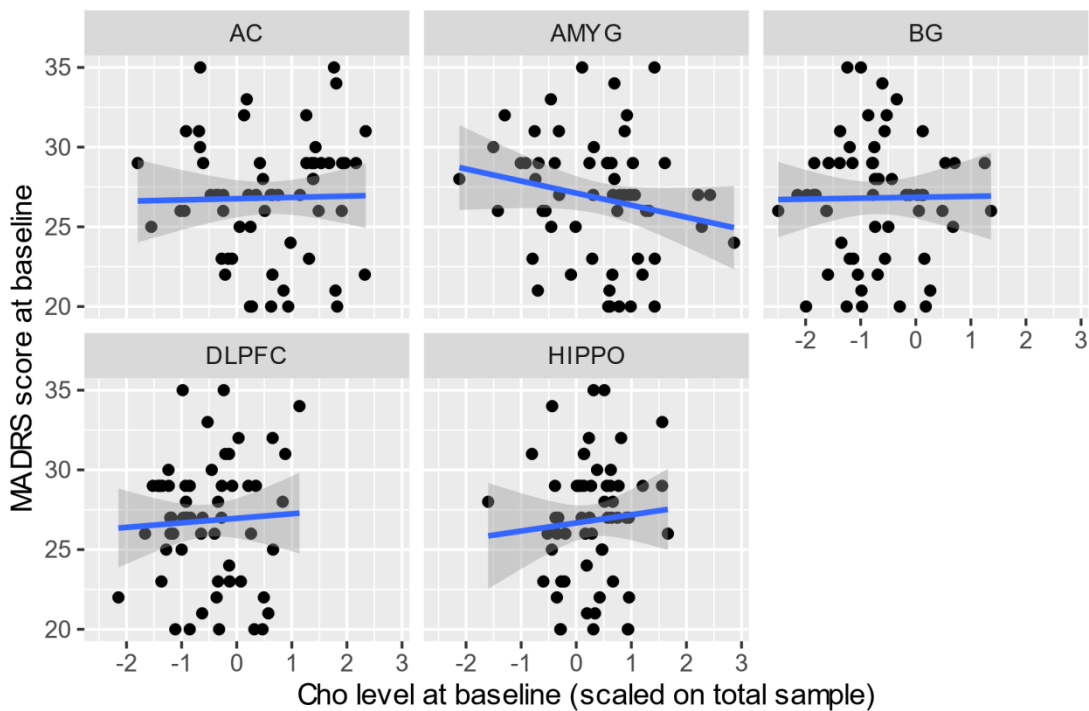
Unutar istog ROI povezanost razina metabolita s drugim metabolitima u istom ROI je mala, a najviša je korelacija između razina Cho i NAA u amigdali ($r=0.36$).



Grafikon 10. Korelacija razine metabolita po ROI na početku istraživanja, bez usklađenja za kolinearnost)

(pomak prema izrazito svijetlim poljima označava veću pozitivnu povezanost, pomak ka izrazito tamnim poljima olakšava prepoznavanje visoko negativnih korelacija)

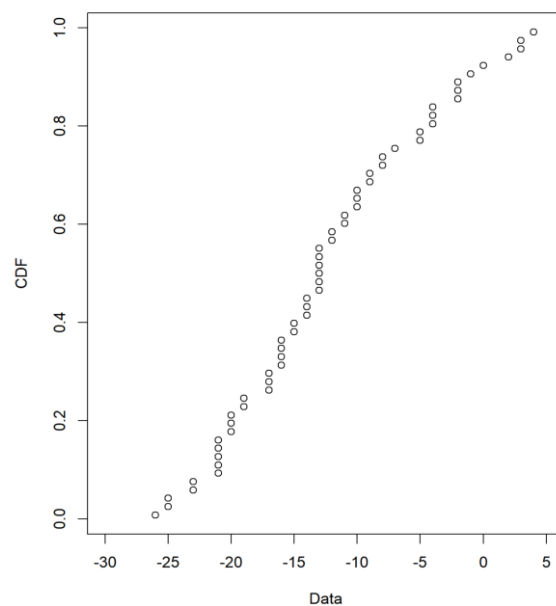
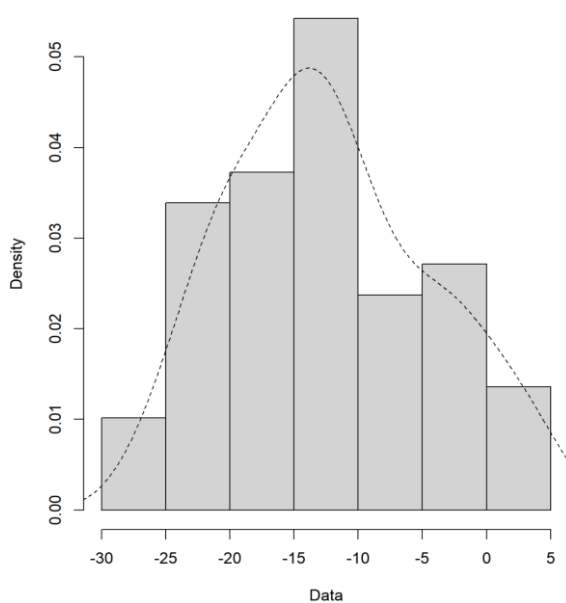
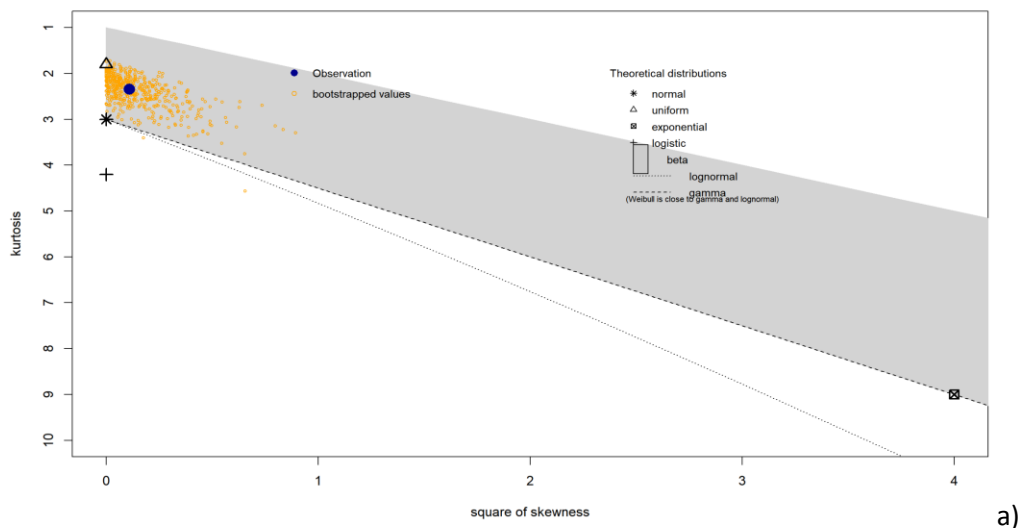
Razina Cho po pojedinim ROI u odnosu na težinu depresije mjerenu MADRS ljestvicom na početku istraživanja u načelu ne pokazuje veću povezanost. Nešto su veće tek pozitivna povezanost između razina Cho i MADRS u hipokampusu i negativna povezanost razine Cho s težinom simptoma mjerenom putem MADRS u amigdali (*Grafikon 11.*).



Grafikon 11. Povezanost razine Cho po pojedinim ROI u odnosu na težinu depresije (MADRS) na početku istraživanja

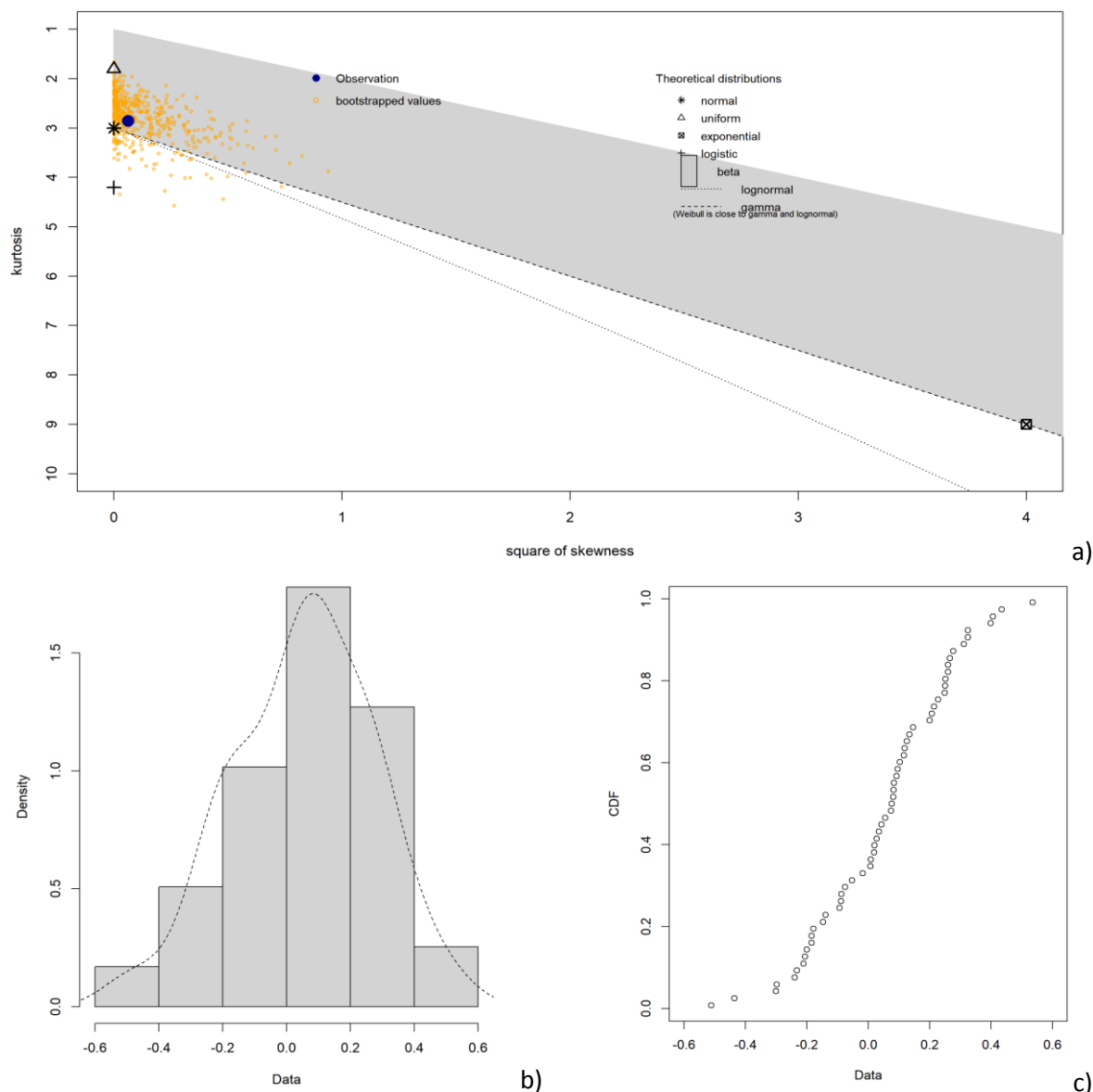
5.4 Primarna analiza – povezanost razine kolina u amigdali s težinom depresije

Okvirna distribucija promjene MADRS prikazana je po Cullenu i Freyu na *Grafikon 12.* koji upućuje na normalnu distribuciju, prema granici s uniformnom. Pretpostavka normalnosti distribucije promjene MADRS testirana je po Shapiro-Wilku ($W = 0.96877$, $p = 0.1333$), što upućuje da distribucija promjene MADRS u istraživanju ne odsupa značajnije od pretpostavljene normalne distribucije .



Grafikon 12. Okvirna distribucija promjena MADRS: a) u odnosu na najčešće teoretske distribucije, grafikon po Cullenu i Freyu; b) prema distribucijskim razredima promjene na MADRS i c) kumulativna distribucija promjene MADRS.

Pretpostavka normalnosti distribucije promjena Cho u Amyg podržana je testom normalnosti distribucije po Shapiro-Wilku $W = 0.98759$ ($p = 0.8096$), što upućuje da distribucija Cho u Amyg ne odstupa značajnije od normalne distribucije (*Grafikon 13.*).



Grafikon 13. Okvirna distribucija promjena razine Cho u Amyg: a) u odnosu na najčešće teoretske distribucije, grafikon po Cullenu i Freyu; b) prema distribucijskim razredima promjene Cho u Amyg i c) kumulativna distribucija promjena Cho u Amyg.

5.4.1 Varijable u istraživanju od utjecaja na MADRS

Prepoznate varijable od značajnijeg utjecaja na MADRS kao mjeru težine depresije, u dijelu koji slijedi analizirane su (a) metodom jednostavne regresije, (b) modelom s varijabilnom konstantom (eng. *intercept*) te (c) modelom s varijabilnom konstantom i varijabilnim koeficijentima regresije (eng. *slope*).

5.4.2 Povezanost razine Cho i MADRS

Model koji slijedi naveden je radi lakše usporedbe redukcije neobjašnjelog dijela varijabiliteta koji je postignut složenijim modelima analize.

Uzimajući u obzir sva mjerenja zajedno, primjenom modela jednostavne regresije (Tablica 9.), tj. uz pretpostavku normalne i neovisne distribucije ϵ , promjene Cho opisuju 11.5% ukupnog varijabiliteta MADRS). Drugim riječima, promatramo li svih 118 mjerenja u istraživanju, prisutna je statistički značajna negativna povezanost Cho i MADRS, na način da promjena za 1 na MADRS smanjuje teoretsku vrijednost Cho na 20.7 – 3.

Tablica 9. Linearni model - povezanost Cho i MADRS

Varijabla	Beta	95% CI	p
Konstanta =20.7 Cho	-3.0	-4.5, -1.5	<0.001

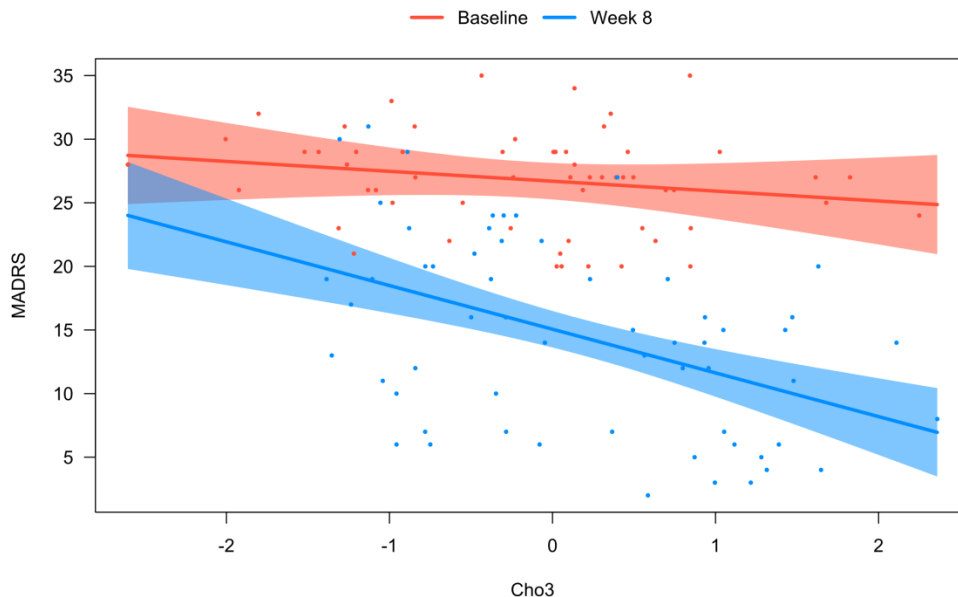
Ovaj simplificirani model samo pokazuje da je razina Cho okvirno povezana s težinom depresije, no ne objašnjava ni na koji način od kuda takav varijabilitet potječe. Moguće je postaviti dvojaku pretpostavku u pokušaju objašnjenja varijabiliteta (ϵ): (a) u načelu bi mogla odražavati početni varijabilitet između ispitanika s time da je promjena razine Cho relativno ujednačena između ispitanika, ali da varira uglavnom zbog različitih početnih vrijednosti (pretpostavka varijabilne konstante između ispitanika), dok bi regresijski koeficijent bio podudaran kod ispitanika i (b) mogućnost da postoji značajni individualni varijabilitet i u konstantnoj vrijednosti i u vrijednostima regresijskih koeficijenata.

5.4.3 Vrijeme istraživanja

Tijekom praćenja u istraživanju značajno su se smanjile vrijednosti ukupnog zbroja MADRS, odnosno primjenom antidepresivne terapije postignuto je značajno poboljšanje, kao što je očekivano i već pokazano čitavim nizom istraživanja.

U ovom je istraživanju varijabla od primarnog interesa bila vrijednost Cho, a posebno promjena Cho u Amyg tijekom istraživanja i međuovisnost te promjene s poboljšanjem

kliničkog stanja. Povezanost razina Cho s MADRS na početku i na kraju istraživanja prikazana je na *Grafikon 14*. Težina simptoma i vrijednosti Cho su u negativnoj korelaciji, s prepoznatljivo većom negativnom korelacijom razina Cho na kraju istraživanja u odnosu na početak istraživanja. Negativna korelacija prikazana u Tablica 9. za sva mjerenja u istraživanju, vrijedi i kod početnih mjerenja i kod završnih mjerenja Cho, no ta je negativna korelacija očigledno izraženija kod završnih mjerenja.



Grafikon 14. Povezanost razine Cho i ukupnog zbroja na MADRS u ukupnom uzorku (vrijednosti Cho su standardizirane u odnosu na izmjerene razine u svim ROI).

(Kod tumačenja rezultata treba uzeti u obzir da je veći MADRS pokazatelj većeg stupnja depresije i da krivulje predstavljaju regresijske koeficijente, a točke pojedina mjerenja.)

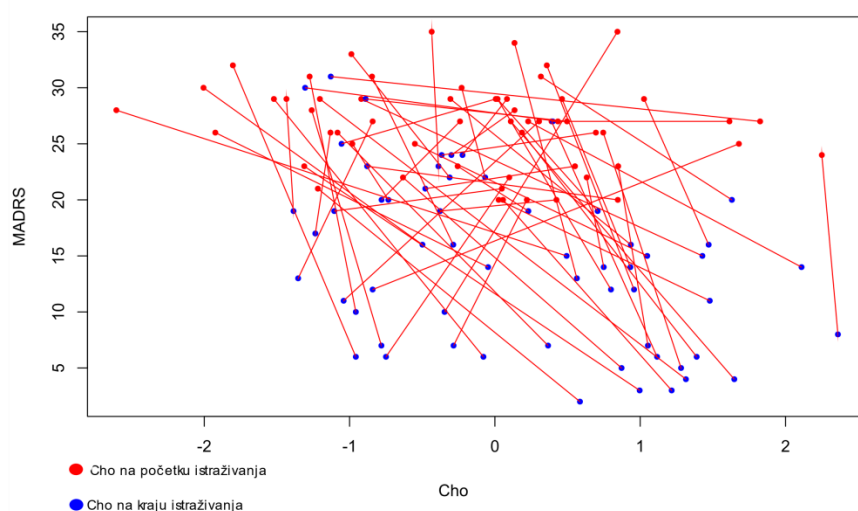
5.4.4 Individualne varijacije u razini Cho

U ukupnom uzorku od 59 ispitanika prosječna razina Cho u Amyg pokazuje porast na kraju istraživanja: na početku istraživanja prosječna razina Cho u Amyg bila je 1.12 (SD = 0.17), uz raspon od 0.70 do 1.53. Na kraju istraživanja, 8 tjedana kasnije, prosječna razina Cho u Amyg povećala se na 1.17 (SD = 0.17), u rasponu od 0.91 do 1.55. Prosječna promjena Cho u Amyg iznosila je 0.05 (SD = 0.22), no uz široki raspon od -0.51 do 0.54 (Tablica 10.).

Tablica 10. Razina Cho u amigdali

	Vrijeme istraživanja	
	Početak	Kraj
<i>N</i>	59	59
<i>M (SD)</i>	1.12 (0.17)	1.17 (0.17)
<i>Medijan (IQR)</i>	1.15 (0.98, 1.22)	1.13 (1.01, 1.31)
<i>Raspon</i>	0.70, 1.53	0.91, 1.55

Iz samih srednjih vrijednosti može se steći dojam o relativno pravilnom povećanju, no kada se pogledaju promjene Cho kod svakog ispitanika pojedinačno (Grafikon 15.), promjene se vizualno uopće ne doimaju ujednačenim, a naročito ne konstanta (eng. *intercept*), što upućuje na opravdanost odabira modela koji uključuje individualni varijabilitet s promijenjivim konstantama.



Grafikon 15. Pojedinačne promjene Cho i MADRS tijekom istraživanja.

Promjene razina kolina kod pojedinih ispitanika prikazani su Grafikon 15. kao ilustracija o različitosti individualnih promjena kolina kod bolesnika. Vrijednosti Cho kod dva ispitanika su iznad 2 vrijednosti standardne devijacije, ali ne odstupaju po vrijednostima na MADRS, a

niti po promjenama na MADRS te nisu isključene kao vrijednosti sa značajnijim odstupanjem (“*outlier*”), a takav pristup doprinosi usporedivosti s dosadašnjim istraživanjima.

U nastavku, prvo su analizirane varijante jednostavnog LMM modela, a po odabiru jednostavnog modela uključene su i dodatne varijable za koje se temeljem dosadašnjih rezultata može pretpostaviti da su od utjecaja na varijabilitet težine depresije.

5.4.5 LMM s longitudinalnim tijekom MADRS i razina Cho u Amyg

Analizirano je više linearnih mješovitih modela (eng. *linear mixed models; linear mixed models; LMM*) s MADRS kao zavisnom varijablom te Cho i vremenom mjerenja (T) kao fiksnim efektima (eng. *fixed effects*) te s individualnim varijabilitetom (ID) kao slučajnim efektom (eng. *random effect*). Pretpostavka je linearnog mješovitog modela da su prosjek zavisne varijable i fiksnih i slučajnih utjecaja (efekata) linearna funkcija, da varijanca nije funkcija prosjeka te da slučajni utjecaji prate normalnu raspodjelu. U svim analizama vezanim uz odabir i daljnju razradu LMM modela korištene su standardizirane (skalirane) vrijednosti Cho.

Uzimajući u obzir značajnije pretpostavke o modifikatorima i medijatorima tijekom depresivnog poremećaja iz literature te analize provedene u sklopu ovog istraživanja koje su prikazane ranije u tekstu, izdvojeno je 6 modela s ciljem odabira najpovoljnijeg modela za objašnjenja varijabiliteta MADRS, istovremeno uzimajući u obzir razinu Cho u Amyg i vrijeme procjene kao prediktore te uzimajući u obzir individualni varijabilitet (Tablica 11. Kod svih je modela kao fiksni efekt bila uključena i interakcija stupnja depresije po MADRS s vremenom procjene. S obzirom da je vrijeme procjene bilo varijabla od interesa u istraživanju modificirana liječenjem, ta je varijabla u svim modelima bila uključena kao fiksni efekt.

Varijabla “Vrijeme” istraživanja, u naravi predstavlja trajanje liječenja, tj. vrijeme izloženosti lijeku, budući da su svi ispitanici cijelo vrijeme istraživanja dobivali terapiju.

Tablica 11. Analizirani linearni mješoviti modeli (LMM) u objašnjenju varijabiliteta MADRS

<i>Model</i>	<i>Fiksni efekti (Fixed effects)</i>	<i>Shema pojašnjenja slučajnih efekata (Random effects term)</i>
1*	Cho, T, Cho:T	-
2	Cho, T, Cho:T	(1 ID)
3	Cho, T, Cho:T	(1 ID) + (0 + Cho2 T)
4	Cho, T, Cho:T	1 + (0 + Cho2 ID)
5	Cho, T, Cho:T	Cho2 + Cho2 ID Cho2 ID
6	Cho, T, Cho:T	(Cho2 * T ID)

Osnovne kratice:

* Model je korišten kao referentni model u daljnjoj procjeni varijabiliteta

ID – identifikacijski broj ispitanika

T – vrijeme procjene

1 – varijabilni intercept

1+ - zajednički intercept

0 – varijabilni intercept i koeficijent (eng. slope) s minimizacijom korelacije

Dodatna pojašnjenja uz tablicu: Cho – razina kolina u amigdali; Cho:T – interakcija Cho-vrijeme, odnosno promjena Cho opažena u istraživanju; „1“ – brojka 1 navedena samostalno predstavlja promjenjivi odsječak (eng. *intercept*); samostalno „ID“ je faktor i njegove razine predstavljaju ispitanike kod kojih su obavljena mjerenja (ponekad se koristi opis „vrijednosti odzivne varijable na entitetima 1. razine“ (uz napomenu da se zapravo ne radi o višerazinskom modelu u užem smislu), dok „(1 | ID)“ predstavlja slučajni prediktor svojstven skupni ID (u ovom slučaju ID je identifikator ispitanika) te izraz predstavlja varijabilitet kod pojedinog ispitanika).

Iz rezultata Tablica 12. prepoznaje se da modeli koji uključuju varijabilno sjecište (eng. *random intercept*) postižu značajno veće objašnjenje varijabiliteta, što nije slučaj s modelima koji istovremeno uključuju varijabilni nagib regresijskog pravca (eng. *slope*), kao što se već dalo okvirno prepoznati na Grafikon 15. Modeli u tablici iskazani su korištenjem redukcije varijabiliteta metodom najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*; ML).

Broj param. ¹ (model br.)	AIC	BIC	logLik	Devijanca	χ^2	df	P(> χ^2)
5 (1)	743.19	757.04	-366.59	733.19	NA	NA	NA
6 (4)	745.19	761.81	-366.59	733.19	0.00	1.00	1.00
6 (2)	741.24	757.86	-364.62	729.24	3.95	0.00	<0.01
7 (3)	743.24	762.63	-364.62	729.24	0.00	1.00	1.00
8 (5)	745.21	767.37	-364.60	729.21	0.03	1.00	0.87
15 (6)	732.02	773.58	-351.01	702.02	27.19	7.00	<0.00

¹ - Broj parametara u modelu i redni broj modela odnosi se na sheme modela prikazane u Tablica 11.

AIC – mjera opisa adekvatnosti modela po Akaiku (eng. *Akaike Information Criterion*)

BIC – mjera opisa adekvatnosti modela po Bayesu (eng. *Bayesian Information Criterion*)

logLik – logaritam vjerojatnosti (eng. *log-likelihood*)

devijanca – u kontekstu statističkog modeliranja, mjera opisa adekvatnosti modela

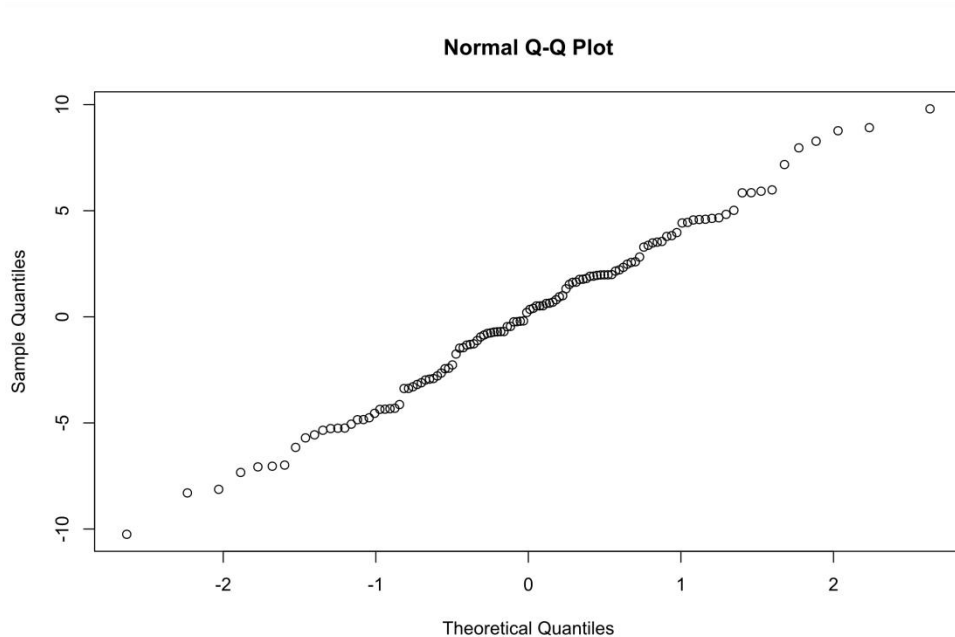
df – stupnjevi slobode

Optimalni model odabran je prvenstveno temeljem AIC, uzimajući u obzir i BIC, budući da BIC u većoj mjeri iskazuje prekomjernu parametrizaciju koja je očito prisutna kod modela br. 6 koji je najpovoljniji prema AIC, no najnepovoljniji po BIC. Sljedeći model po redukciji varijabiliteta je model br. 2 koji uključuje 6 parametara i uravnoteženiji je ako se istovremeno uzime u obzir redukcija varijabiliteta, a da je izbjegnuta prekomjerna parametrizacija uvjetovana složenošću modela. Kod tog je modela nešto veća vrijednost AIC (741.24) no istovremeno ima najnižu vrijednost BIC (757.86) uz nisku devijancu (729.24), što upućuje na bolji omjer efikasnosti i složenosti modela, pa je taj model zadržan kao konačan.

Model pod brojem 2 (Tablica 11.) uključuje Cho, vrijeme procjene (T) i njihovu interakciju kao fiksne varijable te varijabilitet osobit za ispitanika kao slučajnu varijablu. Uopćeno, taj rezultat upućuje da je poboljšanje stanja depresivnih bolesnika (mjereno MADRS ljestvicom) istovremeno praćeno promjenom razine Cho na kraju istraživanja, odnosno da je porast Cho metabolički korelat poboljšanja stanja. Kod posljednjeg tumačenja uzeti su u obzir i rezultati

prethodno prikazane deskriptivne statistike i rezultati ostalih provedenih metoda u analizi uzorka.

LMM podrazumijeva, uz homogenost varijance i homogenost distribucije reziduala i po tome se razlikuje od većine drugih statističkih metoda izbora, koje većinom imaju za pretpostavku homogenost izvorne varijable¹²⁰. Raspodjela reziduala prikazana je kvantilima na Grafikonu 16.



Grafikon 16. Distribucija reziduala završnog LMM (kvantili u uzorku u usporedbi s idealnim vrijednostima)

5.4.6 REML analiza

Premda je metoda tumačenja rezultata putem AIC i BIC primjerenija s obzirom na strukturu i složenost modela, rezultati su dodatno iskazani REML analizom istog konačnog LMM [MADRS ~ Cho * T + (1 | ID)], odnosno u model su kao fiksni efekti bili uključeni skalirana razina Cho, vrijeme istraživanja (T) te varijabilni presjek osi pravca (eng. *random intercept*) svojstven ispitaniku (ID). Za razliku od prethodne metode LMM koja je usmjerena k odabiru najboljeg modela opisa varijabiliteta, REML metoda analizira postojanje uzajamnih odnosa prethodno odabranih varijabli, a obje metode dijele zajednički opći pristup statističkom modeliranju. Dodatni je razlog što procjena putem REML uključuje i jasnije mjerljive pokazatelje za tumačenje značajnosti. Konvergencija kod REML je iznosila 724.8, što daje

dodatno uporište za odabir varijabli u završnom modelu. Individualni varijabilitet koji nije opisan fiksnim efektima je visok (varijanca = 8.47, SD = 2.91), dok (neobjašnjeni) individualni varijabilitet osobit za ispitanika koji se ne može pripisati fiksnim i slučajnim efektima iznosi 22 (4.69). Težina depresije mjerena MADRS očekivano je bila manja na kraju istraživanja ($b = -11.5316$, $t = -13.147$, $p < .001$), uz veću razinu Cho na kraju istraživanja ($b = -1.4791$, $t = -2.098$, $p = .037$), što se odnosi na apsolutne vrijednosti (odnosno, tumačeno s relativne strane, poboljšanje depresivne simptomatike povezana je s većom razinom Cho). Značajna interakcija razine Cho i MADRS bila je na kraju istraživanja ($b = -1.947$, $t = -2.012$, $p = .046$), ali ne i na početku istraživanja.

Rezultati upućuju da je razina Cho nakon liječenja negativni korelat ukupnog zbroja na MADRS, tj. da je manja ukupna težina simptoma depresije na kraju istraživanja praćena većom vrijednošću razine Cho. Time bi razina Cho mogla biti biološki pokazatelj postignutog poboljšanja tijekom liječenja, no ne i prediktor ishoda liječenja.

Koeficijenti fiksnih efekata po REML analizi navedeni su u Tablica 13. a ispod tablice naveden je i detaljni ispis rezultata REML analize.

Tablica 13. Koeficijenti fiksnih efekata - REML		
<i>MADRS ~ Cho * T + (1 ID)</i>		
	β	95% CI¹
Cho	-1.48	-2.9, -0.10
<i>Vrijeme istraživanja (T)</i>		
Početak	—	—
Kraj (8. tjedan)	-11.53	-13, -9.8
<i>Cho * T</i>		
Cho * Kraj (8. tjedan)	-1.95	-3.8, -0.05
Fiksni efekti - intercept	26.59	
Slučajni efekt ID.sd__(Intercept)	2.91	
Residual.sd__Observation	4.69	

¹ CI = Confidence Interval

Dodatni podaci vezani uz analizu:

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
Formula: MADRS ~ Cho2 * TIME + (1 | ID)

REML criterion at convergence: 724.7732

Random effects:

Groups	Name	Std.Dev.
ID	(Intercept)	2.911
Residual		4.690

Number of obs: 118, groups: ID, 59

Fixed Effects:

(Intercept)	Cho2	TIMEWeek 8	Cho2:TIMEWeek 8
26.591	-1.479	-11.532	-1.947

> tbl12st

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']

Formula: MADRS ~ Cho2 * TIME + (1 | ID)

Data: Amyg_svi

REML criterion at convergence: 724.8

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.18526	-0.63224	0.05924	0.54210	2.08973

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
ID	(Intercept)	8.472	2.911
Residual		22.000	4.690

Number of obs: 118, groups: ID, 59

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	26.5905	0.7265	36.602
Cho2	-1.4791	0.7049	-2.098
TIMEWeek 8	-11.5316	0.8771	-13.147
Cho2:TIMEWeek 8	-1.9466	0.9676	-2.012

Cho2 – skalirana (standardizirana) razina Cho

Pojašnjenja vrijednosti dobivenih analizom:

U početnom mjerenju („Baseline“), ako bi sve ostale varijable u teoriji bile vrijednosti 0, ukupan zbroj na MADRS po ovom modelu bi iznosio 26.591 (SE = 0.7265, t = 36.602).

Procjena („estimate“, koeficijent) Cho2 (skalirana vrijednost Cho) koja iznosi -1.479 (SE = 0.7049, t = -2.098, p = 0.038) upućuje da porast Cho za 1 rezultira smanjenjem MADRS zbroja za 1.479, ako su sve ostale varijable ostanu nepromijenjene.

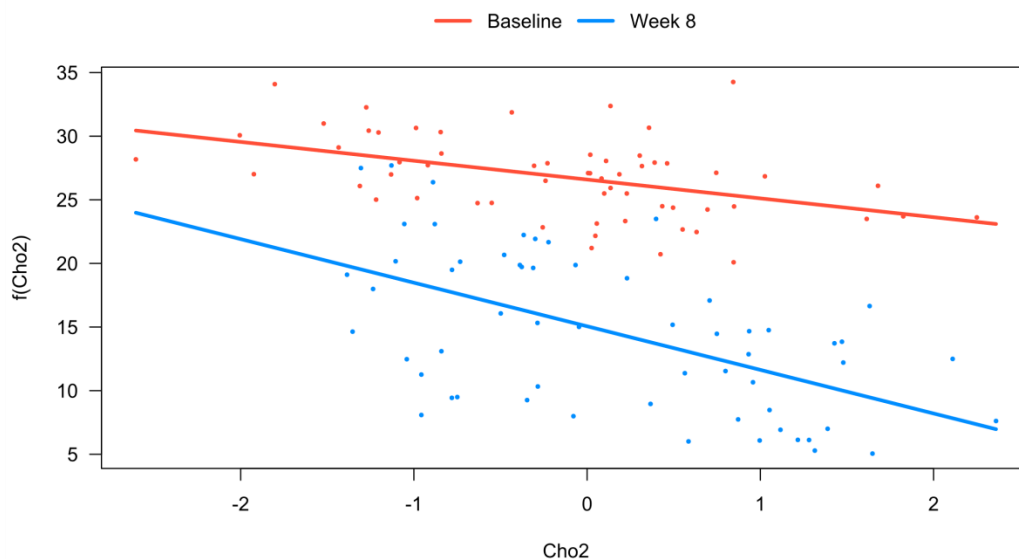
Koeficijent povezan sa završnim mjerenjem, odnosno koji je povezan s terapijom tijekom vremena, t.j. liječenjem (T:Week 8) je -11.532 (SE = 0.8771, t = -13.147, p < 0.001, odnosno model predviđa da se liječenjem tijekom 8 tjedana ukupan zbroj na MADRS smanjuje za 11.532 u odnosu na početno mjerenje („Baseline“), ako sve ostale varijable ostanu nepromijenjene.

Efekt interakcije Cho i vremena istraživanja (Cho:T_Week8) je -1.947 (SE = 0.9676, t = -2.012, p = 0.047) pokazuje da su Cho i zbroj na MADRS na kraju istraživanja drugačije povezani nego na

početku istraživanja, odnosno da povećanje Cho za 1 na kraju istraživanja dodatno snižava vrijednost MADRS za 1.947 ako je ta vrijednost Cho izmjerena na kraju istraživanja. Uopćeno pojednostavljeno, već i sama vrijednost Cho povećana za 1 modelom predviđa smanjenje MADRS za 1.479, a ako je to povećanje Cho za 1 na kraju istraživanja, tada je modelom predviđen iznos MADRS dodatno smanjen još za 1.947.

Takva uloga Cho, kao mogućeg korelata ili modifikatora depresivnog poremećaja, jasnije je prepoznatljiva na grafikonu koji slijedi (Grafikon 17.). Na apscisi je skalirana (standardizirana) vrijednost Cho u Amyg, a na apscisi je vrijednost MADRS iskazana kao $f(\text{Cho}^2)$, tj. kao funkcija standardizirane vrijednosti Cho koja je izračunata na temelju ovdje opisanog modela. Crvenom linijom prikazana je jednostavna korelacija povezanosti Cho i MADRS (odnosno kao $f(\text{Cho}^2)$) na početku istraživanja, plavom linijom je prikazana povezanost Cho i MADRS na kraju istraživanja. Uzmemo li, kao primjer bolesnika, s izuzetno visokom razinom Cho na početku istraživanja (krajnje desno na crvenoj liniji, vrijednosti oko 2 na apscisi označenoj s Cho^2 , takav će bolesnik po modelu imati manji ukupni zbroj MADRS ($f(\text{Cho}^2)$), nego bolesnik na krajnje lijevom dijelu crvenog pravca, kod kojeg bi vrijednosti na apscisi bila -2 sd. Bolesnik na krajnje desnom dijelu pravca ne samo da će u prosjeku imati manji zbroj na MADRS, nego će se MADRS kod tog bolesnika u prosjeku znatno više sniziti nego kod bolesnika kod kojeg je početna vrijednost Cho na krajnje lijevom dijelu. Takvo, veće prosječno poboljšanje, odnosno veće smanjenje zbroja MADRS se prepoznaje po znatno većem razmaku između crvene i plave linije na njenom krajnje desnom dijelu, nego što je razmak između crvene i plave linije na krajnje lijevom dijelu.

Završni model prikazan je na Grafikon 17. kao funkcija povezanosti razine Cho sa stupnjem depresije ocijenjene putem MADRS u točkama istraživanja. Poveznost Cho i MADRS veća je na kraju istraživanja nego poveznost kod uključivanja ispitanika u istraživanje (Grafikon 17.).



Grafikon 17. Ukupan zbroj na MADRS opisan funkcijom $f(\text{Cho}2)$ s parametrima razdoblja istraživanja (T) i razine Cho, prikaz jednostavnim linearnim modelom.

Kolrelacija fiksnih efekata intercepta, standardizirane vrijednosti Cho i vremena (T) prikazana je u Tablica 14.

Tablica 14. Korelacija fiksnih efekata u završnom modelu

Varijabla	Intr	Cho	TIMEW8
Cho	0.15		
T_Week8	-0.60	-0.13	
Ch:T_Wk8	-0.10	-0.69	0.001

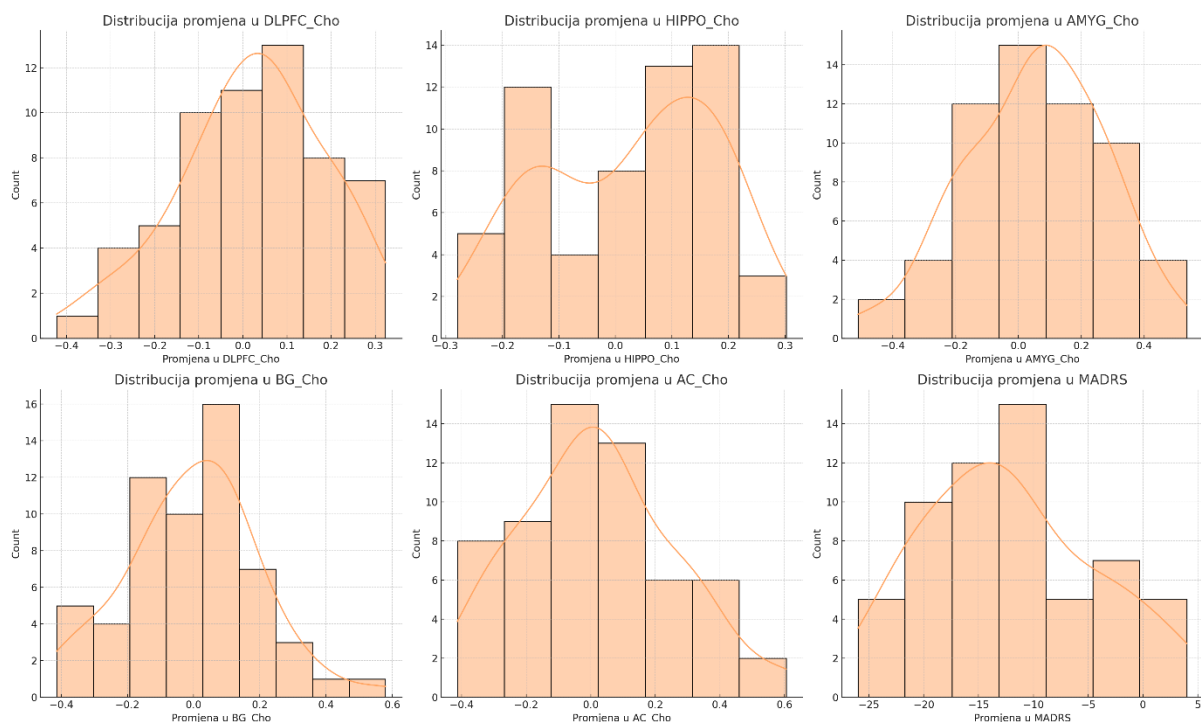
Opažene razine značajnosti pojedinih komponenti fiksnog modela prikazane su po provedenoj analizi varijance metodom po Satterthwaiteu u Tablica 15.

Tablica 15.		Tip III analize varijance metodom po Satterthwaiteu				
	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)
Cho	510.6	510.6	1	112.5	23.2	<0.001
T	3,802.7	3,802.7	1	52.8	172.8	<0.001
Cho:T	89.0	89.0	1	92.0	4.0	0.047

Zaključno, LMM sa 6 parametara (naveden kao model br. 2 u početnom dijelu istraživanja) najpovoljniji je model za objašnjenje varijabiliteta prema mjerilima AIC, BIC i devijancije. REML analizom je dodatno potvrđena značajnost razine Cho s obzirom na vrijeme istraživanja u objašnjenju varijabiliteta težine depresije po MADRS, a REML analiza također pokazuje i opravdanost uključivanja individualno varijabilnog intercepta u završni model.

5.5 Povezanost težine depresije mjerene putem MADRS s promjenama razina Cho po pojedinim ROI

Distribucija promjene Cho po pojedinim ROI načelno slijedi normalnu raspodjelu, osim u hipokampusu. Raspodjela MADRS očekivano ima manji nagib (eng. *skew*) udesno, što se može objasniti na način da je samo kod manjine bolesnika stanje bilo nepromijenjeno ili u manjoj mjeri pogoršano (*Grafikon 18.*).



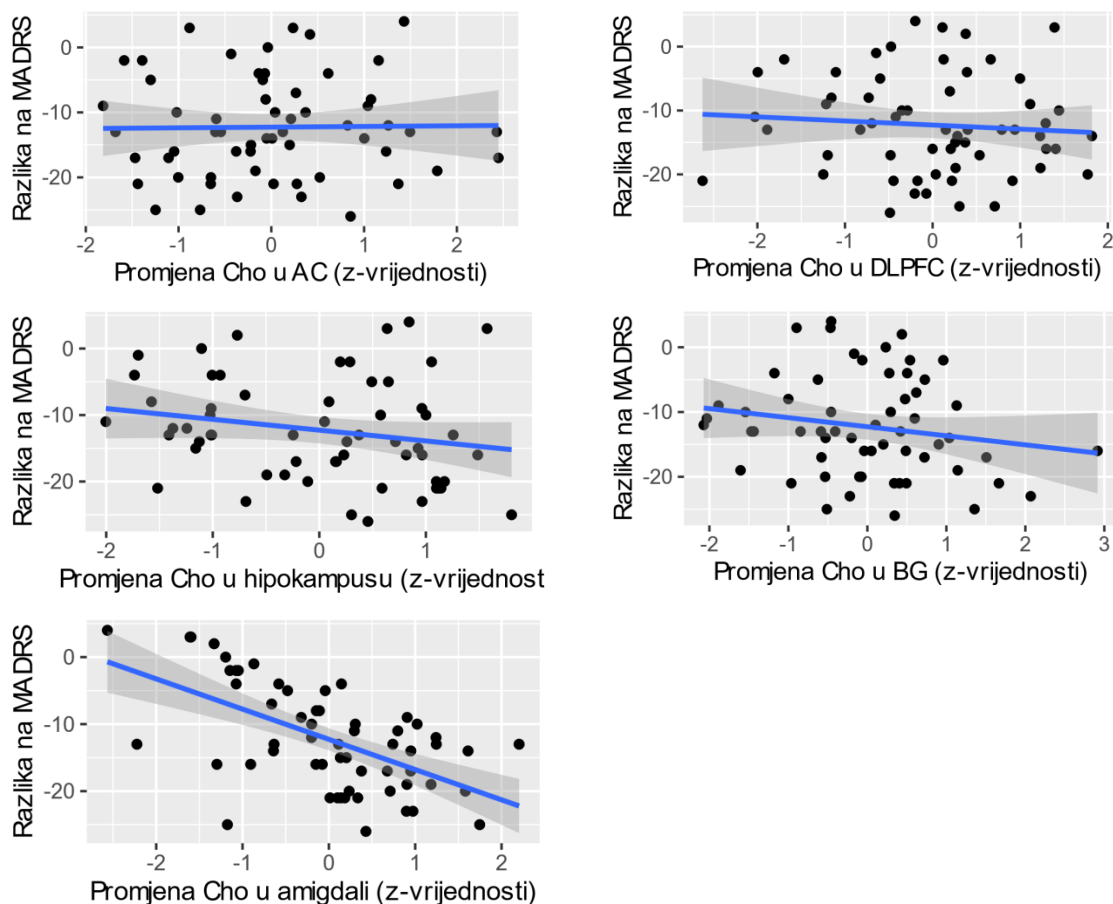
Grafikon 18. Distribucija promjena razine Cho po ROI

Kako se već može okvirno prepoznati s prethodnih grafikona, distribucija značajnije odstupa od normalne samo kod promjene Cho u Hippo (Tablica 16.).

Tablica 16. Test normalnosti distribucije Cho po pojedinim ROI i za promjenu MADRS

ROI	Shapiro-Wilk test	p
DLPFC	0.9778	0.3546
HIPPO	0.9500	0.0169
AMYG	0.9876	0.8096
BG	0.9847	0.6634
AC	0.9788	0.3903
MADRS	0.9688	0.1333

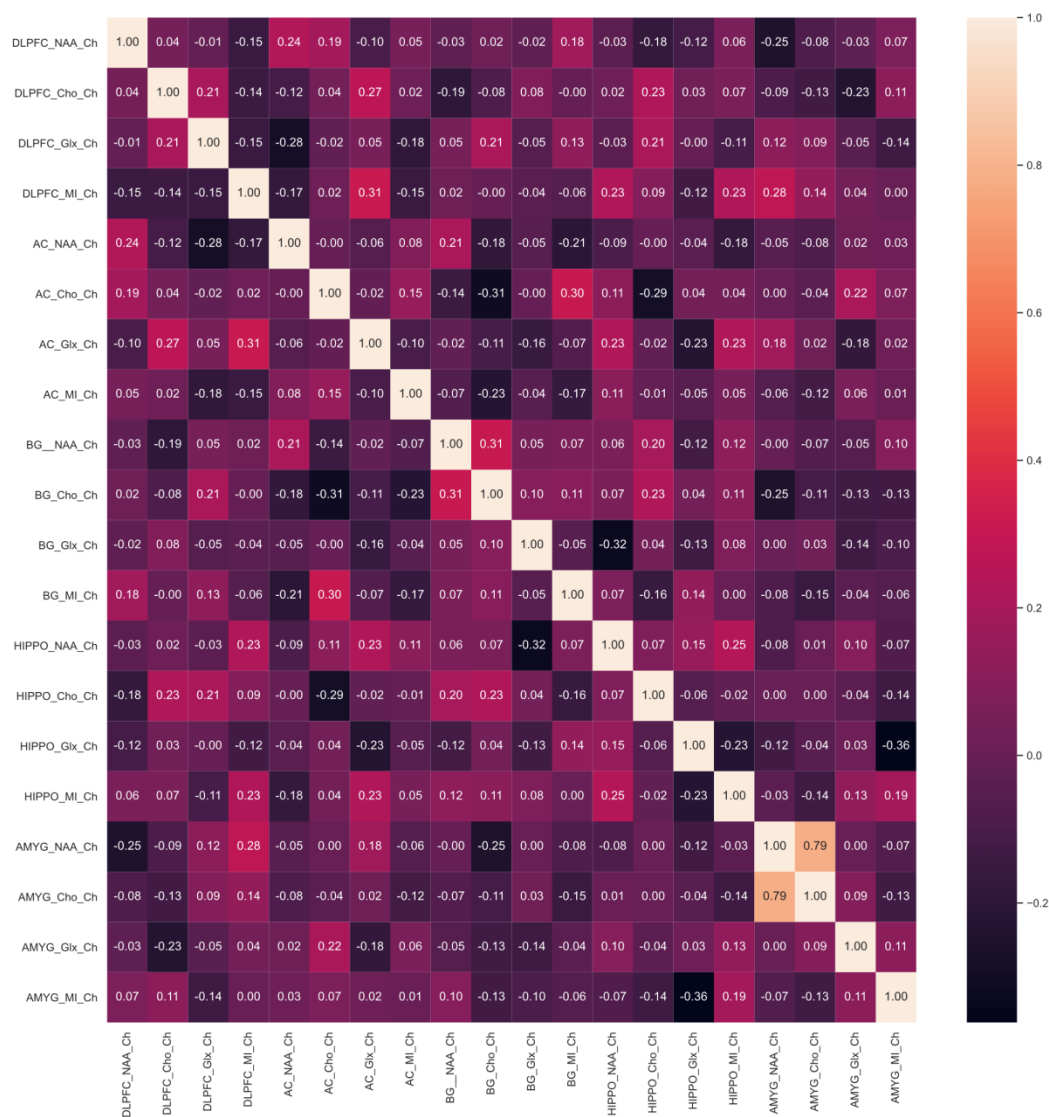
Povezanost promjena razina Cho s poboljšanjem depresije znatno se razlikuje po pojedinim ROI. Na *Grafikon 19.* prikazane su korelacije promjene Cho s promjena na MADRS u analiziranim ROI.



Grafikon 19. Korelacija promjene razine metabolita po ROI između početka i kraja istraživanja (bez usklađenja za kolinearnost)

5.6 Povezanost razina Cho u amigdali s drugim neurometabolitima na kraju istraživanja

Daleko je najveća ($r=0.79$) poveznost promjene Cho i NAA u Amyg, a također postoji i pozitivna korelacija ($r=0.31$) između razina Cho i NAA u bazalnim ganglijima. Od nešto većih korelacija izdvaja se negativna povezanost između promjena u razini Glx u Hippo i promjena u razini MI u Amyg ($r=-0.36$), negativna korelacija između promjena u razini Glx u BG i NAA u hipokampusu ($r=-0.32$), negativna povezanost ($r=-0.31$) između razina Cho u BG i Cho u ACC te pozitivna povezanost MI u DLPFC i Glx u ACC ($r=0.31$). Koeficijenti korelacija između promjena u razini metabolita na kraju istraživanja, po pojedinim ROI prikazana su *Grafikon 20*.



Grafikon 20. Koeficijenti korelacija između promjena u razini metabolita na kraju istraživanja, po pojedinim ROI.

(pomak prema izrazito svijetlim poljima označava veću pozitivnu povezanost, pomak ka izrazito tamnim poljima olakšava prepoznavanje visoko negativnih korelacija)

5.7 Promjene neurometabolita po pojedinim ROI

5.7.1 Dorzolateralni prefrontalni korteks

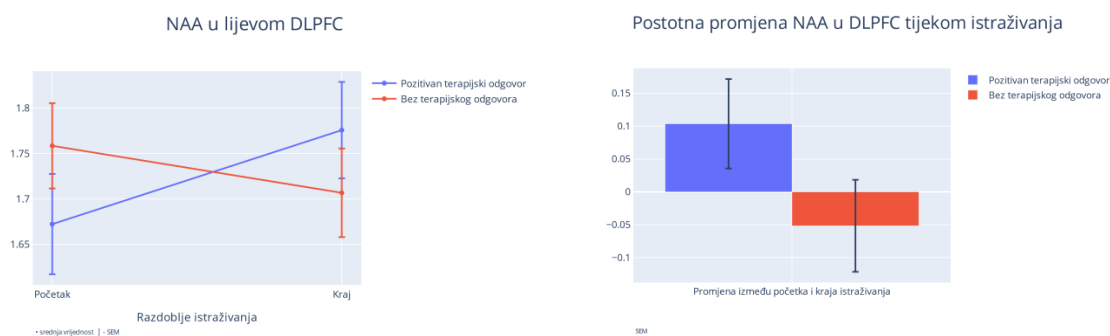
Tijekom istraživanja nije zapažena veća promjene medijana razine NAA u DLPFC (Tablica 17.), što je potvrđeno i Wilcoxonovim testom za zavisne uzorke ($p = 0.754$).

Tablica 17. NAA u DLPFC

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p ²
DLPFC_NAA	1.75 (1.50, 1.90)	1.73 (1.56, 1.88)	0.754

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Premda u ukupnom uzorku nema veće razlike u razini NAA u DLPFC, ako se koristi binomna podjela na pozitivan i negativan terapijski odgovor, promjene se kreću u suprotnim smjerovima (*Grafikon 21.*), a i postoje i veće razlike na početku istraživanja, što upućuje na moguću ulogu NAA u DLPFC kao jednog od potencijalnih indikatora u procjeni vjerojatnosti terapijskog odgovora.



a)

b)

Grafikon 21. Promjena NAA u DLPFC s obzirom na razdoblje istraživanja prikazana a) kao srednja vrijednost sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine i b) kao postotna promjena u odnosu na početnu razinu NAA u DLPFC

Niti na početku ($p=0.165$), a niti na kraju istraživanja ($p=0.945$) nije opažena značajna razlika s obzirom na spol u razini NAA u DLPFC (Tablica 18.).

Tablica 18. Razina NAA u DLPFC s obzirom na spol

	Spol		p^1
	Muškarci	Žene	
Početak istraživanja			0.165
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.77 (0.28)	1.69 (0.27)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.72 (1.58, 1.98)	1.76 (1.47, 1.85)	
<i>Raspon</i>	1.24, 2.19	1.22, 2.52	
Kraj istraživanja			0.945
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.74 (0.28)	1.73 (0.28)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.70 (1.57, 1.88)	1.74 (1.56, 1.89)	
<i>Raspon</i>	1.27, 2.31	1.06, 2.24	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Značajnije razlike nema (Tablica 19.) niti unutar skupine žena ($p=0.470$), a niti kod muškaraca ($p=0.601$).

Tablica 19. NAA u DLPFC s obzirom na spol i vrijeme istraživanja

Spol	Vrijeme istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
Žene	1.76 (1.47, 1.85)	1.74 (1.56, 1.89)	0.470
Muškarci	1.72 (1.58, 1.98)	1.70 (1.57, 1.88)	0.601

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxon signed rank exact test

Razlika u razini NAA između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
DLPFC_NAA_Ch			0.463
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-0.03 (0.30)	0.05 (0.43)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-0.08 (-0.27, 0.24)	0.08 (-0.20, 0.33)	
<i>Raspon</i>	-0.55, 0.59	-0.74, 0.89	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Razina Cho u DLPFC ostala je stabilna u ukupnom uzorku (Tablica 20.).

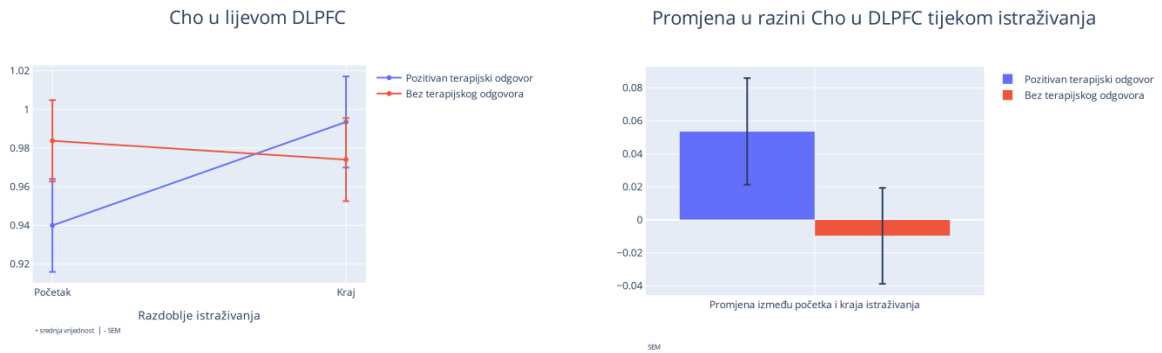
Tablica 20. Cho u DLPFC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
DLPFC_Cho	0.95 (0.86, 1.03)	0.99 (0.91, 1.07)	0.299

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Premda u ukupnom uzorku nema značajnije promjene između početka i kraja istraživanja, slično kao što je to bio slučaj kod NAA u DLPFC, i kod Cho u DLPFC pokazuje se znatna

razlika u početnim i krajnjim razinama Cho, ali i u smjeru promjene između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom (Grafikon 22.).



a)

b)

Grafikon 22. Cho u DLPFC s obzirom na razdoblje istraživanja i terapijski odgovor: a) kretanje razine Cho u DLPFC, b) promjena razina

Jednako kao što je to bio slučaj kod NAA, niti kod razina Cho u DLPFC ne opažaju se značajne razlike niti između skupina po spolu, niti unutar pojedine skupine u pojedinoj točki mjerenja (Tablica 21.).

Tablica 21. a) Razina Cho u DLPFC s obzirom na spol i vrijeme istraživanja

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
Početak			0.969
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.96 (0.11)	0.96 (0.13)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.95 (0.88, 1.02)	0.96 (0.86, 1.04)	
<i>Raspon</i>	0.80, 1.16	0.69, 1.24	
Kraj			0.283
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.01 (0.11)	0.97 (0.13)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.03 (0.93, 1.08)	0.97 (0.90, 1.06)	
<i>Raspon</i>	0.79, 1.17	0.65, 1.19	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Promjena razlike u razini Cho između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
DLPFC_Cho_Ch			0.573
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.04 (0.15)	0.00 (0.18)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.04 (-0.02, 0.12)	0.05 (-0.10, 0.14)	
<i>Raspon</i>	-0.32, 0.32	-0.42, 0.32	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

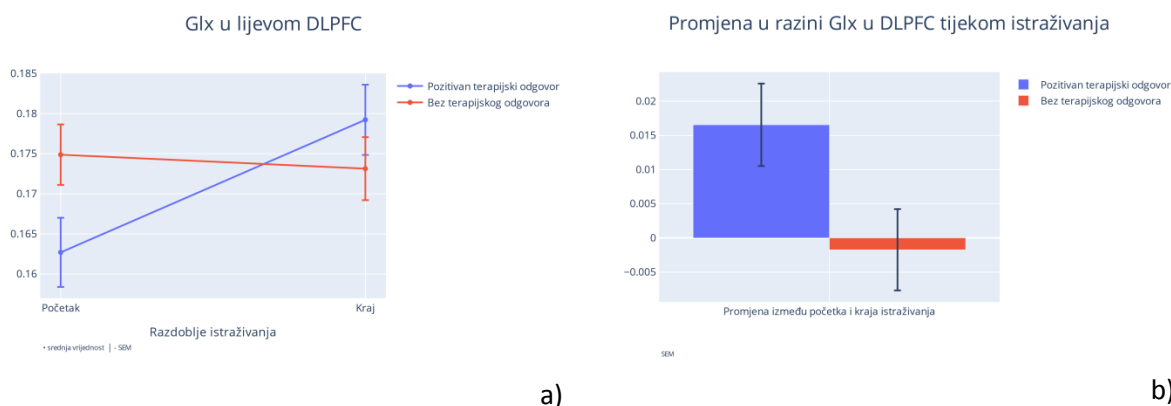
Između početka i kraja istraživanja nema značajnije razlike u razini Glx kompozitnog vrha (Tablica 22.).

Tablica 22. Glx u DLPFC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
DLPFC_Glx	0.168 (0.154, 0.182)	0.173 (0.158, 0.194)	0.086

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Promjene kompozitnog pokazatelja Glx s obzirom na terapijski odgovor slijede isto načelo kao što je bio slučaj kod NAA i Cho u DLPFC: početne vrijednosti se znatno razlikuju, a i smjerovi promjene su potpuno obrnuti (Grafikon 23.).



Grafikon 23. Promjene Glx u DLPFC s obzirom na terapijski odgovor a) izražene srednjim vrijednostima uz standardnu pogrešku aritmetičke sredine i b) kao promjena između početka i kraja istraživanja.

S obzirom na spol (Tablica 23.) nisu opažene razlike u Glx u DLPFC niti između spolova na početku i na kraju istraživanja, a niti između početne i krajnje vrijednosti kod žena i muškaraca.

Tablica 23. a) Glx u DLPFC s obzirom na spol i vrijeme istraživanja

	Spol		p-value ²
	Žene N=36 ¹	Muškarci N=23 ¹	
Početak	0.17 (0.15, 0.18)	0.17 (0.16, 0.18)	0.694
Kraj	0.170 (0.158, 0.192)	0.175 (0.166, 0.194)	0.436

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Glx u DLPFC na početku i na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
Početak			0.694
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.17 (0.02)	0.17 (0.02)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.17 (0.16, 0.18)	0.17 (0.15, 0.18)	
<i>Raspon</i>	0.12, 0.22	0.12, 0.21	
Kraj			0.436
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.18 (0.02)	0.17 (0.02)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.18 (0.17, 0.19)	0.17 (0.16, 0.19)	
<i>Raspon</i>	0.14, 0.22	0.13, 0.23	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Razlike u razinama Glx između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
DLPFC_Glx_Ch			0.717
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.04)	0.00 (0.03)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.01 (-0.01, 0.04)	0.01 (-0.01, 0.03)	
<i>Raspon</i>	-0.06, 0.07	-0.07, 0.06	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Do sada analizirani metaboliti u DLPFC, a to su Cho, NAA i Glx pokazuju zajedničku osobitost da se nema većih razlika u kretanju kroz vrijeme u ukupnom uzorku, da nema razlika s obzirom na spol niti između, a niti unutar skupina, no postoji zajednička osobitost da su razlike između ispitanika koji će imati povoljan terapijski odgovor znatne, i to ne samo na kraju, nego i na početku istraživanja, a da su i smjerovi promjene pojedinih metabolita potpuno suprotni.

Kao ni svi ostali metaboliti, niti MI ne pokazuje značajnu promjenu između početka i kraja istraživanja u ukupnom uzorku (Tablica 24.).

Tablica 24. MI u DLPFC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
DLPFC_MI	0.27 (0.26, 0.30)	0.28 (0.25, 0.30)	0.889

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

S obzirom na spol, značajne razlike nema između žena i muškaraca niti na početku, a niti na kraju istraživanja. Također se ne opaža niti većih razlika u promjeni MI u DLPFC unutar skupine žena i muškaraca između dva mjerenja (Tablica 25.).

Tablica 25. a) Razina MI u DLPFC tijekom istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
Početak			0.764
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.28 (0.05)	0.28 (0.04)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.27 (0.25, 0.31)	0.27 (0.26, 0.29)	
<i>Raspon</i>	0.20, 0.41	0.20, 0.39	
Kraj			0.156
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.29 (0.06)	0.27 (0.03)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.29 (0.26, 0.32)	0.27 (0.25, 0.29)	
<i>Raspon</i>	0.17, 0.41	0.21, 0.39	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Promjena u razlikama razina MI između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
DLPFC_MI_Ch			0.366
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.00 (0.09)	0.00 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.02 (-0.04, 0.03)	0.00 (-0.03, 0.02)	
<i>Raspon</i>	-0.23, 0.16	-0.10, 0.10	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.7.2 Prednji cingularni korteks

Razina Cho približno je istih vrijednosti u ukupnom uzorku na početku i na kraju istraživanja (Tablica 26.).

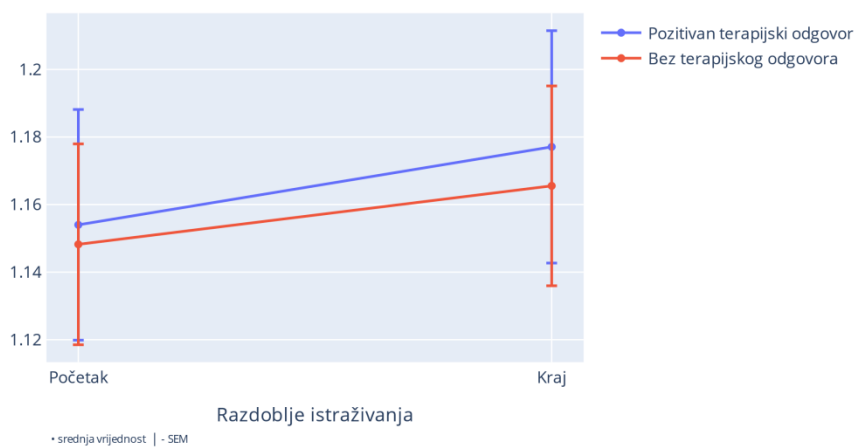
Tablica 26. Cho u ACC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
AC_Cho	1.16 (1.01, 1.29)	1.15 (1.04, 1.28)	0.681

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Za razliku od obrasca promjena Cho u DLPFC kod kojeg su promjene s obzirom na terapijski odgovor značajne i u početku, na kraju i različitih su smjerova, promjene Cho u prednjem cingularnom korteksu su ujednačene između skupine kod koje je opažen pozitivan terapijski odgovor i skupine bez terapijskog odgovora (*Grafikon 24.*).

Cho u anteriornom cingulumu



Grafikon 24. Promjena razine Cho u ACC s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Cho u ACC ne pokazuje bilo kakve razlike po spolu, niti između početka i kraja istraživanja, a niti unutar skupine žena i unutar skupine muškaraca između dva mjerenja (Tablica 27.).

Tablica 27. a) Razina Cho u ACC na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Cho_Bas			0.098
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.20 (0.14)	1.12 (0.18)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.20 (1.10, 1.29)	1.09 (0.99, 1.29)	
<i>Raspon</i>	0.88, 1.44	0.75, 1.45	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Cho na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Cho_W8			0.884
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.18 (0.20)	1.17 (0.15)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.19 (1.01, 1.28)	1.15 (1.06, 1.28)	
<i>Raspon</i>	0.85, 1.64	0.90, 1.57	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Cho između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Cho_Ch			0.276
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-0.02 (0.22)	0.05 (0.25)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-0.01 (-0.21, 0.08)	0.02 (-0.11, 0.22)	
<i>Raspon</i>	-0.33, 0.45	-0.41, 0.60	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

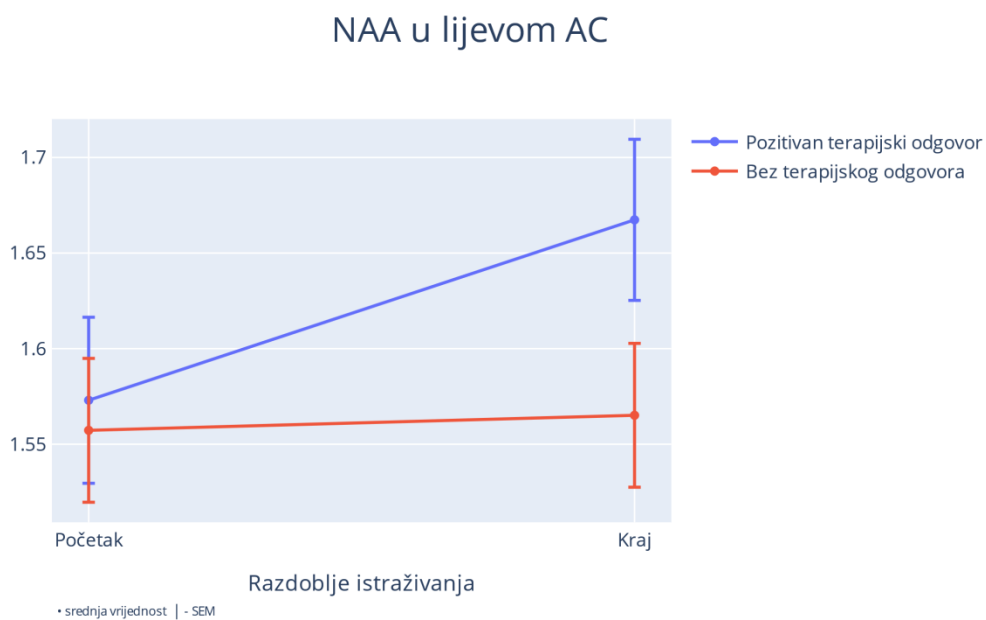
Razina NAA u ACC ostala je u ukupnom uzorku približno istih vrijednosti ($p=0.226$), kao što je prikazano Tablica 28. , no ako se odvojeno analizira skupine s povoljnim i neodgovarajućim terapijskim odgovorom, tada je primjetno da je razina NAA u početku istraživanja bila podudarna, međutim na kraju istraživanja je značajno porasla u skupini koja je postigla povoljan terapijski odgovor (*Grafikon 25.*).

Tablica 28. NAA u AC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
ACC_NAA	1.57 (1.42, 1.72)	1.59 (1.47, 1.76)	0.226

¹ Medijan (IQR)

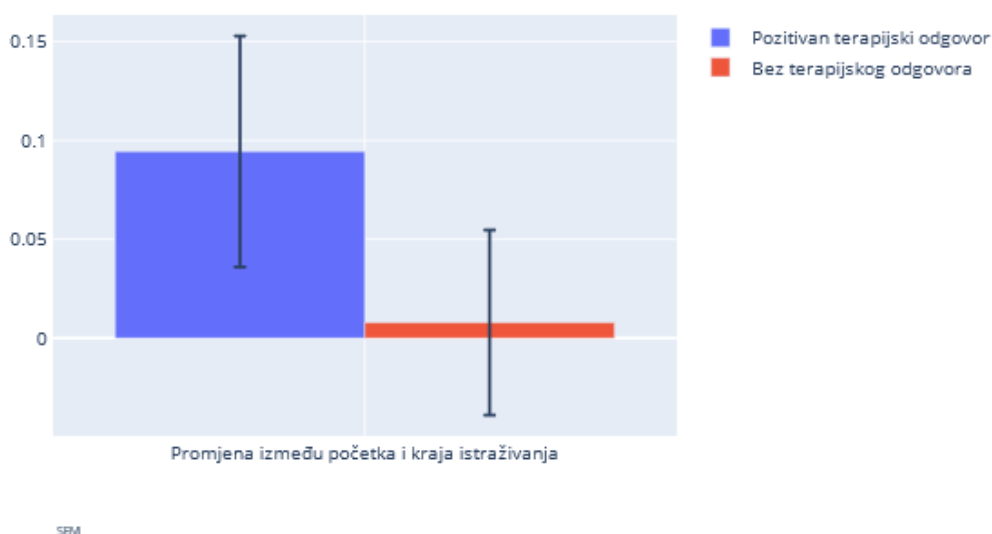
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke



Grafikon 25. Promjena razine NAA u ACC s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Takve, zamjetne razlike između skupine s povoljnim terapijskim odgovorom i skupine bez terapijskog odgovora jasnije su vidljive iz prikaza analize razlika u NAA u AC između skupina (*Grafikon 26.*).

Promjena u razini NAA u prednjem cingularnom režnju



Grafikon 26. Razlika u razini NAA između početka i kraja istraživanja

Wilcoxonov test sume rangova upućuje da na početku istraživanja nije bilo značajne razlike u razinama NAA u ACC između muškaraca i žena ($U = 352$, $p = .908$), a razlike nije bilo niti na kraju istraživanja. Ako se prati promjena u razinama NAA u ACC između početka i 8. tjedna istraživanja također nije bilo značajne razlike po spolu ($U = 293$, $p = .706$.) Sveukupno, razine NAA u ACC i promjene razina bile su usporedive između muškaraca i žena u oba vremenska razdoblja (Tablica 29.).

Tablica 29. a) Razina NAA u ACC na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_NAA_Bas			0.908
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.58 (0.20)	1.56 (0.23)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.52 (1.44, 1.70)	1.59 (1.40, 1.72)	
<i>Raspon</i>	1.32, 2.00	1.05, 1.94	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina NAA na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_NAA_W8			0.896
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.60 (0.22)	1.62 (0.22)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.56 (1.45, 1.77)	1.60 (1.48, 1.75)	
<i>Raspon</i>	1.10, 2.02	1.18, 2.29	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini NAA između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_NAA_Ch			0.706
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.02 (0.31)	0.06 (0.27)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.04 (-0.14, 0.32)	0.06 (-0.14, 0.20)	
<i>Raspon</i>	-0.59, 0.56	-0.38, 0.62	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

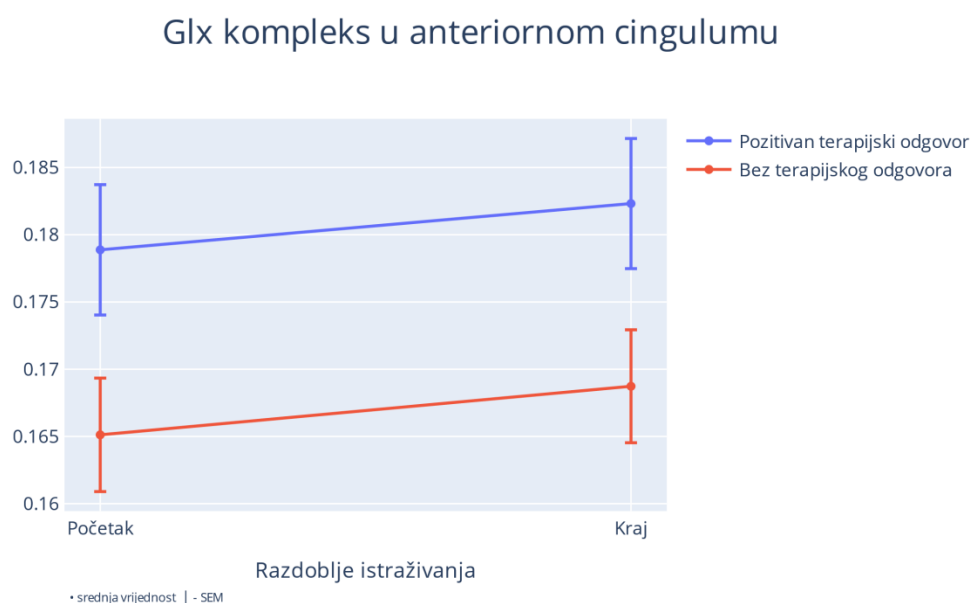
U razini kompozitnog Glx metabolita također nije bilo veće razlike (p=0.336) između početka i kraja istraživanja (Tablica 30.).

Tablica 30. Glx u ACC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
ACC_Glx	0.175 (0.158, 0.188)	0.176 (0.158, 0.192)	0.336

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

U Glx kompleksu u ACC razlike između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom postojale su i u početku istraživanja i ostale približno jednake sve do kraja istraživanja (Grafikon 27.).



Grafikon 27. Promjena u razini Glx kompleksa u ACC s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Na početku istraživanja nije bilo značajne razlike u razinama glutamata/glutamina/GABA (Glx) u ACC između muškaraca ($U = 329, p = .553$), a niti je razlika zapažena na kraju istraživanja ($U = 275, p = .219$). Razlike u razinama Glx u ACC između početka i 8. tjedna istraživanja s obzirom na spol također nisu uočene ($U = 369, p = .605$) (Tablica 31.).

Tablica 31. a) Razina Glx u ACC na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Glx_Bas			0.553
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.17 (0.02)	0.17 (0.03)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.18 (0.16, 0.19)	0.18 (0.15, 0.18)	
<i>Raspon</i>	0.13, 0.20	0.11, 0.25	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Glx na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Glx_W8			0.219
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.18 (0.03)	0.17 (0.02)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.19 (0.16, 0.20)	0.17 (0.16, 0.19)	
<i>Raspon</i>	0.12, 0.22	0.12, 0.23	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Glx između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_Glx_Ch			0.605
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.03)	0.00 (0.03)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.01 (-0.01, 0.03)	0.00 (-0.02, 0.02)	
<i>Raspon</i>	-0.07, 0.05	-0.07, 0.08	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Kao što je slučaj kod do sada analiziranih neurometabolita u ACC, niti MI ne pokazuje imalo veću promjenu tijekom istraživanja ($p=0.6$), kao što je prikazano u Tablica 32.

Tablica 32. MI u ACC s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
ACC_MI	0.31 (0.29, 0.34)	0.32 (0.30, 0.34)	0.600

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Razine MI u ACC nisu se značajno razlikovale između muškaraca i žena niti na početku istraživanja (Wilcoxon $U = 329$, $p = .542$), a niti na kraju 8-tjednog liječenja antidepressivima ($U = 321$, $p = .4$). Razlika u razinama MI između početka i kraja istraživanja također je bila podudarna s obzirom na spol ($U = 293$, $p = .201$), odnosno razine MI u ACC bile su usporedive između muškaraca i žena, kako između skupina, tako i unutar skupine ispitanika istog spola (Tablica 33.).

Tablica 33. a) Razina MI u AC na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AC_MI_Bas			0.542
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.31 (0.04)	0.32 (0.04)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.31 (0.29, 0.34)	0.32 (0.29, 0.34)	
<i>Raspon</i>	0.23, 0.38	0.23, 0.38	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina MI na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_MI_W8			0.400
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.32 (0.04)	0.31 (0.04)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.32 (0.30, 0.35)	0.32 (0.29, 0.33)	
<i>Raspon</i>	0.26, 0.41	0.20, 0.37	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini MI između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
ACC_MI_Ch			0.201
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.06)	-0.01 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.02 (-0.03, 0.06)	0.00 (-0.05, 0.03)	
<i>Raspon</i>	-0.11, 0.11	-0.15, 0.09	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.7.3 Bazalni gangliji

Razina NAA ostala je bez većih promjena na kraju istraživanja ($p=0.643$) u usporedbi s početnom vrijednošću (Tablica 34.).

Tablica 34. NAA u BG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
BG_NAA	1.24 (1.08, 1.52)	1.28 (1.07, 1.49)	0.643

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Na početku istraživanja (Tablica 35.) nije uočena značajnija razlika u razini NAA u BG između muškaraca i žena ($U = 371$, $p = .982$), a razlike između spolova nije bilo niti u završnom mjerenju ($U = 325$, $p = .426$). Razlika razine NAA između dva mjerenja podudarna je kod oba spola ($U = 293$, $p = .717$).

Tablica 35. a) Razina NAA u BG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_NAA_Bas			0.982
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.29 (0.33)	1.29 (0.28)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.24 (1.08, 1.50)	1.28 (1.10, 1.52)	
<i>Raspon</i>	0.80, 1.93	0.80, 1.87	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina NAA na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_NAA_W8			0.426
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.25 (0.25)	1.32 (0.31)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.20 (1.07, 1.48)	1.31 (1.12, 1.48)	
<i>Raspon</i>	0.83, 1.72	0.64, 2.04	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini NAA u BG između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG__NAA_Ch			0.717
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-0.04 (0.37)	0.03 (0.47)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.00 (-0.18, 0.27)	0.07 (-0.21, 0.24)	
<i>Raspon</i>	-0.72, 0.54	-1.23, 1.03	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

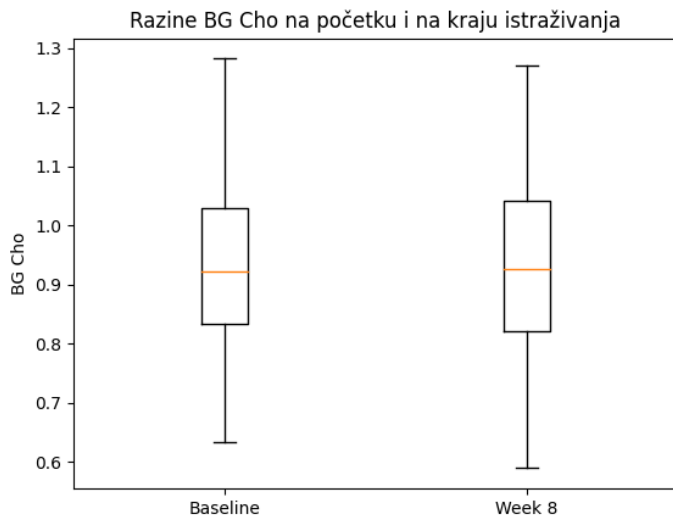
Cho u BG ostaje približno iste razine (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova, $V = 1486$, $p = .997$) na kraju istraživanja, kao što je bio i na početku (Tablica 36.).

Tablica 36. CHO u BG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
BG_Cho	0.92 (0.83, 1.03)	0.93 (0.82, 1.04)	0.997

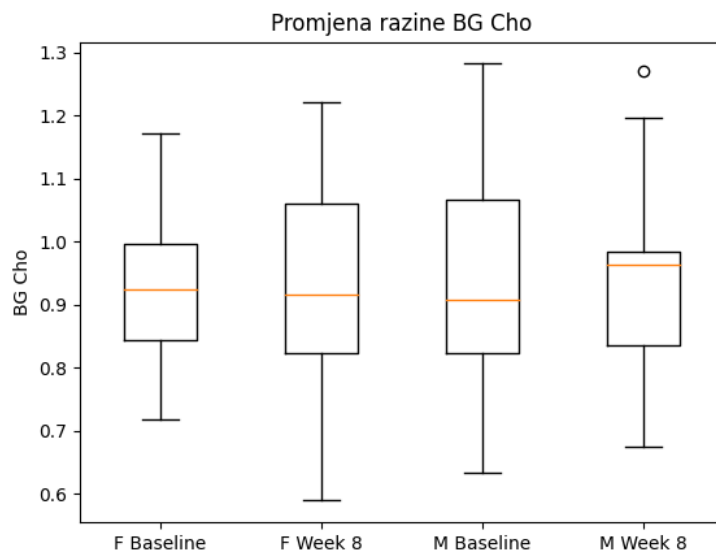
¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Niti kod žena ($V = 657$, $p = .825$), a niti kod muškaraca razine Cho se nisu značajno razlikovale između početka i kraja istraživanja ($V = 260$, $p = .875$), a isto tako niti u ukupnom uzorku *Grafikon 28*.



Grafikon 28. Razine Cho u BG na početku i na kraju istraživanja

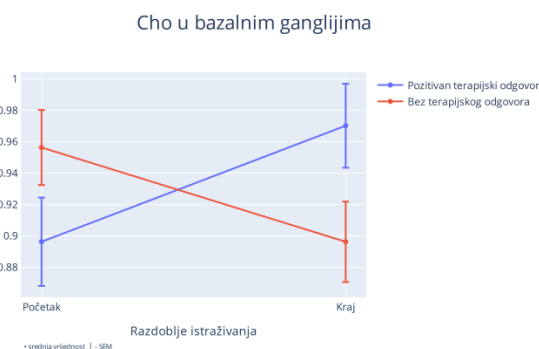
Na početku istraživanja razine Cho u BG bile su podudarne između muškaraca i žena (Wilcoxon $U = 389$, $p = .994$), a podudarnost je ostala do kraja istraživanja (Wilcoxon $U = 389$, $p = .994$.), interkvartilne razine, medijan i rasponi prikazani su na *Grafikon 29*.



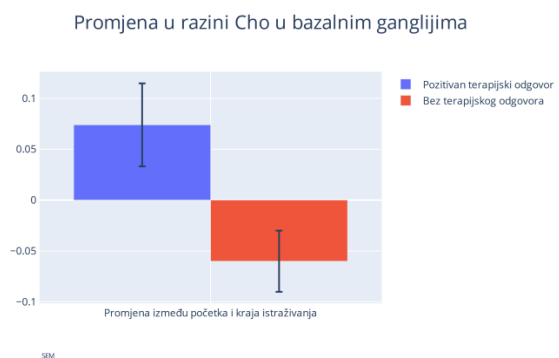
Grafikon 29. Promjena razine Cho u BG

Sljedeći primjer je naveden kao dodatno uporište za korištenje neparametrijskih metoda ili metoda koje ne podrazumijevaju neophodnost standardne normalne distribucije kod pojedinih varijabli, naročito metabolita u pojedinim ROI, premda se radi o uzorku umjerene do veće

veliĉine u ovoj vrsti istraŹivanja. Temeljem srednjih vrijednosti, uz standardne pogreške aritmetiĉke sredine vizualni dojam odaje prisutnost veĉih razlika u Cho u BG izmeĊu ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom i ispitanika bez terapijskog odgovora. MeĊutim, kod 26 ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom medijan Cho na poĉetku istraŹivanja iznosio je 0.91 (IQR: 0.83 - 1.02), a na kraju 0.93 (IQR: 0.81 - 1.05), a promjena Cho u BG do kraja istraŹivanja bila je 0.03 (IQR: -0.09 - 0.12), pa je i iz samih vrijednosti veĉ oĉito da nema nikakve veĉe promjene Cho u BG kod ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom tijekom istraŹivanja (Wilcoxon $V = 299$, $p = 0.768$). Sliĉno je i kod 33 ispitanika bez terapijskog odgovora: na poĉetku medijan je iznosio 0.93 (IQR: 0.84 - 1.04), identično kao i na kraju istraŹivanja 0.93 (IQR: 0.84 - 1.04), a promjena izmeĊu poĉetka i kraja istraŹivanja bila je 0.00 (IQR: -0.10 - 0.11), uz isto tako oĉito nepostojanje bilo kakvih promjena (Wilcoxon $V = 434$, $p = 0.983$), a nema niti bilo kakvih promjena u razlikama Cho u BG izmeĊu skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom (Wilcoxon $U = 375$, $p = 0.825$). Razlika nema niti izmeĊu dviju skupina na poĉetku istraŹivanja ($U = 407$, $p = 0.616$), a niti na kraju istraŹivanja ($U = 399$, $p = 0.528$) (*Grafikon 30, Grafikon 31*).



a) **Grafikon 30.** Promjena razine Cho u BG s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraŹivanja



b) **Grafikon 31.** Promjena razine Cho u BG s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraŹivanja

Nisu zapaŹene znaĉajnije razlike u razini Cho u BG izmeĊu muŹkaraca i Źena (Tablica 37.) na poĉetku istraŹivanja (Wilcoxon $U = 413$, $p = .994$), a nije bilo razlika niti na kraju istraŹivanja ($U = 413$, $p = .994$).

IzmeĊu poĉetka i kraja istraŹivanja nije bilo znaĉajne promjene u razini Cho u BG s obzirom na spol ($U = 389$, $p = .706$).

Tablica 37. a) Razina Cho u BG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Cho_Bas			0.994
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.93 (0.17)	0.93 (0.12)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.91 (0.82, 1.07)	0.92 (0.84, 1.00)	
<i>Raspon</i>	0.63, 1.28	0.72, 1.17	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Cho na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Cho_W8			0.994
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.93 (0.15)	0.93 (0.15)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.96 (0.83, 0.98)	0.92 (0.82, 1.06)	
<i>Raspon</i>	0.68, 1.27	0.59, 1.22	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Cho između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Cho_Ch			0.706
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.00 (0.23)	0.00 (0.18)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-0.04 (-0.14, 0.11)	0.03 (-0.10, 0.10)	
<i>Raspon</i>	-0.41, 0.58	-0.41, 0.30	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Veće promjene Cho u BG između početka i 8. tjedna istraživanja nije bilo niti kod muškaraca ($W = 130.0$, $p = .823$), a niti kod žena ($W = 319.0$, $p = .826$).

Razina Glx kompleksa u ukupnom uzorku nije se značajnije promijenila između početka i kraja istraživanja (Tablica 38.).

Tablica 38. Glx u BG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
BG_Glx	0.20 (0.17, 0.24)	0.20 (0.18, 0.23)	0.979

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Nije bilo razlike u razini Glx u BG između muškaraca i žena na početku istraživanja ($U = -0.031$, $p = .982$), a niti na kraju istraživanja ($U = 1.306$, $p = .196$). Također nije bilo promjena u razlikama razine Glx u BG između dvije točke istraživanja s obzirom na spol ($W = 115.0$, $p = .283$) (Tablica 39.).

Tablica 39. a) Razina Glx u BG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Glx_Bas			0.982
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.21 (0.06)	0.21 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.20 (0.17, 0.24)	0.21 (0.17, 0.24)	
<i>Raspon</i>	0.12, 0.33	0.13, 0.33	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Glx na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Glx_W8			0.196
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.22 (0.05)	0.21 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.22 (0.19, 0.23)	0.20 (0.17, 0.23)	
<i>Raspon</i>	0.14, 0.36	0.11, 0.35	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Glx između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_Glx_Ch			0.283
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.06)	0.00 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.02 (-0.04, 0.05)	0.00 (-0.05, 0.03)	
<i>Raspon</i>	-0.10, 0.10	-0.14, 0.22	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Razina MI također se nije značajnije promijenila u ukupnom uzorku za vrijeme istraživanja (Tablica 40.).

Tablica 40. MI u BG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
BG_MI	0.27 (0.24, 0.31)	0.29 (0.23, 0.32)	0.913

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Nije bilo značajnije razlike u razini MI u BG između muškaraca i žena na početku istraživanja ($U = 1.647$, $p = .101$), a niti na kraju ($U = -1.321$, $p = .191$).

Statistički značajne promjene opažene su između dva vremena u razlici promjena MI u BG s obzirom na spol ($W = 256.0$, $p = .040$). Medijan razlike bio je -0.03 (IQR = -0.05, 0.03) kod muškaraca i 0.02 (IQR = -0.03, 0.08) kod žena žene, s rasponima od -0.18 do 0.15 kod muškaraca i od -0.14 do 0.14 kod žena (Tablica 41.).

Tablica 41. a) Razina MI u BG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_MI_Bas			0.101
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.29 (0.05)	0.27 (0.06)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.28 (0.26, 0.32)	0.27 (0.23, 0.30)	
<i>Raspon</i>	0.18, 0.40	0.13, 0.38	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina MI na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_MI_W8			0.191
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.26 (0.07)	0.28 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.25 (0.22, 0.32)	0.29 (0.27, 0.31)	
<i>Raspon</i>	0.16, 0.40	0.17, 0.36	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini MI između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
BG_MI_Ch			0.040
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	-0.03 (0.08)	0.02 (0.08)	
<i>Medijan (IQR)</i>	-0.03 (-0.05, 0.03)	0.02 (-0.03, 0.08)	
<i>Raspon</i>	-0.18, 0.15	-0.14, 0.14	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.7.4. Hipokampus

U ukupnom uzorku (Tablica 42.) nije bilo značajne razlike u razini NAA u HIPPO između početka i kraja istraživanja (Wilcoxon $V = 314$, $p = .102$), a razlika u promjenama NAA u HIPPO nije opažena niti između skupine kod koje je postignut terapijski odgovor u usporedbi sa skupinom kod koje nije bilo odgovarajućeg terapijskog odgovora.

Tablica 42. NAA u HIPPO s obzirom na vrijeme istraživanja

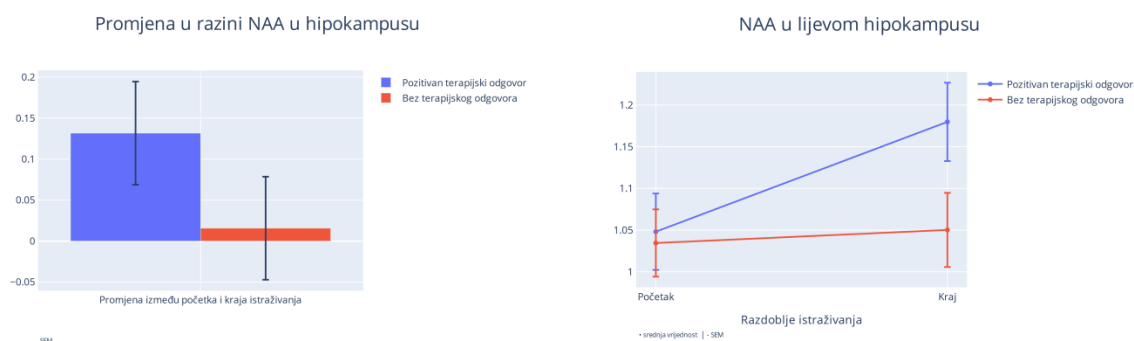
	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
HIPPO_NAA	1.06 (0.88, 1.23)	1.11 (0.96, 1.30)	0.102

¹ Medijan (IQR)

² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Nisu uočene značajnije razlike u razinama NAA u hipokampusu između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom (*Grafikon 32.*) niti na početku (Mann-Whitney $U = 355$, $p = .958$), a niti na kraju istraživanja (Mann-Whitney $U = 323$, $p = .262$). Razlika unutar

skupina također nije bilo, a kod skupine s pozitivnim terapijskim odgovorom razlike su veće (Wilcoxon $V = 247$, $p = .057$), nego kod skupine s negativnim terapijskim odgovorom (Wilcoxon $V = 271$, $p = .404$).



Grafikon 32. Promjena u razini NAA u HIPPO kod ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom i kod ispitanika bez terapijskog odgovora.

Na početku istraživanja (Tablica 43.) nije bilo statistički značajne razlike u razinama NAA u hipokampusu između muškaraca ($n=23$, Medijan = 1.00, IQR = 0.92 - 1.14) i žena ($n=36$, Medijan = 1.10, IQR = 0.80 - 1.24) (Mann-Whitney $U = 325$, $p = .957$).

Tablica 43. Razina NAA u HIPPO na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_NAA_Bas			0.957
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.06 (0.20)	1.03 (0.25)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.00 (0.92, 1.14)	1.10 (0.80, 1.24)	
<i>Raspon</i>	0.76, 1.53	0.59, 1.43	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

U razini NAA u HIPPO nije bilo razlike po spolu niti na kraju istraživanja ($p = 0.191$), a i rasponi razina NAA u HIPPO bili su podudarni između muškaraca i žena (Tablica 44.).

Tablica 44. Razina NAA u HIPPO na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_NAA_W8			0.191
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.26 (0.07)	0.28 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.25 (0.22, 0.32)	0.29 (0.27, 0.31)	
<i>Raspon</i>	0.16, 0.40	0.17, 0.36	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Nisu se pokazale veće razlike između muškaraca i žena (Tablica 45.) u razlikama razina NAA u HIPPO između početka i 8. tjedna istraživanja (Mann-Whitney $U = 293$, $p = .342$). Razlika po spolu nije bilo niti kada se usporede vrijednosti NAA u HIPPO po spolu u početku istraživanja (Mann-Whitney $U = 325$, $p = .957$), a niti na kraju istraživanja (Mann-Whitney $U = 324$, $p = .262$).

Tablica 45. a) Promjena razlika u razini NAA u HIPPO između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_NAA_Ch			0.342
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.35)	0.10 (0.34)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.02 (-0.13, 0.23)	0.13 (-0.08, 0.31)	
<i>Raspon</i>	-0.76, 0.58	-0.60, 0.73	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) NAA u HIPPO s obzirom na spol i vrijeme istraživanja

	Spol		p-value ²
	Žene N=36 ¹	Muškarci N=23 ¹	
Baseline	1.10 (0.80, 1.24)	1.00 (0.92, 1.14)	0.957
Week 8	1.14 (1.02, 1.30)	1.04 (0.90, 1.26)	0.262

¹ Medijan (IQR)

² Wilcoxonov test sume rangova

U ukupnom se uzorku nije promijenio Cho u HIPPO između početka i kraja istraživanja (Tablica 46.).

Tablica 46. CHO u HIPPO s obzirom na vrijeme istraživanja

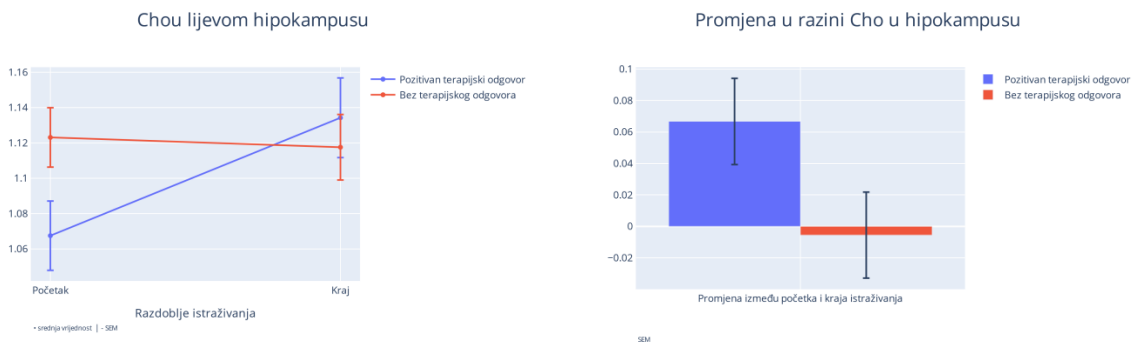
	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
HIPPO_Cho	1.10 (1.02, 1.16)	1.12 (1.05, 1.20)	0.212

¹ Medijan (IQR)

² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Nije bilo značajnih razlika u razinama Cho u HIPPO između skupina s pozitivnim (medijan = 1.11, IQR = 1.06 - 1.16) i negativnim (medijan=1.10, IQR = 1.02 - 1.16) terapijskim odgovorom niti na početku ($U = 371$, $p = .563$), a niti na kraju istraživanja kada je kod skupine s pozitivnim terapijskom odgovorom medijan bio 1.09 (IQR = 1.04 - 1.20), a kod skupine bez terapijskog odgovora medijan je iznosio 1.12 (IQR = 1.05 - 1.20), Mann-Whitney U na kraju istraživanja = 325, $p = .283$). Unutar skupina nije bilo značajnih promjena od početka do kraja istraživanja, niti kod ispitanika s pozitivnim (Wilcoxon $V = 210$, $p = .212$), niti kod onih s negativnim terapijskim odgovorom (Wilcoxon $V = 314$, $p = .404$).

Ponovno se pokazalo da distribucije metabolita ne slijede pravilnosti normalne distribucije, pa usporedba srednjih vrijednosti odaje potpuno drugačiji dojam (Grafikon 33).



Grafikon 33. Promjena razine Cho u hipokampusu s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Nije bilo značajnih razlika u razinama Cho u hipokampusu između skupina na početku ($U = 371$, $p = .563$), niti na kraju istraživanja ($U = 325$, $p = .283$). Razlika Cho u HIPPO nije bilo niti u skupini s pozitivnim ($V = 210$, $p = .212$), niti negativnim terapijskim odgovorom ($V = 314$, $p = .404$), a niti kada se uspoređuju razlike u razinama Cho u HIPPO po spolu ($p=.616$) (Tablica 47.).

Tablica 47. a) Razina Cho u HIPPO na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Cho_Bas			0.563
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.10 (0.11)	1.10 (0.10)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.08 (1.00, 1.16)	1.11 (1.06, 1.16)	
<i>Raspon</i>	0.95, 1.33	0.78, 1.32	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Cho na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Cho_W8			0.283
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.14 (0.10)	1.11 (0.12)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.14 (1.09, 1.18)	1.09 (1.04, 1.20)	
<i>Raspon</i>	0.90, 1.34	0.94, 1.38	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Cho između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Cho_Ch			0.616
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.04 (0.14)	0.02 (0.16)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.05 (-0.08, 0.16)	0.06 (-0.13, 0.14)	
<i>Raspon</i>	-0.24, 0.27	-0.28, 0.30	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Razlika u Glx kompleksu u HIPPO (Tablica 48.) nije bilo u ukupnom uzorku između dva vremena mjerenja (p=.404).

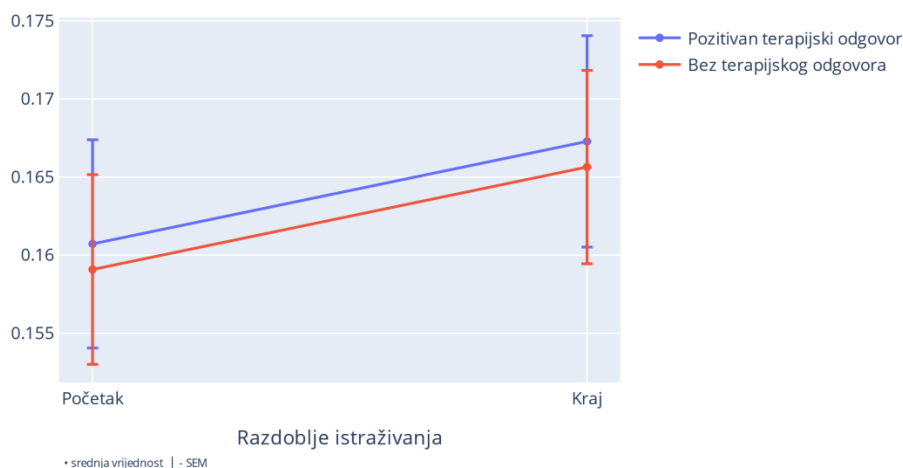
Tablica 48. Glx u HIPPO s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
HIPPO_Glx	0.16 (0.13, 0.18)	0.17 (0.15, 0.19)	0.404

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Kretanje razina Glx kompleksa bilo je skoro potpuno podudarno kod skupina s obzirom na postignuti terapijski odgovor (*Grafikon 34.*). Kod skupine kod koje je postignut terapijski odgovor na početku istraživanja: medijan = 0.16, IQR = 0.13 - 0.18; na kraju istraživanja: M= 0.17, IQR = 0.15 - 0.19; Wilcoxon V = 210, p = 0.070). Kod skupine kod koje nije postignut terapijski odgovor: na početku istraživanja M= 0.16, IQR = 0.14 - 0.18, na kraju istraživanja M = 0.17, IQR = 0.14 - 0.19), također bez razlika (Wilcoxon V = 271, p = 0.512). Između skupina s obzirom na terapijski odgovor, nije bilo razlika niti u početku (Mann-Whitney U = 369, p = 0.859), niti na kraju istraživanja (Mann-Whitney U = 324, p = 0.512).

Glx kompleks u lijevom hipokampusu



Grafikon 34. Promjena u razini Glx kompleksa u hipokampusu s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Razlika po spolu (Tablica 49.) nije bilo niti na početku ($U = 371$, $p = 0.859$), niti na kraju istraživanja ($U = 293$, $p = 0.512$).

Tablica 49. a) Razina Glx u HIPPO na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Glx_Bas			0.859
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.16 (0.04)	0.16 (0.03)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.16 (0.13, 0.18)	0.16 (0.14, 0.18)	
<i>Raspon</i>	0.09, 0.24	0.10, 0.21	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Glx na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Glx_W8			0.512
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.17 (0.03)	0.17 (0.04)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.16 (0.15, 0.18)	0.17 (0.14, 0.19)	
<i>Raspon</i>	0.12, 0.23	0.09, 0.24	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Glx između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_Glx_Ch			0.835
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.00 (0.05)	0.01 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.00 (-0.02, 0.04)	0.00 (-0.02, 0.04)	
<i>Raspon</i>	-0.09, 0.10	-0.09, 0.11	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Kao i kod većine metabolita, nije zapažena razlika niti u MI u HIPPO (Tablica 50.) s obzirom na vrijeme istraživanja (p= .637).

Tablica 50. MI u HIPPO s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
HIPPO_MI	0.30 (0.27, 0.37)	0.31 (0.27, 0.36)	0.637

¹ Medijan (IQR)

² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Razine MI u hipokampusu (Tablica 51.) bile su značajno više kod žena u usporedbi s muškarcima na početku istraživanja ($U = 297$, $p = .025$), ali ne i u 8. tjednu ($U = 324$, $p = .595$). Razlike u razinama MI u HIPPO između početka i 8. tjedna nisu bile značajne s obzirom na spol ($U = 317$, $p = .180$).

Tablica 51. a) Razina MI u HIPPO na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_MI_Bas			0.025
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.29 (0.06)	0.33 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.29 (0.25, 0.32)	0.32 (0.28, 0.37)	
<i>Raspon</i>	0.14, 0.39	0.17, 0.46	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina MI na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_MI_W8			0.595
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.32 (0.08)	0.32 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.30 (0.27, 0.37)	0.32 (0.27, 0.36)	
<i>Raspon</i>	0.15, 0.51	0.19, 0.47	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini MI u HIPPO između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
HIPPO_MI_Ch			0.180
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.03 (0.12)	-0.01 (0.09)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.03 (-0.04, 0.10)	0.00 (-0.07, 0.05)	
<i>Raspon</i>	-0.24, 0.26	-0.26, 0.18	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.7.5. Amigdala

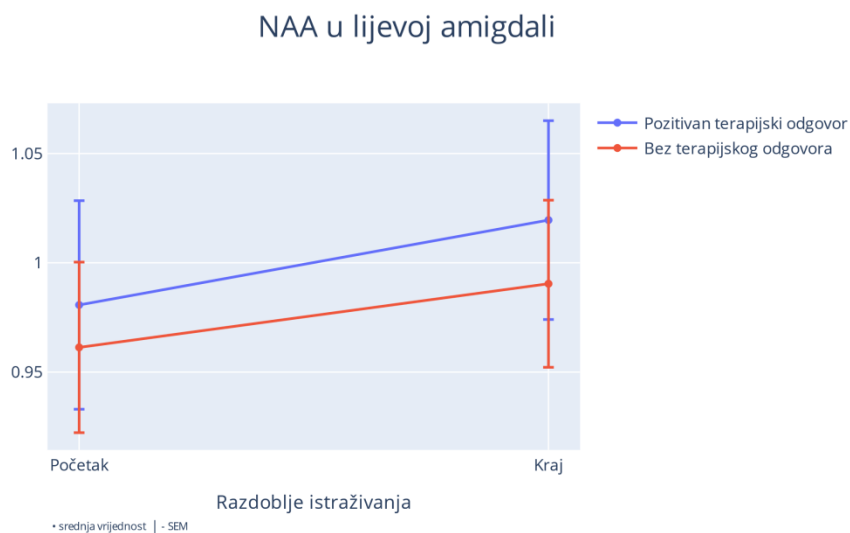
Razlika u NAA u AMYG nije bilo u ukupnom uzorku (Tablica 52.).

Tablica 52. NAA u AMYG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
AMYG_NAA	0.95 (0.79, 1.12)	1.00 (0.89, 1.13)	0.367

¹ Medijan (IQR)

² Wilcoxonov test za zavisne uzorke



Grafikon 35. Promjena razine NAA u amigdali s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Nije bilo značajnih razlika u razinama NAA u amigdali (AMYG_NAA) između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom niti na početku ($U = 329$, $p = .553$) niti na kraju istraživanja ($U = 391$, $p = .391$) (Grafikon 35). Unutar niti jedne od skupina s obzirom na terapijski odgovor nisu zapažene razlike tijekom istraživanja (niti kod onih s pozitivnim ($V = 210$, $p = .764$), niti kod onih s negativnim terapijskim odgovorom ($V = 323$, $p = .235$). Usporedba između skupina također nije pokazala značajne razlike u promjenama NAA u AMYG između početka i 8. tjedna ($U = 334$, $p = .735$).

S obzirom na spol (Tablica 53. , nisu zapažene značajne razlike u početnim razinama NAA u Amyg između muškaraca (n=23) i žena (n=36) niti na početku istraživanja ($U = 329$, $p = .553$), niti na kraju istraživanja ($p=.391$) (Tablica 53.)

Tablica 53. a) Razina NAA u AMYG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_NAA_Bas			0.553
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.95 (0.21)	0.98 (0.25)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.89 (0.78, 1.13)	0.96 (0.82, 1.09)	
<i>Raspon</i>	0.65, 1.38	0.46, 1.63	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina u NAA u AMYG na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_NAA_W8			0.391
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.96 (0.29)	1.03 (0.17)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.94 (0.85, 1.11)	1.01 (0.92, 1.13)	
<i>Raspon</i>	0.24, 1.49	0.70, 1.41	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini NAA u AMYG između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_NAA_Ch			0.764
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.01 (0.39)	0.05 (0.28)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.05 (-0.25, 0.33)	0.04 (-0.10, 0.25)	
<i>Raspon</i>	-0.89, 0.63	-0.62, 0.57	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

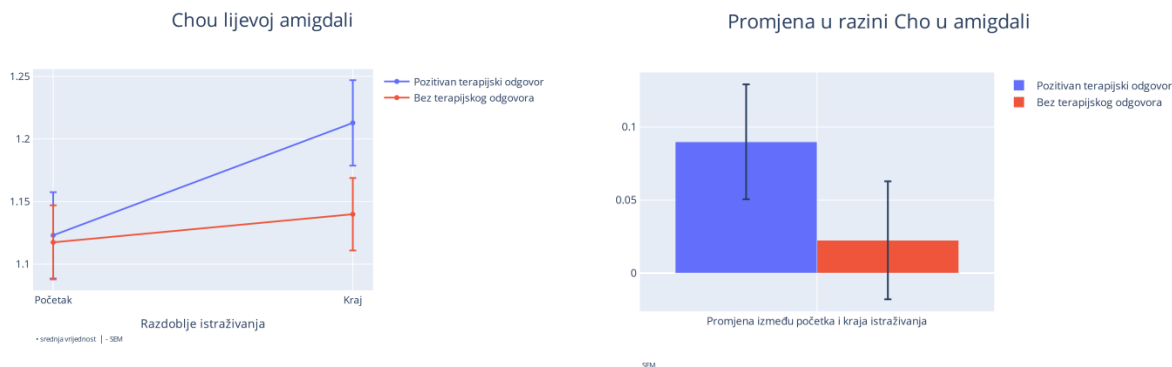
O razinama Cho u AMYG detalji su opisani već u ranijem dijelu ovog poglavlja. Promjene razina Cho u ukupnom uzorku ispitanika (Tablica 54.) nešto su veće nego u slučaju ostalih metabolita, no ne može se zaključiti o postojanju značajne razlike (Wilcoxon $V = 314$, $p = .053$).

Tablica 54. CHO u AMYG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		
	Početak ¹	Kraj ¹	p-value ²
AMYG_Cho	1.15 (0.98, 1.22)	1.13 (1.01, 1.31)	0.053

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke

Isto tako, većih razlika nije bilo između skupina s obzirom na terapijski odgovor (Grafikon 36.). Nisu se pokazale značajne razlike u razinama Cho u Amyg između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom niti na početku ($U = 329$, $p = .070$), niti na kraju istraživanja ($U = 334$, $p = .180$). Također, unutar svake skupine nije bilo značajnih promjena od početka do kraja istraživanja, niti kod onih s pozitivnim ($V = 246$, $p = .083$), niti kod onih s negativnim terapijskim odgovorom ($V = 314$, $p = .438$).



Grafikon 36. Usporedba razlika razina Cho s obzirom na terapijski odgovor.

Razine Cho u Amyg nisu se značajnije razlikovale između muškaraca i žena (Tablica 55.) na početku istraživanja (Mann-Whitney $U=329$, $p=.070$), a niti na kraju istraživanja ($U=334$, $p=.180$). Promjene u razini Cho u Amyg između početka i 8. tjedna također su bile usporedive između muškaraca i žena ($U=334$, $p=.945$).

Tablica 55. a) Razina Cho u AMYG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Cho_Bas			0.070
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.17 (0.17)	1.09 (0.17)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.18 (1.08, 1.25)	1.13 (0.96, 1.19)	
<i>Raspon</i>	0.81, 1.53	0.70, 1.44	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Cho na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Cho_W8			0.180
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	1.21 (0.19)	1.15 (0.16)	
<i>Medijan (IQR)</i>	1.28 (1.04, 1.36)	1.10 (1.01, 1.27)	
<i>Raspon</i>	0.92, 1.55	0.91, 1.51	

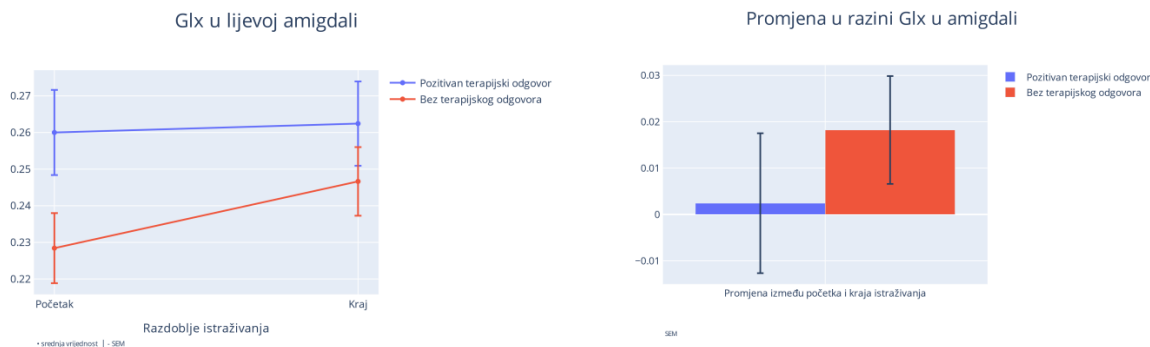
¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Cho između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Cho_Ch			0.945
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.04 (0.24)	0.06 (0.21)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.08 (-0.14, 0.25)	0.06 (-0.09, 0.16)	
<i>Raspon</i>	-0.51, 0.41	-0.44, 0.54	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

Analiza razina Glx u Amyg nije pokazala veće razlike između skupina s pozitivnim i negativnim terapijskim odgovorom niti na početku ($U = 329$, $p = .835$), a niti na kraju istraživanja ($U = 324$, $p = .072$). Promjene nije bilo niti u skupini s pozitivnim ($V = 221$, $p = .115$), niti s negativnim terapijskim odgovorom ($V = 323$, $p = .396$) (Grafikon 37).



Grafikon 37. Promjena razine Glx kompleksa u amigdali s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

U početnim razinama Glx u Amyg nije bilo veće razlike između muškaraca i žena (Mann-Whitney $U = 329$, $p = .835$), a nije uočena razlika niti na kraju istraživanja ($U = 324$, $p = .072$). Promjene u razini Glx u Amyg između početka i kraja istraživanja slične su kod muškaraca i žena ($U = 334$, $p = .115$) (Tablica 56.).

Tablica 56. a) Razina Glx u AMYG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Glx_Bas			0.835
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.24 (0.05)	0.24 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.23 (0.21, 0.28)	0.24 (0.19, 0.28)	
<i>Raspon</i>	0.16, 0.32	0.12, 0.39	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina Glx na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Glx_W8			0.072
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.27 (0.06)	0.24 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.26 (0.23, 0.28)	0.24 (0.21, 0.28)	
<i>Raspon</i>	0.19, 0.44	0.15, 0.38	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini Glx između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_Glx_Ch			0.115
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.03 (0.07)	0.00 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.04 (-0.02, 0.10)	0.02 (-0.04, 0.04)	
<i>Raspon</i>	-0.09, 0.14	-0.13, 0.13	

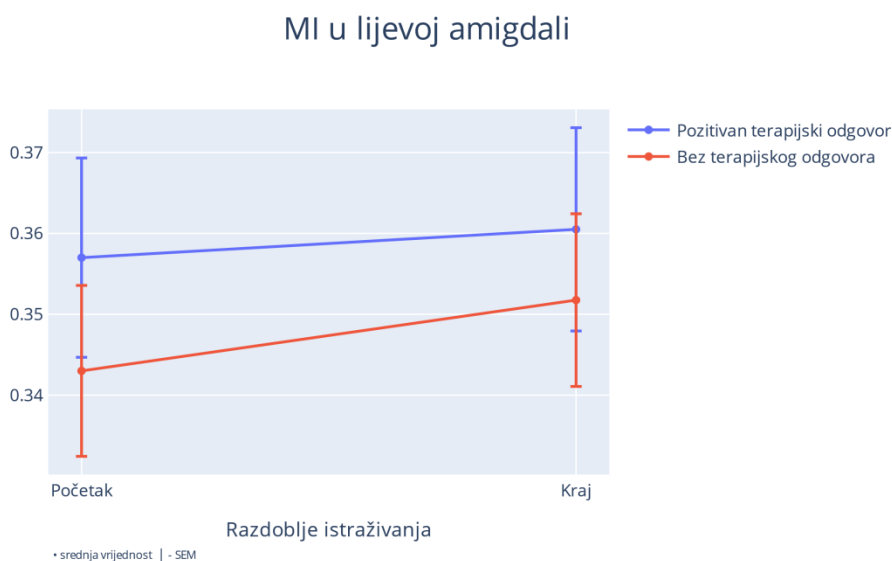
¹ Wilcoxonov test sume rangova

Značajne promjene u razini MI u Amyg između početka istraživanja i 8. tjedna ($V = 314$, $p = .664$) nije bilo (Tablica 57.), a nije bilo niti veće razlike između skupina s obzirom na postignuti terapijski odgovor tijekom istraživanja (*Grafikon 38*).

Tablica 57. MI u AMYG s obzirom na vrijeme istraživanja

	Razdoblje istraživanja		p-value ²
	Početak ¹	Kraj ¹	
AMYG_MI	0.35 (0.31, 0.38)	0.35 (0.31, 0.40)	0.664

¹ Medijan (IQR)
² Wilcoxonov test za zavisne uzorke



Grafikon 38. Promjena razine MI u Amyg s obzirom na terapijski odgovor i vrijeme istraživanja

Početne razine MI u Amyg nisu se razlikovale s obzirom na spol (Mann-Whitney $U = 329$, $p = .799$). Razlike s obzirom na spol nije bilo niti na kraju istraživanja ($U = 334$, $p = .089$). Promjena u razinama MI u Amyg tijekom istraživanja također je bila usporediva po spolu ($U = 293$, $p = .237$) (Tablica 58.).

Tablica 58. a) Razina MI u AMYG na početku istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_MI_Bas			0.799
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.35 (0.07)	0.35 (0.06)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.35 (0.31, 0.39)	0.35 (0.32, 0.38)	
<i>Raspon</i>	0.23, 0.52	0.21, 0.45	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

b) Razina MI na kraju istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_MI_W8			0.089
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.38 (0.07)	0.34 (0.05)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.37 (0.32, 0.42)	0.34 (0.31, 0.37)	
<i>Raspon</i>	0.27, 0.53	0.26, 0.47	

¹ Wilcoxonov test sume rangova

c) Promjena u razini MI između početka i kraja istraživanja s obzirom na spol

	Spol		p-value ¹
	Muškarci	Žene	
AMYG_MI_Ch			0.237
<i>N</i>	23	36	
<i>M (SD)</i>	0.02 (0.11)	0.00 (0.07)	
<i>Medijan (IQR)</i>	0.02 (-0.04, 0.09)	0.00 (-0.06, 0.03)	
<i>Raspon</i>	-0.25, 0.23	-0.13, 0.15	

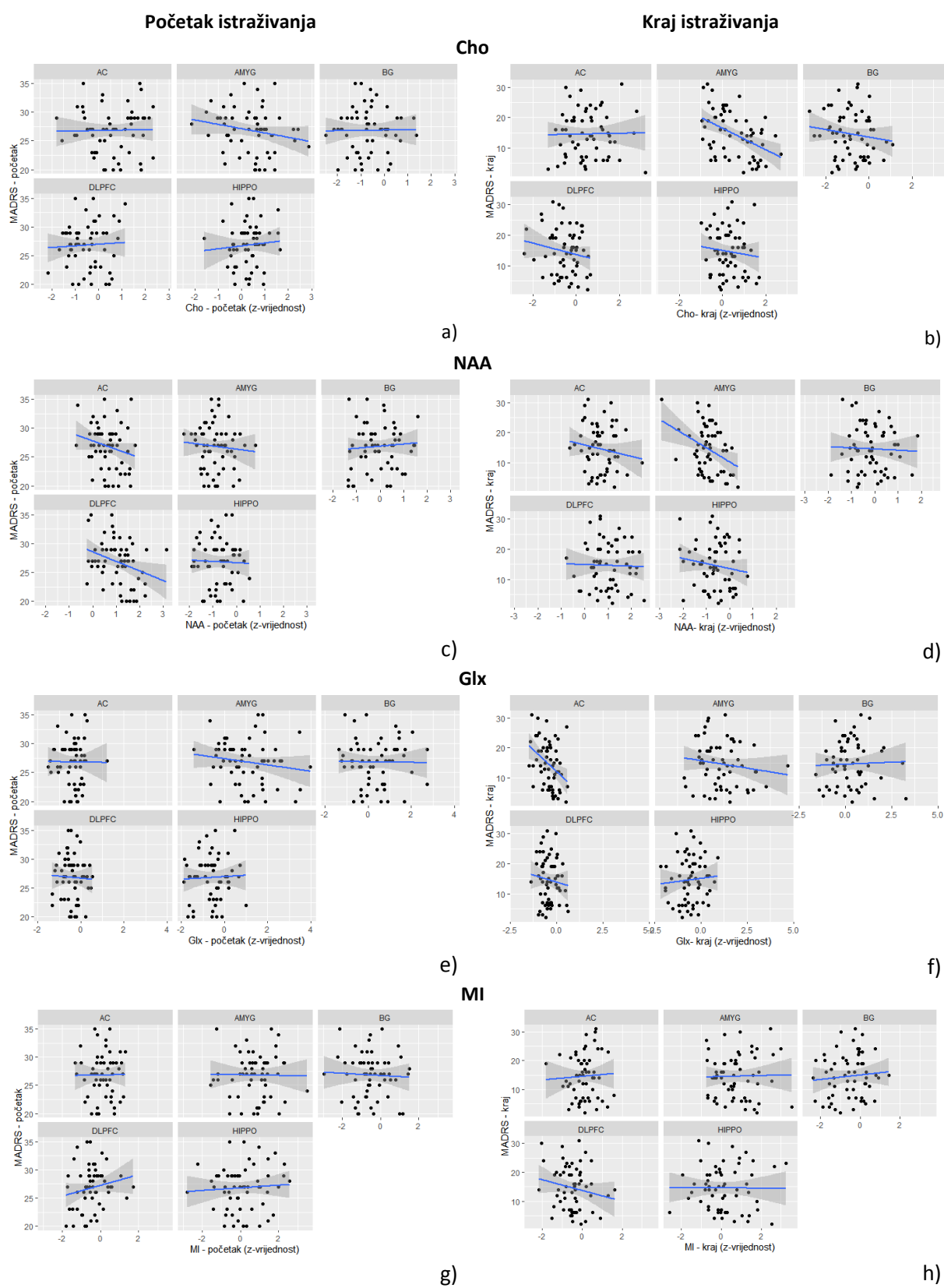
¹ Wilcoxonov test sume rangova

5.8 Razlike u distribucijama razina neurometabolita

Grafikon 39. prikazuje distribuciju pojedinog neurometabolita u svakom od vremena istraživanja s obzirom na ukupni zbroj na MADRS ljestvici. Distribucije su prikazane z-vrijednostima koje su računane odvojeno za početak i za kraj istraživanja, budući da je cilj ovog djela okvirno prikazati razlike u razini pojedinog neurometabolita između analiziranih ROI. Odvojenim prikazom za početak i odvojenim za kraj istraživanja nastojalo se izostaviti mogući učinak antidepressivne terapije na pojedini metabolit. Pojašnjenja radi, ukupni uzorak na grafikonima koji slijede je npr. 295 vrijednosti NAA, budući da je na početku istraživanja NAA bio mjeren kod 59 ispitanika u 5 ROI. Grafikoni ilustriraju do koje mjere je razina NAA različita između ROI.

Razvidne su velike razlike u razini pojedinog neurometabolita u svakom od vremena istraživanja. Primjera radi, u grafikonu koji slijedi razlike u razini NAA značajno su različite između NAA u DLPFC (značajno su veće) i NAA u Amyg (značajno su manje od razina u DLPFC).

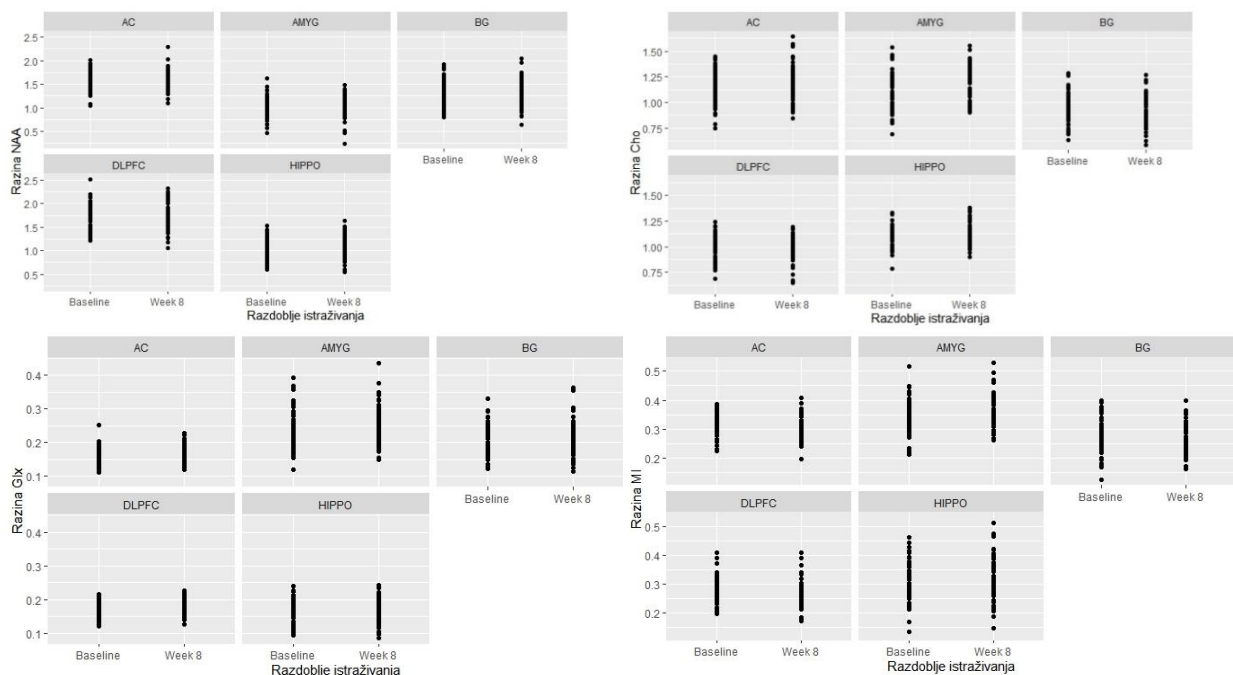
S druge strane, razina Glx na početku istraživanja kod većine ROI ne upućuje na bilo kakvu veću povezanost s težinom depresije, nešto je veća negativna povezanost u Amyg.



Grafikon 39. Distribucija z-vrijednosti mjerenih neurometabolita u usporedbi s MADRS: a) Cho na početku istraživanja, b) Cho na kraju istraživanja, c) NAA na početku istraživanja, d)

NAA na kraju istraživanja, e) Glx na početku istraživanja, f) Glx na kraju istraživanja, g) MI na početku istraživanja, h) MI na kraju istraživanja.

Gotovo u pravilu, na kraju istraživanja povezanosti su daleko veće nego na početku, a naročito odskače negativna povezanost razine Glx u ACC te nešto manja, ali također negativna povezanost u DLPFC. Još je blaža, ali ista po predznaku, poveznost razine Glx u Amyg s MADRS na kraju istraživanja. Suprotno, u BG i Hippo prepoznaje se samo manja, i to pozitivna, povezanost razine Cho s težinom kliničke slike. Od metabolita praćenih u istraživanju, najmanje relativne promjene bile su zapažene kod MI. Premda značajnije promjene razina MI po pojedinim ROI nisu bile uočene tijekom istraživanja, zanimljivo je zapaziti u početku istraživanja relativno visoku pozitivnu korelaciju MI s obzirom na težinu depresije u DLPFC, dok na kraju istraživanja ta povezanost ostaje velika, ali tada je negativnog predznaka.



Grafikon 40. Distribucija analiziranih neurometabolita na početku i na kraju istraživanja (z-vrijednosti).

Bez obzira na opseg razlika u razini povezanosti neurometabolita s MADRS, distribucije razina pojedinog metabolita unutar istog ROI pokazale su se značajno stabilnijima u vremenu (*Grafikon 40.*).

6. Rasprava

Istraživanje je pokazalo da je razina Cho korelat terapijskog odgovora, što upućuje na mogućnost uloge Cho u objektivizaciji terapijskog odgovora kod depresivnog poremećaja.

Analiza putem LMM upućuje na značajnu povezanost poboljšanja simptomatike mjerene promjenom ukupnog zbroja na MADRS s efektima Cho (1.48, $p = 0.036$), vremena liječenja (-11.53, $p < 0.001$) i promjene Cho izražene interakcijom Cho i vremena istraživanja (-1.95, $p = 0.044$).

Istraživanje je pokazalo povezanost razine Cho nakon 8 tjedana liječenja antidepresivnom farmakoterapijom. Daljnjim bi istraživanjima posebno vrijedilo istražiti kada dolazi do promjene razine Cho tijekom liječenja, odnosno istražiti je li Cho korelat terapijskog odgovora ili čak, ako bi promjena razine Cho u nekom razdoblju liječenja prethodila kasnije opaženom terapijskom odgovoru, mogući prediktor terapijskog odgovora. S druge strane, ne može se isključiti da je razina Cho modifikator terapijskog odgovora. Ipak, rezultati istraživanja upućuju da razina Cho nema ulogu modifikatora u samom početku liječenja jer bi tada značajna razlika u Cho bila opažena već na samom početku istraživanja, a za očekivati je da bi se razlika u daljnjem tijeku liječenja samo još više povećavala. Isto tako, temeljem provedenog istraživanja moguće je zaključiti o Cho kao korelatu terapijskog odgovora nakon 8 tjedana liječenja, no ne može se isključiti mogućnost da korelacija nije linearna tijekom razdoblja liječenja.

6.1 Ograničenja istraživanja

6.1.1 Reprezentativnost uzorka

Odabirom uzorka nastojalo se postići da uzorak bude reprezentativan za populaciju u rutinskoj kliničkoj praksi koja je liječena SIPPS, a to je velika većina bolesnika koji su farmakološki liječeni. Ipak, jedan manji dio bolesnika započinje i nastavlja liječenje antidepresivima iz drugih skupina.

Kriteriji uključivanja u istraživanje nisu uključivali pokazatelje longitudinalnog tijeka, jer dosadašnje znanstvene činjenice ne daju dovoljno uporišta za razdvajanje depresivne epizode

od depresivne epizode u sklopu povratnog depresivnog poremećaja. Ako bi pokazatelji longitudinalnog tijeka bili kriteriji uključivanja ispitanika, neminovno bi bili pogrešni, budući da bi uključivali povijest bolesti ispitanika, a naravno da ne bi mogli uključivati naknadni longitudinalni tijek s obzirom da nisu ustanovljeni bilo kakvi pouzdani biološki ili drugi pokazatelji koji bi mogli upućivati na kasniju pojavu hipomanične ili manične epizode. Samim nastupom takve epizode trenutni depresivni poremećaj bolesnika prešao bi u kategoriju bipolarnog poremećaja, koji se formalno vodi kao psihijatrijski poremećaj druge vrste.

Istraživanjem nisu bili obuhvaćeni bolesnici koji boluju od blage depresije, budući da je kod blagog depresivnog poremećaja psihotepija metoda prvog izbora liječenja. Iz etičkih razloga u istraživanje nisu bili uključeni suicidalni bolesnici.

Depresivni poremećaj obuhvaća značajan raspon težina kliničke slike i brojnost moguće simptomatike. Premda se prema MKB-10 težina depresivne epizode dijeli na blagu, umjerenu i tešku (s dodatnim karakteristikama težine i longitudinalnog tijeka), ipak se ne radi o gradiranju na imaginarnoj skali ordinalnog tipa, pa je umjerenu depresiju sa značajnom težinom simptoma teško razlučiti od teške depresije. Gradiranje težine depresivne simptomatike u svakodnevnoj kliničkoj praksi temelji se na prepoznatim simptomima osobitim za depresiju, njihovoj težini, autoanamnestičkim i heteroanamnestičkim podacima te se ocjenske ljestvice rutinski ne koriste, a niti sama klasifikacija po MKB-u to zahtjeva.

Pristup da u istraživanje bude uključen uzorak što podudarniji kliničkoj praksi čini se pogodnijim što se tiče translacije rezultata istraživanja na rutinsku praksu, no takav pristup nije korišten u svim istraživanjima. Po strukturi uzorka naročito odstupaju rezultati dobiveni kliničkim ispitivanjima lijekova, a koji se vrlo često publiciraju, budući da neizostavno uključuju brojne i detaljne ocjenske i samoocjenske ljestvice i biološke pokazatelje. Kod kliničkih ispitivanja lijekova uzorak je najčešće vrlo malo podudaran svakodnevnoj praksi budući da se kod depresije često provodi na relativno uskom spektru umjerene i teške depresivne simptomatike, uključuje brojnije kontakte s liječnikom, iz istraživanja su izuzeti bolesnici s bilo kojim težim tjelesnim bolestima, a od svakodnevne prakse posebno odudaraju rigidni kriteriji za prisutnost konkomitantne terapije.

6.1.2 Razlike u analitičkom pristupu između pojedinih istraživanja

Osim razlika u uključnim i isključnim kriterijima istraživanja, naročite razlike između pojedinih istraživanja postoje i u prisutupu analizi rezultata. Brojna istraživanja uz primjenu MRS na malim uzorcima *a priori* podrazumijevaju normalnost distribucija i koriste takve parametrijske statističke metode kod kojih su normalnost distribucije i homogenost varijanci osnovni uvjet. Niti jedno od do sada provedenih istraživanja, pa niti ovo, nije uključivalo uzorke dovoljne veličine da bi se izbjegla greška tipa II. S druge strane, nepodudarnost metoda i pristupa u istraživanju i brojnost istraživanih ROI takvim različitim metodama, znatno otežava, ako ne i onemogućava provedbu meta-analize.

U ovom je istraživanju naročitu dvojbu predstavljao odabir varijabli u primarnoj analizi i njihova karakterizacija kao fiksnog ili slučajnog efekta. Pripadnost fiksnom ili slučajnom efektu zajednička je poteškoća s kojom se suočavaju sva istraživanja koja koriste LMM i nema ujednačenih kriterija koji bi nedvosmisleno pomogli u karakterizaciji pojedine varijable, a nema ujednačenog pristupa niti da se *post hoc* potvrdi ispravnost takve karakterizacije. Istraživanje koje je po primjenjenoj statističkoj metodi bilo sukladno ovom istraživanju, pokazalo je da na rezultate mjerenja metabolita analizirane LMM značajno utječe čak i proizvođač opreme po karakteristikama istog MR uređaja, a i ustanova u kojoj je mjerenje obavljeno¹²¹. Značajan napredak u smanjenju pogreške mjerenja je neuro-ComBat¹²² kolaborativna inicijativa koja je napravljena po modelu po kojem je razrađen izvorni ComBat model za primjenu u genomskim istraživanjima, koja bi analizom velikih uzoraka učinila dostupnom referentni standard s kojim bi bilo moguće uspoređivati dobivene rezultate (u vrijeme analize rezultata istraživanja bili su dostupni moduli za strukturni MR, fMRI i DTI, ali ne i za MRS). INSPECTOR¹²³ je također novije nastojanje za ujednačavanjem pristupa, no odnosi se više na postizanje standarda u procesiranju izvornog signala, nego na određivanje referentnih vrijednosti.

Pristupi određivanju varijable kao fiksne variraju od pristupa da je fiksni učinak onaj koji je od interesa za istraživanje ili pristupa da fiksni efekt može biti samo u istraživanju uzoraka za koje je pouzdano da su reprezentanti populacije, pa do pokušaja da se pripadnost odredi kvantitativnim metodama¹²⁴ koji se često koristi kod ekonometrijskih modela.

6.1.3 Pogreške u razvrstavanju bolesnika s dobrim terapijskim odgovorom

Dosadašnja su istraživanja učestalo primjenjivala kategoriju “responder”, kojom bi se opisivalo bolesnike kod kojih je postignuto smanjenje na ocjenskoj ljestvici (najčešće MADRS i HAM-D), a kao kriterij postizanja terapijskog odgovora koristilo bi se 30%-tno, 50%-tno ili više smanjenje od rezultata na ljestvici prije početka liječenja. Takva se kategorizacija čini pogrešnom jer se radi o udjelima od prvotnog iznosa na skali koja se uobičajeno smatra intervalnom, no u suštini ima i osobitosti ordinalnih skala. Jednaka distanca susjednih ocjena na ljestvici se podrazumijeva, što je vrlo teško u nedostatku objektivnih metoda koje bi omogućavale nepristranu procjenu stanja. Drugim riječima nije nedvosmisleno jasno da je 50%-tno smanjenje na MADRS od početne vrijednosti 32, identično 50%-tnom smanjenju na MADRS od početne vrijednosti npr. 26.

6.2 Prisutnost komorbidne simptomatike i nepoznat longitudinalni tijek

GPC koji značajnim udjelom sudjeluje u Cho vrhu na 1H-MRS, kao i Cho, utječe pozitivno na kogniciju, smanjenu kognitivnu degradaciju i utječe na izvršne funkcije^{36,37}, uz to što se pokazao korelatom promjene stupnja depresije, mogao bi odražavati i rane simptome kognitivnog propadanja još u vrijeme dok kognitivna simptomatika nije manifestna. Poznato je da depresija može biti jedan od ranih, prodromalnih simptoma demencije u sklopu Alzheimerove bolesti. Daljnjim bi se istraživanjima, uz longitudinalno praćenje u dužem vremenskom razdoblju, moglo razjasniti do koje je mjere GPC korelat ili moderator rane simptomatike kognitivne deterioracije.

6.3 Razjašnjenje uloge Cho kao moderatora ili medijatora u depresivnom poremećaju

Istraživanje upućuje na znatan individualni varijabilitet u razini Cho, što uz podudarnost Cho kao markera terapijskog odgovora kod skupine s pozitivnim odgovorom može upućivati na genetski varijabilitet. Takav genetski varijabilitet mogao bi biti izravno vezan uz metabolizam Cho, ali je moguće da je Cho samo jedan od odraza takvog varijabiliteta.

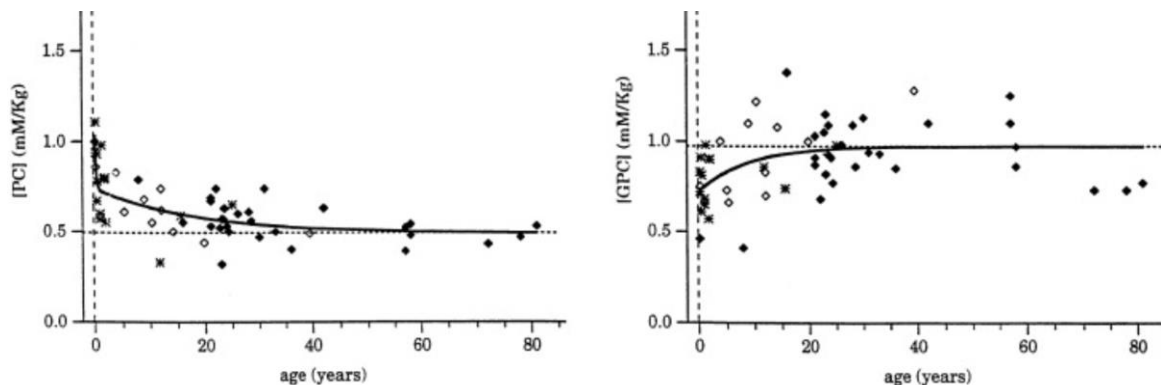
Istraživanje je pokazalo da je terapijski odgovor povezan s razinom Cho. Manji porast ili sniženje Cho bilo je povezano s lošijim terapijskim odgovorom, odnosno depresivna simptomatika je perzistirala u manjoj ili većoj mjeri i na kraju istraživanja. Samo istraživanjem dužeg longitudinalnog tijeka dalo bi se prepoznati je li sniženje Cho pokazatelj trenutne ili dugoročne osobitosti. Ako bi se radilo u dugotrajnijoj osobitosti, sniženje Cho moglo bi se povezati s pretpostavkom dugotrajnijeg sniženja kapaciteta pohrane Cho koja bi mogla dovesti do smanjenog kapaciteta metilacije homocisteina u metionin uz posljedično povećanje razine homocisteina u plazmi za koje je ustanovljeno da je u vezi s povećanim rizikom nastanka bolesti srca i inzulta¹²⁵, karcinoma, osteoporoze i kognitivnog propadanja.

6.4 Neurobiološka osnova promjene razina 1H-MRS kolina u mozgu

U redovitoj kliničkoj praksi mjerenje razine Cho u mozgu najčešće se primjenjuje kao jedna od metoda u ustanovljavanju malignih degeneracija. Kod bolesti koje isključuju malignitet i strukturalna oštećenja mozga tumačenje razine Cho nije u značajnoj mjeri dokumentirano istraživanjima, no čini se da je povećana razina Cho indikativna za produkciju staničnih membrana¹²⁶, prije nego za njihovu razgradnju. Takvo tumačenje temelji se na činjenici da je Cho glavni sastavni dio fosfolipida.

Premda se može doimati da je povećano obnavljanje membrana poželjni efekt u očuvanju zdrave funkcije stanica, s obzirom da je obnavljanje membrana sastavni dio normalne funkcije, čini se da bi povećanje razine Cho moglo upućivati upravo na suprotno jer je MRS istraživanjima ustanovljeno da je razina Cho u mozgu veća u starijoj životnoj dobi nego u mlađoj¹²⁷. Ipak, neka istraživanja upućuju da je Cho pokazatelj sinteze membrana¹²⁸.

Za fosforilkolin i glicerilfosfokolin istražene su promjene s obzirom na dob⁷². Uzimajući u obzir omjere navedene u uvodnom dijelu da u ukupnom vrhu Cho na 1H-MRS 40% čini fosforilkolin i 40% glicerofosforilkolin, iz samog kretanja krivulje ne može se sa sigurnošću zaključiti o dobno uvjetovanim promjenama, budući da se razina fosfokolina s dobi smanjuje, a razina glicerofosfokolina povećava (*Grafikon 41*). Promjene i jednog i drugog metabolita događaju se do oko 50. godine života, a da se radi o razini kolina koja je dobno uvjetovana porastom glicerofosfokolina, te bi promjene bile pogotovo izražene nakon 50. godine života.



Grafikon 41. Promjene fosfokolina (lijevo) i glicerofosforilkolina (desno) s obzirom na dob.

Premda se iz same životne dobi ne može zaključiti da je kolin u većoj mjeri pokazatelj degenerativnih promjena u mozgu, glavno uporište za pretpostavku da je povećanje Cho pokazatelj kataboličkih promjena ostaju istraživanja koja su pokazala povećanu razinu kolina kod neurodegenerativnih promjena kao što je to slučaj kod Alzheimerove bolesti i kognitivnih disfunkcija^{105,106} te kod multiple skleroze¹⁰⁸.

Premda se fosforilkolini i glicerofosforilkolini uobičajeno smatraju pokazateljem anabolizma, odnosno katabolizma u pregradnji membrana, istraživanja su pokazala da fosforilkolini poprima ulogu epitopa po modelu haptena na oksidiranoj formi LDL (oxLDL) i da je niska razina antitijela za fosforilkolini pokazatelj rizika za nastanak kardiovaskularne bolesti i ateroskleroze^{129,130}, no nije u potpunosti razjašnjena veza između razine fosforilkolina i protutijela, a pogotovo nije razjašnjeno do koje se to mjere odnosi na mozak. Ove su pretpostavke iznijete stoga što je jedan od stabilnijih rezultata istraživanja depresije postojanje njene, za sada još nerazjašnjene, veze s upalnim promjenama¹³¹. Istraživanja kojima bi cilj bilo razjasniti do koje bi mjere razina Cho mogla biti pokazatelj upalnih promjena mogla bi doprinijeti razjašnjenju poveznosti upalnih promjena kod depresije samostalno, depresivne simptomatike koja se javlja u post-COVID-19 sindromu i kod koje je već potvrđena povezanost s upalnim promjenama¹³². Općenito se čini da su upalne promjene povezane s depresivnošću naročito potencirane sistemskim dugotrajnijim upalnim procesima koji induciraju proinflammatorne citokine koji izazivaju neuroinflamaciju¹³³. Istraživanja bioloških markera upalnih promjena u mozgu *in vivo*, za sada su više istražena primjenom PET-a¹³⁴, nego primjenom ne-ionizirajućih metoda. Upalne bi promjene, čini se, mogle biti značajne ne samo kod depresivnog poremećaja, nego su prepoznate i kod opsesivno-kompulzivnog poremećaja¹³⁵. Primjenom PET-a, upalne promjene su ustanovljene u frontalnim, temporalnim i parijetalnim strukturama, kao i u bijeloj tvari kod Alzheimerove

bolesti¹³⁶ te se javljaju ne samo u uznapređenoj fazi bolesti, nego i kod kognitivnih promjena koje joj prethode. Istraživanja upućuju da bi upalne promjene naročito mogle biti inducirane pretjeranom reaktivnošću mikroglije¹³⁷ koje dovode do povećanih ROS s posljedičnom neurotoksičnošću koju one izazivaju. Da bi forforilkolin mogao biti povezan s upalnim promjenama mozga upućuju i rezultati istraživanja u kojem monoklono antitijelo na fosforilkolin smanjuje neuralnu degeneraciju kod eksperimentalno uzrokovanog meningitisa¹³⁸.

6.5 Razine neurometabolita s obzirom na spol

Ranija saznanja o ulozi estrogena u regulaciji PC i pokazani utjecaj estrogena na razinu PC²⁹ bili su razlog da se razine i promjene razina svakog od neurometabolita u istraživanju analiziraju i s obzirom na spol.

Rezultati istraživanja nisu pokazali razlike po spolu u razini izmjerenih neurometabolita. Značajno je ograničenje u tumačenju ovog rezultata što istraživanje razlika po spolu nije bilo primarni cilj istraživanja te uzorak nije strukturiran na način koji bi bio usmjeren ustanovljavanju takvih razlika. Za očekivati je da bi se najveće razlike mogle pokazati između skupine žena u pre-menopauzalnoj i post-menopauzalnoj dobi bez nadomjestne terapije estrogenima, no pomak u istraživanom uzorku je bio izrazit prema mlađoj životnoj dobi. S druge strane, uzimajući u obzir rezultate provedenih istraživanja, razlike bi bile najočitije kod deficitarnog unosa kolina hranom, za što ne postoje pretpostavke da je bio slučaj kod bilo kojeg ispitanika u istraživanju.

6.6 Kontinuitet 1H-MRS istraživanja u depresiji

Ovo istraživanje nadopunjuje naša prethodna istraživanja neurokemijskih markera u liječenju depresivnog poremećaja, s ciljem razjašnjenja neurobioloških temelja depresije i njezina ponavljanja. Od našeg posebnog interesa su bile razine kolina (Cho) u depresiji jer su i rana 1H-MRS istraživanja povezala razine Cho s depresijom; međutim, smjer te promjene bio je dvosmislen. Pregledom 68 recenziranih istraživanja utvrđena je povezanost kolina i depresije. Ipak, samo dva istraživanja su pokazala značajnu povezanost, dok ostala nisu pokazala razliku u razini Cho između skupina bolesnika s različitim odgovorom na antidepresivnu

terapiju¹³⁹. Ova istraživanja su dovela do početne hipoteze o povišenim razinama Cho u depresiji.

Analizirajući razine metabolita u AMYG na 1H-MRS tijekom početne faze oporavka kod bolesnika na terapiji održavanja antidepressivima, istražili smo mogućnost predviđanja ponovne pojave depresivne epizode¹⁴⁰. Prethodnim istraživanjem smo istražili mogu li rane promjene u razini moždanih metabolita nakon oporavka od depresije ukazivati na rizik od povrata depresivnih simptoma. Naši ključni rezultati su pokazali da su povećane razine Cho u AMYG tijekom ranog oporavka povezane s produljenim razdobljima bez depresivnih epizoda, ukazujući tako na Cho kao potencijalni biomarker za praćenje razvoja depresivnog poremećaja. Ovo je bilo istraživanje longitudinalnog kohortnog dizajna s dva 1H-MRS snimanja na području AMYG, provedena u razmaku od šest mjeseci. Kliničke ljestvice ocjene za težinu depresije i 1H-MRS kao metoda neurometaboličke procjene omogućile su kvantifikaciju razina N-acetil aspartata (NAA), Cho i glutamat-glutamina (Glx). Ključna vremenska razdoblja promatranja su bila početak faze oporavka i praćenje nakon šest mjeseci, naglašavajući time prognostičku vrijednost Cho za dugotrajnije intervale bez depresije.

Istraživanje smo proširili proučavajući vezu između razina metabolita na 1H-MRS u DLPFC-u tijekom ranog oporavka od depresije i vjerojatnosti ponavljanja depresivne epizode¹⁴¹. Uočili smo da smanjene razine NAA i Cho u ovoj fazi udvostručuju rizik od naknadnih depresivnih epizoda. Razine NAA, Cho i Glx na 1H-MRS smo mjerili na početku oporavka i šest mjeseci kasnije, a težinu depresivnih simptoma smo procjenjivali ocjenskim ljestvicama za depresiju. Ključna vremenska razdoblja u praćenju bolesnika su bila početak oporavka i šest mjeseci nakon oporavka. Stabilnost razina NAA i Cho u DLPFC-u u ranoj fazi oporavka mogla bi ukazivati na povećanu moždanu otpornost zbog antidepressivne terapije. Pad razina ovih metabolita mogao bi odražavati prolazni odgovor na liječenje, vezan uz osobine ličnosti, što bi ukazivalo na postojanje podskupine bolesnika s drugačijom neurobiološkom reakcijom na depresiju.

U istraživanju retrospektivnog kohortnog dizajna istraživali smo povezanost neurometaboličkih promjena u DLPFC-u i ponavljanje depresivnih epizoda kod bolesnika koji su bili na terapiji održavanja¹⁴². 1H-MRS snimanjem smo pratili razine Cho i NAA u DLPFC-u. Provedena su dva 1H-MRS snimanja, prvo tijekom akutne depresivne epizode, a drugo tijekom faze oporavka. Primijetili smo da su manji porast Cho/Cr i nemogućnost

održavanja razina NAA/Cr tijekom faze oporavka bili prediktori učinkovitosti antidepresiva i korelirali su sa smanjenim rizikom od ponovne pojave depresije. Naša istraživanja upućuju na potencijal ovih metoda da povećaju dugotrajniji učinak antidepresiva i poboljšaju kliničke ishode.

Zaključno, naši rezultati naglašavaju potencijal 1H-MRS za predviđanje uspjeha terapije održavanja kod depresivnog poremećaja. Rezultati naših prethodnih istraživanja potvrđuju mogućnost metabolita mjerenih 1H-MRS da služe kao biomarkeri za rizik od ponovnog javljanja depresije, što bi moglo poslužiti u razvoju personaliziranih pristupa liječenju depresije. Iz neurobiološke perspektive, naše istraživanje naglašava važnost održavanja razine Cho kao neurometaboličkog pokazatelja moždane otpornosti protiv ponavljanja depresivnih epizoda. Uočene promjene u omjeru Cho upućuju na njegovu ulogu markera izmjene membrane i moždane metaboličke aktivnosti tijekom oporavka. Naši rezultati, potkrijepljeni i drugim istraživanjima, podupiru dosljedno opažanje povišenog Cho/Cr u oporavku od depresije i njegovu povezanost s produljenim vremenskim periodom bez depresivnih epizoda. Ovi rezultati imaju implikacije za poboljšanje personaliziranih strategija liječenja depresivnog poremećaja.

Promjene razine Cho u Amyg tijekom depresije, kao što je objavljeno u našem prethodnom istraživanju, mogu proizaći iz neravnoteže između sinteze i razgradnje fosforilkolina i glicerofosforilkolina, što može odgovarati promjenama u funkcionalnoj povezanosti uočenim u studijama DLPFC-a¹⁴³, hipokampusa¹⁴⁴ te studijama na lipidima¹⁴⁵. Održiva je hipoteza da fosfolipidi odražavaju širu neravnotežu lipida i proteina, s obzirom da lipidi upravljaju lokalizacijom proteina i funkcijom unutar stanične membrane, regulirajući tako sinaptički prijenos u neuronima. Značajno je i to da je fosfolipidno-proteinska neravnoteža očigledna u frontalnim i hipokampalnim regijama nakon olfaktorne bulbektomije, modela depresije kod štakora, te da ona postoji unatoč učinkovitoj farmakoterapiji¹⁴⁶. Povezanost olfaktornog sustava, fosfolipida i depresivnih simptoma u post-COVID periodu je bila jedna od polaznih točaka istraživanja funkcionalnih, bihevioralnih i kognitivnih simptoma post-COVID-a¹⁴⁷ u kojemu su se najizraženijima pokazali simptomi depresije, anksioznosti i kognitivne tegobe¹⁴⁸, a javljaju se u oko 35% preboljelih¹⁴⁹.

S obzirom na to da su AMYG, DLPFC i HIPPO ključni za neurobiologiju posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP), te uzimajući u obzir simptomatsko preklapanje i česte komorbiditete depresije i PTSP-a, moguće je da bi kvantifikacija neurometabolita MRS-om

poboljšala učinkovitost liječenja i ovog poremećaja¹⁵⁰. Čini se da su metabolizam i promjena membranskih fosfolipida mnogostruko povezani s neurobiologijom depresije, iako točno stanično podrijetlo ove neravnoteže ostaje nedokučivo. Neizravni dokazi, na temelju meta-analize apsolutnih prefrontalnih neurometaboličkih koncentracija, upućuju na selektivnu uključenost glijе u glutamatne mehanizme regulacije raspoloženja u depresiji. Iako su fosfolipidi koji sadrže kolin prepoznati kao ključni markeri propadanja neuronske membrane u raznim akutnim i kroničnim neurološkim stanjima, još uvijek je neizvjesno je li gubitak membranskih fosfolipida uzrok ili posljedica procesa neurodegenerativne bolesti¹⁵¹.

6.7 Mogući razlozi nepodudarnosti istraživanja u prepoznavanju bioloških markera

Istraživanja putem 1H-MRS zbog visokih troškova vrlo se rijetko provode na većem broju ispitanika. Istraživanja na manjim uzorcima posebno su podložna tipu I i tipu II statističke pogreške. Negativan rezultat istraživanja gotovo neminovno motivira istraživače da cilj svojeg znanstvenog interesa prebace na drugi ROI i/ili na druge metabolite, premda bi možda na većem uzorku i početno istraživanje pokazalo rezultate iznad postavljene razine statističke značajnosti. S druge strane, brojnost manjih istraživanja s malim uzorcima povećava mogućnost greške tipa I, tj. da se pogrešno odbaci nulta hipoteza i „pozitivan“ ishod prihvati kao činjenica. Mala statistička snaga s obzirom na veličinu uzorka i varijabilitet pogoduje pogrešnom zaključivanju po modelu tipa II statističke pogreške.

Dodatna je poteškoća i pristranost sklonosti objavljivanju rezultata i kod istraživača, a i kod časopisa. Istraživači pretpostavljaju da su časopisi manje motivirani za objavu negativnih rezultata, s obzirom na manju citiranost takvih istraživanja, pa često odustaju i od samog pokušaja objavljivanja istraživanja koja nisu pokazala barem neki „pozitivan“ rezultat. Od drugih čimbenika od utjecaja su značajno različiti planovi istraživanja koja su različitog trajanja s različitim kriterijima uključivanja i isključivanja, u kojima su uključene različite težine bolesti ili pak isključeni bilo kakvi trenutni komorbiditeti ili druge psihijatrijske bolesti u anamnezi.

Također, od značajnog su utjecaja različite tehnike neuroslikovnog prikaza mozga čak i unutar iste vrste neuroslikovnog prikaza, kao što je slučaj i kod MRS.

Među istraživanjima, različiti su i načini analize podataka, uključujući pripremu podataka; iz nekih su istraživanja isključene arbitrarno određene vrijednosti koje odskaču (eng. outlier), iz drugih istraživanja nisu, a vrlo su velike razlike u metodama analize podataka.

6.8 Mogućnosti poboljšanja prepoznavanja bioloških markera putem 1H- MRS

U interpretaciji rezultata 1H-MRS istraživanja, ključno je uzeti u obzir sve prethodno navedene čimbenike te pokušati uvesti standardizirane metode u buduća istraživanja kako bi se povećala pouzdanost i valjanost dobivenih rezultata.

Za daljnja istraživanja pouzdanosti primjene 1H-MRS u objektivizaciji psihijatrijskih poremećaja od posebne bi koristi bilo objedinjavanje rezultata različitih istraživačkih skupina, na način kao što je to već bilo učinjeno u neuroznanstvenim područjima.

6.9 Utvrđivanje točnije specifičnosti i osjetljivosti metode putem translacijskih istraživanja

Sadašnje pretpostavke o 40%-tnom ukupnom udjelu fosforilkolina i istom udjelu glicerofosforilkolina, 10%-tnom slobodnog kolina, 5%-tnom fosfatidilkolina, još manjem udjelu sfingomijelina, 1%-tnom acetilkolina i jedva postojećem fosfokolina u ukupnom vrhu kolina na 1H-MRS temelje se na neizravnom zaključivanju iz različitih pretkliničkih istraživanja, a kojem niti jednom nije bio cilj ustanoviti točniju molekularnu strukturu 1H-MRS mjerljivih parametara.

Čak i da se ustanovi točna struktura udjela u Cho vrhu mjenom 1H-MRS, još uvijek ostaje nepoznato koja se molekularna frakcija sa sadržajem kolina zapravo mijenja, teško je za pretpostaviti da kod npr. smanjenja kolina tijekom liječenja depresivnog poremećaja dolazi do linearnog smanjenja svake od molekula u proporcionalnom dijelu.

Točnije udjele i doprinos promjenama pojedinih molekula u ukupnim mjerama neurometabolita koji se određuju putem 1H-MRS nije moguće istražiti isključivo provođenjem kliničkih istraživanja, nego prvenstveno integracijom s pretkliničkim istraživanjima primjenom različitih analitičkih metoda.

Očigledno je da tijekom pojave i liječenja psihijatrijskih poremećaja ne dolazi samo do promjene kolina, nego da je kolin samo jedna od molekula unutar složene strukture promjena. Translacijskim istraživanjima moglo bi se doprinijeti razjašnjenju međuovisnosti s drugim medijatorima ili moderatorima kod depresivnog poremećaja, kao što su BDNF ili glukokortikoidi za koje postoje čvrste pretpostavke da bi mogle utjecati na razinu kolina.

7. Zaključak

1. Razina Cho u amigdali mjerena protonskom spektroskopijom magnetskom rezonancijom negativni je korelat težine depresivne simptomatike ocjenjene putem MADRS nakon 8 tjedana antidepresivne terapije selektivnim inhibitorima ponovne pohrane serotonina. Analiza putem LMM upućuje na značajnu povezanost poboljšanja simptomatike mjerene promjenom ukupnog zbroja na MADRS sa statističkim efektima Cho (1.48, $p = 0.036$), vremena liječenja (-11.53, $p < 0.001$) i promjene Cho izražene interakcijom Cho i vremena istraživanja (-1.95, $p = 0.044$).
2. Povezanost manje izražene depresivne simptomatike s većom razinom Cho u amigdali opaženoj na kraju istraživanja, ali ne i na početku, uz ustanovljenu veću varijabilnost u početnim razinama Cho, upućuje na mogućnost postojanja optimalne razine Cho u amigdali, za koju se može pretpostaviti da je modelirana nizom neurokemijskih parametara u istom ROI, ali i u drugim dijelovima mozga, što bi moglo upućivati na genetski uvjetovani varijabilitet.
3. Nije ustanovljena izravna povezanost razine Cho u amigdali s razinom Cho u drugim ROI, niti u razdoblju prisutne depresivne simptomatike, niti nakon povlačenja simptoma.
4. Nije ustanovljena izravna povezanost razine Cho u amigdali s razinama NAA, Glx (glutamin, glutamat i GABA) i MI u bilo kojem ROI.
5. Povećanje razine Cho tijekom liječenja naročito je povezano sa smanjenjem razine suicidalnih ideacija, što bi vrijedilo provjeriti dodatnim analizama koje bi uključivale specifične instrumente usmjerene na praćenje razine suicidalnosti.
6. Niže promjene razine Cho opažene su kod ispitanika s klinički dijagnosticiranim kognitivnim deficitima u sklopu moguće Alzheimerove bolesti, no nedostatak genotipizacije i pathohistološke potvrde postojanja sigurne Alzheimerove bolesti za sada nije čvrsto uporište za zaključak o ranoj prisutnosti neurometaboličkog markera.
7. Značajan inter-individualni varijabilitet razine Cho mogući je korelat regionalne aktivacije, ali i funkcionalnog konektiviteta, što bi vrijedilo istražiti longitudinalnim praćenjem razina Cho i drugih neurometabolita mjerljivim MRS.
8. S obzirom da u provedenom istraživanju nije ustanovljena prediktivna valjanost razine Cho u prognozi bolesti, a da su naša ranija istraživanja pokazala prediktivnu vrijednost razine Cho kod konverzije depresivnog poremećaja u druge entitete,

vrijedilo bi nastaviti s longitudinalnim praćenjem razina neurometabolita uključujući razdoblja remisije, relapsa, povrata i konverzije depresivnog poremećaja. Ovim bi se pristupom pojasnilo postoji li prediktivna vrijednost razine Cho za konverziju u drugi psihijatrijski poremećaj i u razdoblju koje prethodi konverziji u drugi psihijatrijski poremećaj, naročito u bipolarni poremećaj.

9. Istraživanja Cho putem ¹H-MRS tijekom liječenja vrlo su malobrojna, jer je većina istraživanja bila usmjerena na razlike između bolesne i zdrave populacije. Objedinjavanjem istraživanja koja prate promjene metabolita tijekom terapijskih postupaka znatno bi se doprinijelo kvaliteti daljnjih istraživanja i smanjila vjerojatnost pogreške tipa I i tipa II koje se sada mogu često događati zbog malih uzoraka ispitanika, odnosno detaljnije bi se procijenila osjetljivost i specifičnost metode u objektivizaciji težine depresivnog poremećaja i terapijskog odgovara te procijenila prediktivna vrijednost metode.

8. Sažetak

Depresija je najčešći psihijatrijski poremećaj sa životnom prevalencijom od preko 10% i povezan je s visokom stopom suicida. Metoda prvog izbora farmakološkog liječenja unutar skupine antidepresiva su selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SIPPS), a terapijski odgovor se najčešće opaža tek nakon 4-6 tjedana. Nisu ustanovljeni pouzdani biološki markeri ranog prepoznavanja ili korelacije s kliničkim terapijskim odgovorom. Najčešće korištene ocjenske ljestvice u kliničkoj praksi su Montgomery-Åsbergova ljestvica (MADRS) i Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (HAM-D). Konzervativnim pristupom se pozitivnim terapijskim odgovorom smatra smanjenje ukupnog zbroja na MADRS od najmanje 50%.

Spektroskopija protonskom magnetskom rezonacijom (1H-MRS) je ne-ionizirajuća radiološka metoda koja omogućuje višekratne procjene u kraćem vremenskom razdoblju i jedina je metoda koja omogućuje *in vivo* prepoznavanje razina metabolita u mozgu.

Cilj je istraživanja bio prepoznati korelate kliničkog terapijskog odgovora kod depresije s parametrima mjerenim putem spektroskopije magnetskom rezonancijom, a posebno razine kolina (Cho) u amigdali (AMYG). Istraživanje je uključivalo i druge neurometabolite: N-acetil-aspartat (NAA), kompleks glutamin/glutamat/GABA koji se na 1H-MRS očituje kao Glx vrh, mioinozitol (MI) i kreatin (Cr) koji se zbog svoje relativne stabilne razine smatra referentnim parametrom za određivanje razine pojedinog metabolita. Uz AMYG, druga područja mozga od interesa (ROI) uključivala su dorzolateralni prefrontalni korteks (DLPFC), bazalne ganglije (BG), prednji cingularni korteks (ACC) i hipokampus (HIPPO). Istraživanje je provedeno na skupini od 59 ispitanika (36 žena i 23 muškarca) koji su u početku istraživanja udovoljavali kliničkim kriterijima depresivnog poremećaja prema DSM-IV, prosječne dobi od 29,4 godine (SD = 7,4), u rasponu od 18,4 godine do 42,5 godina. Mjerenja razina neurometabolita putem 1H-MRS na 3T učinjena su na početku istraživanja, prije započinjanja antidepresivne terapije, i nakon 8 tjedana liječenja.

U početnim razinama Cho u AMYG nisu ustanovljene značajne razlike između skupine ispitanika s pozitivnim terapijskim odgovorom i skupine kod koje nije postignut očekivani terapijski odgovor.

Analizom mješovitim linearnim modelom (LMM) ustanovljena je negativna korelacija razine Cho sa stupnjem depresivne simptomatike nakon 8 tjedana antidepresivne terapije SIPPS. LMM analiza upućuje na značajnu povezanost poboljšanja simptomatike mjerene promjenom

ukupnog zbroja na MADRS s efektima Cho (1.48, $p = 0.036$), vremena liječenja (-11.53, $p < 0.001$) i promjene Cho izražene interakcijom Cho i vremena istraživanja (-1.95, $p = 0.044$). Razina Cho na kraju istraživanja bila je značajno viša kod ispitanika kod kojih je postignut pozitivan terapijski odgovor.

Rezultati istraživanja upućuju da je razina Cho mjerena 1H-MRS objektivni korelat kliničke procjene terapijskog odgovora mjenog putem MADRS, uz značajan inter-individualni varijabilitet u razinama Cho. Razlike po spolu nisu opažene. Prediktivna valjanost Cho nije potvrđena.

Ponovljenim rezultatima na većim skupinama ispitanika, uz češća objektivna vrednovanja putem 1H-MRS i dužim longitudinalnim praćenjem, bilo bi moguće pouzdanije utvrditi korelacijski potencijal Cho mjenog 1H-MRS kao objektivnog parametra u praćenju terapijskog odgovora.

Ključne riječi: depresivni poremećaj, antidepresivi, 1H-spektroskopija magnetskom rezonancijom, kolin, NAA, amigdala, DLPFC

9. Abstract

Correlation of therapeutic response with changes in 1H-MRS findings in treatment of depression

Depression is the most common psychiatric disorder with a lifetime prevalence of over 10% and is a disorder associated with a high suicide rate. The method of first choice of pharmacological treatment within the group of antidepressants is selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI). The therapeutic response is usually observed only after 4-6 weeks. No reliable biological markers for early recognition or correlation with clinical therapeutic response have been established. The most commonly used rating scales in clinical practice are the Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) and the Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D). Conservatively, a positive therapeutic response is considered a reduction of the total sum on the MADRS of at least 50%.

Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) is a non-ionizing radiological method that enables multiple assessments in a shorter period of time and is the only method that allows *in vivo* recognition of metabolite levels in the brain.

The aim of the research was to identify the correlations of clinical therapeutic response in depression with parameters measured by magnetic resonance spectroscopy, and especially choline (Cho) levels in the amygdala (AMYG). The research also included other neurometabolites: N-acetyl-aspartate (NAA), the glutamine/glutamate/GABA complex which appears on 1H-MRS as a Glx peak, myoinositol (MI) and creatine (Cr), which is considered a reference for determining the level of an individual metabolite due to its relatively stable level parameter. In addition to the amygdala, other brain regions of interest (ROIs) included the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), basal ganglia (BG), anterior cingulate cortex (ACC), and hippocampus (HIPPO).

The research was conducted on a group of 59 subjects (36 women and 23 men) who, at the beginning of the study, met the clinical criteria for a depressive disorder according to DSM-IV, with an average age of 29.4 years ($SD = 7.4$), in the range of 18.4 years to 42.5 years. Neurometabolite levels were measured by 1H-MRS at 3T at the beginning of the study, before starting antidepressant therapy, and after 8 weeks of treatment.

No significant differences were found in the initial levels of Cho in AMYG between the group of subjects with a positive therapeutic response and the group in which the expected therapeutic response was not achieved.

A linear mixed models (LMM) analysis revealed a negative correlation of Cho level with the degree of depressive symptoms after 8 weeks of SSRI antidepressant therapy. LMM analysis indicates a significant association of improvement in symptoms measured by the change in the total score on the MADRS with the effects of Cho (1.48, $p = 0.036$), treatment time (-11.53, $p < 0.001$) and the change in Cho expressed by the interaction of Cho and research time (-1.95, $p = 0.044$). The level of Cho at the end of the study was significantly higher in subjects who achieved a positive therapeutic response.

Research results suggest that Cho level measured by 1H-MRS is an objective correlate of clinical assessment of therapeutic response measured by MADRS, with significant inter-individual variability in Cho levels. No gender differences were observed. The predictive validity of Cho has not been confirmed.

Repeated results on larger groups of subjects, with more frequent objective evaluations by 1H-MRS and longer longitudinal follow-up, would make it possible to more reliably determine the correlation potential of Cho measured by 1H-MRS as an objective parameter in monitoring the therapeutic response.

Keywords: depressive disorder, antidepressants, proton magnetic resonance spectroscopy, choline, NAA, amygdala, DCPFC

Petra Kalember, 2024.

10. Popis literature

- ¹ Ramel W, Goldin PR, Eyler LT, Brown GG, Gotlib IH, McQuaid JR. Amygdala reactivity and mood-congruent memory in individuals at risk for depression. *Bio Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):231-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.004.
- ² Zimmerman M, Posternak MA, Chelminski I. Defining remission on the Montgomery-Asberg depression rating scale. *J Clin Psychiatry*. 2004 Feb;65(2):163–8. doi: 10.4088/jcp.v65n0204.
- ³ Aripiprazole (Abilify): Depression, Major Depressive Disorder (MDD) [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2016 Nov [pristupljeno 21.07.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK409752/>
- ⁴ Müller MJ, Himmerich H, Kienzle B, Szegedi A. Differentiating moderate and severe depression using the Montgomery-Åsberg depression rating scale (MADRS). *J Affect Disord*. 2003 Dec;77(3):255–60. doi: 10.1016/s0165-0327(02)00120-9.
- ⁵ Carmody TJ, Rush AJ, Bernstein I, Warden D, Brannan S, Burnham D, i sur. The Montgomery Åsberg and the Hamilton ratings of depression: a comparison of measures. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006 Dec;16(8):601–11. doi: 10.1016/j.euroneuro.2006.04.008.
- ⁶ Davidson J, Turnbull CD, Strickland R, Miller R, Graves K. The Montgomery-Asberg Depression Scale: reliability and validity. *Acta Psychiatr Scand*. 1986 May;73(5):544–8. doi: 10.1111/j.1600-0447.1986.tb02723.x.
- ⁷ Maier W, Philipp M, Heuser I, Schlegel S, Buller R, Wetzel H. Improving depression severity assessment--I. Reliability, internal validity and sensitivity to change of three observer depression scales. *J Psychiatr Res*. 1988;22(1):3–12. doi: 10.1016/0022-3956(88)90022-2.
- ⁸ Undurraga J, Baldessarini RJ. Randomized, placebo-controlled trials of antidepressants for acute major depression: Thirty-year meta-analytic review. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Mar;37:851–64. doi: 10.1038/npp.2011.306.
- ⁹ Relf MV, Eisbach S, Okine KN, Ward T. Evidence-based clinical practice guidelines for managing depression in persons living with HIV. *J Assoc Nurses AIDS Care*. 2013 Jan-Feb;24(Suppl 1):S15-28. doi: 10.1016/j.jana.2012.05.007.

-
- ¹⁰ Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Geddes JR, Higgins JP, Churchill R, et al. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 2009 Feb 28;373(9665):746-58. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60046-5.
- ¹¹ Fantino B, Moore N, Verdoux H, Auray JP. Cost-effectiveness of escitalopram vs. citalopram in major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*. 2007;22(2):107-15.
- ¹² Kasper S, Lemming OM, de Swart H. Escitalopram in the long-term treatment of major depressive disorder in elderly patients. *Neuropsychobiology*. 2007 Mar;54(3):152-9. doi: 10.1097/YIC.0b013e3280128d16.
- ¹³ Kornstein SG, Bose A, Li D, Saikali KG, Gandhi C. Escitalopram maintenance treatment for prevention of recurrent depression: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2006 Nov;67(11):1767-75. doi: 10.4088/jcp.v67n1115.
- ¹⁴ Strekalova T, Gorenkova N, Schunk E, Dolgov O, Bartsch D. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behav Pharmacol*. 2006 May;17(3):271-87. doi: 10.1097/00008877-200605000-00008.
- ¹⁵ Arborelius L, Eklund MB. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*. 2007 Mar 16;145(2):738-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.007.
- ¹⁶ Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yücel M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord*. 2009 Sep;117(1-2):1-17. doi: 10.1016/j.jad.2008.11.021.
- ¹⁷ Lorenzetti V, Allen NB, Whittle S, Yücel M. Amygdala volumes in a sample of current depressed and remitted depressed patients and healthy controls. *J Affect Disord*. 2010 Jan;120(1-3):112-9. doi: 10.1016/j.jad.2009.04.021.
- ¹⁸ O'Rourke H, Fudge JL. Distribution of serotonin transporter labeled fibers in amygdaloid subregions: implications for mood disorder. *Bio Psychiatry*. 2006 Sep 1;60:479-90. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.020.
- ¹⁹ Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2002 Sep 1;52(5):404-12. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01404-x.

-
- ²⁰ Gelenberg A, Freeman M, Markowitz J, Rosenbaum J, Thase M, Trivedi M, i sur. Practice guideline for the treatment of patients with major depressive disorder [Internet]. 3. izd. Washington: American Psychiatric Association Publishing; 2010 [pristupljeno: 14.09.2023.] Dostupno na: https://psychiatryonline.org/pb/assets/raw/sitewide/practice_guidelines/guidelines/mdd.pdf
- ²¹ Bland RC, Newman SC, Orn H. Recurrent and nonrecurrent depression: A family study. *Arch Gen Psychiatry*. 1986 Nov;43:1085–9. doi: 10.1001/archpsyc.1986.01800110071009.
- ²² Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2000 Oct;157:1552–62. doi: 10.1176/appi.ajp.157.10.1552.
- ²³ Pettit JW, Lewinsohn PM, Roberts RE, Seeley JR, Monteith L. The long-term course of depression: Development of an empirical index and identification of early adult outcomes. *Psychol Med*. 2009 Mar;39:403–12. doi: 10.1017/S0033291708003851.
- ²⁴ Rosenblat JD, Lee Y, McIntyre RS. Does pharmacogenomic testing improve clinical outcomes for major depressive disorder? A systematic review of clinical trials and cost-effectiveness studies. *J Clin Psychiatry*. 2017 Jun;78:720–9. doi: 10.4088/JCP.15r10583.
- ²⁵ Lin JC, Gant N. *The Biochemistry of Choline*. U: Stagg C, Rothman D, ur. *Magnetic Resonance Spectroscopy*. Cambridge: Academic Press; 2014. Str. 104-10. doi: 10.1016/B978-0-12-401688-0.00008-2.
- ²⁶ Zeisel SH. *Choline and phosphatidylcholine*. U: Shils ME, ur. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins; 1999. Str: 513-23.
- ²⁷ Klein J, Gonzalez R, Koppen A, Loffelholz K. Free choline and choline metabolites in rat brain and body fluids: sensitive determination and implications for choline supply to the brain. *Neurochem Int*, 1993 Mar;22(3):293-300. doi: 10.1016/0197-0186(93)90058-d.
- ²⁸ Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998 [pristupljeno: 22.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/>

-
- ²⁹ Fischer LM, DaCosta KA, Kwock L, Stewart PW, Lu TS, Stabler SP, et al. Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1275-85. doi: 10.1093/ajcn/85.5.1275.
- ³⁰ Velazquez R, Ash JA, Powers BE, Kelley CM, Strawderman M, Luscher ZI, et al. Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult hippocampal neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis*. 2013 Oct;58:92-101. doi: 10.1016/j.nbd.2013.04.016.
- ³¹ Blusztajn JK, Mellott TJ. Neuroprotective Actions of Perinatal Choline Nutrition. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Mar 1;51(3):591-9. doi: 10.1515/cclm-2012-0635.
- ³² Blusztajn JK, Slack BE, Mellott TJ. Neuroprotective actions of dietary choline. *Nutrients*. 2017 Jul 28;9(8):815. doi: 10.3390/nu9080815.
- ³³ Fernstrom JD. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. *Lipids*. 1999 Feb;34(2):161-9. doi: 10.1007/s11745-999-0350-3.
- ³⁴ Glenn MJ, Gibson EM, Kirby ED, Mellott TJ, Blusztajn JK, Williams CL. Prenatal choline availability modulates hippocampal neurogenesis and neurogenic responses to enriching experiences in adult female rats. *Eur J Neurosci*. 2007 Apr;25(8):2473-82. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05505.x.
- ³⁵ Niculescu MD, Yamamuro Y, Zeisel SH. Choline availability modulates human neuroblastoma cell proliferation and alters the methylation of the promoter region of the cyclin-dependent kinase inhibitor 3 gene. *J Neurochem*. 2004 Jun;89(6):1252-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02414.x.
- ³⁶ Gatti G, Barzaghi N, Acuto G, Abbiati G, Fossati T, Perucca E. A comparative study of free plasma choline levels following intramuscular administration of L-alpha-glycerolphosphorylcholine and citicoline in normal volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1992 Sep;30(9):331-5.
- ³⁷ Barbagallo Sangiorgi G, Barbagallo M, Giordano M, Meli M, Panzarasa R. Alpha-Glycerophosphocholine in the mental recovery of cerebral ischemic attacks. An Italian multicenter clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Jun 30;717:253-69. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb12095.x.

-
- ³⁸ Scafidi S, Fiskum G, Lindauer SL, Bamford P, Shi D, Hopkins I, i sur. Metabolism of acetyl-l-carnitine for energy and neurotransmitter synthesis in the immature rat brain. *J Neurochem.* 2010;114:820-31.
- ³⁹ Parnetti L, Abate G, Bartorelli L, Cucinotta D, Cuzzupoli M, Maggioni M, i sur. Multicentre study of l-alpha-glyceryl-phosphorylcholine vs ST200 among patients with probable senile dementia of Alzheimer's type. *Drugs Aging.* 1993 Mar-Apr;3(2):159-64. doi: 10.2165/00002512-199303020-00006.
- ⁴⁰ Spiers PA, Myers D, Hochanadel GS, Lieberman HR, Wurtman RJ. Citicoline improves verbal memory in aging. *Arch Neurol.* 1996 May;53(5):441-8. doi: 10.1001/archneur.1996.00550050071026.
- ⁴¹ Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, Merboldt KD, Hänicke W, Sauter R. Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo. *Magn Reson Med.* 1989 Jan;9(1):79-93.
- ⁴² Kewitz H, Dross K, Pleul O. (1974). Choline and its Metabolic Successors in Brain. U: Genazzani E, Herken H, ur. *Central Nervous System.* Springer, Berlin, Heidelberg; 1974. Str. 21-32. doi.org/10.1007/978-3-642-65714-6_3
- ⁴³ Marsman G, von, Richthofen H, Bulder I, Lupu F, Hazelzet J, Luken BM, i sur. DNA and factor VII-activating protease protect against the cytotoxicity of histones. *Blood Adv.* 2017 Nov 30;1(26):2491-2502. doi: 10.1182/bloodadvances.2017010959.
- ⁴⁴ Bird A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA. *Science.* 2001 Dec 7;294(5549):2113-5. doi: 10.1126/science.1066726.
- ⁴⁵ Siegle GJ, Thompson W, Carter CS, Steinhauer SR, Thase ME. Increased amygdala and decreased dorsolateral prefrontal BOLD responses in unipolar depression related and independent features. *Biol Psychiatry.* 2007 Jan 15;61(2):198-209. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.048.
- ⁴⁶ Harmer CJ, Mackay CE, Reid CB, Cowen PJ, Goodwin GM. Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues. *Biol Psychiatry.* 2006 May 1;59(9):816-20. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.10.015.

-
- ⁴⁷ Caetano SC, Hatch JP, Brambilla P, Sassi RB, Nicoletti M, Mallinger AG, *i sur.* Anatomical MRI study of hippocampus and amygdala in patients with current and remitted major depression. *Psychiatry Res.* 2004 Dec 15;132(2):141-7. doi: 10.1016/j.psychresns.2004.08.002.
- ⁴⁸ Godlewska BR, Norbury R, Selvaraj S, Cowen PJ, Harmer CJ. Short-term SSRI treatment normalises amygdala hyperactivity in depressed patients. *Psychol Med.* 2012 Dec;42(12):2609-17. doi: 10.1017/S0033291712000591.
- ⁴⁹ Harmer CJ, Mackay CE, Reid CB, Cowen PJ, Goodwin GM. Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues. *Biol Psychiatry.* 2006 May 1;59(9):816-20. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.10.015.
- ⁵⁰ Inoue T, Li XB, Abekawa T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, *i sur.* Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *Eur J Pharmacol.* 2004 Aug 30;497(3):311-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.06.061.
- ⁵¹ Ruhe HG, Koster M, Booij J, van Herk M, Veltman DJ, Schene AH. Occupancy of serotonin transporters in the amygdala by paroxetine in association with attenuation of left amygdala activation by negative faces in major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2014 Feb 28; 221(2):155-61. doi: 10.1016/j.psychresns.2013.12.003.
- ⁵² Costafreda SG, McCann P, Saker P, Cole JH, Cohen-Woods S, Farmer AE, *i sur.* Modulation of amygdala response and connectivity in depression by serotonin transporter polymorphism and diagnosis. *J Affect Disord.* 2013 Aug 15;150(1):96-103. doi: 10.1016/j.jad.2013.02.028.
- ⁵³ Izumi T, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Koyama T. Target brain sites of the anxiolytic effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 18; 534(1-3):129-32. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.073.
- ⁵⁴ Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, Kugel H, Arolt V, Heindel W, *i sur.* Amygdala reactivity to masked negative faces is associated with automatic judgmental bias in major depression: a 3 T fMRI study. *J Psychiatry Neurosci.* 2007 Nov; 32(6): 423–9.
- ⁵⁵ Arnold JF, Zwiers MP, Fitzgerald DA, van Eijndhoven P, Becker ES, Rinck M, *i sur.* Fronto-limbic microstructure and structural connectivity in remission from major depression. *Psychiatry Res.* 2012 Oct 30;204(1):40-8. doi: 10.1016/j.psychresns.2012.07.010.

-
- ⁵⁶ Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):192-216. doi: 10.1038/npp.2009.104.
- ⁵⁷ Siegle GJ, Carter CS, Thase ME. Use of fMRI to predict recovery from unipolar depression with cognitive behavior therapy. *Am J Psychiatry*. 2006 Apr;163(4):735-8. doi: 10.1176/ajp.2006.163.4.735.
- ⁵⁸ Siegle GJ, Steinhauer SR, Thase ME, Stenger VA, Carter CS. Can't shake that feeling: event-related fMRI assessment of sustained amygdala activity in response to emotional information in depressed individuals. *Biol Psychiatry*. 2002 May 1;51(9):693-707. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01314-8.
- ⁵⁹ Ramel W, Goldin PR, Eyler LT, Brown GG, Gotlib IH, McQuaid JR. Amygdala reactivity and mood-congruent memory in individuals at risk for depression. *Bio Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):231-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.004.
- ⁶⁰ Abler B, Erk S, Herwig U, Walter H. Anticipation of aversive stimuli activates extended amygdala in unipolar depression. *J Psychiatr Res*. 2007 Sep;41:511-22. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.020.
- ⁶¹ Arnone D, McKie S, Elliott R, Thomas EJ, Downey D, Juhasz G, et al. Increased amygdala responses to sad but not fearful faces in major depression: relation to mood state and pharmacological treatment. *Am J Psychiatry*. 2012 Aug;169(8):841-50. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.11121774.
- ⁶² Grotegerd D, Stuhrmann A, Kugel H, Schmidt S, Redlich R, Zwanzger P, et al. Amygdala excitability to subliminally presented emotional faces distinguishes unipolar and bipolar depression: An fMRI and pattern classification study. *Hum Brain Mapp*. 2014 Jul;35(7):2995-3007. doi: 10.1002/hbm.22380.
- ⁶³ Moore WE 3rd, Pfeifer JH, Masten CL, Mazziotta JC, Iacoboni M, Dapretto M. Facing puberty: associations between pubertal development and neural responses to affective facial displays. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2012 Jan;7(1):35-43. doi: 10.1093/scan/nsr066.
- ⁶⁴ Thomas KM, Drevets WC, Dahl RE, Ryan ND, Birmaher B, Eccard CH, et al. Amygdala response to fearful faces in anxious and depressed children. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1057-63. doi: 10.1001/archpsyc.58.11.1057.

-
- ⁶⁵ Gaffrey MS, Barch DM, Singer J, Shenoy R, Luby JL. Disrupted amygdala reactivity in depressed 4- to 6-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2013 Jul;52(7):737-46. doi: 10.1016/j.jaac.2013.04.009.
- ⁶⁶ Pagliaccio D, Luby JL, Gaffrey MS, Belden AC, Botteron KN, Harms MP, i sur. Functional brain activation to emotional and nonemotional faces in healthy children: evidence for developmentally undifferentiated amygdala function during the school-age period. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2013 Dec;13(4):771-89. doi: 10.3758/s13415-013-0167-5.
- ⁶⁷ Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D. REM sleep dysregulation in depression: State of the art. *Sleep Med. Rev.* 2013 Oct;17:377–90. doi: 10.1016/j.smrv.2012.11.001.
- ⁶⁸ Kang SG, Cho SE. Neuroimaging Biomarkers for Predicting Treatment Response and Recurrence of Major Depressive Disorder. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 20;21(6):2148. doi: 10.3390/ijms21062148.
- ⁶⁹ Drost DJ, Riddle WR, Clarke GD; AAPM MR Task Group #9. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: report of AAPM MR Task Group #9. *Med Phys*. 2002 Sep;29(9):2177-97. doi: 10.1118/1.1501822.
- ⁷⁰ Novotny E, Ashwal S, Shevell M. Proton magnetic resonance spectroscopy: an emerging technology in pediatric neurology research. *Pediatr Res*. 1998 Jul;44(1):1-10. doi: 10.1203/00006450-199807000-00001.
- ⁷¹ Caverzasi E, Pichiecchio A, Poloni GU, Calligaro A, Pasin M, Palesi F, Castellazzi G, Pasquini M, Biondi M, Barale F, Bastianello S. Magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of treatment efficacy in unipolar major depressive disorder: a review of the literature. *Funct Neurol*. 2012 Jan-Mar;27(1):13-22.
- ⁷² Ross B, Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat Rec*. 2001 Apr;265(2):54-84. doi: 10.1002/ar.1058.
- ⁷³ Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti M, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, i sur. 1H Magnetic resonance spectroscopy study of dorsolateral prefrontal cortex in unipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res*. 2005 Feb 28;138(2):131-9. doi: 10.1016/j.psychres.2004.12.001.

-
- ⁷⁴ Yildiz-Yesiloglu A, Ankerst DP. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: A meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2006 Jun 30;147(1):1-25. doi: 10.1016/j.psychres.2005.12.004.
- ⁷⁵ Glunde K, Serkova N J. Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipid metabolism. *Pharmacogenomics.* 2006 Oct;7(7):1109-23. doi: 10.2217/14622416.7.7.1109.
- ⁷⁶ Barker PB, Breiter SN, Soher BJ, Chatham JC, Forder JR, Samphilipo MA, et al. Quantitative proton spectroscopy of canine brain: in vivo and in vitro correlations. *Magn Reson Med.* 1994 Aug;32(2):157-63. doi: 10.1002/mrm.1910320202.
- ⁷⁷ Miller BL, Chang L, Booth R, Ernst T, Cornford M, Nikas D, et al. In vivo 1H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology. *Life Sci.* 1996;58(22):1929-35. doi: 10.1016/0024-3205(96)00182-8.
- ⁷⁸ Ross AJ, Sachdev PS. Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res Rev.* 2004 Mar;44(2-3):83-102. doi: 10.1016/j.brainresrev.2003.11.001.
- ⁷⁹ Petroff OA. Biological 1H NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B.* 1988;90(2):249-60.
- ⁸⁰ Naudi A, Cabré R, Jové M, et al. Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int Rev Neurobiol.* 2015;122:133-89. doi: 10.1016/bs.irm.2015.05.008.
- ⁸¹ Svennerholm L, Vanier MT, Jungbjer B. Changes in fatty acid composition of human brain myelin lipids during maturation. *J Neurochem.* 1978 Jun;30(6):1383-90. doi: 10.1111/j.1471-4159.1978.tb10470.x.
- ⁸² Tucek S. Acetylcoenzyme A and the synthesis of acetylcholine in neurones: review of recent progress. *Gen Physiol Biophys.* 1983 Aug;2(4):313-24.
- ⁸³ Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Apr 14;1212(1):26-42. doi: 10.1016/0005-2760(94)90186-4.
- ⁸⁴ Obergruesser T, Ende G, Braus DF. Long-term follow-up of magnetic resonance-detectable choline signal changes in the hippocampus of patients treated with electroconvulsive therapy. *J Clin Psychiatry.* 2003 Jul;64(7):775-80. doi: 10.4088/jcp.v64n0706.

-
- ⁸⁵ Wang Y, Jia Y, Xu G, Ling X, Liu S, Huang L. Frontal white matter biochemical abnormalities in first-episode, treatment-naive patients with major depressive disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Affect Disord*. 2012 Feb;136(3):620-6. doi: 10.1016/j.jad.2011.10.020.
- ⁸⁶ Fuchs E, Czeh B, Kole MHP, Michaelis T, Lucassen PJ. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2004 Dec;14(Suppl 5):S481-90. doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.09.002.
- ⁸⁷ Sartorius A, Neumann-Haefelin C, Vollmayr B, Hoehn M, Henn FA. Choline rise in the rat hippocampus induced by electroconvulsive shock treatment. *Biol Psychiatry*. 2003 Apr 1;53(7):620-3. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01600-1.
- ⁸⁸ Renshaw PF, Lafer B, Babb SM, Fava M, Stoll AL, Christensen JD, et al. Basal ganglia choline levels in depression and response to fluoxetine treatment: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry*. 1997 Apr 15;41(8):837-43. doi: 10.1016/S0006-3223(96)00256-9.
- ⁸⁹ Milne A, MacQueen GM, Yucel K, Soreni N, Hall GB. Hippocampal metabolic abnormalities at first onset and with recurrent episodes of a major depressive disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroimage*. 2009 Aug 1;47(1):36-41. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.03.031.
- ⁹⁰ Moore GJ, Galloway MP. Magnetic resonance spectroscopy: neurochemistry and treatment effects in affective disorders. Review. *Psychopharmacol Bull*. 2002 Spring;36(2):5-23.
- ⁹¹ Kusumakar V, MacMaster FP, Gates L, Sparkes SJ, Khan SC. Left medial temporal cytosolic choline in early onset depression. *Can J Psychiatry*. 2001 Dec;46(10):959-64. doi: 10.1177/070674370104601009.
- ⁹² Steingard RJ, Yurgelun-Todd DA, Hennen J, Moore JC, Moore CM, Vakili K, et al. Increased orbitofrontal cortex levels of choline in depressed adolescents as detected by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry*. 2000 Dec 1;48(11):1053-61. doi: 10.1016/s0006-3223(00)00942-2.
- ⁹³ Yang XR, Langevin LM, Jaworska N, Kirton A, Lebel RM, Harris AD, et al. Proton spectroscopy study of the dorsolateral prefrontal cortex in youth with familial depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016 Jul;70(7):269-77. doi: 10.1111/pcn.12392.

-
- ⁹⁴Husarova V, Bittsanky M, Ondrejka I, Kerna V, Dobrota D. Hippocampal neurometabolite changes in depression treatment: a (1)H magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res.* 2012 Mar 31;201(3):206-13. doi: 10.1016/j.psychresns.2011.07.006.
- ⁹⁵ Chen CS, Chiang IC, Li CW, Lin WC, Lu CY, Hsieh TJ, i sur. Proton magnetic resonance spectroscopy of late-life major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2009 Jun 30;172(3):210-4. doi: 10.1016/j.psychresns.2009.01.003.
- ⁹⁶ Elderkin-Thompson V, Thomas MA, Binesh N, Mintz J, Haroon E, Dunkin JJ, i sur. Brain metabolites and cognitive function among older depressed and healthy individuals using 2D MR spectroscopy. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Dec;29(12):2251-7. doi: 10.1038/sj.npp.1300553.
- ⁹⁷ Loening NM, Chamberlin AM, Zepeda AG, Gonzalez RG, Cheng LL. Quantification of phosphocholine and glycerophosphocholine with 31P edited 1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 2005 Nov;18(7):413-20. doi: 10.1002/nbm.973.
- ⁹⁸ Glunde K, Jacobs MA, Bhujwala ZM. Choline metabolism in cancer: implications for diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006 Nov;6(6):821-9. doi: 10.1586/14737159.6.6.821.
- ⁹⁹ Kousi E, Tsougos I, Eftychi K. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of the Central Nervous System. U: Fountas K, ur. *Novel Frontiers of Advanced Neuroimaging.* InTech [Internet]. 2013 [pristupljeno 12.06.2023.] Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/53892>
- ¹⁰⁰ Chang L, Ernst T, Poland RE, Jenden DJ. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the normal aging human brain. *Life Sci.* 1996;58(22):2049-56. doi: 10.1016/0024-3205(96)00197-x.
- ¹⁰¹ Mirza Y, Tang J, Russell A, Banerjee SP, Bhandari R, Ivey J, i sur. Reduced anterior cingulate cortex glutamatergic concentrations in childhood major depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2004 Mar;43(3):341-8. doi: 10.1097/00004583-200403000-00017.
- ¹⁰² Auer DP, Pütz B, Kraft E, Lipinski B, Schill J, Holsboer F. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry.* 2000 Feb 15;47(4):305-13. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00159-6.

-
- ¹⁰³ Kumar A, Thomas A, Lavretsky H, Yue K, Huda A, Curran J, i sur. Frontal white matter biochemical abnormalities in late-life major depression detected with proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 2002 Apr;159(4):630-6. doi: 10.1176/appi.ajp.159.4.630.
- ¹⁰⁴ Scotti-Muzzi E, Umla-Runge K, Soeiro-de-Souza MG. Anterior cingulate cortex neurometabolites in bipolar disorder are influenced by mood state and medication: A meta-analysis of 1H-MRS studies. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2021 Jun;47:62-73. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.01.096.
- ¹⁰⁵ Kantarci K, Jack CR Jr. Neuroimaging in Alzheimer disease: an evidence-based review. *Neuroimaging Clin N Am*. 2003 Nov;13(4):197-209. doi: 10.1016/s1052-5149(03)00025-x.
- ¹⁰⁶ Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci*. 1993;15(3-5):289-98. doi: 10.1159/000111347.
- ¹⁰⁷ Sturrock A, Laule C, Decolongon J, Dar Santos R, Coleman AJ, Creighton S, i sur. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease. *Neurology*. 2010 May 25;75(21):1702-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181fc27e4.
- ¹⁰⁸ Vrenken H, Barkhof F, Uitdehaag BM, Castelijns JA, Polman CH, Pouwels PJ. MR spectroscopic evidence for glial increase but not for neuro-axonal damage in MS normal-appearing white matter. *Magn Reson Med*. 2005 Feb;53(2):256-66. doi: 10.1002/mrm.20366.
- ¹⁰⁹ Bustillo JR, Rowland LM, Jung R, Brooks WM, Qualls C, Hammond R, i sur. Proton magnetic resonance spectroscopy during initial treatment with antipsychotic medication in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jul;33(8):1656-66. doi: 10.1038/sj.npp.1301631.
- ¹¹⁰ Rosenberg DR, Mirza Y, Russell A, Tang J, Smith JM, Banerjee SP, i sur. Reduced anterior cingulate glutamatergic concentrations in childhood OCD and major depression versus healthy controls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004 Sep;43(9):1146-53. doi: 10.1097/01.chi.0000132812.44664.2d.
- ¹¹¹ Perlov E, Philipsen A, Matthies S, Drieling T, Maier S, Bubl E, i sur. Spectroscopic findings in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a review and meta-analysis. *World J Biol Psychiatry*. 2009;10(4 Pt 2):355-65. doi: 10.1080/15622970802176032.

-
- ¹¹² Ulus IH, Wurtman RJ, Mauron C, Blusztajn JK. Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res.* 1989 Sep 5;484(1-2):217-27. doi: 10.1016/0006-8993(89)90364-8.
- ¹¹³ Salvatore G, Cornwell BR, Colon-Rosario V, Coppola R, Grillon C, Zarate CA Jr, i sur. Increased anterior cingulate cortical activity in response to fearful faces: a neurophysiological biomarker that predicts rapid antidepressant response to ketamine. *Biol Psychiatry.* 2009 Apr 15;65(8):289-95. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.08.014.
- ¹¹⁴ American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.
- ¹¹⁵ Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, i sur. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry.* 1998;59 Suppl 20:22-33;quiz 34-57.
- ¹¹⁶ 63. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960; 12: 56-62. doi: 10.1136/jnnp.23.1.56.
- ¹¹⁷ Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 1979; 134:382-9. doi: 10.1192/bjp.134.4.382.
- ¹¹⁸ Sonawalla S, Renshaw PF, Moore C, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum JF, i sur. Compounds containing cytosolic choline in basal ganglia: a potential biological marker of true drug response to fluoxetine. *Am J Psychiatry.* 1999Oct;156(10):1638-40. doi: 10.1176/ajp.156.10.1638.
- ¹¹⁹ Steffens DC, Krishnan KR, Helms MJ. Are SSRIs better than TCAs? Comparison of SSRIs and TCAs: a meta-analysis. *Depress Anxiety.* 1997;6(1):10-8. doi: 10.1002/(sici)1520-6394(1997)6:1<10::aid-da2>3.0.co;2-9.
- ¹²⁰ Pinheiro JC, Bates DM, ur. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. New York: Springer; 2000. Str. 528. doi.org/10.1007/b98882.
- ¹²¹ La PL, Bell TK, Craig W, Doan Q, Beauchamp MH, Zemek R, i sur. Comparison of different approaches to manage multi-site magnetic resonance spectroscopy clinical data analysis. *Front Psychol.* 2023; 14:1130188. doi: 10.3389/fpsyg.2023.1130188.

-
- ¹²² Fortin J-P. ComBat Harmonization. GitHub, Inc., 2023 [pristupljeno: 29.10.2023.].
Dostupna: <https://github.com/Jfortin1/ComBatHarmonization/tree/master>
- ¹²³ Gajdošík M, Landheer K, Swanberg KM, Juchem C. (2021). INSPECTOR: Free software for magnetic resonance spectroscopy data inspection, processing, simulation and analysis. *Sci Rep.* 2021 Jan 22;11(1), 2094. doi: 10.1038/s41598-021-81193-9.
- ¹²⁴ Hamaker EL, Muthén B. The fixed versus random effects debate and how it relates to centering in multilevel modeling. *Psychol Methods.* 2020 Jun;25(3):365-79. doi: 10.1037/met0000239.
- ¹²⁵ Clarke R, Collins R, Lewington S, Donald AE, Alftan G, Tuomilehto J, i sur. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002 Oct;288(16):2015-22. doi: 10.1001/jama.288.16.2015.
- ¹²⁶ Sabah B, Arshad J, Bilal M, Sanauulah, Ume H, Quratulain R, i sur. Metabolic evaluation of brain tumor using magnetic resonance spectroscopy. *Materials Today: Proceedings.* 2020; 47. doi: 10.1016/j.matpr.2020.04.646.
- ¹²⁷ Harris JL, Yeh HW, Swerdlow RH, Choi IY, Lee P, Brooks WM. High-field proton magnetic resonance spectroscopy reveals metabolic effects of normal brain aging. *Neurobiol Aging.* 2014 Jul;35(7):1686-94. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.018.
- ¹²⁸ Strózik-Kotlorz, D. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Phys. Part. Nuclei.* 2014;45:347–8. doi: 10.1134/S1063779614010997.
- ¹²⁹ Anania C, Gustafsson T, Hua X, Su J, Vikström M, de Faire U, i sur. Increased prevalence of vulnerable atherosclerotic plaques and low levels of natural IgM antibodies against phosphorylcholine in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R214. doi: 10.1186/ar3193.
- ¹³⁰ Frostegård J. Low level natural antibodies against phosphorylcholine: a novel risk marker and potential mechanism in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Clin Immunol.* 2010 Jan;134(1):47-54. doi: 10.1016/j.clim.2009.08.013.
- ¹³¹ Toenders YJ, Laskaris L, Davey CG, Berk M, Milaneschi Y, Lamers F, i sur. Inflammation and depression in young people: a systematic review and proposed inflammatory pathways. *Mol Psychiatry.* 2022 Jan;27(1):315-327. doi: 10.1038/s41380-021-01306-8.

-
- ¹³² Braga J, Lepra M, Kish SJ, Rusjan PM, Nasser Z, Verhoeff N, i sur. Neuroinflammation After COVID-19 With Persistent Depressive and Cognitive Symptoms. *JAMA Psychiatry*. 2023;80(8):787–95. doi:10.1001/jamapsychiatry.2023.1321.
- ¹³³ Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46-56. doi: 10.1038/nrn2297.
- ¹³⁴ Meyer JH, Cervenka S, Kim MJ, Kreisl WC, Henter ID, Innis RB. Neuroinflammation in psychiatric disorders: PET imaging and promising new targets. *Lancet Psychiatry*. 2020 Dec;7(12):1064-74. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30255-8.
- ¹³⁵ Attwells S, Setiawan E, Wilson AA, Rusjan PM, Mizrahi R, Miler L, i sur. Inflammation in the Neurocircuitry of Obsessive-Compulsive Disorder. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(8):833–40. doi:10.1001/jamapsychiatry.2017.1567.
- ¹³⁶ Gaubert M, Lange C, Garnier-Crussard A, Köbe T, Bougacha S, Gonneaud J, i sur. Topographic patterns of white matter hyperintensities are associated with multimodal neuroimaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2021 Jan 18;13(1):29. doi: 10.1186/s13195-020-00759-3.
- ¹³⁷ Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jan;8(1):57-69. doi: 10.1038/nrn2038.
- ¹³⁸ Gerber J, Redlich S, Ribes S, Tauber SC, Schmidt H, Nau R. Intrathecal treatment with the anti-phosphorylcholine monoclonal antibody TEPC-15 decreases neuronal damage in experimental pneumococcal meningitis. *Chemotherapy*. 2012;58(3):212-6. doi: 10.1159/000337287.
- ¹³⁹ Riley CA, Renshaw PF. Brain choline in major depression: A review of the literature. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2018 Jan 30;271:142-153. doi: 10.1016/j.pscychresns.2017.11.009.
- ¹⁴⁰ Henigberg N, Savić A, Radoš M, Radoš M, Šarac H, Šečić A, Bajš Janović M, Foro T, Ozretić D, Erdeljić Turk V, Hrabač P, Kalember P. Choline elevation in amygdala region at recovery indicates longer survival without depressive episode: a magnetic resonance spectroscopy study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021 May;238(5):1303-1314. doi: 10.1007/s00213-019-05303-2.

¹⁴¹ Henigsberg N, Savić A, Radoš M, Šarac H, Radoš M, Ozretić D, Bajš Janović M, Erdeljić Turk V, Šečić A, Kalember P, Hrabač P. Choline and N-acetyl aspartate levels in the dorsolateral prefrontal cortex at the beginning of the recovery phase as markers of increased risk for depressive episode recurrence under different duration of maintenance therapy and after it: a retrospective cohort study. *Croat Med J*. 2018 Oct 31;59(5):244-252. doi: 10.3325/cmj.2018.59.244.

¹⁴² Henigsberg N, Šarac H, Radoš M, Radoš M, Ozretić D, Foro T, Erdeljić Turk V, Hrabač P, Bajš Janović M, Rak B, Kalember P. Lower Choline-Containing Metabolites/Creatine (Cr) Rise and Failure to Sustain NAA/Cr Levels in the Dorsolateral Prefrontal Cortex Are Associated with Depressive Episode Recurrence under Maintenance Therapy: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Retrospective Cohort Study. *Front Psychiatry*. 2017 Dec 13;8:277. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00277.

¹⁴³ Yang XR, Langevin LM, Jaworska N, Kirton A, Lebel RM, Harris AD, Jasoui Y, Wilkes TC, Sembo M, Swansburg R, MacMaster FP. Proton spectroscopy study of the dorsolateral prefrontal cortex in youth with familial depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016 Jul;70(7):269-77. doi: 10.1111/pcn.12392.

¹⁴⁴ Ende G, Demirakca T, Walter S, Wokrina T, Sartorius A, Wildgruber D, Henn FA. Subcortical and medial temporal MR-detectable metabolite abnormalities in unipolar major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2007 Feb;257(1):36-9. doi: 10.1007/s00406-006-0680-4.

¹⁴⁵ Demirkan A, Isaacs A, Ugocsai P, Liebisch G, Struchalin M, Rudan I, Wilson JF, Pramstaller PP, Gyllensten U, Campbell H, Schmitz G, Oostra BA, van Duijn CM. Plasma phosphatidylcholine and sphingomyelin concentrations are associated with depression and anxiety symptoms in a Dutch family-based lipidomics study. *J Psychiatr Res*. 2013 Mar;47(3):357-62. doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.11.001.

¹⁴⁶ Depciuch J, Sowa-Kućma M, Misztak P, Szewczyk B, Nowak G, Pankiewicz P, Parlińska-Wojtan M. Olfactory bulbectomy-induced changes in phospholipids and protein profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. A preliminary study using a FTIR spectroscopy. *Pharmacol Rep*. 2016 Jun;68(3):521-8. doi: 10.1016/j.pharep.2015.12.005.

¹⁴⁷ Henigsberg N. Prepoznavanje neurostrukturalnih, neurofunkcionalnih, kognitivnih i bihevioralnih pokazatelja zahvaćenosti mozga u COVID-19 i pokazatelji ishoda tijekom

longitudinalnog praćenja [Internet]. Hrvatska zaklada za znanost [pristupljeno 8.10.2023.].
Dostupno na: <https://hrzz.hr/rezultati-natjecaja-ip-corona-2020-12/>

¹⁴⁸ Mazza MG, Palladini M, Poletti S, Benedetti F. Post-COVID-19 Depressive Symptoms: Epidemiology, Pathophysiology, and Pharmacological Treatment. *CNS Drugs*. 2022 Jul;36(7):681-702. doi: 10.1007/s40263-022-00931-3.

¹⁴⁹ Villarreal-Zegarra D, Paredes-Angeles R, Mayo-Puchoc N, Vilela-Estada AL, Copez-Lonzoy A, Huarcaya-Victoria J. An explanatory model of depressive symptoms from anxiety, post-traumatic stress, somatic symptoms, and symptom perception: the potential role of inflammatory markers in hospitalized COVID-19 patients. *BMC Psychiatry*. 2022 Oct 10;22(1):638. doi: 10.1186/s12888-022-04277-4.

¹⁵⁰ Henigsberg N, Kalember P, Petrović ZK, Šečić A. Neuroimaging research in posttraumatic stress disorder - Focus on amygdala, hippocampus and prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Mar 2;90:37-42. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.003.

¹⁵¹ Klein J. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm (Vienna)*. 2000;107(8-9):1027-63. doi: 10.1007/s007020070051.

11. Životopis

Petra Kalember je rođena 15. lipnja 1997. godine u Zagrebu. Nakon završene VII. Gimnazije u Zagrebu, upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te diplomirala 2002. godine. Stručni staž je odradila u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“. Nakon položenog stručnog ispita 2004. godine postaje suradnik na FP6 projektu Europske komisije „Genome-based therapeutic drugs for depression“ (GENDEP) na Poliklinici Neuron pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Godine 2006. se zapošljava na Poliklinici Neuron kao specijalizant psihijatrije, od 2010. godine radi kao specijalist psihijatrije, a 2021. godine polaže ispit iz uže specijalizacije biologijske psihijatrije. U svojem stručnom radu sudjeluje u provođenju kliničkih ispitivanja s indikacijama iz kruga psihijatrijskih poremećaja, a u znanstvenom radu djeluje kao suradnik na projektima odobrenima od Ministarstva znanosti, Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatske zaklade za znanost.