

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Katarina Z. Simić

**Metabolomičko ispitivanje biomarkera u serumu obolelih od shizofrenije i bipolarnog afektivnog poremećaja**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.



UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Katarina Z. Simić

# **Metabolomic serum biomarkers study of patients with schizophrenia and bipolar disorder**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.





## Mentori:

---

dr Vele Tešević,  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

---

dr Boris Mandić,  
viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

## Članovi komisije:

---

dr Snežana Trifunović  
naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

---

dr Ljubodrag Vujisić,  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

---

dr Gordana Krstić,  
docent, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

---

dr Zoran Miladinović,  
naučni savetnik, Institut za opštu i fizičku hemiju

---

dr Milka Jadranin,  
naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju –  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

dr Nataša Avramović,  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

dr Čedo Miljević,  
docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2024.



## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija izrađena je pri katedri za Organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu i Centra za Hemiju IHTM.*

*Mentorima, redovnom profesoru dr Veletu Teševiću i višem naučnom saradniku Borisu Mandiću, zahvaljujem se na predlogu ovako interesantne teme, ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći i korisnim savetima prilikom izrade ove disertacije.*

*Veliko hvala dugujem svim članovima komisije, dr Snežani Trifunović, dr Ljubodragu Vujisiću, dr Gordani Krstić, dr Zoranu Miladinoviću, dr Milki Jadranin, dr Nataši Avramović i dr Čedi Miljeviću, koji su uložili svoje vreme za čitanje i ispravke disertacije i svojim komentarima omogućili kvalitetniji izgled ove disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem dr Snežani Trifunović na velikoj pomoći i divnoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije. Dr Zoran Miladinoviću dugujem veliku zahvalnost za svo preneto znanje iz oblasti hemometrije.*

*Dr Aleksandri Gavrilović se zahvaljujem na lepoj saradnji i veoma korisnim savetima.*

*Akademiku profesoru dr Slobodanu Milosavljeviću se zahvaljujem na svim savetima i pomoći toku izrade ove disertacije, kao i na savetima i pomoći koju sam dobila prilikom držanja vežbi.*

*Dr Dejanu Gođevcu dugujem veliku zahvalnost što me je uveo u svet metabolomike još za vreme mog diplomskog rada na ovom odeljenju.*

*Kolegama iz centra za instrumentalnu analizu, Marini Todosijević, dr Jovani Stanković Jeremić, dr Mirjani Cvetković, dr Miroslavu Novakoviću, dr Nini Todorović, Dejanu Vučetiću, zahvaljujem se na saradnji i spremnosti da uvek pomognu u svakoj prilici. Posebnu zahvalnost dugujem i najmlađim kolegama Stefanu i Danici.*

*Kolegama, a pre svega mojim prijateljima dr Iris Đorđević, tetki, dr Bobanu Anđelkoviću, mom npzu, dr Ivani Sofrenić, mom bffu i Jovani Ljujić, malo, se zahvaljujem na neizmernoj podršci, osloncu i trenucima ispunjenim smehom. Pored toga što sam dosta naučila od svih Vas, rad sa Vama omogućio mi je da svaku prepreku mnogo lakše prebrodim. Hvala Vam.*

*Acknowledgment: This work was funded by the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), (Project Account No: L/ICA/ICB-217652/18 and L/ICA/ICB-108/21).*

*Neveni, kumi Milici, Ivani, Nikoli, sestri Sandri, sam neizmerno zahvalna na divnim, zajedničkim trenucima, poverenju koje su mi pružili, zbog kojih je ovaj put bio znatno olakšan. Srećna sam što ste moji prijatelji.*

*Stefanu hvala na divno provedenim zajedničkim trenucima, na svim savetima i sugestijama koje su me načinile jačom osobom. Takođe, hvala ti na učestvovanju prilikom izrade ove disertacije i pomoći pri rešavanju svakog problema.*

*Mojoj najdražoj Mariji se neizmerno zahvaljujem što je uvek bila moj oslonac, pravi prijatelj i saučesnik u svakom zločinu. Maki, jedan pasus nije dovoljan za sve što želim reći, pa ću završiti sa, velika je čast i privilegija imati tebe kao prijatelja.*

*I na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami Božici i tati Zoranu, kao i bratu Aleksandru. Hvala na nesebičnoj ljubavi i podršci koju mi pružate, što ste me uvek gurali napred i niste dozvolili da posustanem.*

*Mojoj teški se zahvaljujem na svu pruženu ljubav i srećno detinjstvo, žao mi je što nisi tu da ovo zajedno proživimo.*

*Put do ove doktorske disertacije nije bio nimalo lagan, ali je na kraju to bilo jedno divno putovanje na kome sam srela izuzetne ljude, saradnike i prijatelje. Hvala svima koji su bili uz mene na tom putovanju.*

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima. Gotovo je!!*

*Autor*

*Beograd, 2024.*



# **Metabolomičko ispitivanje biomarkera u serumu obolelih od shizofrenije i bipolarnog afektivnog poremećaja**

## **SAŽETAK**

U skladu sa ciljem doktorske disertacije razvijena je metoda za metabolomičko utvrđivanje serumskih biomarkera zasnovana na NMR spektroskopiji i hemometrijskoj analizi. Utvrđeni su setovi potencijalnih serumskih biomarkera za shizofreniju, bipolarni poremećaj i razlikovanje ova dva mentalna oboljenja. Hemometrijskom analizom 1D NOESY spektralnih podataka seruma obolelih i zdravih osoba (kontrolna grupa) konstruisani su PCA i OPLSA-DA modeli i utvrđene su promenljive za razdvajanje ispitivanih grupa uzoraka. Identifikacija metabolita, potencijalnih biomarkera na osnovu hemometrijske analize je urađena analizom podataka dobijenih 2D NMR eksperimentima. Utvrđeno je 26 serumskih biomarkera za shizofreniju, 22 biomarkera za bipolarni poremećaj i 5 biomarkera za razlikovanje ova dva oboljenja. Četiri nova potencijalna biomarkera (aspartat/asparaginska kiselina, lizin, 2-hidroksibuterna kiselina i acilgliceroli) za shizofreniju, šest biomarkera (treonin, aspartat,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, 2-hidroksibuterna kiselina, serin i manoz) za bipolarni poremećaj i pet biomarkera ( $\gamma$ -aminobuterna kiselina, valin, glicerol, glukoza i manoz) za razlikovanje ovih oboljenja je utvrđeno prvi put NMR analizom. Prisustvo 16 potencijalnih biomarkera za shizofreniju i 15 biomarkera za bipolarni poremećaj je potvrđeno GC-MS analizom seruma obolelih od ovih bolesti.

**Ključne reči:** shizofrenija, bipolarni poremećaj, serum, metaboliti, biomarkeri, hemometrija, NMR spektroskopija, GC-MS

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Organska hemija

**UDK broj:** 547



## Metabolomic serum biomarkers study of patients with schizophrenia and bipolar disorder

### ABSTRACT

In accordance with the goal of this doctoral dissertation, a method based on metabolomics for the determination of serum biomarkers was developed using NMR spectroscopy and chemometric analysis. Sets of potential serum biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder were determined, as well as a set of biomarkers for distinguishing these two mental illnesses. Chemometric analysis of 1D NOESY NMR spectral data of serum obtained from sick and healthy people (control group) was used to create the PCA and OPLSA-DA models. Variables for separation of the serum samples from the two tested groups were detected. Identification of metabolites and potential biomarkers based on detected variables was performed by analysing data obtained by 2D NMR experiments. Twenty-six serum biomarkers for schizophrenia, twenty-two biomarkers for bipolar disorder, and five biomarkers for differentiating these two diseases were identified. For the first time, NMR analysis provided four new potential biomarkers for schizophrenia (aspartate/aspartic acid, lysine, 2-hydroxybutyric acid, and acylglycerols), six biomarkers for bipolar disorder (threonine, aspartate,  $\gamma$ -aminobutyric acid, 2-hydroxybutyric acid, serine, and mannose), and five biomarkers for differentiating these diseases ( $\gamma$ -aminobutyric acid, valine, glycerol, glucose and mannose). The presence of sixteen potential biomarkers for schizophrenia and fifteen biomarkers for bipolar disorder was confirmed by GC-MS analysis of patient' serum.

**Keywords:** schizophrenia; bipolar disorder; serum; metabolites; biomarkers; chemometrics; NMR spectroscopy; GC-MS;

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Organic chemistry

**UDC number:** 547





## LISTA SKRAĆENICA

**<sup>1</sup>H NMR** - <sup>1</sup>H nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

**BMI** – Indeks telesne mase (eng. Body mass index)

**CE-TOF/MS** – Kapilarna elektroforeza kombinovana sa masenom spektrometrijom sa analizatorom koji meri vreme preleta (eng. Capillary electrophoresis-mass spectrometry)

**COSY** – Korelisana spektroskopija (eng. Correlated Spectroscopy)

**CV** – Unakrsna validacija (eng. Cross-validation)

**D<sub>2</sub>O** – Deuterisana voda

**FT-IR** – Infracrvena spektroskopija sa Fourijeovom transformacijom (eng. Fourier transform infrared spectroscopy)

**GC-MS** – Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. Gas chromatography-mass spectrometry)

**HMBC** – Heteronuklearna korelacija višestrukih veza (eng. Heteronuclear Multiple Bond Coherence)

**HSQC** – Direktna heteronuklearna korelacija, preko jedne hemijske veze (eng. Heteronuclear Single Quantum Coherence)

**LC-MS** – Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. Liquid chromatography–mass spectrometry)

**NOESY** – Dvodimenzionalna NOE spektroskopija (eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

**OPLS-DA** – Diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (eng. Orthogonal partial least squares discriminant analysis)

**PCA** – Analiza glavnih komponentata (eng. Principal component analysis)

**PLS-DA** – Diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (eng. Partial least squares-discriminant analysis)

**PQN** – Normalizacija na osnovu verovatnoće količnika (eng. Probabilistic quotient normalization)

**RMSEC** – Koren srednjeg kvadratnog odstupanja za kalibraciju (eng. Root mean square of calibration)

**RMSECV** – Koren srednjeg kvadratnog odstupanja određen za unakrsnu validaciju (eng. Root mean squared error cross-validation)

**TOCSY** – Totalna korelisana spektroskopija (eng. Total Correlated Spectroscopy)

**VIP** – Značajne promenljive modela (eng. Variable influence on projection)

**δ** – Hemijsko pomeranje u NMR spektrima

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DEO .....	2
2.1. Mentalna oboljenja .....	2
2.1.1 Psihotični poremećaji.....	4
2.1.2 Shizofrenija i bipolarni poremećaj.....	6
2.2. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja NMR spektroskopijom.....	10
2.2.1. NMR biofluida.....	10
2.2.2. NMR pulsne sekvence u analizi seruma.....	12
2.2.3. Identifikovani metaboliti i hemometrijska analiza seruma.....	12
2.3. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja GC-MS analizom.....	17
2.4. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja LC-MS analizom.....	21
2.5. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja ostalim tehnikama.....	24
2.5.1. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja CE-TOFMS tehnikom.....	24
2.5.2. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja FT-IR tehnikom .....	25
2.6. Hemometrijska analiza u metabolomici.....	26
2.6.1. Analiza glavnih komponenti, PCA.....	27
2.6.2. Diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, PLS-DA.....	27
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	29
3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka .....	29
3.2. Instrumentalna analiza.....	29
3.3 Hemometrijska analiza.....	30
3.4. Hemikalije i laboratorijska oprema .....	31
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	32
4.1. Hemometrijska analiza .....	33
4.1.1. Hemometrijska analiza spektralnih podataka NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije i kontrola .....	34
4.1.2. Hemometrijska analiza spektralnih podataka dobijenih NMR analizom seruma obolelih od bipolarnog poremećaja i kontrola .....	47
4.1.3. Hemometrijska analiza spektralnih podataka dobijenih NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije, bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola .....	56
4.2. Identifikacija metabolita/potencijalnih biomarkera za shizofreniju i bipolarni poremećaj i razlikovanje ovih oboljenja.....	76

4.3. Identifikacija biomarkera u serumu obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja GC-MS analizom.....	84
4.4. Univerzalnost biomarkera za shizofreniju i bipolarni poremećaj .....	87
5. ZAKLJUČAK .....	93
6. LITERATURA.....	94
7. PRILOG .....	111
Biografija .....	117

## 1. UVOD

Shizofrenija i bipolarni poremećaj ubrajaju se u najteže i veoma česte psihijatrijske poremećaje. Procenjeno je da po 1% svetske populacije boluje od shizofrenije [1] i od bipolarnog poremećaja. Uprkos velikom broju dosadašnjih istraživanja, uzorci nastanka, biohemijski mehanizmi i patologija ovih oboljenja još uvek nisu do kraja razjašnjeni. Osobe obolele od ovih poremećaja imaju smanjenu funkcionalnost u životnim aktivnostima što može imati značajan negativan uticaj na kvalitet života obolelih i njihovog okruženja, a takođe i na društveni i ekonomski život cele zajednice. Trenutno, dijagnostika ovih mentalnih oboljenja zasnovana je na psihijatrijskoj proceni na osnovu kliničke fenomenologije koja uključuje standardni razgovor sa pacijentom i/ili njegovim starateljem. Usled preklapanja simptoma (sumanutosti i halucinacije), dijagnostika može biti dodatno otežana i izazovna. Savremena medicina ukazuje na potrebu za tačnom, preciznom i brzom instrumentalnom metodom za dijagnostiku mentalnih oboljenja zasnovanom na analizi biofluida. Takođe postoji potreba za razvojem objektivnih, instrumentalnih metoda za praćenje efikasnosti farmakoterapije na tok bolesti svakog pojedinačnog pacijenta. Kao odgovor na savremene potrebe za instrumentalnom dijagnostikom, praćenjem odgovora pacijenata na medicinsku terapiju i boljim razumevanjem metaboličkih promena kod mentalnih oboljenja, neophodan korak je uspostavljanje seta biomarkera bolesti ovih oboljenja. Cilj ove doktorske disertacije je identifikacija metabolita, potencijalnih biomarkera u serumu pacijenata obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja primenom NMR spektroskopije i hemometrijske analize.

Ovaj rad se sastoji iz četiri dela:

**Opšti deo** ovog rada obuhvata kratak prikaz mentalnih oboljenja, njihove osnovne karakteristike, klasifikaciju i simptome koji ih karakterišu. Opisani su simptomi shizofrenije i bipolarnog poremećaja kao i izazovi koji se javljaju u dijagnostici. Takođe, prikazana je primena različitih instrumentalnih tehnika u analizi biofluida ovih bolesti, sa pregledom do sada predloženih potencijalnih biomarkera.

**Eksperimentalni deo** obuhvata informacije o prikupljanju uzoraka i njihovoj pripremi za metabolomičko ispitivanje. Date su detaljne informacije o korišćenim instrumentima, programima za hemometrijsku analizu, rastvaračima i hemikalijama. Ovo poglavlje obuhvata i detaljne eksperimentalne uslove za svaku od primenjenih instrumentalnih tehnika.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** prikazani su i diskutovani eksperimentalni rezultati instrumentalne i hemometrijske analize uzoraka ispitivanih u okviru ove disertacije. Prikazani su spektroskopski podaci utvrđenih biomarkera seruma pacijenata sa područja Republike Srbije. Diskutovana je univerzalnost biomarkera i njihov značaj u dijagnostici navedenih bolesti.

U **Zaključku** su izdvojeni najznačajniji rezultati proistekli iz ove teze.

Poglavlje **Literatura** sadrži 244 reference navedene na osnovu redosleda pojavljivanja u tezi.

## 2. OPŠTI DEO

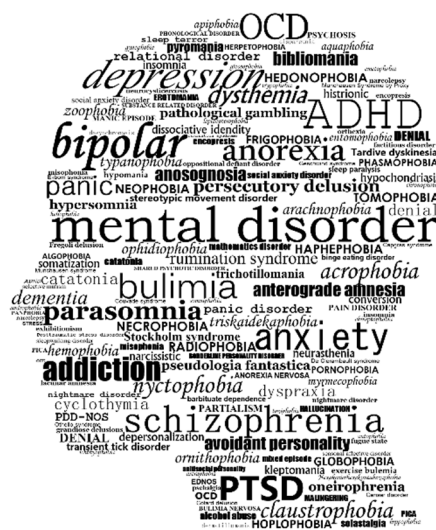
### 2.1. Mentalna oboljenja

Mentalni poremećaji, odnosno mentalne bolesti su stanja koja utiču na razmišljanje, osećanja, raspoloženje i ponašanje pojedinca [2]. Osnovne karakteristike ovih oboljenja su klinički značajni poremećaji u emocionalnoj regulaciji ili ponašanju pojedinca i povezani su sa uznemirenošću ili oštećenju u važnim oblastima funkcionisanja. Mentalni poremećaji se takođe mogu smatrati i stanjem mentalnog zdravlja. Procenjuje se da jedan od osam ljudi na svetu, ili 970 miliona ljudi, živi sa nekom vrstom metalnog poremećaja, a najčešći su anksioznost i depresija [3]. U 2020. godini broj ljudi koji žive sa anksioznim i depresivnim poremećajem značajno je porastao zbog pandemije COVID-19. Preliminarne procene pokazuju porast od 28% u samo jednoj godini [4]. Uzroci nastajanja mentalnih bolesti još uvek nisu utvrđeni. Otežavajuća okolnost je što verovatno ne postoji jedan uzrok bolesti, već više faktora koji mogu doprineti razvoju mentalnih oboljenja: (1) genetika i porodična istorija, životno iskustvo, stres ili istorija zlostavljanja, posebno u detinjstvu, (2) biološki faktori: hemijska neravnoteža u mozgu, izloženost majke virusima ili nekim toksičnim hemikalijama tokom perioda trudnoće, upotreba alkohola, droga, konkomitantno somatoneurološko oboljenje, (3) odsustvo prijatelja, usamljenost i izolovanost. Usled velikog broja faktora i njihovog različitog uticaja, teško je utvrditi uzrok i dalji tok ovih bolesti. Postoje različite vrste mentalnih poremećaja, a po trajanju mogu biti privremeni (privremeni mogu biti i dugotrajni) ili dugotrajni (hronični) [5].

Poznato je da svaka bolest ima karakteristične znakove i simptome. Međutim, kod mentalnih bolesti, oni se preklapaju, ne javljaju se izolovano, što često može dovesti do otežane dijagnostike same bolesti. Ono što predstavlja poseban problem je što ne postoji jedan patogonomičan, ekskluzivan simptom za određeni psihijatrijski poremećaj nego je dijagnoza psihijatrijskog poremećaja sindromološka, odnosno predstavlja skup simptoma. U psihijatriji, kao i u ostalim granama medicine, veoma je važno prepoznavanje sindroma i njihova pravilna klasifikacija u određene dijagnostičke kategorije. U kliničkoj praksi, dijagnoza psihijatrijskih poremećaja postavlja se na osnovu upoređivanja kliničke slike pacijenata i opisa osnovnih kliničkih karakteristika poremećaja koje se nalaze u klasifikaciji, trajanja simptoma, isključivanja drugih, mogućih uzroka poremećaja, te disfunkcionalnosti do koje dovodi poremećaj. Radi lakše dijagnoze samih poremećaja, psihijatrijski poremećaji, odnosno duševni poremećaji i poremećaji ponašanja su klasifikovani u Međunarodnoj klasifikaciji bolesti 10 revizija u određene grupe, označene početnim slovom F, uz dve cifre koje se odnose na specifičan poremećaj, neki od njih su sledeći: [2,6]

- **Organski i simptomski mentalni poremećaji (F00-F09)** – ova podgrupa obuhvata poremećaje koji su posledica organske bolesti, povrede ili drugog oštećenja mozga, a uključuju poremećaje kao što su demencija (F00-F03) i delirijum (F05).
- **Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja zbog upotrebe psihoaktivnih supstanci (F10-F19)** – prvi numerički deo šifre označava pojedinačnu upotrebenu supstancu, kao što su alkohol (F10), opijati (F12), kanabinoidi (F12) i druge supstance, do F19, koja označava upotrebu više supstanci. Drugi deo numeričke šifre označava kliničko stanje, kao što su akutno trovanje (.0), zloupotreba (.1), sindrom zavisnosti (.2).
- **Shizofrenija, shizotipski poremećaj i poremećaj sa sumanutošću (F20-F29)** – shizofrenija (F20), perzistentni poremećaj sa sumanutošću (F22), akutni i prolazni psihotični poremećaj (F23) i drugi.
- **Poremećaj raspoloženja – afektivni poremećaji (F30-F39)** – među njima se izdvajaju manija (F30), bipolarni afektivni poremećaj (F31), depresija (F32 i F33) i prezistentni poremećaj raspoloženja (F34).
- **Neurotični, sa stresom povezani i somatofornni poremećaj (F40-F49)** – veoma široka grupa poremećaja, među kojima se nalaze fobije (F40), panični i generalizovani anksiozni poremećaj (F41), reakcija na stres i poremećaj prilagođavanja (F43).

- **Bihevioralni sindromi udruženi sa fiziološkim poremećajima i somatskim faktorima (F50-F59)** – ovde spadaju poremećaj ishrane (F50), neorganski poremećaj spavanja (F51), seksualne disfunkcije (F52).
- **Poremećaj ličnosti i poremećaj ponašanja odraslih (F60-F69)** – ovde spadaju poremećaji ponašanja koji se manifestuju kao neprilagođena, ekstremna ili devijantna ponašanja, kao što su poremećaj ličnosti (F60), poremećaj navika i impulsa (F63), poremećaj polnog identiteta (F64), polne sklonosti (F65).
- **Mentalna retardacija (F70-F79)** – ova grupa obuhvata laku (F70), umerenu (F71), tešku (F72) i duboku (F73) mentalnu retardaciju.
- **Poremećaj psihičkog razvoja (F80-F89)** – ova grupa obuhvata poremećaje koje karakteriše početak u detinjstvu i tu spadaju poremećaj razvoja govora (F80), poremećaj razvoja motorike (F82), prožimajući ili pervazivni poremećaj razvoja (F84) i drugi.
- **Poremećaj ponašanja i poremećaji emocija sa početkom u detinjstvu i adolescenciji (F90-F99)** – ovde spadaju hiperkinetički poremećaj (F90), poremećaj ponašanja (F91) i emocija (F93) i drugi [6,7].



Slika 1. Slikovit prikaz raznih mentalnih bolesti (izvor Wikipedia)

Jedan od glavnih savremenih problema društva je konstantan porast broja obolelih od mentalnih bolesti. Procenjuje se da je trenutno čak 13% procenata globalnog stanovništva obolelo od mentalnih, neuroloških i poremećaja nastalih upotrebom nedozvoljenih supstanci [8–10]. Procenjeno je da je jedan od najvećih uzroka invaliditeta širom sveta depresija, koja je dijagnostikovana kod  $\approx 16,2\%$  [11] mentalno obolelih i posebno je izražena kod žena. Utvrđeno je da 27% evropske populacije starosti između 18 i 65 godina ima neki od mentalnih poremećaja. Rizik od oboljevanja od depresije za žene iznosi 33,2%, dok je za muškarce 21,7% [12]. Smatra se da će broj obolelih rasti i da se može očekivati da će tokom života 32% populacije imati jedan mentalni poremećaj, oko 18% populacije dva, a oko 14% populacije tri mentalna poremećaja. U Republici Srbiji, prema podacima iz 2017. godine, zbog duševnih bolesti i poremećaja na bolničkom lečenju je ukupno 34 497 osoba, od kojih je 18 806 muškaraca i 15 691 žena [13]. Na osnovu procene programa Svetske zdravstvene organizacije u Republici Srbiji sa depresijom živi 419 302 lica, odnosno oko 5% populacije, dok anksiozni poremećaj ima 323.690 osoba ili oko 3,8% populacije [14].

Pored društvenih i političkih posledica, ekonomske posledice ovih zdravstvenih problema su podjednako velike. Nedavna studija procenjuje da će zbirno globalni uticaj mentalnih bolesti, kako direktnih, tako i indirektnih troškova biti 16,3 biliona američkih dolara, za period od 2011 – 2030.

godine [12,15], pri čemu su indirektni troškovi obično veći od direktnih. Prema podacima iz 2010. godine, indirektni troškovi su iznosili 1,7 biliona dolara, dok su direktni troškovi iznosili svega 0,8 biliona dolara [16]. Troškovi nastali usled mentalnih bolesti su poredivi sa troškovima usled kardiovaskularnih bolesti i znatno veći od troškova usled hroničnih respiratornih bolesti, dijabetesa i raka [17]. Zbog njihove kompleksnosti i raznovrsnog uticaja na društvo i ekonomiju, teško je proceniti ukupne globalne troškove za mentalne bolesti. Pretpostavlja se da oni mogu biti i do 1% bruto domaće proizvodnje [9,15,18], a globalna potrošnja za mentalno zdravlje je nedovoljna za lečenje i manja je od 2 dolara po osobi [8]. U Evropi, procenjeni direktni i indirektni troškovi su 798 milijardi evra [13] i očekuje se da će se udvostručiti do 2030. godine.

Usled velikog broja obolelih, velikog uticaja mentalnih oboljenja na društveni, politički i ekonomski status, Svetska zdravstvena organizacija usvojila je akcioni plan za bolji pristup i lečenje obolelih. Sveobuhvatna vizija akcionog plana za mentalno zdravlje su bolji uslovi za sve obolele. Plan teži svetu u kome se mentalno zdravlje ceni, promovise i štiti, radi se na prevenciji i očuvanju mentalnog zdravlja, a osobe obolele od ovih poremećaja imaju visokokvalitetnu, odgovarajuću zdravstvenu i socijalnu zaštitu. Promovisanjem bolesti, utičemo na uključenost obolelih u društvu, na poslu, bez stigmatizacije i diskriminacije, što predstavlja važan korak u oporavku. Pored promovisanja i kvalitetnog zdravstvenog lečenja, jedan od ciljeva je i jačanje informacionog sistema, prikupljanje dokaza i podsticanje istraživanja u oblasti mentalnog zdravlja [8]. U Republici Srbiji postoje propisani zakoni koji se bave pravima i socijalnom zaštitom obolelih i sprečavanjem diskriminacije osoba sa invaliditetom [19–22]. Strategija nacionalnog programa mentalnog zdravlja Srbije je nastojanje Republike Srbije da bude integrisana u savremene evropske procese i tendencije na planu zaštite mentalnog zdravlja, kao i same dobrobiti stanovništva. Počiva na međunarodno dogovorenim, već pomenutim, ciljevima, konvencijama, strateškim i operativnim dokumentima, propisima i standardima Ujedinjenih nacija, Saveta Evrope i Evropske unije [12]. Program se prilagođava u skladu sa potrebama, mogućnostima i razvojem društva, međunarodnim standardima i dobrom praksom.

### 2.1.1 Psihoteični poremećaji

Psihoze predstavljaju veliku grupu kliničkih psihijatrijskih dijagnoza, odnosno predstavljaju psihičko stanje u kome postoji izobličen doživljaj realnosti. To su teški mentalni poremećaji koji obolele značajno ograničavaju u životnom funkcionisanju i društvu. Psihoze mogu biti uzrokovane različitim činiocima, mogu imati različite kliničke slike i manifestuju se kombinacijom najrazličitijih simptoma [2].

Dele se u dve podgrupe: *organske* i *funkcionalne* psihoze.

**Organske psihoze** su sindromi poremećaja moždanih funkcija izazvani spoljnim patogenim činiocima (hemijskim – intoksikacije, biološkim – infekcije, fizičkim – povrede) ili oboljenjima organizma koja negativno utiču na funkcionisanje centralnog nervnog sistema. Akutni organski moždani psihosindrom u klinici je poznat pod nazivom sindrom delirijuma. Ključne kliničke manifestacije delirijuma čine: dezorijentacija, halucinacije i psihomotorni nemir. Strukturu disfunkcije kod organskih mentalnih poremećaja čine dva elementa: organska bolest, odnosno poremećaj koji uzrokuje mentalni poremećaj i klinički ispoljeni psihopatološki sindromi (sindrom delirijuma, amnestički sindrom i sindrom demencije) [2,23,24]. Dijagnostički kriterijumi delirijuma uključuju: poremećaj pažnje, dezorganizovano mišljenje, najmanje dva od dalje navedenih poremećaja: poremećaj savesti, percepcioni poremećaj (iluzije i halucinacije), poremećaj spavanja, psihomotorni nemir, dezorijentacija, kako u vremenu i prostoru, tako i prema ličnostima, poremećaj pamćenja, naročito za događaje iz skorije prošlosti, naglo razvijanje simptoma. Pored navedenih kriterijuma, postoje i dopunski uslovi kao što su podaci iz anamneze i laboratorijski nalazi kao dokaz postojanja organskog uzroka mentalne disfunkcije. Lečenje organskih mentalnih poremećaja



sprovodi se na dva načina, usmeravanjem na uzročni organski poremećaj koji direktno ili indirektno narušava funkcionisanje mozga ili usmeravanjem na simptome, poremećaj raspoloženja, sumanute ideje, halucinacije i slično, u cilju uklanjanja ili bar ublažavanja mentalnih poremećaja. U simptomatskoj terapiji neophodno je voditi računa o specifičnim karakteristikama bolesnika, tipu i stepenu bolesti i na osnovu svega toga prepisati odgovarajuću medikamentnu terapiju.

**Funkcionalne psihoze** uglavnom imaju urođenu predispoziciju, odnosno nasledni faktor pri nastajanju. Pored toga, ključnu ulogu ima i celokupan sistem socijalizacije kao i činioci sredine. Primer jedne ovakve psihoze je shizofrenija. Ovoj grupi takođe pripada i manično-depresivna psihoza, odnosno bipolarni poremećaj, koji predstavlja specifičan poremećaj raspoloženja, a koji se manifestuje najčešće smanjivanjem epizoda manije i depresije. U zavisnosti od vrste poremećaja primenjuje se posebna medikamentna terapija [2,23].

Svi psihotični poremećaji su među najtežim psihijatrijskim poremećajima i vrlo često predstavljaju hronične psihičke poremećaje koji zahtevaju ozbiljno, disciplinovano i dugotrajno lečenje, uzimanje propisane terapije (antipsihotici, stabilizatori raspoloženja, antidepresivi). U fazama remisije – povlačenja simptoma, nužno je nastavljanje sa terapijom, jer povlačenje simptoma kod ove vrste bolesti ne znači i izlečenje. Kao dodatak terapiji lekovima, veoma su korisne psihoterapije, socioterapije, terapijska zajednica ili radna terapija. Psihoterapije se kod ovih tipova bolesti ne rade klasičnim psihoterapijskim metodama, koje se koriste kod neuroza ili nekih kriznih stanja, već su modifikovane i prilagođene kapacitetima ličnog oboljenja, kao i stepenu samog oboljenja [2].

**Poremećaji raspoloženja** predstavljaju široku grupu mentalnih poremećaja. Ranije je ova grupa poremećaja označavana kao afektivni poremećaji ili afektivne psihoze, međutim, budući da afekti predstavljaju kratkotrajna i interivna stanja emocija, za razliku od raspoloženja, oni se danas nazivaju poremećajima raspoloženja. Hiljadama godina unazad poremećaji raspoloženja se opisuju kao najčešći psihički poremećaj. Svetska zdravstvena organizacija je ovaj poremećaj označila kao četvrti na listi najurgentnijih zdravstvenih problema ljudi širom sveta. Prvi opisi kontinuuma afektivne bolesti, sa maničnim i depresivnim fazama istog poremećaja, potiču od francuskih psihijatarata Falrea (Jean Pierre Falret) i Bejaržea (Jules Baillarger), koji su nezavisno jedan od drugog, 1854. godine opisali današnji bipolarni poremećaj [2]. Termin manično-depresivna psihoza u psihijatriju uveo je Krepelin (Emil Kreapelin) 1899. godine, označavajući time poseban poremećaj kod koga nema trajnog oštećenja ličnosti kao kod shizofrenije, tako da mentalne sposobnosti ostaju dugo očuvane. U aktuelno važećoj Međunarodnoj klasifikaciji mentalnih poremećaja i poremećaja ponašanja Svetske zdravstvene organizacije, kao i zvanične klasifikacije u Srbiji, u grupi poremećaja raspoloženja izdvajaju se: manične i depresivne epizode – znatan broj pacijenata ima samo jednu epizodu bolesti, bipolarni poremećaj – javljaju se faze depresije i faze manije, ponavljajući depresivni poremećaj – karakteriše se ponavljanjem epizoda depresije, stalni poremećaj raspoloženja i nespecifični poremećaj raspoloženja. U postavljanju dijagnoze, osim kliničke slike, uzima se u obzir težina izraženosti poremećaja, epizode se označavaju kao blage, umereno jake, teške sa ili bez psihotičnih simptoma, kao i sam tok bolesti. Faktori rizika značajni za učestalost poremećaja raspoloženja su, pre svega, pol (žene dva puta češće oboljevaju od depresivnog poremećaja nego muškarci) i starost (poremećaji raspoloženja se javljaju najčešće između 20–40 godina). Takođe, niži socioekonomski status se povezuje sa razvojem depresivnog poremećaja, a viši sa pojavom bipolarnog poremećaja. Istraživanja pokazuju da se 85–90% bolesnika oporavlja posle svake epizode bolesti i uspostavlja permorbini nivo funkcionisanja. Kod mlađih bolesnika faze traju kraće. Odavno je uočeno da se poremećaji raspoloženja češće javljaju u nekim porodicama. Skoro sve studije koje su se bavile ispitivanjem faktora nasleđa utvrdile su da se u porodicama obolelih znatno povećava šansa obolevanja potomaka. Kod prvostepenih rođaka bolesnika koji boluju od depresije, bipolarni poremećaj se javlja 1,5 do 2,5 puta češće nego u kontrolno grupi, a depresivni poremećaj 2 do 3 puta češće. Ukoliko je jedan roditelj oboleo od bipolarnog poremećaja, postoji verovatnoća da će dete oboleti od poremećaja raspoloženja u 25% slučajeva, a ukoliko su oba roditelja bolesna, verovatnoća iznosi 50–75%. Tretman poremećaja raspoloženja podrazumeva najpre pažljivu procenu poremećaja

na osnovu koje se dalje koncipira terapijski plan. Budući da je etiopatogeneza poremećaja raspoložena multifaktorska, terapija podrazumeva primenu različitih modaliteta tretmana: farmakoterapiju, psihosocijalnu terapiju, ponekad i biološku terapiju a često je neophodna i hospitalizacija [25–27].

### 2.1.2 Shizofrenija i bipolarni poremećaj

Termin *shizofrenija* prvi put se pominje 1911. godine, predložio ga je švajcarski psihijatar Paul Ojgen Blojler (Paul Eugen Bleuler), potiče od reči *shizo* (rascep) i *phrenos* (um), što u doslovnom prevodu znači cepanje uma. Međutim, misli se na cepanje intrapsihičkog jedinstva i stvaranje više nezavisnih ličnosti. Shizofrenija je jedan od najtežih i čestih psihijatrijskih poremećaja i spada u grupu neafektivnih psihoza [6,28–31]. Počinje u mladosti, uglavnom od 16. do 25. godine života, u velikoj meri ometa privatni i profesionalni život obolelog i najčešće traje tokom celog života [32]. Nasleđuje se poligenetski, ali u izvesnoj meri doprinose i različiti spoljašnji faktori. Jasan uzrok nastanka shizofrenije još uvek nije poznat [33]. Uprkos velikom broju istraživanja, biohemijski mehanizam i patologija bolesti još nisu utemeljeni [28,34]. Osim što shizofrenija pogađa samu osobu poremećajem mišljenja, opažanja, afekta i ponašanja, ona pogađa čitavu porodicu, ali i društvo, jer dugotrajno lečenje, česte hospitalizacije, odsustvo sa posla, problemi su od opšteg značaja. Shizofrenija se javlja češće kod muškaraca, nego kod žena (1,1:1), i kod muškaraca započinje 3 do 4 godine ranije [35]. Smatra se da urbano okruženje i industrijalizacija nose viši rizik za javljanje poremećaja, pa je broj obolelih često veći u urbanim nego u ruralnim i neindustrijalizovanim sredinama [36].

Pažljivom analizom širokog spektra psihopatologije koji je uočen kod obolelih od shizofrenije, pokazano je da postoje tri glavne dimenzije psihopatologije [35,36,37]:

- Pozitivni sindrom
- Dezorganizacija
- Negativni sindrom

Pozitivni sindrom nastaje usled poremećene obrade informacija, poremećenog doživljaja realnosti i sastoji se od halucinacija i sumanutih ideja. Halucinacije su najčešće slušne, pojavljuju se kao glasovi, bilo poznati ili nepoznati, buka i javljaju se nezavisno od sopstvenih misli pojedinaca. Osim slušnih, ređe se javljaju i vizuelne halucinacije (svetlucanje, različiti predmeti, ljudi), olfaktivne i gustativne (obično udružen osećaj neprijatnog mirisa i ukusa) ili taktilne. Iako se za halucinacije misli da su glavno obeležje shizofrenije, treba imati u vidu da se one javljaju i kod drugih psihijatrijskih poremećaja. Sumanutost predstavlja sadržinski poremećajem mišljenja i može imati različite sadržaje i to persekucije (bolesnika prate, posmatraju), uticaja (bolesnik je pod nečijom kontrolom, upravljaju mu mislima, osećanjima ili telom) i odnosa (bolesnik primećuje u okolini mnoge poruke i znake specijalno usmerene na njega)[39].

Dezorganizacija predstavlja formalni poremećaj mišljenja, pa shodno tome govora, zatim ponašanja i afekta. Poremećaj govora odraz je formalnog poremećaja mišljenja. Dezorganizovan govor je lako prepoznatljiv, siromašan je, oskudnog je sadržaja, odgovori na pitanja nisu direktni, i obično u razgovoru dolazi do gubitka logičnog sleda. U komunikaciji sa bolesnikom zapažaju se nelogizmi i blok misli. Dezorganizacija ponašanja postoji u sferi motorike, ali i u domenu socijalne interakcije. Treća komponenta je afektivna neusklađenost tj. ideofektivna disocijacija (radost prilikom tužnih događaja) [40].

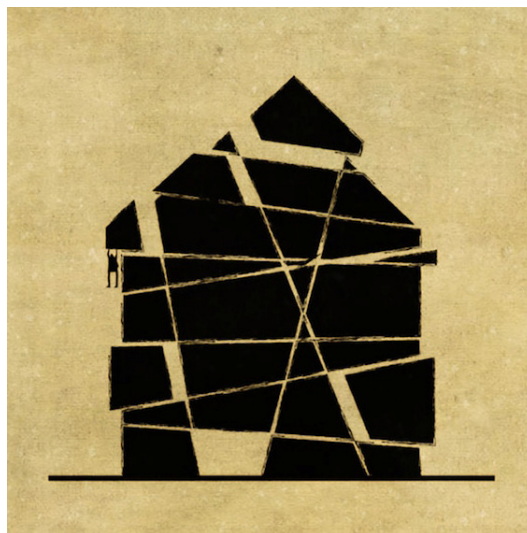
Negativni sindrom karakterišu pet glavnih sindroma: alogija, afektivno siromaštvo, abulija, anhedonija i asocijalnost. Alogija se uočava u govoru, bolesnik govori sve manje ili je sadržaj govora prazan. Afektivno siromaštvo karakteriše osećaj stalne emocionalne praznine. Karakteriše ga nepromenjen izraz lica, nedostatak spontanih pokreta, monotonija u govoru, izbegavanje kontakta

očima. Abulija ili gubitak volje uočava se kao nedostatak inicijative, pasivnost, neizdržljivost u izvršenju uobičajnih zadataka [41,42]. Anhedonija predstavlja emocionalno stanje koje karakteriše nemogućnost osećanja zadovoljstva, odnosno izrazito smanjeno interesovanje za skoro sve aktivnosti. Najšire posmatrano, asocialno ponašanje obuhvata odstupanja u ponašovanju društvenih pravila, običaja, propisa i normi, bez obzira na sadržaj ili posledicu [6].

Bolest uobičajno počinje nakon faze prodroma, a sam početak može biti postepen (šunjajući) i akutan, a nastavlja se akutnom epizodom. Oporavak može biti i kompletna ili delimična remisija, a kod najvećeg broja obolelih, bolest se karakteriše smenjivanjem novih akutnih epizoda bolesti (šubova) i faza manjeg ili većeg oporavka – remitentni, hronični tok bolesti [2,6].

**Tabela 1.** Simptomi akutnog sindroma u shizofreniji prema učestalosti pojavljivanja, prema podacima Svetske Zdravstvene organizacije

Simptomi	Učestalost ponavljana (%)
Gubitak uvida	97
Slušne halucinacije	74
Ideje odnosa	70
Sumnjičavost	66
Afektivno povlačenje	66
Glasovi	65
Ideo-afektivni blok	64
Ideje praćenja	64
Depersonalizacija	52
Ozvučenost misli	50



**Slika 2.** Grafički prikaz mentalne bolesti shizofrenije ilustratora i arhitekta Federika Babine (Federico Babina), u seriji pod nazivom *Arhiatric*

Shizofrenija pogađa 24 miliona ljudi u svetu, odnosno 0,32% svetske populacije. Rangirana je među 25 glavnih uzoraka invaliditeta širom sveta. Pored uticaja na obolele, nefunkcionalnost u obavljanju životnih aktivnosti ima uticaj na društveni i ekonomski život zajednice [43]. U Sjedinjenim Američkim Državama procenjeni godišnji trošak za shizofreniju je veći od ukupnih godišnjih troškova svih oboljenja kancera [44]. Veliki deo troškova odlazi na medicinsku negu, rehabilitaciju, socijalne usluge, gubitak posla i drugo [45,46]. Ekonomski troškovi nastali kao posledica shizofrenije, u 2019. godini, procenjeni su na 343,2 milijarde dolara [47]. Direktni troškovi

zdravstvene zaštite iznose 62,3 milijarde dolara, dok nezdravstvene zaštite iznose 35,0 milijardi dolara [43]. Indirektni troškovi iznose 112,3 milijardi dolara, odnosno 73,4% ukupnih troškova [43,44]. Najveći deo indirektnih troškova čine troškovi povezani sa negom, čak jednu trećinu. Na osnovu prethodnih podataka, zaključeno je da su se troškovi, u poređenju sa troškovima iz 2013. godine udvostručili [33].

**Bipolarni poremećaj**, pored shizofrenije, predstavlja jedno od čestih mentalnih oboljenja. Ovaj poremećaj pogađa 1% svetske populacije i jedan je od vodećih uzroka invaliditeta među mladima [48–52]. Bipolarni poremećaj se karakteriše ponavljanjem epizoda, najmanje dve, u kojima su raspoloženje i aktivnost osobe značajno poremećeni. U toku bolesti smenjuju se faze povišenog raspoloženja, povećane aktivnosti i raspoloženja, odnosno manija ili hipomanija sa fazama tuge, nerasploženja, depresije i smanjene aktivnosti. Manične epizode obično počinju naglo i traju između dve nedelje i 4 do 5 meseci. Depresija ispoljava tendenciju da duže traje u odnosu na maniju, u proseku 6 meseci, ukoliko se ne leči. Prva epizoda se može pojaviti u bilo kom životnom dobu a najčešće u ranoj mladosti. Učestalost epizoda i obazac remisije su promenjivi, mada remisija pokazuje tendenciju skraćivanja tokom vremena, dok depresivne faze postaju sve duže i češće nakon srednjeg doba. Na osnovu broja maničnih i depresivnih epizoda, bipolarni poremećaj se deli u podvrste [2]:

- Bipolarni poremećaj tip I – najmanje jedna manična depresija sa jednom ili više depresivnih epizoda
- Bipolarni poremećaj tip II – jedna ili više epizoda hipomanije i najmanje jedna epizoda depresije
- Ciklotimija – dugotrajni depresivni i hipomanični simptomi poremećaja
- Unipolarna depresija – isključivo se javlja depresija i negativno raspoloženje
- Distimija – u doslovnom prevodu znači loše raspoloženje. Glavni simptom je depresivno raspoloženje koje se karakteriše tugom, nerasploženjem i nelagodnošću.

Na osnovu istraživanja svetskog mentalnog zdravlja [53], pokazano je da ne postoje razlike u kulturnim i etničkim grupama, ali postoje razlike u broju obolelih između tipova bipolarnog poremećaja i to 0,6% tip I, a 0,4% tip II, od ukupnog broja obolelih od bipolarnog poremećaja. Od bipolarnog poremećaja tipa I, podjednako oboljevaju muškarci i žene, a od bipolarnog poremećaja tip II češće oboljevaju žene [54].

Manične epizode karakteriše povišeno euforično raspoloženje koje je van konteksta od okolnosti vezanih za obolelu osobu. Ono može da varira od bezbrižne veselosti do nekontrolisanog uzbuđenja i praćeno je povećanjem fizičke i mentalne aktivnosti. Manični pacijenti karakteristično izgledaju i upadljivo se ponašaju, u stalnom su pokretu, nametljivi, pričljivi [55]. Manične epizode narušavaju društveno ili radno funkcionisanje u društvu i često dovode do hospitalizacije. Razlika između hipomaničnih i maničnih epizoda je u trajanju i intenzitetu, hipomanične epizode traju najmanje četiri uzastopna dana, dok manične epizode traju najmanje jednu nedelju [56]. Tokom manije karakteristična su oštećenja funkcionisanja emocija, mišljenja, percepcije, nagona, volje, svesti, pamćenja i inteligencije [57].

Karakteristike depresivne epizode kod ljudi obolelih od bipolarnog poremećaja su bezrazložna tuga, bespomoćnost, beznadežnost, gubitak interesovanja i zadovoljstva u aktivnostima koje su ranije pricinjavale zadovoljstvo, smanjena energija i osećaj zamora. U depresiji su uvek poremećene emocije, mišljenje, volja i nagoni. Depresija kog bipolarnog oboljenja je dosta različita od klasične depresije i prvi put je opisana još 1950. godine [58–61]. Bipolarna depresija javlja se ranije [62], ima češće epizode, kraće trajanje [63], ima nagli početak i kraj [64] i povezana je sa zloupotrebom nedozvoljenih supstanci [65], stres u ranim fazama [66], dok su somatoformni poremećaji [67] karakteristična za klasičnu depresiju.

Ljudi sa poremećajem raspoloženja su u veoma visokom riziku od smrti samoubistvom. Smrt usled samoubistva među pacijentima sa bipolarnim poremećajem je velika [68,69] i može biti do 20 puta veća nego u ostalim poremećajima [70]. Trećina do polovina pacijenata sa bipolarnom poremećajem pokuša samoubistvo bar jednom u životu, a 15 do 20% pokušaja se završi smrću [71].

**Tabela 2.** Dugotrajno lečenje bipolarnog afektivnog poremećaja – terapija održavanja

<b>Biološko</b>	<b>Psihološko</b>	<b>Socijalno</b>
Stabilizatori raspoloženja (Li, valproati, karbamazepin i lamotrigin)	Savetovanje	Podrška porodice
Litijumove soli Klonazepam	Rehabilitacija Posebne terapije	Socijalna intervencija
Antipsihotici I i III generacije	Prepoznavanje ranih znakova Saveti kako živeti sa bolešću	



**Slika 3.** Grafički prikaz mentalne bolesti bipolarni poremećaj ilustratora i arhitekta Federika Babine (Federico Babina), u seriji pod nazivom *Arhiatric*

Bipolarni poremećaj se uglavnom dijagnostikuje kod mlađe populacije. Uticaj na troškove društva je značajan [72]. Godišnji troškovi u SAD iznose 219,1 milijardi dolara, što je u proseku 88 443 dolara po oboleloj osobi [73]. Navedeni iznos uključuje 50,9 milijardi dolara na direktne troškove, 9,7 milijardi dolara na direktne nezdravstvene troškove zaštite i 158,5 milijardi dolara na indirektno prouzrokovane gubitkom radne produktivnosti ili prerane smrti [74]. Studije su pokazale da su troškovi lečenja obolelih od bipolarnog poremećaja oko četiri puta veći nego za odgovarajuće osobe bez poremećaja mentalnog zdravlja [75].

Shizofrenija i bipolarni afektivni poremećaj imaju više oblika, to jest endofenotipova. Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti 10 revizije kod shizofrenije, razlikuje se veliki broj podklasa i to su F20.0 – paranoidna shizofrenija, F20.1 – dezorganizovani tip „Hebefrena shizofrenija”, F20.2– katatonski tip shizofrenije, F20.3 – nediferencirani tip shizofrenije, F20.4 – postshizofrena depresija, F20.5 – rezidualna shizofrenija, F20.6 – jednostavna shizofrenija, F20.8 – ostali tipovi shizofrenije i F20.9– nespecifična shizofrenija. Kod bipolarnog afektivnog poremećaja takođe postoji više oblika i to su F31.0 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom hipomaničnom epizodom, F31.1 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom maničnom epizodom bez psihotičnih simptoma,

F31.2 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom maničnom epizodom sa psihotičnim simptomima, F31.3 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom epizodom blage ili umerene depresije, F31.4 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom epizodom teške depresije bez psihotičnih simptoma, F31.5 – bipolarni afektivni poremećaj sa trenutnom epizodom teške depresije sa psihotičnim simptomima, F31.6 – bipolarni afektivni poremećaj sa mešovitom trenutnom epizodom, F31.7 – bipolarni afektivni poremećaj, trenutno u remisiji, F31.8 – drugi bipolarni afektivni poremećaj, F31.9 – nespecifični bipolarni afektivni poremećaj [6].

Dijagnostika shizofrenije i bipolarnog poremećaja je fenomenološka i bazira se na posmatranju obolele osobe. Većina psihičkih funkcija pacijenata može biti poremećena, ali bez specifičnog kliničkog simptoma koji je karakterističan za ova oboljenja. U većini slučajeva svaki znak i simptom može se primetiti i u drugim psihijatrijskim ili neurološkim poremećajima. Nepostojanje jasne granice između različitih psihijatrijskih poremećaja uzrokuje dijagnostičke izazove. Takvi izazovi su mogući pri razlikovanju shizofrenije od bipolarnog poremećaja, depresije i shizoafektivnog poremećaja, kao i kod razlikovanja bipolarnog poremećaja i klasične depresije [30]. Prethodna istraživanja u ovoj oblasti ukazuju da su ova mentalna oboljenja rezultat složenih interakcija genetskih i faktora okruženja, a da patofiziologija nije u potpunosti razjašnjena. Sadašnji dijagnostički kriterijumi zasnovani su na kliničkoj fenomenologiji i ograničeni su na mišljenje psihijatra nakon standardnog kliničkog intervjua sa pacijentom i/ili starateljem. Dijagnoza je značajno otežana u slučajevima gde je bolest značajno uznapredovala, zbog otežane komunikacije sa pacijentom ili zbog nedostatka verodostojnih informacija iz okruženja. Tačna i brza dijagnostika je veoma važna kod ovih oboljenja, jer rano uočavanje bolesti i odgovarajuća terapija utiču na kvalitet života obolelih [76,77]. Pored izazova u dijagnostici i nepotpunog razumevanja nastanka ovih oboljenja, postoji potreba za personalizovanim pristupom pacijentima kroz prilagođeni medicinski tretman i pouzdano praćenje odgovora na medicinsku terapiju. Neophodan korak u rešavanju navedenih izazova je utvrđivanje biomarkera ovih oboljenja.

## **2.2. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja NMR spektroskopijom**

### **2.2.1. NMR biofluida**

Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR) visoke rezolucije je kvantitativna, nedestruktivna i brza analitička metoda [78]. Interesovanje za primenu ove metode u analizi biofluida poraslo je pojavom NMR spektrometra sa Furijeovom (Fourier), poboljšanjem rezolucije, unapređenjem NMR eksperimenata [79]. Prva primena NMR-a u analizi biofluida zabeležena je početkom osamdesetih godina. [79,80]. Dalji razvoj, uvođenjem jačeg magnetnog polja i krio sistema, doveo je do značajnog povećanja osetljivosti ove tehnike. Iako je osetljivost NMR analiza značajno povećana i dalje je niža u poređenju sa masenom spektrometrijom (MS). Međutim, prednost NMR-a za metabolomičko profilisanje je kvantitativnost metode, brzina analize i jednostavna priprema uzoraka. Takođe, nije neophodno poznavanje sastava uzoraka, što je čini idealnom tehnikom za neciljano profilisanje. Danas, rezultati NMR i MS analiza imaju približno podjednak značaj u metabolomičkim ispitivanjima koja eksponencijalno rastu i imaju sve širu i raznovrsniju upotrebu.

Urin, krvna plazma i serum najčešće su analizirani biofluidi u metabolomičkim ispitivanjima. Iz ovih uzoraka je na neinvazivan način identifikovano hiljade metabolita [81,82]. Cerebralno-spinalna tečnost se takođe često koristi u metabolomičkim studijama neuroloških bolesti [83,84], ali je proces uzorkovanja kompleksniji jer zahteva invazivniji pristup i posebnu pripremu pacijenata.

Zbog relativno jednostavnog prikupljanja i pripreme uzoraka, plazma i serum se uglavnom koriste u metabolomičkim eksperimentima. Plazma se dobija centrifugiranjem uzoraka krvi sa

antikoagulansom (kao što je litijum heparin), a serum se dobija centrifugiranjem na ledu koaguliranih uzoraka krvi. Stabilizatori poput etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) i citrata se izbegavaju u pripremi uzoraka krvi za NMR analizu usled mogućnosti preklapanja signala koji potiču od ovih jedinjenja sa signalima analita od značaja [85]. Uzorci krvi se najčešće prikupljaju u jutarnjim časovima, a nakon koagulacije i centrifugiranja odvaja se supernatant (serum). Ako se uzorci ne analiziraju odmah, čuvaju se na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  radi zaustavljanja metaboličkih procesa u uzorku ili se konzerviraju natrijum-azidom ( $\text{NaN}_3$ ) [86].

U NMR analizi seruma primenjuju se tri strategije pripreme uzoraka:

- direktna analiza biofluida
- ultrafiltracija – korišćenjem filtera različite molekulske mase za odvajanje malih molekula
- tečno – tečna ekstrakcija za taloženje proteina.

Najčešće korišćeni i najjednostavniji postupak pripreme je razblaživanje seruma ili plazme deuterisanom vodom ili fosfatnim puferom. Pored toga što je brza i jednostavna, direktna NMR analiza seruma ili plazme omogućava uvid u prirodnu raspodelu lipoproteina, ali onemogućava kvantifikaciju i otežava identifikaciju metabolita malih molekulske mase.

Ceđenje uzoraka kroz filtere molekulske mase 3 do 10 kDa omogućava fizičko razdvajanje malih molekula od drugih komponenata. Ovakvi filteri su komercijalno dostupni, relativno jeftini i veoma jednostavni za korišćenje [87,88]. Ultrafiltracija nudi jednostavan put do identifikacije velikog broja metabolita NMR analizom, međutim postoji mogućnost da li neki metaboliti ostaju vezani za makromolekule [89].

U novijim istraživanjima [90,91] pokazana je visoka ponovljivost i pokrivenost metaboličkog profila taloženjem proteina, a nađeno je i da je optimalan zapreminski odnos organskog rastvarača za taloženje – metanola i seruma 2:1, za razliku od prethodnih studija, gde je za NMR profilisanje korišćen acetonitril. Mana ovog postupka pripreme je mogućnost gubitka isparljivih metabolita (poput dietilamina, acetona, uree i 2-propanola) tokom uklanjanja rastvarača.

Iako su studije zasnovane na pripremi uzoraka seruma ili plazme za NMR analizu malobrojne i ne sadrže sve kvantitativne podatke, ne ukazuju da je kombinacija direktne analize i tečno-tečne ekstrakcije najbolji pristup za istraživanje metaboličkih profila seruma i plazme. Ultrafiltracija se primenjuje ukoliko je primarni cilj istraživanja sadržaj malih molekula. Ono što je iznenađujuće je da literaturni podaci, do sada, ne preporučuju upotrebu dvofazne ekstrakcije za istovremeno razdvajanje lipida i polarnih molekula, uprkos potencijalnim prednostima u smislu pokrivenosti metabolita. Direktna analiza seruma ima vodeću ulogu od metoda pripreme uzoraka za NMR metabolička istraživanja [92].

### 2.2.2. NMR pulsne sekvence u analizi seruma

Identifikacija serumskih metabolita analizom  $^1\text{H-NMR}$  spektara je onemogućena usled prisustva intezivnog signala vode iz uzoraka seruma. U prisustvu signala vode punog inteziteta gotovo da nema korisnih informacija o većini metabolitai. Stoga je neophodno koristiti pulsne sekvence za suzbijanje ovog signala. Najčešće korišćena pulsna sekvenca za supresiju signala vode je WATERGATE [93], međutim njena primena u metabolomičkim ispitivanjima je ograničena zbog problema sa artefaktima  $J$ -modulacije. Drugi problem u metabolomičkoj analizi spektara seruma je prouzrokovan njegovim hemijskim sastavom, koji je smeša metabolita male molekulske mase (do 1500 Da) i makromolekula. Široki signali makromolekula nastaju usled kratkog vremena relaksacije ( $T_2$ ) i prekrivaju signale metabolita male molekulske mase u NMR spektru, što otežava interpretaciju spektara. Da bi se prevazišli ovi problemi, koriste se dve pulsne sekvence,  $^1\text{H-NOESY}$  (eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, 1D NOESY) sa presaturacijom [94,95] i  $^1\text{H-CPMG}$  (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) pulsna sekvenca. 1D NOESY predstavlja jednu od najpopularnijih pulsni sekvenci za metabolomičke NMR analize, usled efikasne supresije signala vode uz malu optimizaciju i doslednost u dobijenim spektrima.  $^1\text{H-CPMG}$  pulsna sekvenca omogućava analizu signala malih molekula, uklanjanjem širokih signala makromolekula iz NMR spektara. Na ovaj način moguće je razdvajanje signala, bez fizičkog razdvajanja ovih jedinjenja i potrebe za dodatnom pripremom uzoraka, što smanjuje rizik od gubitka metabolita od interesa [96,97]. Često se primenjuju i difuzioni eksperimenti, poput 1D DOSY, koji se zasnivaju na primeni različitih vrednosti gradijenata polja sa ciljem dobijanja podataka o lipoproteinima i drugim makromolekulima prisutnim u ispitivanim uzorcima [98]. Zbog velikog broja prisutnih metabolita čiji signali su često bliskog hemijskog pomeranja ili preklapljeni, za njihovu identifikaciju koriste se i 2D NMR eksperimenti, kao što su COSY (eng. Correlation Spectroscopy) [99], TOSCY (eng. Total Correlation Spectroscopy) [100] eksperimenti i 2D  $J$  razložna tehnika.

### 2.2.3. Identifikovani metaboliti i hemometrijska analiza seruma

Utvrđivanje biomarkera bolesti je od izuzetnog značaja za sve oblasti medicine [101]. Termin biomarker je prvi put upotrebljen 1989. godine i definisan kao biološki parametar koji služi za procenu zdravlja i patofiziologije bolesti. Metaboliti su krajnji proizvod ekspresije gena i direktan su rezultat enzimske i proteinske aktivnosti. Metabolomički biomarkeri bolesti su od posebnog značaja za oboljenja koja nisu povezana sa genetskim defektima [102,103]. Ispitivanje biomarkera za psihijatrijske poremećaje ima dugu istoriju. Jedan od najranijih pristupa u psihijatriji zasnovan je na korišćenju hromatografije i identifikaciji biomarkera u urinu, gde je identifikovan  $p$ -tiramini kod obolelih od shizofrenije [104]. Do danas, brojne studije su se bavile proučavanjem metabolomike za bolje razumevanje psihijatrijskih poremećaja i identifikaciju biomarkera, sa ciljem poboljšanja terapijskih strategija. Metabolomička istraživanja novih biomarkera u različitim kliničkim oblastima zasnivaju se na hipotezi da sve bolesti izazivaju određene poremećaje u biohemijskim putevima, koji dovode do metabolomičkog otiska prsta, karakterističnog za prirodu same bolesti [105]. Metabolomika ima potencijal da utvrdi biomarkere koji će poboljšati dijagnostiku bolesti, kao i da dovede do razvoja potencijalno novih lekova [106]. Očekuje se da će pristup globalnog metabolomičkog profila omogućiti precizno određivanje specifičnih biomarkera za određene bolesti [107]. Jedinstvena vrednost metabolomike u dijagnostici i terapiji zasniva se na činjenici da su promene u metabolomu, skupu primarnih i sekundarnih metabolita koji se istovremeno analiziraju, direktan rezultat poremećaja u ćelijskoj aktivnosti.

Najčešće primenjivane bioanalitičke platforme u metabolomičkim istraživanjima su NMR i MS. Publikovani potencijalni biomarkeri za shizofreniju i bipolarni poremećaj koji su utvrđeni metabolomičkim NMR eksperimentima u različitim biofluidima, prikazani su u tabelama 3. i 4.



**Tabela 3.** Potencijalni biomarkeri za shizofreniju, utvrđeni NMR analizom biofluida

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Acetoacetat	urin	Yang et al. [108]
Aceton	urin	Yang et al. [108]
Citrat	serum	Yang et al. [108], Xuan et al. [109]
Glukoza	urin, CST <sup>1</sup>	Yang et al. [108], Xuan et al. [109], Holmes et al. [110]
3-Hidroksibuterna kiselina	urin	Yang et al. [108]
Laktat	serum, CST	Yang et al. [108], Xuan et al. [109], Holmes et al. [110]
Treonin	serum	Tasic et al. [111], Lui et al [112]
Leucin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Valin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Glutamin	serum	Tasic et al. [111,113], Lui et al [112]
Glutamat	serum	Tasic et al. [111]
Asparagin	serum	Tasic et al. [111], Lui et al. [112], Wang et al. [114]
Alanin	serum	Tasic et al. [111], Lui et al. [112], Wang et al. [114]
γ-Aminobuterna kiselina	serum	Tasic et al. [111,113]
Holin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Arginin	serum	Lui et al [112]
Izoleucin	serum	Tasic et al. [111], Lui et al [112]
Serin	serum	Tasic et al. [111]
Manoza	serum	Tasic et al. [111]
Glicin	serum	Tasic et al. [111,113], Lui et al [112]
Glicerol	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Tirozin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Fenilalanin	serum	Tasic et al. [111], Lui et al [112]
p-Aminobenzoeva kiselina	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Acetilholin	serum	Tasic et al. [113]
Manitol	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Amigdalin	serum	Tasic et al. [111]
Lipoamidi	serum	Tasic et al., [111]
Mioinozitol	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Prolin	serum	Lui et al [112]
Acetil-glikoprotein	serum	Lui et al [112]
Piruvat	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Taurin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
Kreatin	serum	Tasic et al. [113], Lui et al [112]
3-Metilhistidin	serum	Lui et al. [112]
Hipotaurin	serum	Wang et al. [114]
Malonat	serum	Wang et al. [114]
Gvanidinacetat	serum	Wang et al. [114]
Propilen glikol	serum	Wang et al. [114]
Treitol	serum	Wang et al. [114]
Metilmalonska kiselina	serum	Wang et al. [114]
Maleinska kiselina	serum	Wang et al. [114]

<sup>1</sup> CST – cerebralno spinalna tečnost

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
N-Acetilglicin	serum	Wang et al. [114]
Dimetilglicin	serum	Wang et al. [114]
Betain	serum	Wang et al. [114]
Arabitol	serum	Wang et al. [114]
Ksilitol	serum	Wang et al. [114]
Fosfoholin	serum	Wang et al. [114], Tasic et al. [113]
2-Metilglutarna kiselina	serum	Wang et al. [114]
Fruktoza	serum	Wang et al. [114]
D-Glukarna kiselina	serum	Wang et al. [114]
Galaktinol	serum	Wang et al. [114]
Homovanilinska kiselina	serum	Wang et al. [114]
Metilamin	serum	Wang et al. [114]
6-Hidroksidopamin	serum	Tasic et al. [113]
Izovaleril-karnitin	serum	Tasic et al. [113]
Pantotenska kiselina	serum	Tasic et al. [111,113]
Guanin	serum	Tasic et al. [111]
3-Metil-2-oksobuterna kiselina	serum	Tasic et al. [111]

Osnove patofiziologije shizofrenije zasnovane su na nepravilnosti u neurotransmisiji. Mnoge teorije patofiziologiju shizofrenije objašnjavaju viškom ili nedostatkom neurotransmitera kao što su dopamin, serotonin i glutamat. Ostale teorije se zasnivaju na metabolitima kao što su aspartat, glicin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, koji utiču na narušavanje ravnoteže kod shizofrenije [115]. Studije pokazuju da postoje dva različita metabolička puta, koja predstavljaju veliki rizik za nastanak shizofrenije i to su metabolizam glukoze i prolina [116]. Analizom lipida iz plazme pacijenata obolelih od shizofrenije otkrivena je značajno veća koncentracija lipida nego kod zdravih osoba [117]. Potencijalni biomarkeri su masne kiseline i ketonska tela (acetoacetat,  $\beta$ -hidroksibuterna kiselina i aceton), kao odgovor na pojačan katabolizam masnih kiselina, koji je rezultat nedovoljnog snabdevanje mozga glukozom [108]. Najčešće objavljeni biomarkeri u literaturi su aminokiseline glicin i serin [118,119].

Istraživačka grupa Koike [120] je u svojoj studiji pokazala da je primećeno smanjenje nivoa betaina kod pacijenata obolelih od shizofrenije i posledično povećanje koncentracije homocisteina u mozgu, što može dovesti do visokog oksidativnog stresa. Betain učestvuje u konverziji homocisteina u metionin. Pored betaina, metaboliti poput hidroksiamina, piroglutaminske kiseline,  $\alpha$ - i  $\gamma$ - tokoferola su navedeni kao markeri povećanja oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od shizofrenije. Veća koncentracija hidroksiamina kod pacijenata obolelih od shizofrenije, u odnosu na kontrolnu grupu, ukazuje na veću akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta [121].

**Tabela 4.** Potencijalni biomarkeri za bipolarni poremećaj, utvrđeni NMR analizom biofluida

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Acetilholin	serum	Sussulini et al. [122]
Aceton	urin	Chen et al. [123], Chen et al. [124]
N-Acetil-aspartat-glutaminska kiselina	serum	Sethi et al. [125]
N-Acetil-fenilalanin	serum	Sethi et al. [125]
Alanin	urin	Chen et al. [123], Chen et al. [126], Yoshimi [127]
Amigalin	serum	Sethi et al. [125]
Azelainska kilseina	urin	Chen et al. [123], Chen et al. [126]
Holin	serum, urin	Zheng et al. [128], Sethi et al. [129], Chen et al. [124]
Glutamat	serum	Sussulini et al. [122]
Glutamin	serum	Sethi et al. [125]
Glikolna kiselina	urin	Chen et al. [123]
$\alpha$ -Hidroksibutirat	urin	Chen et al. [123], Chen et al. [126]
D-Hidroksi-pirimidin	urin	Chen et al. [123], Chen et al. [126]
Isobutirat	urin	Zheng et al. [128]
$\alpha$ -Ketoglutarna kiselina	serum	Sethi et al. [125]
Laktat	urin	Chen et al. [123]
Lipidi i lipoamidi	serum	Sethi et al. [125], Sussulini et al. [122]
N-Metil-nikotinamid	urin	Chen et al. [124]
Mioinozitol	serum	Sethi et al. [125], Sussulini et al. [122]
Oksaloacetat	urin	Chen et al. [124]
Propionat	urin	Chen et al. [123]
Pseudouridin	urin	Chen et al. [126]
Leucin	serum	Sethi et al. [125], Sussulini et al. [122], Xiangjie et al. [130]
Valin	serum	Sethi et al. [125], Sussulini et al. [122], Xiangjie et al. [130] Tasic et al. [113]118]
Citrat	serum	Xiangjie et al. [130]
Asparagin	serum	Sussulini et al. [125]
Glukoza	serum	Sethi et al. [125], Xiangjie et al. [130]
Arginin	serum	Sussulini et al. [125]
Lizin	serum	Sussulini et al. [125]
Izoleucin	serum	Xiangjie et al. [130], Tasic et al. [113]
Glicin	serum	Tasic et al. [113]
Glicerol	serum	Xiangjie et al. [130]
Tirozin	serum	Tasic et al. [113]
Prolin	serum	Sethi et al. [125] Sussulini et al. [122]
Acetat	serum	Sussulini et al. [125] Xiangjie et al. [130]
Acetoacetat	serum	Xiangjie et al. [130]
Metionin	serum	Xiangjie et al. [130]
Gvanidinilacetat	serum	Xiangjie et al. [130]
Uracil	serum	Xiangjie et al. [130]
Histidin	serum	Xiangjie et al. [130], Tasic et al. [113]
Taurin	serum	Xiangjie et al. [130]
Betain	serum	Xiangjie et al. [130]
2,3-Difosfo-D-glicerinska kiselina	serum	Tasic et al. [113]
Monoetil malonat	serum	Tasic et al. [113]
6-Hidroksidopamin	serum	Tasic et al. [113]

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Acetilholin	serum	Tasic et al. [113]
Kreatin	serum	Xiangjie et al. [130], Tasic et al. [113]
N-Acetil glikoproteini	serum	Xiangjie et al. [130]
O-Acetil glikoproteini	serum	Xiangjie et al. [130]
Dimetilglicin	serum	Xiangjie et al. [130]
Citrulin	serum	Xiangjie et al. [130]
Askorbat	serum	Xiangjie et al. [130]
Piruvat	serum	Xiangjie et al. [130]

Početakom devetnaestog veka, verovalo se da je problem metabolizma mokraćne kiseline, uzrok mnogih bolesti. U većini ispitivanja, u tom periodu, rađeno je sa solima litijuma, koje su pokazale dobru sposobnost rastvaranja kristala mokraćne kiseline. Na osnovu tih informacija javlja se ideja o korišćenju litijumovih soli, kao što je litijum-karbonat ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) u terapiji mentalnih bolesti. Ova so pokazala se efikasnom u lečenju pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja [131,132]. Metabolomičkom analizom seruma, pomoću  $^1\text{H}$  NMR, utvrđeno je da je koncentracija mioinozitola značajno smanjena kod pacijenata koji su bili podvrgnuti terapiji koja je sadržala lekove na bazi litijuma [129]. Mioinozitol igra značajnu ulogu u ćelijskoj morfogenezi i citogenezi, u sintezi lipida, u strukturi ćelijske membrane i u razvoju ćelija. U literaturi su najviše diskutovani glutamat, glutamin, kreatin i njihov međusobni odnos [122,125]. Glutamat je jedan od najzastupljenijih neurotransmitera u mozgu, kao prekursor glutamina,  $\gamma$ -aminobuterne kiseline i glutationa. Razlike između metabolita, na koje ukazuje Seti (Sethi) i saradnici [125], navode na zaključak da su mogući biomarkeri za bipolarni poremećaj  $\alpha$ -ketoglutarina kiselina, N-acetil-aspartat, N-acetil-fenilalanin i glutamin, koji su identifikovani kod bipolarnog poremećaja, dok je u kontrolnoj grupi identifikovan N-acetil-alanin. Autori smatraju da su navedeni rezultati posledica smanjenog integriteta neurona, pošto je N-acetil-aspartat drugi po zastupljenosti neurotransmitter u mozgu, posle glutamata, i nastaje u mitohondrijama iz acetyl CoA i aspartata.

Ženg (Zheng) i saradnici [128] ispitivali su metabolomičke profile uzoraka urina NMR analizom i otkrili da holin, izobutirat,  $\alpha$ -hidroksibutirat i N-metilnikotinamid mogu biti dobri biomarkeri bipolarnog poremećaja. Promena koncentracije holina u urinu pacijenata sa bipolarnim poremećajem može biti posledica nepravilnosti u metabolizmu fosfolipida.

$^1\text{H}$  NMR spektri bioloških uzoraka sadrže ogroman broj signala zbog prisustva velikog broja metabolita koje je potrebno detaljno analizirati. Za analizu velikog broja signala neophodna je primena hemometrijske analize, koja se razvija i unapređuje uporedo sa razvojem računara i softvera [133]. Pre hemometrijske analize neophodna je obrada spektara, koja podrazumeva uklanjanje nepotrebnih spektralnih podataka. Predhemometrijski koraci zahtevaju smutovanje, (eng. smoothing), korekciju bazne linije, korekciju faze, zaključavanje spektara, poravnanje pikova (eng. peak alignment), binovanje (eng. binning), normalizaciju i skaliranje podataka. Navedeni koraci u literaturi su poznati kao predobrada podataka (eng. preprocessing data). Najčešće korišćeni programi za hemometrijsku analizu su MATLAB [134], SIMCA [135] i Pirouette [136]. Postoji veliki broj statističkih i matematičkih modela koji se koriste u cilju metabolomičkog proučavanja metabolizma. Najčešće primenjivane metode su: analiza glavnih komponenata (PCA), parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS), diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA), diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS-DA) i diskriminantna dvosmerna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (O2PLS-DA). U analizi različitih biofluida pacijenata obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaju najčešće su primenjivane PCA i PLS-DA analize [137]. Nakon analize modela, odnosno razdvajanja grupa, moguće je redukovati grupu metabolita odgovornih za razdvajanje posmatranjih grupa. Naknadnom analizom 2D NMR spektara moguća je njihova identifikacija. Velika pomoć u identifikaciji metabolita su i besplatne

baze podataka, otvorenog pristupa, poput Human Metabolome Database (HMDB) [138], Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) [139] i Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database (MMCD) [140]. Postoje studije koje se bave analizom različitih baza podataka, njihovom korelacijom za NMR metaboličku analizu, kao i odabirom najboljih platformi za statističku analizu [141].

### **2.3. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja GC-MS analizom**

Kombinacija gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) jedna je od tehnika koja se koristila na samom početku razvoja metabolomike. GC-MS analiza je najstandardizovanija metoda u metabolomici sa već uspostavljenim protokolima za analizu metabolita [142–144]. Omogućava identifikaciju i kvantifikaciju najrazličitijih klasa metabolita, što je njena prednost, uz visoku osetljivost, rezoluciju i mogućnost identifikacije metabolita poređenjem sa podacima iz biblioteke spektara. Nedostaci ove tehnike su zahtevnija priprema uzoraka, koja uključuje ekstrakciju i derivatizaciju, ograničena veličina i vrsta jedinjenja koja se može analizirati [145]. Metabolomika zasnovana na GC-MS analizi idealna je za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita male molekulske mase. Više od četrdeset godina postoje biblioteke sa masenim spektrima i retencionim vremenom metabolita koje su javno dostupne i znatno olakšavaju identifikaciju metabolita. Jedna od najznačajnijih je NIST Mass Spectral Library, Biblioteka masenih spektara američkog Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju [146]. Novija istraživanja se zasnivaju na primeni dvodimenzionalne GC-MS tehnike. GC-GC-MS tehnika pokazala se efikasnijom u identifikaciji metabolita – njenom primenom je identifikovano tri puta više metabolita, u poređenju sa klasičnom GC-MS analizom, uglavnom zbog bolje rezolucije hromatografije [147].

Različiti biofluidi se mogu analizirati ovom tehnikom. Urin, serum i plazma predstavljaju najčešće analizirane biofluide ovom tehnikom. Dosadašnja ispitivanja seruma i plazme ukazuju na to da ne postoje značajne razlike u metabolitima ovih biofluida [148,149]. Jedina razlika je nešto brža priprema plazme, jer nema potrebe za zgrušavanjem krvi [150]. Velika prednost ovih biofluida je međusobna poredivost, što u velikoj meri olakšava metaboličku analizu, odnosno dobijanje metaboličkog profila.

Efikasnost metaboličke analize u velikoj meri zavisi od pripreme uzoraka. Greške u ovoj fazi utiču na broj identifikovanih metabolita, kvalitet podataka, samim tim i rezultate [151]. Izbor metode za pripremu uzoraka je veoma važan i uglavnom zavisi od vrste i zapremine uzoraka, fizičko-hemijskih svojstava i instrumentalne tehnike koja se koristi za analizu. Metabolička analiza plazme ili seruma pomoću GC-MS tehnike uključuje nekoliko koraka i to su: zaustavljanje enzimskih procesa, ekstrakcija i derivatizacija. Prvi korak zahteva zaustavljanje enzimskih procesa u svakom biološkom uzorku, nakon čega sledi taloženje proteina, pa ekstrakcija koja omogućava oslobođenje metabolita iz matriksa seruma ili plazme i njihovo koncentrovanje. Nakon ekstrakcije sledi derivatizacija metabolita da bi se poboljšala njihova isparljivost i termička stabilnost, što ujedno predstavlja i poslednji korak u pripremi.

Plazma i serum predstavljaju biofluide umerene metaboličke aktivnosti, za razliku od urina koji je metabolički neaktivan, odnosno njegov metabolički sastav se ne menja tokom vremena [152]. Da bi zaustavili enzimske procese potrebno je promeniti polarnost, pH ili temperaturu, što je jedan od najčešćih postupaka prilikom pripreme biofluida.

Taloženje proteina je neophodno kako bi se smanjila složenost uzorka i poboljšalo metaboličko profilisanje. Taloženje se postiže promenom pH ili polarnost rastvora [153]. Za plazmu i serum koriste se organski rastvarači kao što su metanol ili acetonitril [154], nakon čega sledi centrifugiranje i odvajanje supernatanta.

Ekstrakcija ima za cilj da omogući potpuno odvajanje ciljanih jedinjenja. U zavisnosti od cilja analize, primenom različitih ekstrakcionih reagenasa dobijaju se različiti rezultati. Postoje studije koje se bave proučavanjem izbora reagensa za ekstrakciju, zapremine reagensa, kao i vremena ekstrakcije [154]. Jedan od reagenasa koji se pokazao kao najbolji je smeša metanola i vode u zapreminskom odnosu 8:1, koji je dao najbolje rezultate u pogledu efikasnosti i ponovljivosti [152].

Derivatizacija se može primeniti pre ili nakon hromatografskog razdvajanja. Prilično egzotična je derivatizacija nakon hromatografisanja, koja poboljšava detekciju metabolita brzim fizičko-hemijskim reakcijama, poput pirolize i katalitičke hidrogenizacije, koja je dosta ređi tip derivatizacije [155]. Derivatizacija pre hromatografisanja je češći oblik derivatizacije i podrazumeva zaštitu polarnih funkcionalnih grupa, uz poboljšanje isparljivosti i termičke stabilnosti molekula [156]. Najuniverzalniji protokol derivatizacije podrazumeva korišćenje reagenasa za silanizaciju i njegovih varijanti [157].

Biomarkeri shizofrenije i bipolarnog poremećaja utvrđeni u krvi, serumu i urinu, pomoću GC-MS tehnike [109,121,123,126,158–163] prikazani su u tabelama 5. i 6.

**Tabela 5.** Potencijalni biomarkeri za shizofreniju, utvrđeni GC-MS analizom biofluida

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Acetoacetat	urin	Yang et al. [158]
Aceton	urin	Yang et al. [158]
N-Acetil-aspartat	serum	Huan et al. [109]
Alantoin	serum	Cai et al. [159]
$\alpha$ -Amino-butirat	serum, urin	Yang et al. [158]
Asparaginska kiselina	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109], Liu et al. [121]
Benzoeva kiselina	serum, plazma	Liu et al. [121]
1,3-Bisfosfoglicerat	serum	Huan et al. [109]
Holesterol	serum	Huan et al. [109]
Kreatinin	plazma	Liu et al. [121]
Katehol	urin	Yang et al. [158]
Cistin	serum	Yang et al. [158]
Citrat	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
6-Dezokimanofuranoza	serum	Al Awam et al. [160]
2,3-Dihidroksibutanska kiselina	urin	Yang et al. [158]
Dopamin	serum	Liu et al. [121]
Eritroza	serum	Huan et al. [109]
Arahidonska kiselina	serum	Yang et al. [158]
11-Eikozenska kiselina	serum	Yang et al. [158]
Galaktoza	serum	Al Awam et al. [160]
Glukoza	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Glukuronska kiselina	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Glutamat	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Glicerat	serum	Yang et al. [158]
Glicerol	serum	Huan et al. [109]
Glicin	serum	Huan et al. [109]
Heptadekanska kiselina	serum	Al Awam et al. [160]
Homoserin	serum, plazma	Al Awam et al. [160]
Palmitinska kiselina	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
2-Hidroksibutirat	serum, urin	Yang et al. [158]
3-Hidroksibutirat	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
2-Hidroksietil-palmitat	serum, plazma	Liu et al. [121]
Izoleucin	urin	Yang et al. [158]
$\alpha$ -Ketoglutarat	serum	Huan et al. [109]
Laktat	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Laktobionska kiselina	serum	Huan et al. [109]
Linolna kiselina	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Malat	serum	Yang et al. [158]
Maltoza	serum, plazma	Al Awam et al. [160]
Metifosfat	serum, plazma	Al Awam et al. [160]
Metil-histamin	CST	Ito et al. [161]
Mioinozitol	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Stearinska kiselina	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Sorbitol	serum, plazma	Al Awam et al. [160]
Oleinska kiselina	serum	Yang et al. [158], Al Awam et al. [160]
2-Oksoglutarat	serum	Yang et al. [158]

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
1-Oksoprolin	serum	Al Awam et al. [160]
Pentadekansk kiselina	serum	Al Awam et al. [160]
Fenilalanin	serum	Yang et al. [158]
Piperidinska kiselina	urin	Yang et al. [158]
2-Piperidinkarboksilna kiselina	serum	Al Awam et al. [160]
5-Oksoprolin	serum	Yang et al. [158], Liu et al. [121]
Piruvat	serum	Yang et al. [158]
Serin	serum	Yang et al. [158]
Tetradekanska kiselina	serum	Yang et al. [158]
$\gamma$ -Tokoferol	serum	Liu et al. [121]
Triptofan	serum	Yang et al. [158], Huan et al. [109]
Urinska kiselina	serum	Huan et al. [109]
Hidroksilamin	serum, plazma	Al Awam et al. [160]
Fumarna kiselina	serum, plazma	Liu et al. [121]
Kaprilna kiselina	serum, plazma	Liu et al. [121]
Valin	plazma, urin	Yang et al. [158], Liu et al. [121]

**Tabela 6.** Potencijalni biomarkeri za bipolarni poremećaj utvrđeni GC-MS analizom biofluida

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Adipinska kiselina	urin	Chen et al. [123]
$\beta$ -Alanin	urin	Chen et al. [123][126]
$\beta$ -Amino-izobuterna kiselina	urin	Chen et al. [123]
Arabitol	urin	Chen et al. [123]
Azelainska kiselina	urin	Chen et al. [123][126]
N-Metil-norsalsolinol	serum	Hashimoto et al. [162]
Citrulin	serum	Hashimoto et al. [162]
Glicin	urin	Chen et al. [123]
4-Hidroksibenzoeva kiselina	urin	Chen et al. [123]
$\alpha$ -Hidroksibutirat	urin	Chen et al. [123][126]
5-Hidroksi-heksanska kiselina	urin	Chen et al. [123]
D-Hidroksi-pirimidin	urin	Chen et al. [123], Xu et al. [163]
Manitol	urin	Chen et al. [123]
Metil-malonska kiselina	urin	Chen et al. [123]
Fenilalanin	urin	Chen et al. [123]
Pseudouridin	urin	Chen et al. [123]
Piroglutarna kiselina	urin	Chen et al. [123]

Interpretacija rezultata dobijenih GC-MS analizom predstavlja veoma zahtevan proces [151]. Najčešće korišćen softver za obradu podataka je ChemStation proizvođača Agilent Technologies [164]. Javno dostupan, besplatan softver za analizu hromatograma je AMDIS (skraćeno od Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System) [165]. U novijim studijama, sve izraženiji je trend prelaska na online platforme za obradu podataka, od kojih je najistaknutija XCMS koja omogućava korisniku potpunu obradu podataka, od pretprocesiranja do identifikacije metabolita. Pretprocesioni koraci podrazumevaju smutovanje, korekciju bazne linije, detekciju pikova, poravnanje, normalizaciju i, na kraju, njihovo poređenje sa bibliotekom i identifikaciju. Trenutno se za vizualizaciju metaboličkih poremećaja najčešće koristi grafički prikaz PLS-DA modela [166,167].



## 2.4. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja LC-MS analizom

Masena spektrometrija (MS) u kombinaciji sa hromatografskim tehnikama, predstavlja najšire primenjenu tehniku u metabolomici. Razlog tome je velika osetljivost ove tehnike, kao i selektivnost, relativno brza analiza i mogućnost primene kvalitativne i kvantitativne analize. [168] Poslednjih decenija, MS doživljava brz tehnički razvoj i postaje široko primenjena tehnika kako u hemijskim, tako i u fizičkim naukama [169].

Analiza bioloških uzoraka ovom tehnikom, u početku, bila je dosta ograničena, prvenstveno zbog dostupnih tehnika jonizacije, koje su bile pogodne samo za molekule malih molekulskih masa. Situacija sa analizom bioloških uzoraka drastično se menja pojavom jonizacije u elektrospreju (ESI), blage tehnike jonizacije koja je pogodna za veliki broj biomolekula [170]. Nakon toga upotreba LC-MS tehnike u analizi biofluida je ubrzano razvijana za potrebe farmaceutske industrije, toksikologije, endokrinologije i kliničke laboratorijske prakse [171], i vremenom preuzima primat nad GC-MS tehnikom u analizi biofluida. Prednosti LC-MS tehnike u odnosu na GC-MS tehniku u analizi biofluida su: (1) jednostavnija priprema uzoraka (nije neophodna derivatizacije), jer se razdvajanje smeše analita od interesa vrši na sobnoj temperaturi i nije potrebno da analiti budu isparljivi [172], (2) bolje hromatografske razdvajanje i (3) veća osetljivost [173].

Uzorci seruma i plazme predstavljaju veoma složene smeše za analizu, sastoje se od složenog matriksa organskih i neorganskih supstanci, jedinjenja malih i velikih molekulskih masa koja su međusobno u nekovalentnim interakcijama. Analiza uzorka urina je izazovnija od analiza seruma i plazme usled prisustva analita od interesa u znatno nižim koncentracijama. Priprema uzoraka seruma i plazme za LC-MS analizu uključuje uklanjanje molekula velikih molekulskih masa (proteini, polipeptidi) dodatkom smeše organskih rastvarača [174], koje prati centrifugiranje, odvajanje supernatanta koji sadrži metabolite od interesa i rastvaranje u odgovarajućoj mobilnoj fazi za LC analizu. Prethodna istraživanja sa ciljem optimizacije metoda za pripremu uzoraka u metaboličkim ispitivanjima su optimizovala primenu različitih rastvarača u odgovarajućim odnosima i optimalne temperature za taloženje polipeptida [175–177]. Na sobnoj temperaturi (15–20 °C), optimalni rezultati taloženja su postignuti korišćenjem tri puta veće zapremine metanola u odnosu na zapreminu uzoraka. Serum i plazma sadrže enzime, pa se preporučuje da se taloženje proteina radi na temperaturi nešto većoj od temperature mržnjenja vode kako bi se smanjila aktivnost enzima, a potpuna inhibicija enzima je moguća na -56 °C. Pored već pomenutih klasičnih metoda taloženja proteina, koristi se i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, solid phase extraction). Iako SPE kertridži nisu univerzalni i pogodni za sve klase jedinjenja od interesa, ovaj način priprema uzoraka je uobičajen u kliničkim analizama [178–180].

Grana koja se eksponencijalno razvija u metaboličkim ispitivanjima pomoću masene spektrometrije je lipidomika [181]. Lipidomika predstavlja metabolomički pristup čiji je cilj sveobuhvatna analiza lipida u biološkim uzorcima [182]. Razvoj instrumentalnih tehnika je omogućio i metabolomičko profilisanje lipida. Primena lipidomike u naučnim izučavanjima bolesti je kod različitih bolesti ukazala na značajne promena u profilu lipida biofluida. Lipidi učestvuju u ćelijskoj signalizaciji i fiziologiji tkiva i promena njihovog profila u biofluidima je dovedena u vezu sa različitim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, shizofrenije i bipolarnog poremećaja [183]. Lipidni biomarkeri otvaraju mogućnost za novi pristup medicinske dijagnostike i praćenja toka bolesti.

Potencijalni biomarkeri shizofrenije i bipolarnog poremećaja utvrđeni u krvi, serumu i urinu, LC-MS tehnikom prikazani su u tabeli tabelama 7. i 8.

**Tabela 7.** Potencijalni biomarkeri za shizofreniju utvrđeni LC-MS analizom biofluida

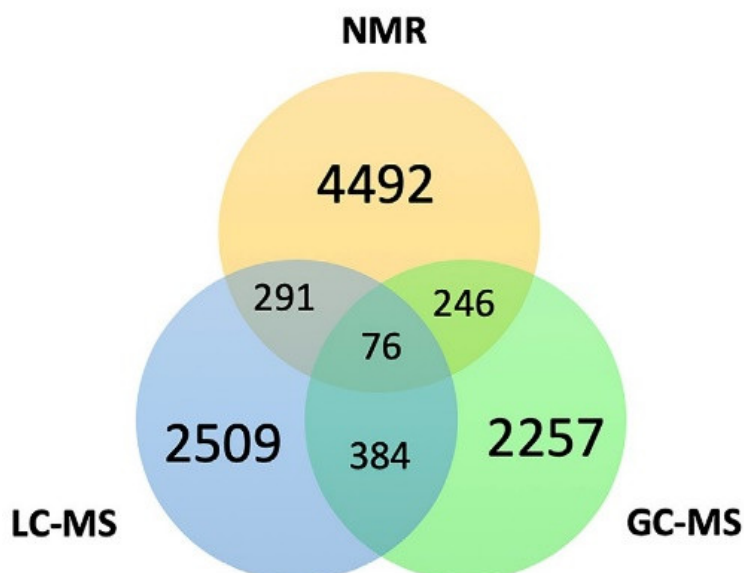
Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
$\gamma$ -Aminobuterna kiselina	krv	Cai et al. [159]
Arginin	plazma	He et al. [184]
3,4-Hidroksifenilsirćetna kiselina	krv	Cai et al. [159]
Dopamin	krv	Cai et al. [159]
Glutamat	krv, plazma	Cai et al. [159], Fukushima et al. [185]
$\gamma$ -Glutamilcistein	serum	Fukushima et al. [185]
Glutation	serum	Fukushima et al. [185]
Homovanilinska kiselina	krv	Cai et al. [159]
3-Hidroksibutirat	serum	Fukushima et al. [185]
5-Hidroksiindolsirćetna kiselina	krv	Cai et al. [159]
Serotonin	krv, serum	Cai et al. [159], Fukushima et al. [185]
Kinurenska kiselina	serum	Fukushima et al. [185]
Laktat	serum	Fukushima et al. [185]
Linolna kiselina	serum	Fukushima et al. [185]
3-Metoksi-4-hidroksifenilglicerol	krv	Cai et al. [159]
Noradrenalin	krv	Cai et al. [159]
Ornitin	plazma	He et al. [184]
Serin	plazma	Fukushima et al. [185]
Treonin	serum	Fukushima et al. [185]
Triptofan	serum	Fukushima et al. [185]
Tirozin	serum	Fukushima et al. [185]
Valinbademova kiselina	krv	Cai et al. [159]
<i>p</i> -Krezol-sulfat	plazma	Wang et al. [114]
3-(2-Teonil)propanska kiselina	plazma	Wang et al. [114]
4-Vinilfenol-sulfat	plazma	Wang et al. [114]
3-Karboksi-4-metil-5-propil-2-furanpropanska kiselina	plazma	Wang et al. [114]
3-Karboksi-4-metil-5-pentil-2-furanpropanska kiselina	plazma	Wang et al. [114]
16-Hidroksipalmitinska kiselina	plazma	Wang et al. [114]
N-(1-Deoksi-1-fruktozil)-valin	plazma	Wang et al. [114]
N-(1-Deoksi-1-fruktozil)-izoleucin	plazma	Wang et al. [114]
N-(1-Deoksi-1-fruktozil)-fenilalanin	plazma	Wang et al. [114]
Fenilalanin-fenilalanin	plazma	Wang et al. [114]
Androsteron-sulfat	plazma	Wang et al. [114]
N-Palmitoil-fosfoetanolamin	plazma	Wang et al. [114]
Testosteron	plazma	Wang et al. [114]
Sulfolitoholna kiselina	plazma	Wang et al. [114]
N-Metil-2-pirolidinon	plazma	Wang et al. [114]
Oleamin	plazma	Wang et al. [114]
Dekanoil-karnitin	plazma	Wang et al. [114]
9-Decenoil-karnitin	plazma	Wang et al. [114]
Kreatin	urin	Cai et al. [159]
Mokraćna kiselina	plazma, urin	Cai et al. [159]

**Tabela 8.** Potencijalni biomarkeri za bipolarni poremećaj, utvrđeni LC-MS analizom biofluida

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Fosfatidinska kiselina	serum	Ribeiro et al. [186]
Fosfatidinska kiselina (48:8, OH)	serum	Ribeiro et al. [186]
Fosfatidiltanolamin	serum	Ribeiro et al. [186]
Fosfatidilglicerol	serum	Ribeiro et al. [186]
Fosfatidilinozitol	serum	Ribeiro et al. [186]
Triacilgliceroli	serum	Ribeiro et al. [186], Jadranin et al. [187]
Slobodne masne kiseline	serum	Jadranin et al. [187]
Sfingolipidi	serum	Jadranin et al. [187]
Glikofosfolipidi	serum	Jadranin et al. [187]

Podaci dobijeni LC-MS tehnikom se na isti način obrađuju kao i podaci dobijeni GC-MS tehnikom, razlika je u softverima i bibliotekama koje se koriste prilikom obrade podataka [188]. Efikasna i pouzdana obrada podataka predstavlja jedan od najvažnijih koraka u metabolomičkoj analizi i podrazumeva pretvaranje LC-MS eksperimentalnih podataka u dvodimenzionalnu matricu za hemometrijsku analizu. Za konverziju podataka najčešće se koriste komercijalne i online dostupne platforme, odnosno metabolomički softverski alati: XCMS, MS-DIAL, Mzmine, AMDIS, OpenMS, MetAlign, MET-COFEA, msCom-pare, Spectconnect, MAVEN, MetaboliteDetector i MetaboAnalyst [189–191]. Navedene platforme imaju svoje prednosti i mane, u zavisnosti od svrhe i cilja istraživanja. Pomoć u identifikaciji metabolita su često online dostupne biblioteke. Za razliku od GC-MS tehnike, koja ima bogate baze podataka, identifikacija metabolita u LC-MS je najizazovnije korak tokom metabolomičke analize. Masena spektrometrija visoke rezolucije omogućava određivanje molekulske formule metabolita, ali ne i strukturne formule jedinjenja, pa je upotreba standarda metabolita od interesa često neophodna, iako neke strukturne informacije mogu pružiti fragmentacioni joni. Kao što je slučaj i u prethodno opisanim tehnikama, i ovde se koriste hemometrijske analize, od koji su najznačajnije PCA i PLS-DA.

Sve instrumentalne tehnika koje se primenjuju u metabolomici biofluida imaju prednosti i mane u zavisnosti od tipa uzorka i analita od interesa. Razvojem tehnike mane se prevazilaze i dovode do različite upotrebe. Razvojem tehnologije, NMR i LC-MS su u odnosu na GC-MS preuzele vodeću ulogu. U metabolomičkom ispitivanju postoji potreba za identifikacijom i određivanjem više stotina metabolita koji pripadaju različitim klasama jedinjenja u istom uzorku biofluida [192–194]. Nijedna tehnika samostalno ne ispunjava taj zahtev, pa je do potpune slike ćelijskog metaboloma jedino moguće doći kombinacijom različitih tehnika [188]. Nažalost, najveći broj metabolomičkih studija zasniva se samo na jednoj analitičkoj tehnici (slika 4).



**Slika 4.** Venov dijagram sa brojem publikacija zasnovan na LC-MS, GC-MS i NMR metabolomičkoj studiji u periodu od 2010. do 2019. (slika preuzeta iz reference [188])

## 2.5. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja ostalim tehnikama

### 2.5.1. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja CE-TOFMS tehnikom

Elektroforeza predstavlja kretanje naelektrisanih čestica kroz određeni medijum korišćenjem indukovano električnog polja. U proteomici, elektroforeza predstavlja tehniku odvajanja kompleksnih molekula proteina, odnosno služi za frakcionisanje proteina seruma i plazme pre masenospektrometrijske analize [195].

Kapilarna elektroforeza je tehnika uvedena šezdesetih godina prošlog veka i njen glavni cilj je bio odvajanje molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja unutar malih kapilara, čiji je unutrašnji prečnik 20 do 100  $\mu\text{m}$ . Kapilare su najčešće staklene ili napravljene od silicijum-dioksida. Kapilarna elektroforeza sa masenom spektrometrijom, najčešća kombinacija je sa TOF-MS (analizatorom koji razdvaja jone na osnovu vremena preleta, eng. time of light), CE-TOFMS, je razvijena pre 20-ak godina i predstavlja najsavremeniju alatku za analizu metabolita [196]. Glavne prednosti ove tehnike su analiza biofluida sa izuzetno velikom moći razdvajanja i sposobnost analize različitog metaboličkog profila istovremeno, visoka ponovljivost i kratko vreme analize [197]. Efikasnost ove tehnike ispitana je u nekoliko kliničkih studija [198,199]. Još jedna od prednosti ove tehnike je veoma mala količina uzoraka koja je potrebna za analizu, reda veličine nanolitara. Sa druge strane, u poređenju sa LC-MS metodom, nedostatak ove tehnike je dodatni korak u pripremi uzoraka koji zahteva koncentrovanje uzorka [200]. Bez prethodnog koncentrovanja uzorka, proteini ili peptidi koji su prisutni u niskoj koncentraciji mogu biti potpuno izostavljeni. Upravo zbog toga do sada je sproveden relativno mali broj studija u kojima je ova tehnika primenjena za identifikaciju biomarkera u urinu [201], serumu i plazmi [200].

Priprema uzorka za CE zahteva slične korake kao i priprema uzorka za LC-MS tehniku. Najčešće je to dodavanje određene količine metanola sa internim standardom uzorku seruma ili plazme. Nakon toga sledi taloženje proteina, najčešće tečno-tečnom ekstrakcijom, tj. dodavanjem smeše organskih rastvarača, odvajanje proteina centrifugiranjem i zatim rastvaranje proteina u odgovarajućem rastvaraču za analizu. Nekada je potrebno filtriranje uzoraka kroz filtere, najčešće filtere od 5 kDa.

Kao i kod prethodno navedenih tehnika, cilj i ove tehnike je identifikacija potencijalnih biomarkera za određene bolesti. U poslednjih nekoliko godina ova metoda se primenjuje za analizu biofluida kod pacijenata obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Biomarkeri identifikovani, pomoću ove tehnike prikazane su tabelama 8. i 9.

**Tabela 9.** Biomarkeri identifikovani kod pacijenata obolelih od shizofrenije pomoću CE-TOF/MS tehnike

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
Betain	plazma	Cai et al. [159]
Benzoeva kiselina	plazma	Koike et al. [120]
Kreatin	plazma	Cai et al. [159]
Glukonska kiselina	plazma	Cai et al. [159]
Glutamat	plazma	Cai et al. [159]

**Tabela 10.** Biomarkeri identifikovani kod pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja pomoću CE-TOF/MS tehnike

Biomarkeri	Vrsta biofluida	Referenca
N-acetil-glutaminska kiselina	serum	Yoshimi et al. [127]
Alanin	urin	Yoshimi et al. [127]
Arginin	serum	Yoshimi et al. [127]
Citrulin	plazma	Kageyama et al. [202]
Izolimunska kiselina	CFS	Yoshimi et al. [127]
Piruvat	serum	Yoshimi et al. [127]
Serin	serum	Yoshimi et al. [127]

### 2.5.2. Metabolomičko ispitivanje seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja FT-IR tehnikom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, FT-IR, je spektroskopska metoda koja se koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu kao i u strukturnoj analizi [203]. IR analiza postaje moćno sredstvo za kvalitativnu analizu bioloških uzoraka kao što su plazma, serum, tkivo, pljuvačka i urin [204,205]. Analiza infracrvenom spektroskopijom je brza, nedestruktivna, bez reagenasa i ne zahteva posebnu pripremu uzoraka [168]. Poslednjih godina IR spektroskopija se koristi kao komplementarna tehnika u kliničkoj dijagnostici i karakterizaciji mnogih vrsta bolesti poput Parkinsonove, Alchajmerove i leukemije [206,207]. Identifikacija se zasniva na spektralnim informacijama. Glavni region interesovanja u IR spektru nalazi se između 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ , gde se nalazi većina vibracionih traka od značaja za određene klase jedinjenja. Pored toga što IR spektroskopija predstavlja otisak prsta svakog jedinjenja, ona predstavlja tehniku pomoću koje je moguće analizirati ugljene hidrate, aminokiseline, masne kiseline, lipide, proteine i polisaharide istovremeno. Jedna od najvećih prednosti ove tehnike je mala količina uzoraka koja je potrebna za analizu. Međutim, pored svih navedenih prednosti, i ova tehnika ima određene mane, u smislu osetljivosti i selektivnosti metode. Intenzivna traka koja potiče od vode dosta ometa analizu podataka, međutim to se može prevazići dodatnim koracima u pripremi uzoraka.

Poslednjih nekoliko godina, naučnici posvećuju sve više pažnje ovoj tehnici. Ova tehnika je danas veoma korišćena u metabolomičkom ispitivanju, pogotovo za praćenje određenih metabolita tokom vremena [208]. Primene su različite, kako u kliničke svrhe, tako i u mikrobiologiji, hemiji hrane,

biljnoj metabolomici itd. Brojne studije su urađene korišćenjem ove tehnike za analizu tkiva, ćelija, biofluida, sa ciljem razvoja brze metodologije za otkrivanje i dijagnozu određenih bolesti [209]. Analiza seruma ovom tehnikom korišćena je za razlikovanje tipa dijabetesa i uočavanje razlika između kontrolnih grupa [210]. Ovom tehnikom moguća je i analiza urina, koja predstavlja jednu od rutinskih kliničkih analiza i zasniva se na metabolomičkom profilisanju sportista u pogledu doping kontrole [211].

FT-IR tehnikom takođe je analizirana plazma pacijenata obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Ildiz i saradnici su 2014. godine objavili rezultate studije u kojoj su predložili metodologiju zasnovanu na metabolomičkoj analizi i identifikaciji spektralnih promena i njihovu korelaciju sa biomarkerima koji su povezani sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem [203]. Glavni cilj ove studije je bio da na osnovu dobijenih spektralnih podataka urade klasifikaciju i razlikovanje uzoraka pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem i kontrolne grupe. Rezultati ove studije su pokazali jasno odvajanje uzoraka pacijenata i kontrolne grupe i takođe prikazali identifikaciju tri glavna regiona koja pokazuju razliku između ova dva mentalna poremećaja. Uočene tri regije razlikovanja nalaze se u oblasti od  $1300\text{--}950\text{ cm}^{-1}$  i  $3750\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ . Regija od  $1080\text{--}1242\text{ cm}^{-1}$  pripada asimetričnim i simetričnim vibracijama P-O veze fosfatne grupe iz DNK lanca, dok se u regiji od  $2850$  i  $2920\text{ cm}^{-1}$  nalaze valencione deformacije  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$  grupe lipida iz lipoproteina. Na  $3290\text{ cm}^{-1}$  nalaze se vibracije N-H veze iz polipeptidnog lanca. Dobijeni rezultati pokazuju potencijal ove metode u analizi karakterističnih biomarkera za mentalne bolesti, shizofreniju i bipolarni poremećaj.

## 2.6. Hemometrijska analiza u metabolomici

Hemometrija predstavlja multidisciplinarnu naučnu oblast koja primenjuje matematičke, statističke, informatičke i grafičke metode na hemijske podatke i na taj način obezbeđuje maksimalnu količinu informacija analizom hemijskih podataka. Termin hemometrija prvi put je upotrebljen 1974. godine [212] i izveden je prema analogiji sa nazivom naučne discipline ekonometrija, koji ukazuje na obradu ekonomskih podataka. Matematički obrasci se modeluju pomoću osnovnog skupa ulaznih podataka dobijenih eksperimentalnim putem. Za uspostavljanje matematičke korelacije između dobijenih eksperimentalnih podataka neophodno je sve informacije pretvoriti u numeričke vrednosti. Primenom matematičkih modela moguće je i posmatranje bioloških sistema i reakcija koje se u njima odvijaju. Jedan od modela koji daje vezu između strukture molekula i njihove biološke aktivnosti je QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) model [213]. Najčešće se primenjuje u oblastima medicinske hemije, toksikologije i zaštite životne sredine. Tehnološkim razvojem, hemometrijske metode postaju tehnike koje se rutinski primenjuju. U poslednjih 30 godina hemometrija je ostvarila izuzetan napredak što je dovelo do razvoja različitih analiza koje omogućavaju dobijanje pouzdanih metoda za reprodukciju eksperimentalnih podataka. Oblasti hemometrije na koju je u današnje vreme stavljen akcenat jesu dizajn, organizacija i upravljanje podacima, kao i analiza i vizuelizacija hemijskih podataka.

Multivarijantna statistička analiza je metoda koja uzima u obzir veliki broj promenljivih (varijabli) u proučavanju hemijskih podataka pri kreiranju matematičkih modela. Za većinu hemijskih pojava karakterističan je uticaj većeg broja faktora, nezavisno promenljivih, što znači da je za njihovu dobru karakterizaciju neophodno sagledavanje i razmatranje većeg broja promenljivih. Uzimanjem u obzir više promenljivih istovremeno moguće je dobijanje više korisnih informacija nego prilikom sagledavanja svake promenljive pojedinačno (univarijantni pristup), što predstavlja jednu od prednosti multivarijantne analize. Postoje mnogi primeri koji pokazuju da ovaj pristup može dati uspešne rezultate, čak i u slučajevima kada je primena univarijantne analize neproduktivna [214].

Metabolomika se definiše kao sveobuhvatna kvalitativna i kvantitativna analiza svih metabolita prisutnih u biološkim sistemima [215,216]. Metabolomika je našla primenu u različitim sferama

medicine, u dijagnostici, toksikologiji, razvoju i primeni lekova [217]. Dobijanje metaboličkog profila omogućava dobijanje detaljnijih informacija o metaboličkim putevima biohemijskih procesa. Za analizu metaboloma karakteristična su tri pristupa: ciljana analiza, analiza metabolomičkih profila i analiza metabolomičkog otiska prsta. Metabolomički otisak prsta, metoda koja je i korišćenja u ovoj disertaciji, najkorisnija je za otkrivanje biomarkera i primenu u dijagnostici [215]. Ovaj pristup analize ima za cilj pronalaženje razlika između uzoraka, primenom spektroskopskih tehnika, najčešće poređenjem spektara, i njihovu klasifikaciju na osnovu multivarijantne analize. Nedostatak ove metode je nemogućnost direktnog poređenja metaboličkih puteva, zbog otežane identifikacije komponenata [218].

Spektroskopski ili hromatografski podaci obično zahtevaju obradu pre statističke analize. Obrada podataka je neophodna i važna za čitav proces dobijanja validnih rezultata. Svi koraci prilikom obrade imaju za cilj da smanje složenost podataka i izvuku najvažnije informacije iz polaznih podataka [219]. Koraci pri obradi su smanjenje šuma, detekcija i poravnanje pikova, normalizacija, binovanje, centriranje i skaliranje [220]. Ako razmatramo NMR spektroskopiju, dobijeni NMR spektri, zbog svoje složenosti zahtevaju određenu obradu, procesiranje spektara, što podrazumeva korekciju faze, bazne linije i zaključavanje spektara.

Nakon dobijanja seta podataka, pristupa se multivarijantnoj analizi. Najčešće korišćene metode su, pre svega, PCA, PLS, PLS-DA, OPLS-DA i O2PLS-DA. Navedene metode se mogu svrstati u nadgledane i nenadgledane. Nenadgledane metode su metode koje se koriste pri konstrukciji modela i ne koriste informacije o identitetu grupe. Za razliku od nenadgledanih metoda, nadgledane metode, prilikom konstruisanja modela koriste već definisan identitet grupe i samu analizu fokusiraju na dobijanje promenljivih važnih za razdvajanje grupa. Za otkrivanje biomarkera ili testiranja određene hipoteze nadgledane metode su od većeg značaja.

### **2.6.1. Analiza glavnih komponenti, PCA**

PCA je najčešće korišćena nenadgledana multivarijantna metoda. Najranije zapise o PCA metodi dali su Pearson i Hotelling [221,222]. Analiza glavnih komponenti predstavlja statističku analizu redukcije dimenzionalnosti skupa podataka na način da bude obuhvaćena što veća količina varijanse podataka. Koristi se kao metoda za pronalaženje šablona u podacima. Zadatak metode glavnih komponenti je određivanje linearnih kombinacija originalnih promenljivih koje će imati maksimalnu varijansu i biti međusobno nekorelisane, pri tom gubeći u najmanjoj mogućoj meri informacije sadržane u originalnom skupu podataka. Prva glavna komponenta se konstruiše tako da obuhvata najveći deo varijanse originalnog skupa podataka, a naredne komponente obuhvataju onaj deo varijanse koji nije obuhvaćen prethodno izdvojenim komponentama [223]. Sve ostale glavne komponente su ortogonalne na prethodne. Glavne komponente koje imaju niske vrednosti varijansi ne pružaju dovoljno informacija koje su od značaja za analizu, pa se stoga mogu zanemariti [224]. Jedan od najbitnijih koraka u analizi je određivanje broja glavnih komponenata. Nekoliko prvih glavnih komponenata sadrži najveću količinu varijansi. Okvirno pravilo je da se uzima onoliko komponenata koje objašnjavaju više od 80% ukupne varijanse podataka. Primarna upotreba PCA je u proceni kvaliteta i homogenosti skupa podataka, zbog čega često predstavlja prvi korak u multivarijantnoj analizi.

### **2.6.2. Diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, PLS-DA**

PLS-DA je najčešće korišćenja nadgledana metoda i primenjuje se u cilju klasifikacije uzoraka. Ova metoda prvenstveno je razvijana u okviru društvenih nauka [225], ali je najveću primenu našla upravo u hemometriji. Predstavlja metodu za linearno modelovanje odnosa između skupova posmatranih promenljivih posredstvom latentnih varijabli (LV). Ukupan broj promenljivih u pomenutom modelu

dobija se unakrsnom validacijom [226] gde se deo podataka koristi kao set za kalibraciju, odnosno konstruisanje modela (tzv. trening set), a drugi deo se izdvaja kao set za testiranje (tzv. test set) i koristi se za validaciju konstruisanog modela. Uvek je poželjno da samo nekoliko latentnih promenljivih opisuje najveći deo varijanse. PLS-DA sadrži dva odvojena seta, X i Y, od kojih X predstavlja spektroskopske ili hromatografske podatke, dok Y sadrži promenljive odgovora, na primer određenu bioaktivnost. PLS-DA analiza ima za cilj poboljšanje razdvajanja grupa rotiranjem komponenata, da bi se dobilo maksimalno razdvajanje između klasa, kao i definisanje promenljivih odgovornih za to razdvajanje. Stoga kod PLS-DA metode ne postoji druga mogućnost osim pripadnosti ili ne nekoj od navedenih klasa [227]. Posmatrano u odnosu na PCA analizu, ovim pristupom se dobija bolje razdvajanje klasa [228].

Diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, OPLS-DA, je uvedena kao poboljšanje PLS-DA analize za razdvajanje dveju ili više grupa. Prednost OPLS-DA je u tome što jedna komponenta služi kao prediktor za klasu, odnosno u direktnoj je vezi sa Y setom, dok ostale komponente opisuju varijaciju ortogonalno na Y komponentu [219].



### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

Uzorkovanje je obavljeno u skladu sa odobrenjima etičkih komiteta: Specijalne bolnice za psihijatrijske bolesti „Kovin“ (br. 01-3342/1-1), Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta (br. 369/2), kao i Instituta za transfuziju krvi Srbije (br. 1226). Uzorci krvi odabranih lečenih pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem obezbeđeni su iz Specijalne bolnice za psihijatrijske bolesti „Kovin“, dok su odgovarajući uzorci zdravih osoba (kontrola) obezbeđeni u Institutu za transfuziju krvi Srbije. U skladu sa zahtevima etičkih komiteta, pacijenti i/ili njihovi staratelji i zdravi dobrovoljci su potpisali pismenu saglasnost za donaciju njihove krvi za ovo istraživanje. Prikupljeno je ukupno 50 uzoraka krvi pacijenata obolelih od shizofrenije, 33 uzorka krvi pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja i 39 uzoraka krvi zdravih osoba.

Uzorci krvi pacijenata obolelih od shizofrenije dobijeni su od 25 muških i 25 ženskih pacijenata, starosti od 32 do 68 godina. Srednja vrednost njihovog indeksa telesne mase (eng. Body mass index, BMI) iznosila je 32, a od ukupnog broja pacijenata 83% su bili su pušači. Pacijente obolele od bipolarnog poremećaja, čiji su uzorci prikupljeni za istraživanje, predstavljalo je 14 muških i 19 ženskih pacijenata, ukupno 33 pacijenta, starosti od 20 do 74 godina. Procentualno, broj pušača kod pacijenata sa bipolarnim poremećajem iznosio je 66,7%, dok se BMI kretao od 18,5 do 35,5. Kontrolnu grupu, u oba slučaja, činilo je 39 zdravih dobrovoljaca, 27 muškaraca i 12 žena, starosti od 23 do 60 godina. Njihov BMI se kretao od 22,2 do 33,2, dok je pušača bilo 48,7%.

Svi uzorci krvi su prikupljeni u jutarnjim časovima, između 8 i 9 h. Uzorci su prikupljeni u vakutajneru i ostavljeni 1h na ledu kako bi došlo do koagulacije. Nakon koagulacije su centrifugirani 10 min (4500 rpm), odvojen je supernatant koji je čuvan na -80 °C do NMR i GC-MS analize.

Za NMR eksperimente, alikvotu od 250 µL seruma dodato je 250 µL deuterisane vode (D<sub>2</sub>O). Ovako pripremljeni uzorci su prebačeni u NMR kivete od 5 mm i snimani. Svi uzorci su pripremani u triplikatu.

Za GC-MS analize, u 100 µL prethodno odmrznutog seruma, dodato je 10 µL sorbitola kao internog standarda, koncentracije 0,4 mg/mL. Taloženje proteina je izvršeno dodatkom 800 µL prethodno pripremljene hladne smeše metanol:voda u odnosu 8:1 (v:v). Uzorci su potom vorteksirani 1 minut. Nakon toga uzorci su ostavljeni 20 minuta na 4 °C, pa centrifugirani 10 minuta (4500 rpm). Za dalju analizu odmereno je 200 µL supernatanta koji je uparen pod strujom azota. Radi potpunog uklanjanja rastvarača, uzorci su liofilizovani tokom 24 h. Dobijeni suvi ostatak je derivatizovan sa 100 µL metoksiamin hidrohlorida u piridinu, koncentracije 20 mg/mL, inkubacijom tokom 2 h na 40 °C, nakon čega je silanizovan sa 100 µL BSTFA sa 1% TMCS (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid sa 1% trimetilhlorosilanom) i inkubiran 1 h na 80 °C.

#### 3.2. Instrumentalna analiza

NMR eksperimenti su izvođeni na Brukerovom spektrometru AVANCE III radne frekvencije 500,26 MHz (za <sup>1</sup>H jezgro) i BBI Bruker probom sa gradijentom po Z osi i kivetama prečnika 5 mm. Svi spektri su snimani na temperaturi od 298 K. Za potrebe hemometrijske analize snimane su pulsne sekvence sa presaturacijom: standardni pulsni program „zgpr“, watergate, 1d noesy, cpmg i 1d dosy. Spektralna širina je podešena na 15 ppm, za sve pulsne programe. Sve pulsne sekvence su snimane sa 128 skanova, vremenom relaksacije od 2 s (d1) i vremenom akvizicije od 2 s. Signal metil grupe laktata sa hemijskim pomeranjem od 1,33 ppm (3H, 3J = 7,0 Hz) korišćen je kao referentni signal.

Identifikacija pojedinačnih metabolita, kao i asignacija odgovarajućih signala urađena je pomoću 1D spektara CPMG pulsne sekvence, u kombinaciji sa 2D eksperimentima (JRES, COSY/TOCSY, HSQC, HMBC). Hemijska pomeranja su izražena u δ jedinicama, dok su konstante spezanja izražene

u Hz. TOCSY eksperiment sniman je *mlevphpr.2* pulsnom sekvencom, sa 512 inkremenata, 32 skana i vremenom mešanja od 160 ms. Za HSQC eksperiment korišćena je *hsqcetgpprsisp2.2* pulsna sekvenca, sa 256 inkremenata i 120 skanova. Pulsna sekvenca eksperimenta JRES je *jresgpprqf* i sniman je sa 40 inkremenata i 128 skanova. COSY eksperiment sniman je *cosyprqf* pulsnom sekvencom sa 256 inkremenata i 16 skanova, dok je HMBC eksperiment sniman *hmbcqpplndqf* pulsnom sekvencom sa istim brojem inkremenata ali sa 512 skanova. Sve navedene pulsne sekvence preuzete su iz Brukerove biblioteke. Pored 2D eksperimenata, za identifikaciju je korišćena i besplatno dostupna baza podataka HMDB.

GC-MS analiza urađena je na Agilent 7890A gasnom hromatografu opremljenom sa dva detektora: plameno-jonizujućim (flame ionization detector, FID) i maseno- spektrometrijskim (MS). Za ovu analizu korišćeni su sledeći uslovi: temperatura isparivača od 250 °C u splitless modu; kapilarna kolona HP-5MSI (dužine 30 m, prečnika 0,25 mm i 0,25 µm debljine filma stacionarne faze; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) pri konstantnom pritisku helijuma kao nosećeg gasa od 1 mL/min na 210 °C; početna temperatura kolone je 60°C sa kontinualnim porastom od 3 °C/min do 300 °C. Kolona je poslednjih 15 min grejana na 315 °C (Adams metoda). Kao detektori su korišćeni istovremeno i MS i FID. Temperatura FID detektora je iznosila 300 °C. Maseni spektri su snimani na Agilent-ovom kvadrupolnom detektoru 5975C inert XL EI/CI Mass Selective Detector (MSD) tehnikom elektronske jonizacije (70 eV). Temperatura jonskog izvora je bila 230 °C, a temperatura kvadrupola 150 °C. Maseni spektri elektronske jonizacije snimani su u opsegu 40 – 900 *m/z*. Identifikacija metabolita rađena je pretragom biblioteke NIST AMDIS (automated mass spectral deconvolution and identification system).

### 3.3 Hemometrijska analiza

Hemometrijska obrada podataka urađena je u programu MATLAB, verzija 9.7 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA). U okviru programskog okruženja Matlab, kao poseban programski paket (toolbox) za hemometrijsku analizu <sup>1</sup>H NMR spektara korišćen je PLS Toolbox verzija 8.9.1. Preliminarna priprema i učitavanje NMR spektara u Matlab radno okruženje, rađena je pomoću Matlab programskog dodatka (GNAT), verzija 1.2. U nekim slučajevima je korišćen potprogram preuzet iz matNMR programskog paketa, verzija 3.9.144, koji je razvijen takođe u okviru Matlab okruženja. Uravnavanje signala u okviru određenog spektralnog regiona u svim NMR spektrima urađeno je korišćenjem Matlab programskog paketa ICOSHIFT, verzija 3.0 beta. Oblast između 4,35 i 5,00 ppm isključena je iz dalje analize zbog prisustva zaostalih signala vode, kao posledica primenjenih NMR pulsnih sekvenci za supresiju vode. Na osnovu analize skjunes i kurtoses (eng. skewness and kurtosis), kao mera asimetrije i spljoštenosti (treći i četvrti centralni moment) isključeni su spektralni regioni ispod 0,17 ppm i iznad 8 ppm. Funkcija polinoma prvog reda korišćena je za korekciju bazne linije. Normalizacija je urađena pomoću kvocijent normalizacije, normalizacija na osnovu verovatnoće količnika (PQN) [229], gde je normalizacioni faktor jednak ukupnoj površini (sumi) svih apsolutnih vrednosti promenljivih unutar svakog pojedinačnog uzorka. U slučaju PQN normalizacije, ovaj faktor je dodatno korigovan za vrednost koja se dobija kao najverovatnija (medijana) iz skupa vrednosti i koji se određuje kao količnik između svih promenljivih svakog pojedinačnog uzorka u data setu i referentnog uzorka (najčešće se uzima mediana uzoraka u data setu). Izvršeno je centriranje u odnosu na srednju vrednost (mean centering) svake promenljive u tabeli. Korišćene su različite metode skaliranja, Pareto skaliranje i autoskaliranje, odnosno njihova kombinacija, metoda reskaliranja sa projekcijom na polaznu vrednost dobijenu centriranjem. Za validaciju modela korišćena je sedmostruka unakrsna validacija (CV), koja podrazumeva podelu podataka na blokove nasumično izabranih uzoraka unutar svakog bloka, zadržavajući triplikatnu strukturu svakog od uzorka u okviru tabele podataka.

### **3.4. Hemikalije i laboratorijska oprema**

Prilikom pripreme uzoraka za NMR analizu, korišćena je deuterisana voda (Sigma Aldrich 99,9% atoma D).

Prilikom pripreme uzoraka za GC-MS analizu korišćene su sledeće hemikalije: voda, metanol (čistoće za tečnu hromatografiju, Sigma-Aldrich), metoksiamin hidrohlorid u piridinu, N,O bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid sa 1% trimetilhlorosilanom, sorbitol (Sigma-Aldrich, 99%) i piridin (Sigma-Aldrich) koji je prethodno prečišćen destilacijom i osušen.

Laboratorijska oprema: centrifuge (DLAB D2012plus i DLAB DM0412), vorteks (IKA MS basic) i liofilizator (Christ Alpha 2-4 LD plus).

#### 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertacije je utvrđivanje serumskih biomarkera pacijenata obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja primenom NMR spektroskopije i hemometrijske analize.

Metabolomička ispitivanja seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja, urađena su u skladu sa odobrenjima Etičkog odbora Specijalne bolnice za psihijatrijske bolesti Kovin (br. 01-3342/1-1), Etičkog odbora Instituta za transfuziju krvi Srbije (br. 1226) i Etičke komisije za upotrebu humanog biološkog materijala za istraživanje Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta (br. 369/2).

Pretragom literature ustanovljeno je da do sada nema objavljenih podataka o potencijalnim biomarkerima obolelih od ovih mentalnih bolesti našeg, odnosno sa područja Republike Srbije. Takođe, ne postoje literaturni podaci o razvoju instrumentalnih metoda zasnovanih na analizi uzoraka krvi pacijenata koje bi omogućile pouzdanije razlikovanje shizofrenije i bipolarnog poremećaja u kliničkoj praksi. Stoga, u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put je urađena analiza seruma pacijenata sa područja Republike Srbije obolelih od navedenih psihijatrijskih poremećaja.

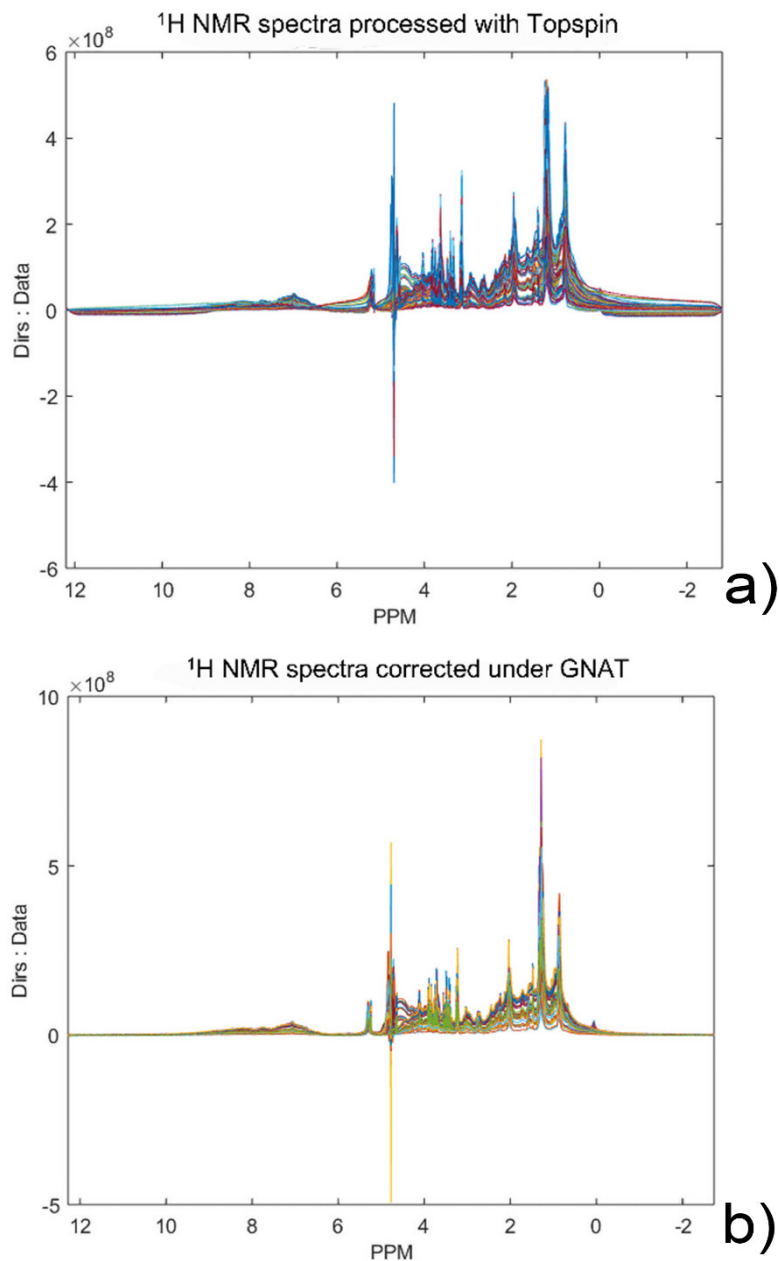
Tokom metabolomičkog ispitivanja seruma obolelih i zdravih pojedinaca primenjivani su 1D  $^1\text{H}$  NMR eksperimenti sa pulsним sekvencama za: supresiju signala HOD (zgpr, noesypr1d, p3919gp i zgppwg), eliminaciju signala makromolekula (cpmgpr1d) i malih molekula (stebpgp1s191d). Statistička analiza dobijenih spektralnih podataka obuhvatala je PCA, PLS-DA i OPLS-DA metode. Metaboliti, potencijalni biomarkeri su identifikovani na osnovu hemometrijske analize i analize podataka dobijenih 2D NMR eksperimentima: COSY, TOCSY, 2DJ razložna spektroskopije, HSQC i HMBC. Prisustvo potencijalnih biomarkera u serumu obolelih potvrđivano je i GC-MS analizom prethodno derivatizovanih uzoraka. Detaljan opis parametara svih eksperimenata dat je u eksperimentalnom delu.

#### 4.1. Hemometrijska analiza

Hemometrijska analiza rađanja je na osnovu 1D NOESY NMR (*noesypr1d*) eksperimentalnih rezultata, dobijenih analizom seruma pacijenata i zdravih kontrola, poređenjem grupa: (1) shizofrenije i kontrolne, (2) bipolarnog poremećaja i kontrolne, (3) shizofrenije i bipolarnog poremećaja. PCA analiza je korišćena kao metoda za pronalaženje obrasca među uzorcima na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka. PLS-DA i OPLS-DA analize su korišćene za dobijanje klasifikacionih modela koji razlikuju uzorke iz različitih grupa. Analiza skjunes i kurtoses, kao mera asimetrije i spljoštenosti (treći i četvrti centralni moment) korišćenja je za odstranjivanje spektralnih regiona koji nisu značajni za analizu, kao i za pomoć pri odabiru adekvatnog načina skaliranja. Urađena je PQN (quotient) normalizacija, a centriranje srednje vrednosti (eng. mean centering) je primenjivano prilikom centriranja podataka. Centriranje predstavlja metodu u kojoj se svaka vrednost u koloni izražava kao odstupanje od srednje vrednosti čitave kolone. Kod centriranja srednje vrednosti, izračunava se prosečna vrednost svake kolone, a zatim se oduzima od pojedinačnih vrednosti i na taj način se poboljšavaju karakteristike modela. Kao metode skaliranja korišćene su Pareto skaliranje i autoskaliranje, kao i njihova kombinacija. Autoskaliranje je postupak u kome se centrirana srednja vrednost deli srednjom vrednošću standardne devijacije promenljive. Pareto skaliranje je veoma slično autoskaliranju, jedinu razliku predstavlja faktor skaliranja, koji je u ovom slučaju kvadratni koren standardne devijacije. Takođe, korišćeno je i centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klase (class centroid centering and scalling). Centroid je ekvivalentan ponderisanoj srednjoj vrednosti, gde svaka klasa učestvuje sa istom težinom. Centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klase definiše se centriranjem koje odgovara srednjoj vrednosti od aritmetičke sredine za svaku klasu i skaliranjem baziranim na ponderisanoj standardnoj devijaciji. Nakon konstrukcije modela, urađena je unakrsna (CV) i spoljna validacija sa ciljem procene karaktera podataka koji se koriste za izradu samog modela, broja promenljivih potrebnih za karakterizaciju podataka i sposobnosti modela da predvidi klasu nepoznatih uzorke. Najjednostavnija varijanta unakrsne validacije predstavlja metodu izostavljanja jednog objekta (LOO-CV). Statistički parametri koji definišu unakrsnu validaciju su koren srednjeg kvadratnog odstupanja određen za unakrsnu validaciju (eng. *Root mean squared error cross-validation*, RMSECV) i koren srednjeg kvadratnog odstupanja za kalibraciju (eng. *Root mean square of calibration*, RMSEC). Permutacioni testovi predstavljaju još jedan način pomoći prilikom identifikovanja overfitovanih modela (eng. *Overfitted*), kao i za obezbeđenje veovatnoće da se dati model znatno razlikuje od već izgrađenog pod istim uslovima, ali na slučajnim podacima. Testovi permutacije uključuju višekratno i nasumično preuređivanje Y seta, obnavljanje modela sa trenutnim postavkama modeliranja nakon svakog preuređivanja. Pored navedenih analiza, prikazan je i grafik promenljivih od značaja (eng. *Variable Importance in Projection*, VIP) kao pomoć u identifikaciji metabolita od značaja, biomarkera.

#### 4.1.1. Hemometrijska analiza spektralnih podataka NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije i kontrola

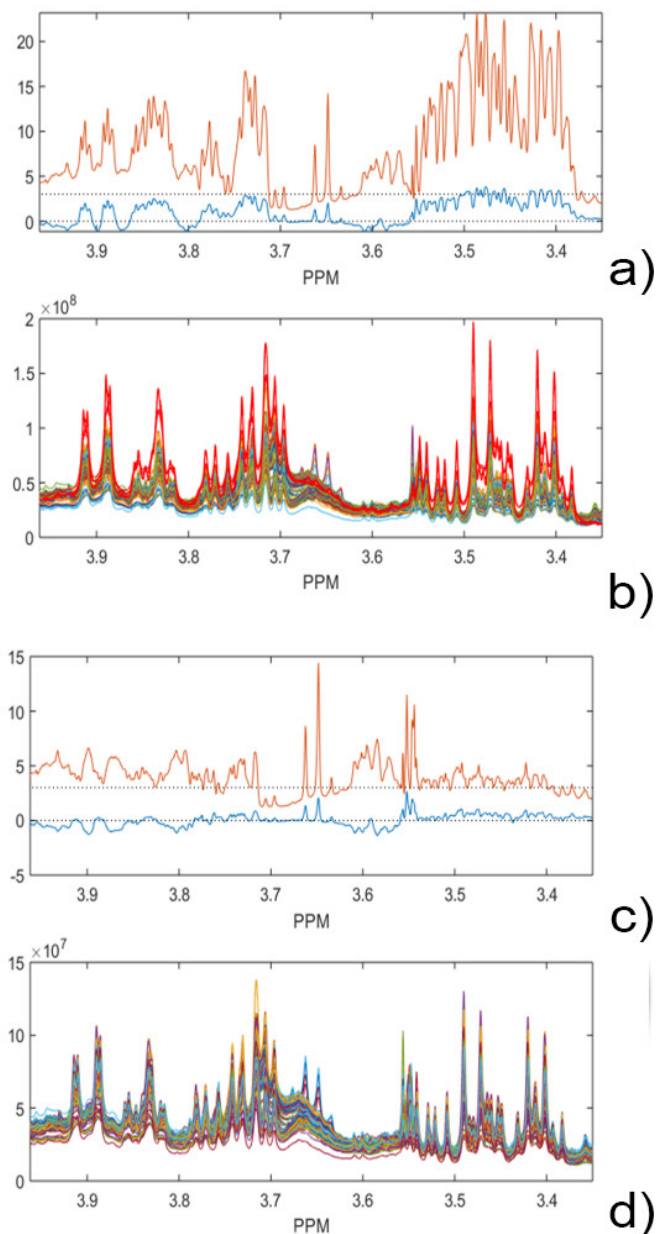
Skupovi  $^1\text{H}$  NMR spektara obrađeni su primenom Brukerovog softvera TopSpin. Faza i bazna linija korigovane su korišćenjem automatskih opcija. Naknadna korekcija faze rađena je korišćenjem faze nultog reda i na taj način uklonjena je varijacija šuma, što se može videti na slici 5.



**Slika 5.** a)  $^1\text{H}$  NMR spektri obrađeni u TopSpinu b) Isti spektri sa korigovanom fazom, obrađeni u GNAT programu.

Najčešće, prvi korak u hemometrijskoj analizi seruma je analiza glavnih komponenti, PCA. Kada je broj promenljivih 32K, kao što je ovde slučaju, uobičajene univarijantne metode nisu jednostavne za primenu. Mere asimetrije i spljoštenosti korišćene su kao pomoć pri odabiru adekvatne metode skaliranja ili oblasti promenljivih sa značajnim odstupanjem. Kurtoses za normalnu raspodelu podataka treba da bude blizu 3. Pozitivne vrednosti za obe statističke metode uočene su u spektralnom regionu između 3,2 i 3,9 ppm, kao i na 1,21 ppm. Stoga se signali u ovoj spektralnoj oblasti smatraju mogućim autlajerima, ekstremnim vrednostima, vrednostima koje drastično odstupaju od drugih

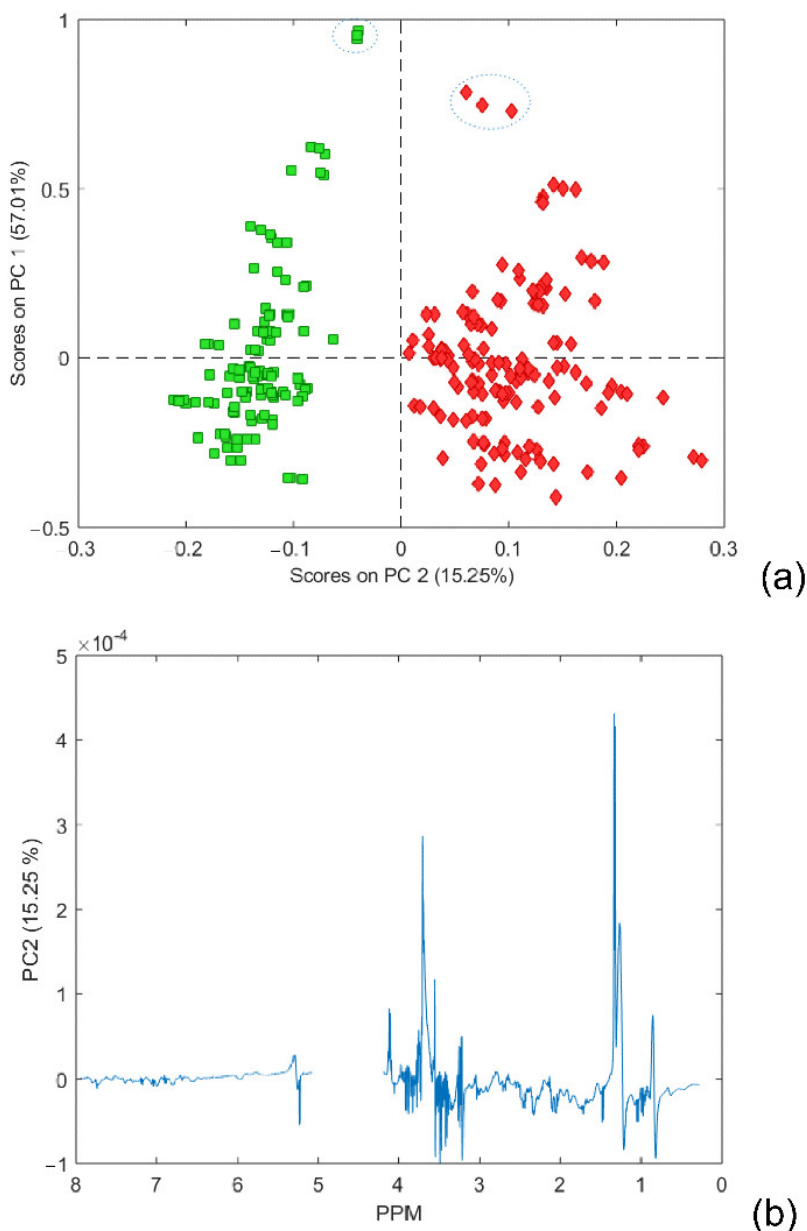
vrednosti unutar uzoraka, opservacijama koje nisu konzistentne sa ostatkom podataka. Spektralne oblasti ispod 0 ppm i iznad 8 ppm takođe su uklonjena iz analize, jer ne sadrže signale koji bi mogli biti od značaja (slika 5). U PCA analizi identifikovana su dva autlajera. Iz dalje hemometrijske analize isključeno je još ukupno osam spektara, zbog efekta visokog razblaženja koji je rezultirao veoma niskim odnosom signal-šum.



**Slika 6.** a) Rezultati za *skjunes* i *kurtoses*, kao mere asimetrije i spljoštenosti (treći i četvrti centralni moment) u spektralnoj oblasti sa značajnim odstupanjem od regularne vrednosti za normalnu raspodelu; b) Preklapljeni NMR spektri, gde crveno obojeni spektri ukazuju na potencijalna odstupanja; c) Rezultati za *skjunes* i *kurtosesu* spektralnoj oblasti nakon uklanjanja uzoraka koji su identifikovani kao potencijalni autlajeri. Horizontalna isprekidana linija na slikama a i c prolazi kroz date vrednosti (0 za *skjunes* i 3 za *kurtoses*); d) NMR spektri nakon uklanjanja potencijalnih odstupanja.

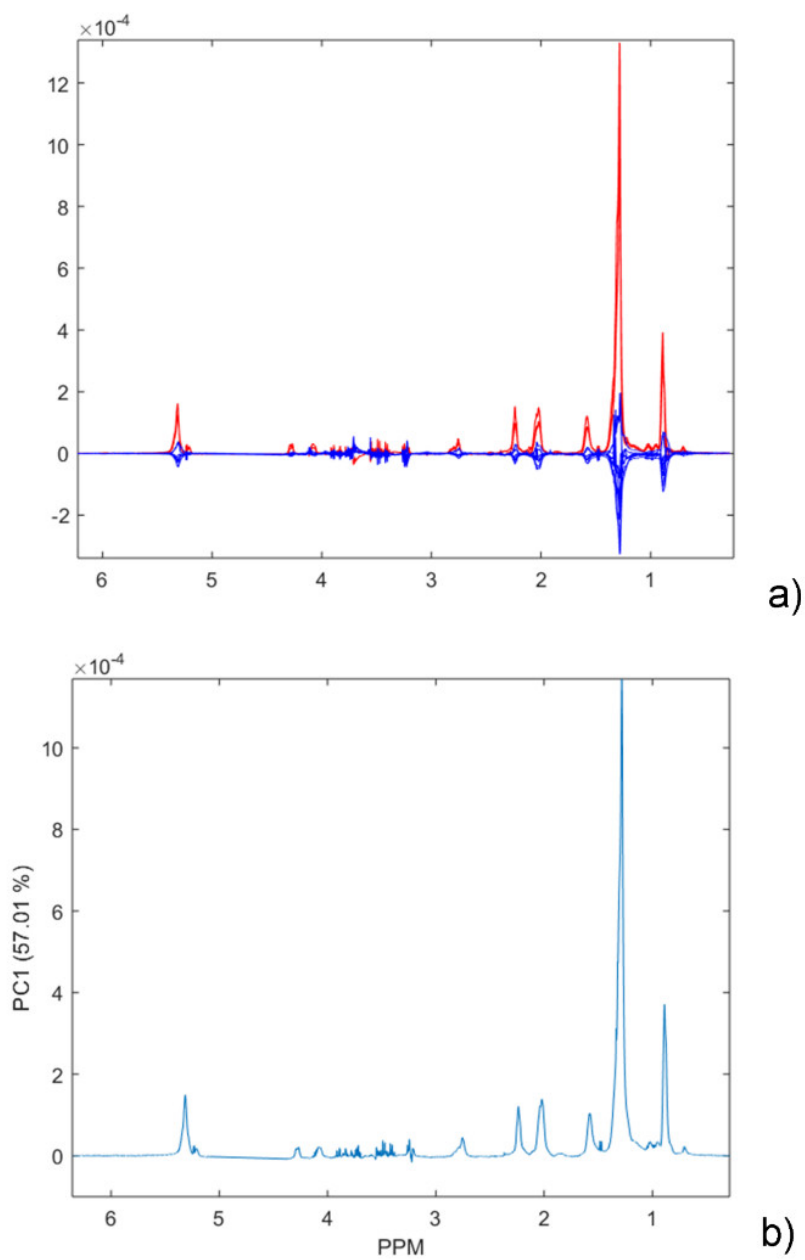
### Analiza glavnih komponenti, PCA modeli za razlikovanje obolelih od shizofrenije i kontrola

Da bi se dobili najpouzdaniji PCA modeli, primenjeni su Pareto skaliranje i autoskaliranje. Određen je rezultujući broj komponenata u modelu, pomoću RMSECV, koristeći sedmostruku unakrsnu validaciju. PCA model dobijen sa Pareto skaliranjem pokazao je ukupnu varijansu od 90,95%, a prve dve komponente su pokazale veoma dobro razdvajanje između dve glavne klase, shizofrenije i kontrola. Rezultati ovog modela prikazani su na slici 7. Na slici 8a su dati srednje centrirani NMR spektri uzoraka uokvireni elipsom na slici 7a, na slici 8b prikazani su NMR spektri uzoraka uokvireni plavim elipsama na slici 7a. Na slici 9 prikazani su rezultati PCA analize dobijene autoskaliranjem.

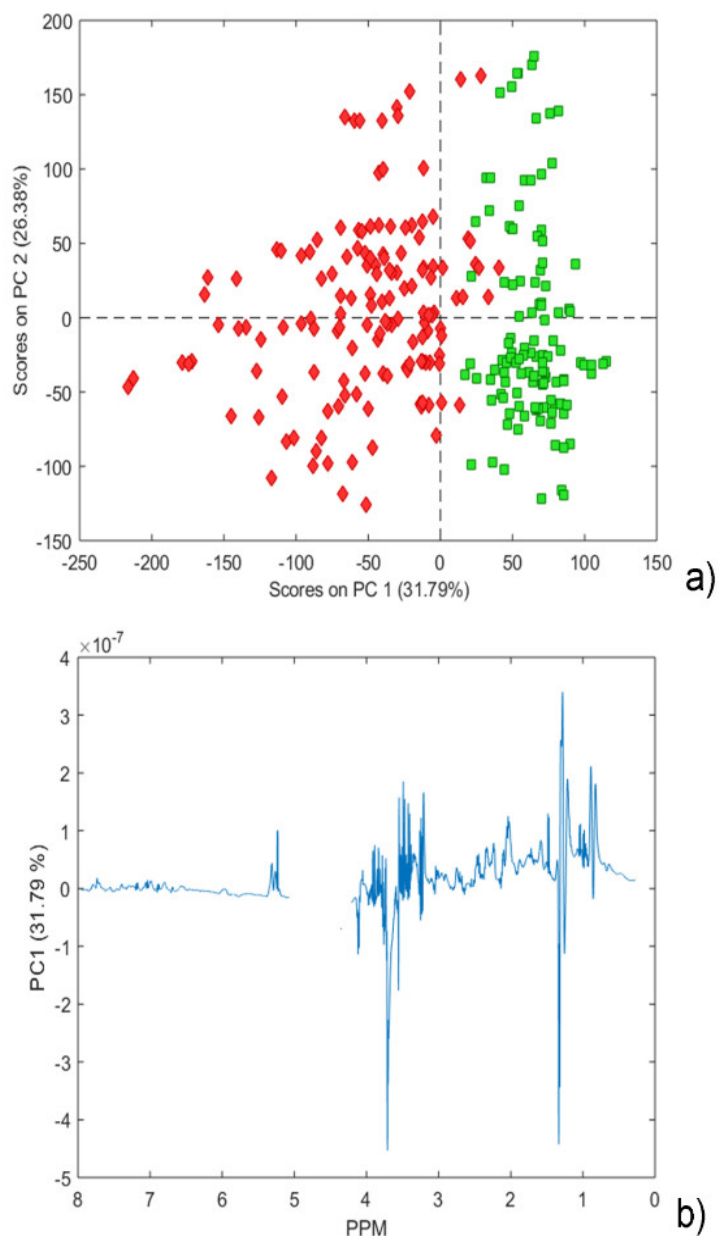


**Slika 7.** a) PCA model prve dve komponente; grupa pacijenata obolelih od shizofrenije prikazana je crvenom bojom, dok je kontrolna grupa prikazna zelenom. b) PC2 reskalirani samo na osnovu polaznog centriranja srednje vrednosti (aritmetičke sredine) u NMR skali, izostavljeni deo spektra pripada oblasti zaostalih signala vode nakon supresije.





**Slika 8.** a) Srednje centrirani NMR spektri koji se odnose na uzorke označene elipsama na slici 7a b) NMR spektri uzoraka koji potiču iz centralnog dela grafika sa slike 7a.

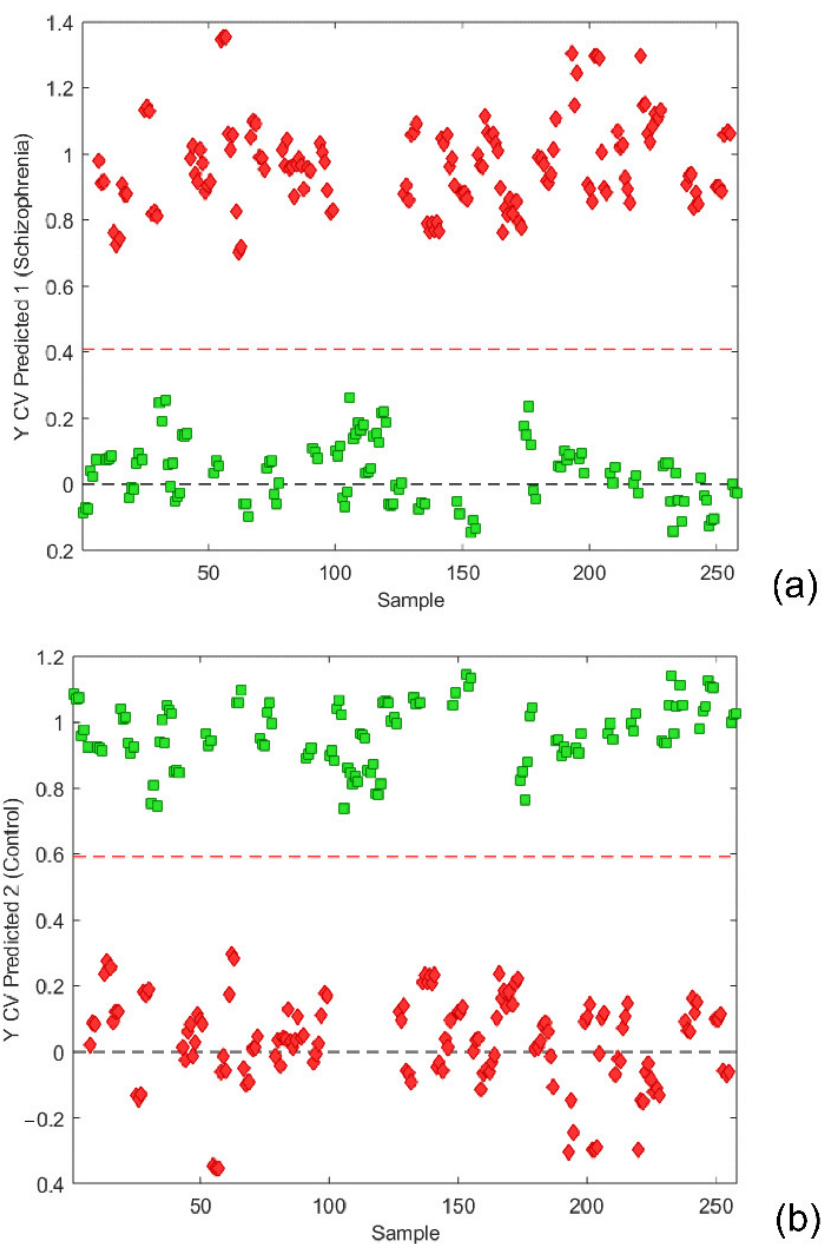


**Slika 9.** a) Prikaz rezultata PCA modela sa prve dve PC komponente, kreiranog uz autoskaliranje podataka: centriranje u odnosu na srednju vrednost i skaliranje na standardnu devijaciju. b) Odgovarajući prikaz opterećenja PC1 komponente

Najpozitivniji doprinos razdvajanju grupa, pomoću PC2 komponente, koji odgovara klasi shizofrenija potiče od sledećih signala: dubleta na 1,33 ppm i kvarteta na 4,11 ppm, koji pripadaju laktatu, kao i signala u oblasti između 3,61 i 3,71 ppm, tipičnih za molekule šećera. Pored navedenih signala, hemijska pomeranja na 0,84 ppm, 3,21 ppm, 3,55 ppm i 5,28 ppm pokazuju karakterističan obrazac za disperziju faze, odnosno varijacije hemijskog pomeranja gde se dobija oblik signala sličan krivoj prvog izvoda pikova u navedenim oblastima. Najizraženiji signali u NMR spektrima nalaze se na  $\delta_H$  0,88; 1,28; 1,58; 2,04; 2,24; 2,75 i 5,31. Navedeni signali daju pozitivan doprinos razdvajanju duž PC1 komponente. Na slici 7a, obuhvaćeno plavim elipsama, mogu se uočiti uzorci koji imaju veće pozitivne projekcije, kao i znatno izraženije vrednosti inteziteta za hemijske pomeranje duž PC1 komponente.

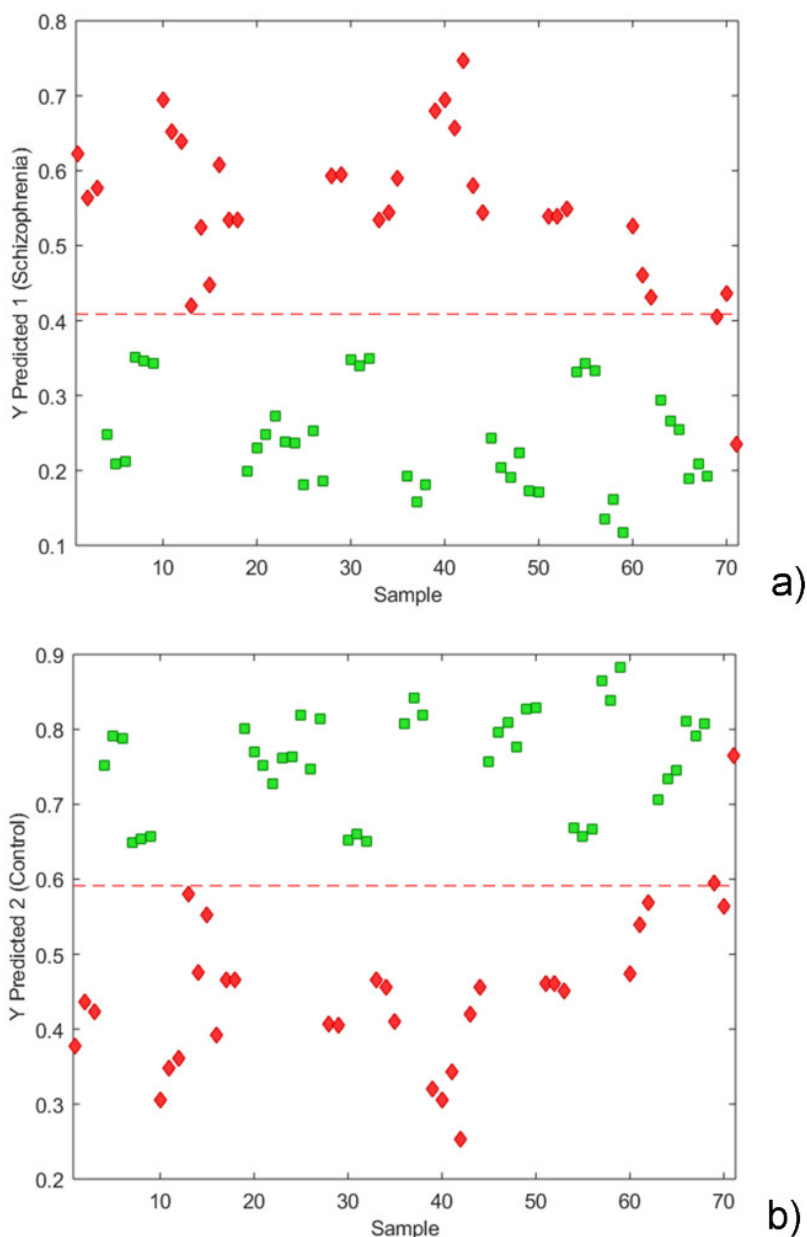
## Diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, OPLS-DA model za razlikovanje obolelih od shizofrenije i kontrola

Analiza podataka sa prepoznavanjem obrasca, spovedena je u dva koraka. Prvi korak podrazumeva srednje centriranje svih promenljivih i autoskalaranje, a nakon toga i njihovo analiziranje primenom OPLS modela. Testiranje modela je urađeno sa izabranim brojem komponenata, sa nezavisnim skupom podataka, koji se sastoji od 32 uzorka shizofrenije i 39 uzoraka kontrolne grupe, što je ukupno iznosilo 71 uzorak. Kao rezultat, konačan broj komponenata je izabran prema minimalnoj vrednosti srednjeg kvadratnog predviđanja (RMSEP) dobijenoj za različiti broj komponenata modela. Predviđanje za obe klase korišćenjem autoskalaranja kao metode preprocesiranja prikazano je na slici 10. Prag klasifikacije za svaku klasu u modelu, izračunat je primenom Bajesove (Bayes) metode [230,231]. Za klasu shizofrenija i kontrole pragovi su 0,4086 i 0,5914.



**Slika 10.** a) Y CV predikcija za klasu shizofrenija i granična vrednost za razdvajanje klasa od 0,4086. b) Y CV predikcija za klasu kontrola i granična vrednost od 0,5914 korišćenjem autoskalaranja. Grupa shizofrenija je označena crvenom, a kontrolna grupa zelenom bojom.

Odgovarajuća matrica konfuzije za klasifikaciju skupa podataka eksternog testa prema PLS-DA modelu sa autoskalaranjem prikazana je u tabeli 11. Može se videti da su dva uzroka shizofrenije pogrešno klasifikovana, sa tačnošću od 0,9718, što ukazuje da model ima zadovoljavajuću sposobnost predviđanja, slika 11.

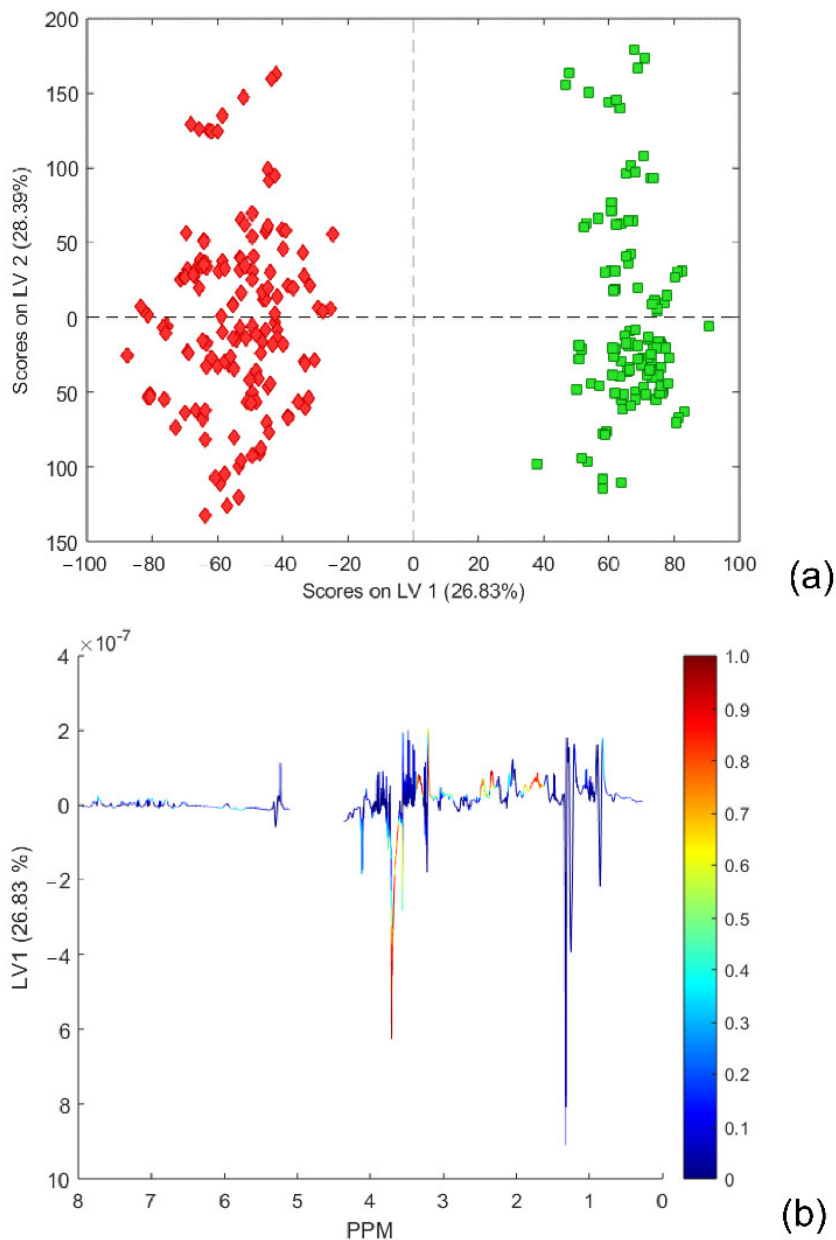


**Slika 11.** a) Y predviđanje za klasu shizofrenija; b) Y predviđanje za klasu kontrola iz eksternog skupa test podataka, dobijeno autoskalaranjem.

**Tabela 11.** Matrica konfuzije za klasifikaciju test podataka prema PLS-DA modelu

	Prava klasa	
	Shizofrenija	Kontrola
klasifikovano kao Sch	30	0
klasifikovano kao kontrola	2	39
neklasifikovano	0	0

Model prve prediktivne komponente, LV 1, koja objašnjava 26,83% varijanse i prve ortogonalne komponente LV 2, koja objašnjava 28,39% varijanse, dobijen je srednjim centriranjem i autoskaliranjem i prikazan je na slici 12. Ukupna varijansa koju model objašnjava sa svim komponentama OPLS-DA modela je 72,57%. Projekcija prediktivnih komponenata na skali data je prema korelaciji opterećenja koju je predložio Viklund (Wiklund) [231] i nazvana je S grafik.

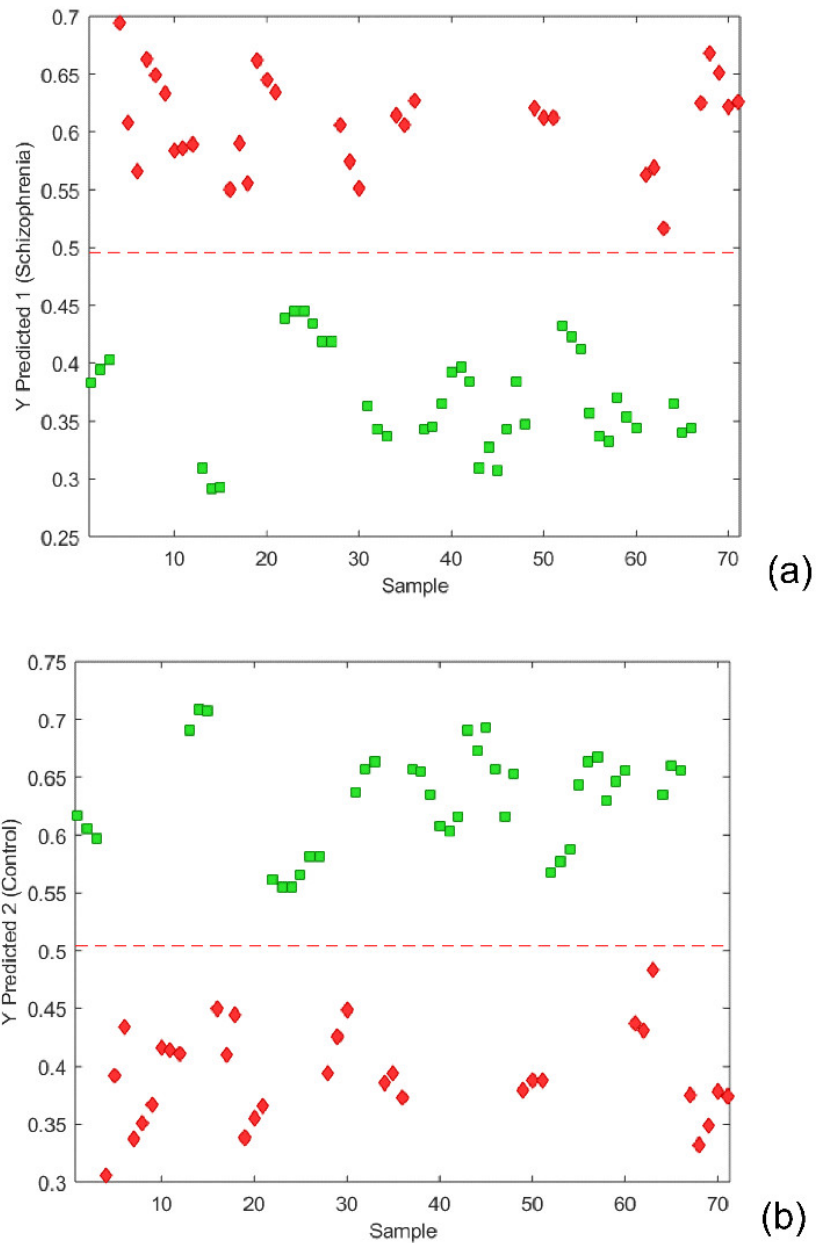


**Slika 12.** a) OPLS-DA model sa dve komponente, dobijen autoskaliranjem (RMSEC=0,0934; RMSECV=0,1304). Grupa shizofrenija je prikazana crvenom, dok je kontrola prikazana zelenom bojom. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boje kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.

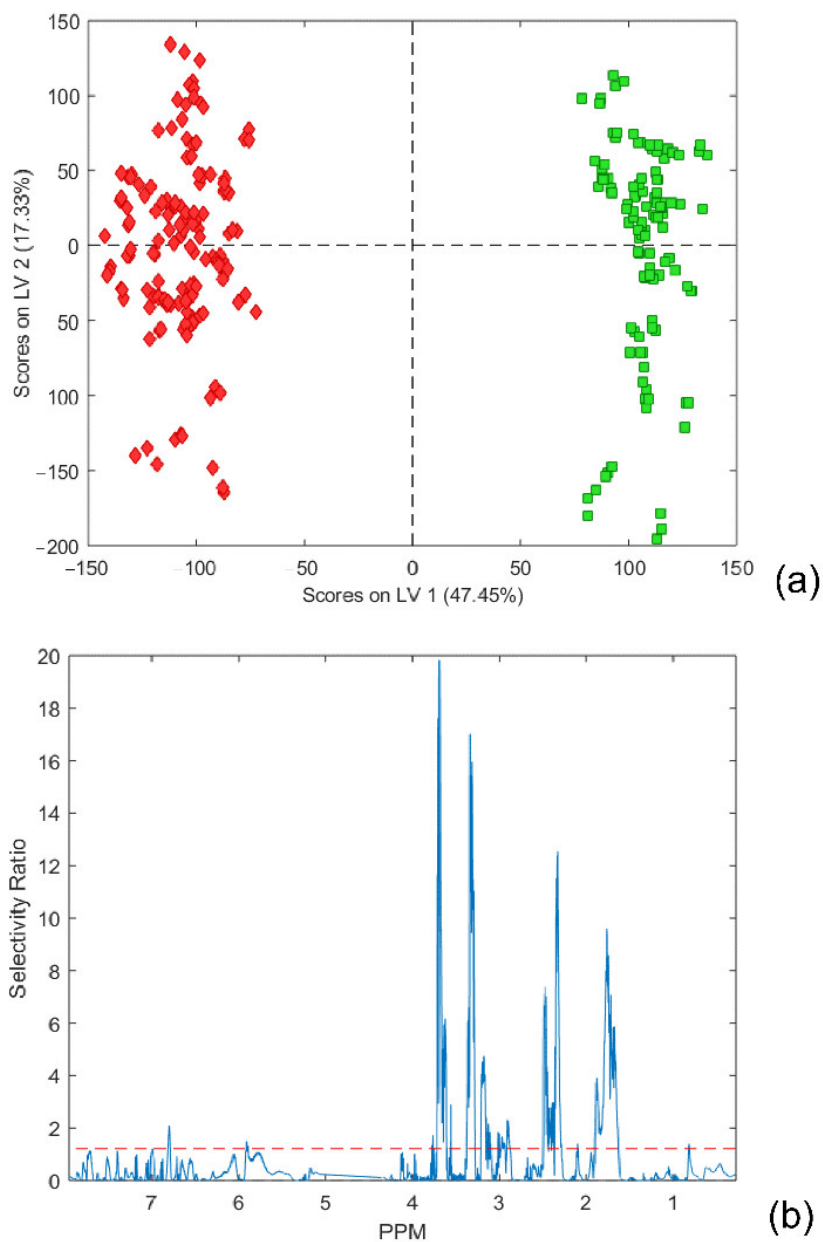
**Parcijalna regresija najmanjih kvadrata – diskriminantna analiza, PLS-DA model za nejednaku veličinu grupa za razlikovanje obolelih od shizofrenije i kontrola**

Kada je broj uzoraka u analiziranim grupama nejednak ili neuravnotežen, primena standardnog pristupa u obradi podataka za PLS-DA ne daje najbolje razdvajanje klasa [232]. U tom slučaju, centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klasa daje bolje rezultate.

Za centriranje i skaliranje korišćena su dva načina, autoskaliranje sa centriranjem srednje vrednosti i centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klasa. Na taj način su upoređeni uticaji obe metode skaliranja na PLS-DA model i predvidljivost članova klasa. Uočena su bolja predviđanja za model koji je konstruisan sa centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa (slika 13). Klasno razdvajanje, u ovom slučaju, je bilo veoma dobro, bez pogrešnog klasifikovanja uzoraka. Veća varijansa prediktivne komponente dobijene nakon težinskog centriranja (ukupna varijansa 47,45%, slika 14a) postiže bolje razdvajanje između klasa i smanjuje prag razdvajanja između klasa (slika 13) u poređenju sa OPLS-DA modelom gde je rađeno automatsko skaliranje (slika 11). Za dodatnu potvrdu da dobijeni OPLS-DA modeli nisu previše optimistički (overfitovani), urađen je permutacioni test sa 200 ponavljanja za svaki model. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je malo verovatno da će originalni modeli biti previše optimistički (overfitovani). Rezultati ispitivanja za svaku klasu predstavljeni su na slici 15.

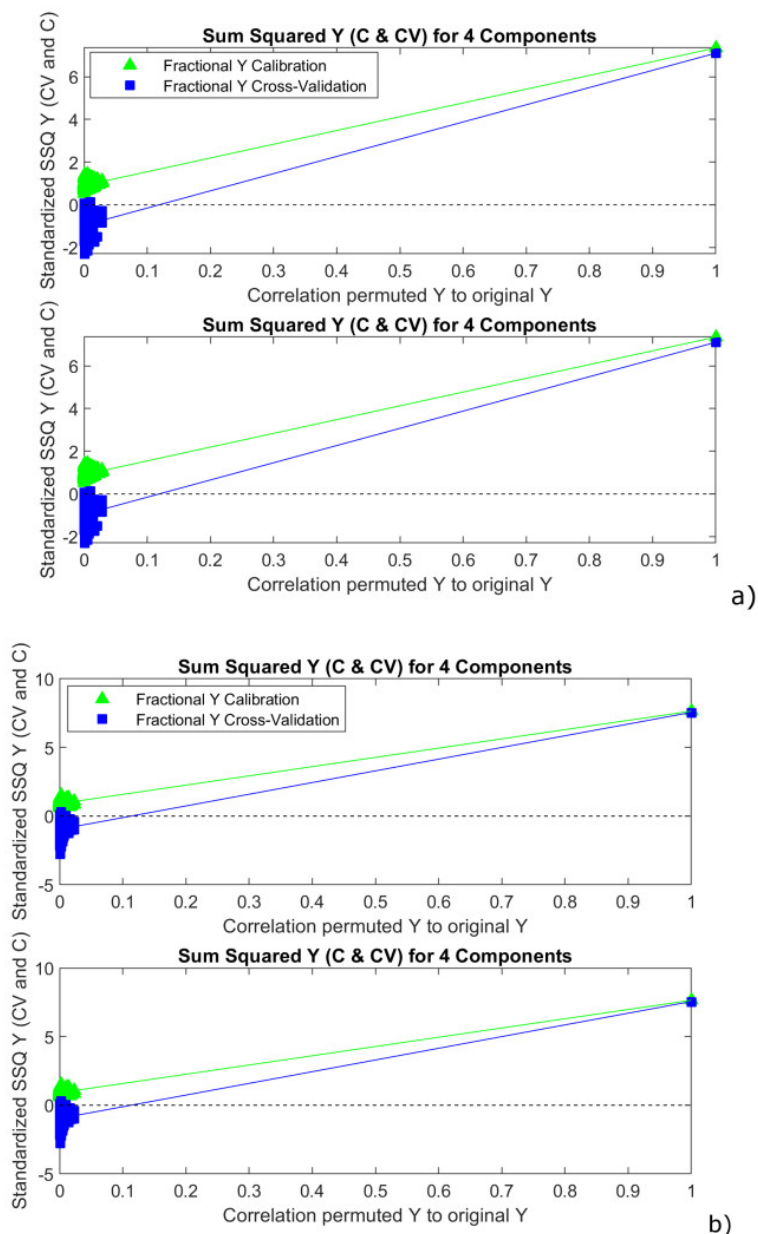


**Slika 13.** a) Y predikcija za klasu shizofrenija. b) Y predikcija za klasu kontrola iz eksternog skupa podataka sa centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa. Klasa shizofrenija je obeležena crvenom, a kontrola zelenom bojom.



**Slika 14.** a) Prikaz rezultata prve prediktivne komponente LV 1 i prve ortogonalne LV 2 komponente (RMSEC=0,0845; RMSECV= 0,1071). Klasa shizofrenija je obeležena crvenom, a kontrola zelenom bojom. b) Grafik odnosa selektivnosti.





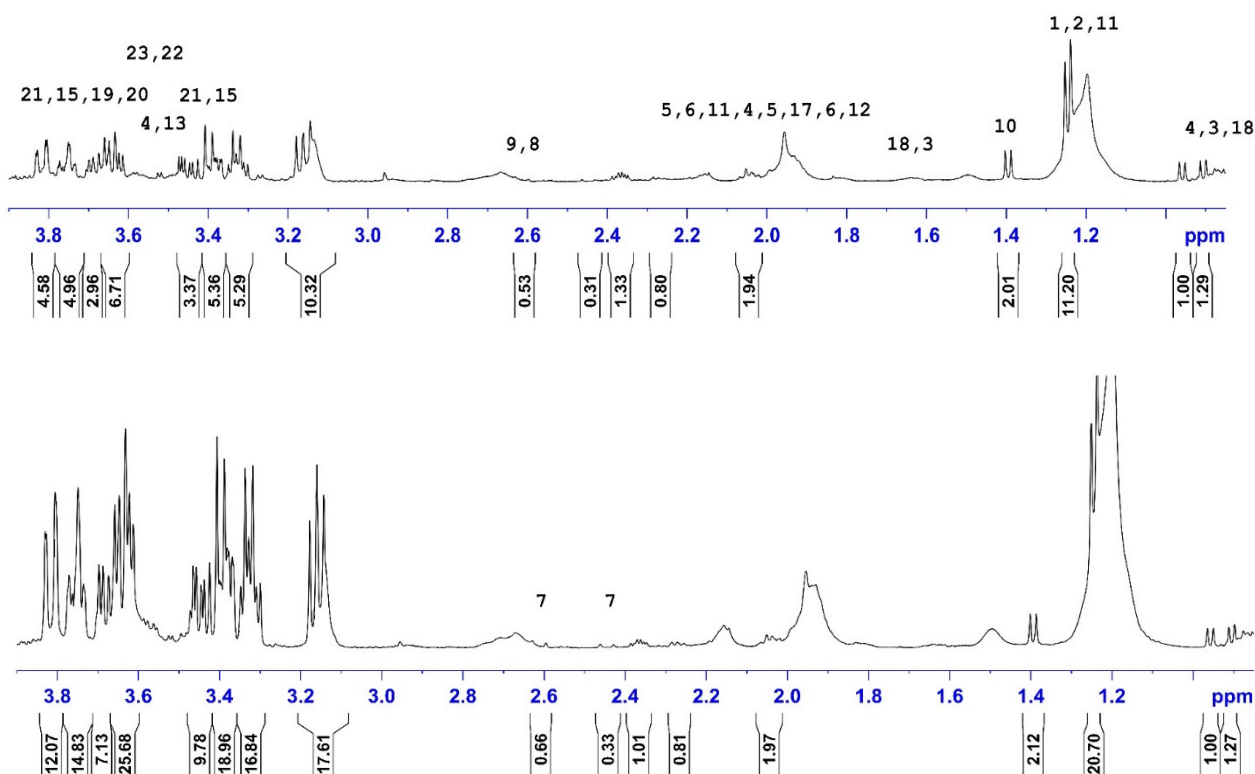
**Slika 15.** Deo Y varijanse preuzet za samopredikciju (kalibraciju) i unakrsna validaciju u odnosu na permutovane vrednosti Y bloka za četiri LV komponente modela. a) OPLS-DA model dobijen autoskaliranjem. b) OPLS-DA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa.

### Diskriminatorni metaboliti za obolele od shizofrenije i kontrole i značaj promenljivih

Postoji mnogo načina da se odaberu karakteristični metaboliti kao što su: promenljive sa visokim koeficijentom regresije [233], normalizovana kovarijansa [234,235], važnost promenljive u projekciji (VIP) [236,237] i dijagram odnosa selektivnosti [238]. U ovom slučaju korišćen je dijagram odnosa selektivnosti koji je predložen u radu Rajalahti i saradnika [238]. Kao što se može videti na slikama 12 i 14, obe metode ukazuju na skoro identičan opseg hemijskog pomeranja unutar NMR spektra kao potencijalne oblasti za biomarkere zaslužne za razlikovanje klasa shizofrenija i kontrola. Najintezivnije razlike mogu se uočiti u opsegu od 3,61 do 3,71 ppm, što pripada signalima šećera, a na osnovu dijagrama opterećenja pokazano je da su ovi signali relevantniji za klasu shizofrenija nego za kontrolnu grupu. Delovi spektra u opsegu 1,63–1,89 ppm, 2,29–2,49 ppm i 3,28–3,35 ppm su relevantniji za kontrolnu grupu. Hemijska pomeranja u opsegu 3,14–3,21 ppm pokazala su nešto

manji značaj nego prethodno pomenuta pomeranja, ali se takođe smatraju potencijalno važnim biomarkerima.

Kako bi jednostavnije i grafički prikazali razlike u koncentracijama metabolita od značaja, biomarkera, između pacijenata i zdravih osoba, integraljene su oblasti od interesa, dobijene na osnovu hemometrijske analize. Kao referentna vrednost pri integraljenju korišćen je signal valina, dublet, na 0.98 ppm. Jedan od razloga zašto je odabran ovaj signal kao referenti je taj da u VIP skoru nije prepoznat kao marker klasifikacije, odnosno razdvajanja i nema značajnih razlika između ispitivanih grupa. Ovaj signal nije preklapljen sa drugim signalima, jasno je definisano od kog jedinjenja potiče i u tom delu nema deformacije, odnosno podizanja bazne linije, što su samo dodatni razlozi za odabir ovog signala kao referentnog signala pri integraljenju. Spektri sa integraljenim signalim prikazani su na slici 16. Brojevima su na slici obeležena identifikovana jedinjenja, čiji se signali nalaze u zonama od interesa, a njihovi nazivi su dati u daljem tekstu, u Tabeli 14.



**Slika 16.** Reprezentativni <sup>1</sup>H NMR spektri sa integraljenim regionima ili signalima pripadajućih jedinjenja od značaja za kontrolnu grupu (gore) i pacijente obolele od shizofrenije (dole).

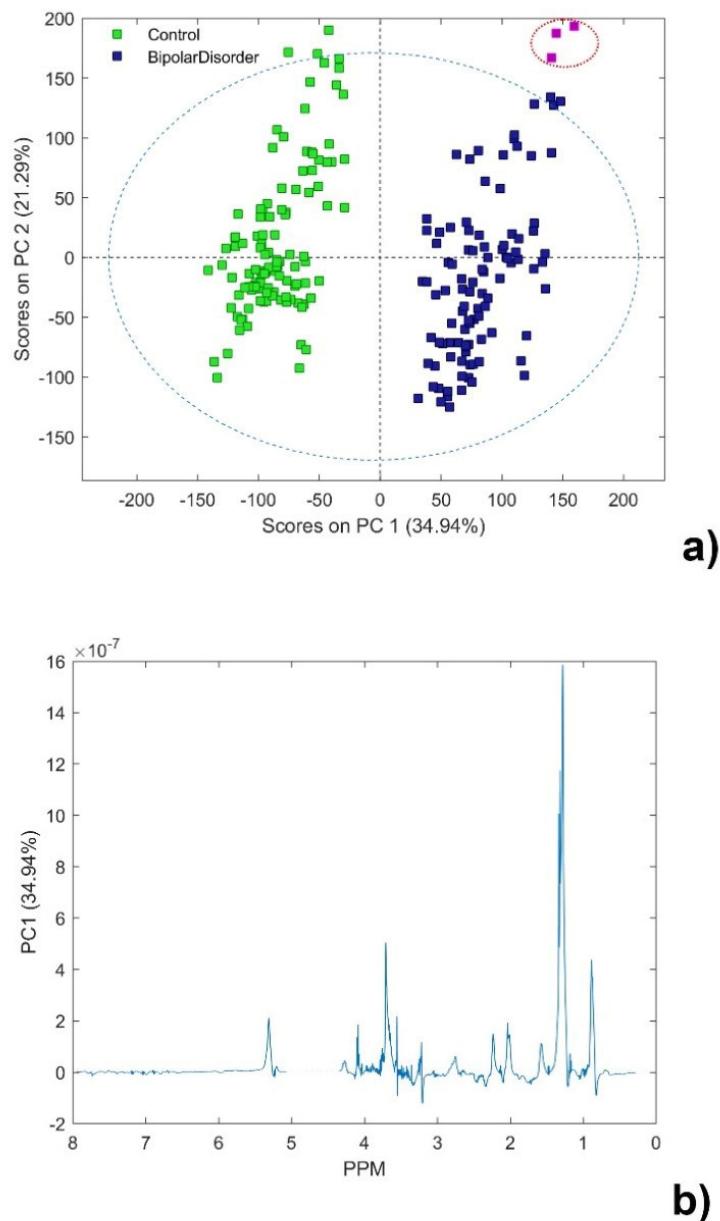
#### **4.1.2. Hemometrijska analiza spektralnih podataka dobijenih NMR analizom seruma obolelih od bipolarnog poremećaja i kontrola**

Da bi se utvrdilo prisustvo potencijalnih odstupanja ili da bi se pronašla optimalna metoda skaliranja, prvi korak predstavlja izvođenje istraživačke analize podataka (eng. exploratory data analysis, EDA) [239]. Za procenu mera asimetrije i spljoštenosti, kao pomoć pri odabiru adekvatnog načina skaliranja i određivanja regiona sa značajnim odstupanjem, i ovde su primenjene univarijantne metode. Na osnovu poređenja različitih tipova standardnih devijacija određen je način skaliranja podataka. Rezultati korišćenja različitih standardnih devijacija sugerišu da je metoda skaliranja od velikog značaja za razumevanje dobijenih rezultata tokom pravljenja modela. Za analizu ovih rezultata primenjeno je Pareto skaliranje, autoskaliranje i centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klasa.

#### **Analiza glavnih komponenti, PCA modeli za razlikovanje obolelih od bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola**

Kao rezultat primene PCA dobija se smanjeni broj ortogonalnih glavnih komponentata koje predstavljaju linerne kombinacije originalnih promenljivih. Da bi se otkrili pouzdani autlajeri, potrebno je utvrditi broj komponentata za svaki PCA model [240]. Broj komponentata u svakom od dobijenih PCA modela je određen na osnovu minimuma RMSECV. Kao rezultat toga, svi PCA modeli su sastavljeni koristeći šest glavnih komponentata. PCA modeli dobijeni Pareto skaliranjem i centriranjem srednje vrednosti, imali su ukupnu varijansu od 91,82%. Razdvajanje između klasa uočeno je duž PC 2 komponente (varijansa 11,31%), dok su prve dve komponente obuhvatale 73,28% ukupne varijanse nakon uklanjanja autlajera.

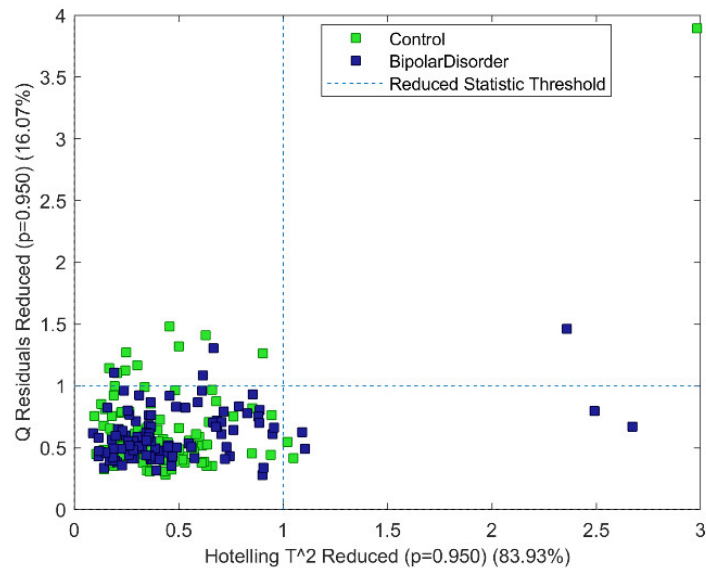
PCA modeli dobijeni centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa, gde su svi ostali parametri preprocesiranja bili isti kao za modele dobijene Pareto skaliranjem, sadrže šest glavnih komponentata i imaju ukupnu varijansu od 83,93%. Veoma jasno razdvajanje klasa uočeno je i u ovom modelu, ali duž PC1 komponente (varijansa 34,94%). Rezultati PCA analize za ovaj način skaliranja prikazani su na slici 17.



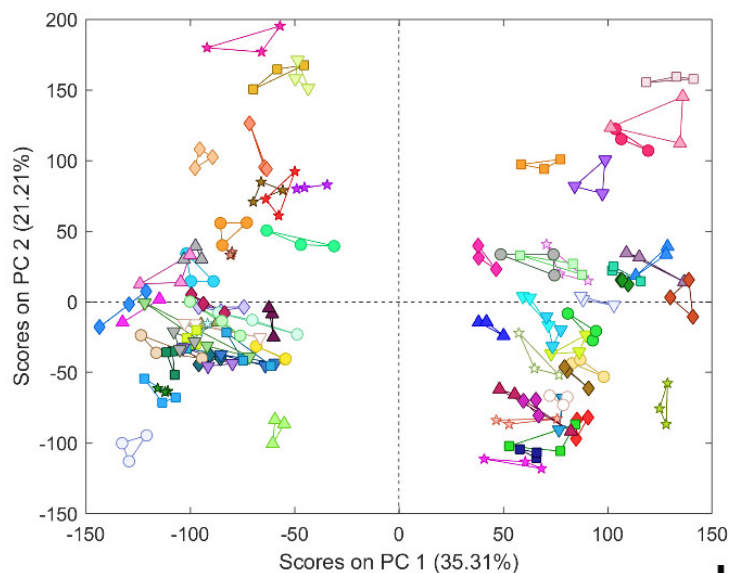
**Slika 17.** a) PCA modeli dobijeni korišćenjem centriranja i skaliranja baziranog na centroidu klasa. Uzorci obuhvaćeni crvenom elipsom iz grupe bipolarnog poremećaja, identifikovani su kao potencijalni autlajeri. b) Vektor opterećenja PC1 komponente dobijen gore pomenutim načinom skaliranja.

PCA u kombinaciji sa Q i  $T^2$  Hotellingovom raspodelom određeni su na 95% nivou značajnosti i omogućili su identifikaciju potencijalnih autlajera. Na slici 18a pokazan je dijagram uticajnosti (Q u funkciji  $T^2$  Hoteling) dobijene tokom pravljenja PCA modela. Mogu se uočiti triplikat jednog pacijenta sa bipolarnim poremećajem i jedan uzorak kontrole koji pokazuju znatnije odstupanje duž Hotelingove  $T^2$  ose, odnosno duž Q ose i predstavljaju autlajere. Obično se koristi interval pouzdanosti 95% za identifikaciju podataka. Detaljnom analizom grafika doprinosa Hotelinga  $T^2$  za uzorke bipolarnog poremećaja uočene su oblasti hemijskih pomeranja  $\delta_H$  0,89; 1,29; 1,58; 2,04; 2,24; 2,75; 4,07; 4,27; 5,23 gde su signali pokazali mnogo veće vrednosti inteziteta u poređenju sa drugim uzorcima. Zbog toga su ovi izuzeci uklonjeni iz skupa podataka za ostale analize. PCA model, gde su uklonjeni identifikovani autlajeri, prikazan na slici 18b ukazuje na to da je varijabilnost unutar svake od grupa triplikata istog uzorka u proseku mnogo manja od varijabilnosti između grupa uzoraka

pacijenata. Da bi se izvršila podela podataka za test pomoću unakrsne validacije, CV, neophodno je da uzorke triplikata istog uzorka držati zajedno unutar svake test ili kalibracione grupe uzoraka.



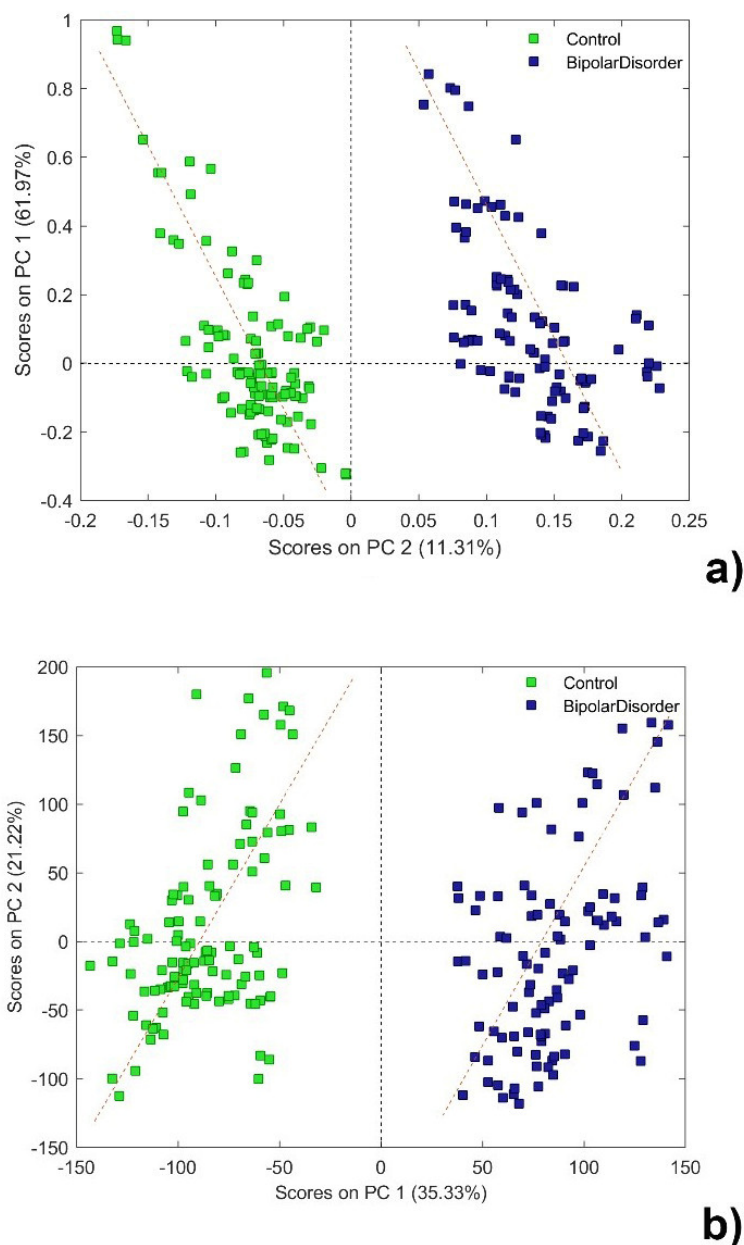
a)



b)

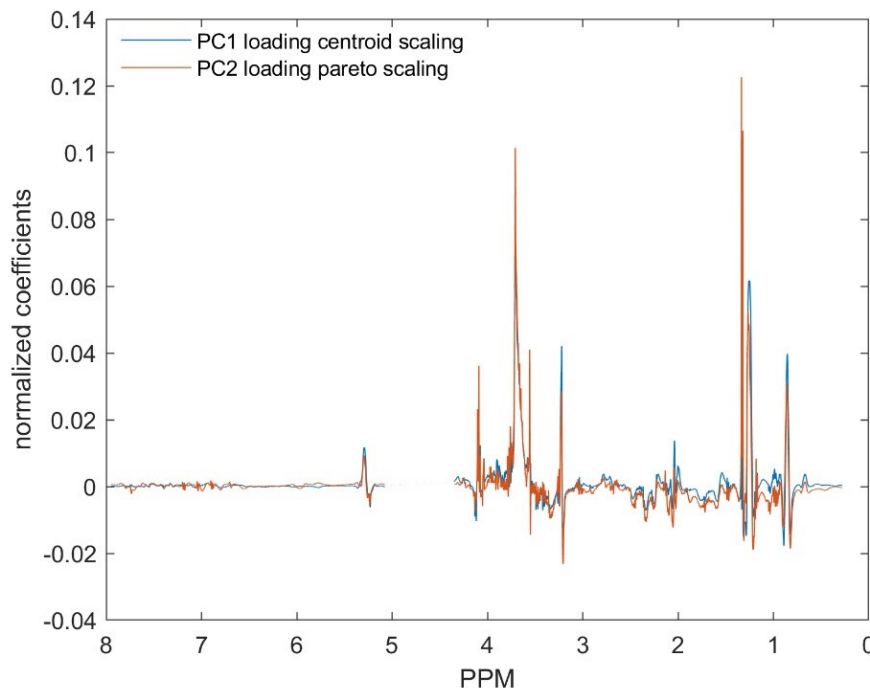
**Slika 18.** a) Dijagram uticajnosti za PCA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa. b) PCA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa nakon uklanjanja autlajera. Rezultati uzorka koji pripadaju jednom određenom pacijentu su grupisani zajedno i označeni odgovarajućim simbolima, bojama i povezani linijama između svakog triplikata.

Ortogonalna rotacija opterećenja kojoj pripadaju sledeći PCA modeli izvedena je prema Kajzer-Varimaks (Kaiser-Varimax) rotaciji [241].



**Slika 19.** a) PCA model dobijen centriranjem srednje vrednosti i Pareto skaliranjem, gde isprekidana linija označava pravac oblika klastera koji je blago nagnut ulevo u poređenju sa vertikalnom PC1 komponentom. b) PCA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa, gde isprekidana linija označava pravac oblika klastera koji je blago nagnut udesno u poređenju sa vertikalnom PC2 komponentom. Oba modela su sastavljena nakon uklanjanja autlajera.

Kao ulaz za Varimaks rotaciju korišćene su najmanje prve dve komponente podprostora (PC1 i PC2 za kreiranje PCA modela pomoću Pareto skaliranja podataka) ili svih šest komponentata za kreiranje PCA modela pomoću centriranja i skaliranja baziranog na centroidu klasa. Grafik dobijen nakon projekcije prethodno obrađenih podataka na faktorski prostor definisan novim opterećenjem korišćen je da bi se proverila pouzdanost Varimaks rotacije. Rezultati analize rotacije za odgovarajuća opterećenja prikazani su na slici 20.



**Slika 20.** Vektor opterećenja PC1 komponente iz modela dobijenog centriranjem podataka i skaliranjem baziranim na centroidu klasa i PC2 komponente iz modela dobijenog primenom srednjeg centriranja i Pareto skaliranjem, nakon Varimaks rotacije.

Rezultirajuća opterećenja se ponovo reskaliraju množenjem svih vrednosti njihovom odgovarajućom standardnom devijacijom. Sa slike 20 se može videti da oba opterećenja, iako su rađena sa različitim skaliranjem daju skoro identičan rezultat za doprinose promenljivih određenoj komponenti. Zbog toga bi se dobijeni rezultat dijagrama opterećenja mogao koristiti za pouzdanije određivanje grupa promenljivih, odnosno hemijskih pomeranja koja doprinose razdvajanju klasa. Na osnovu slike 20 uočava se da najpozitivniji doprinos za klasu bipolarni poremećaj imaju signali na 0,856 ppm, 1,246 ppm i u opsegu 3,76–3,60 ppm, koji pripadaju šećerima. Dublet na 1,328 ppm pripada laktatu, što takođe ima značajan uticaj. Ipak, poređenjem odgovarajućih promenljivih za ove grupe pacijenata otkriveno je da oblast između 4,012 ppm i 4,146 ppm pokazuju značajne razlike u razdvajanju. Tri nova signala koja se uočavaju takođe pokazuju pozitivan doprinos. Prvi karakteristični signal je na 4,038 ppm, drugi na 4,075 ppm, a treći se preklapa sa kvartetom laktata na 4,09 ppm. Sledeća primetna razlika između dva grafika opterećenja uočava se u opsegu od 3,324 do 3,546 ppm i od 3,785 do 3,942 ppm.

### **Diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, OPLS-DA model za razlikovanje obolelih od bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola**

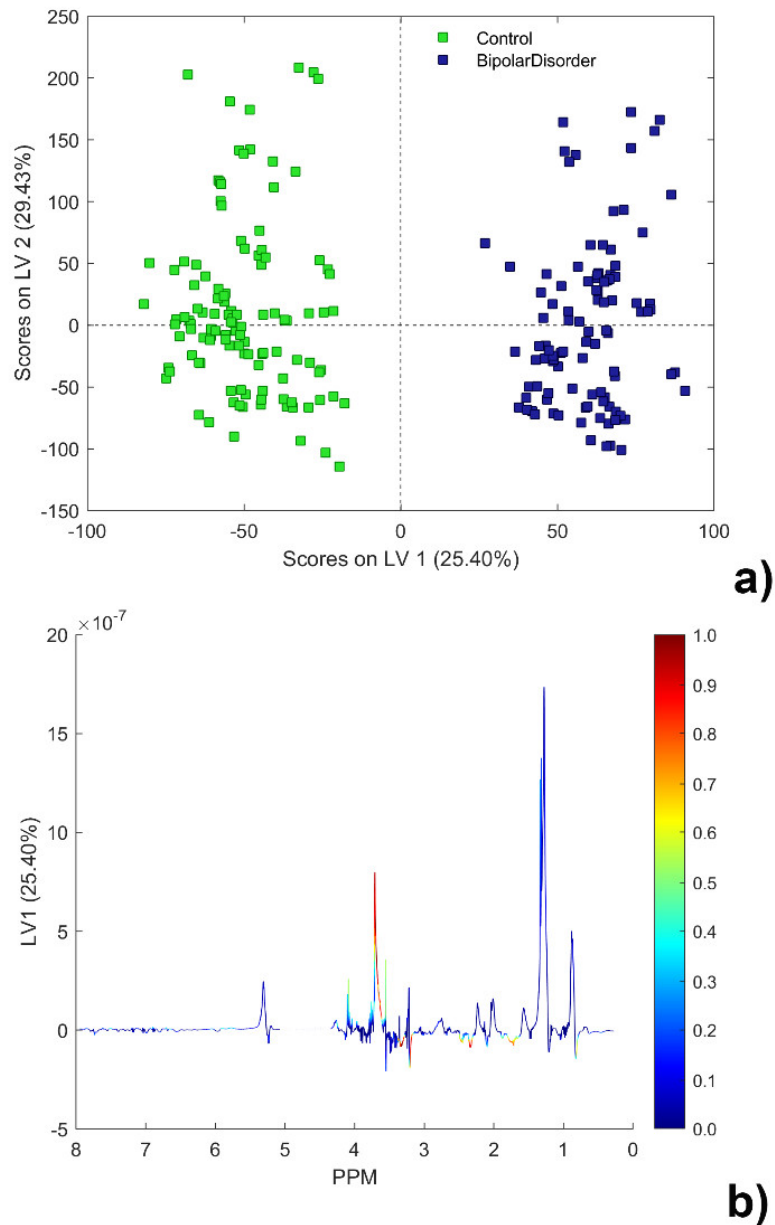
Identifikacija metabolita, potencijalnih biomarkera, je glavni cilj u svakoj metabolomičkom ispitivanju. Pomoću PLS-DA metode, a potom i OPLS-DA metode, dobijeno je razdvajanje između različitih klasa uzoraka, a u isto vreme identifikovana su jedinjenja odgovorna za to razdvajanje. Metode skaliranja i centriranja podataka pri stvaranju modela imaju važan uticaj na ishod rezultata. Neodgovarajući način skaliranja može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata i određivanja promenljivih koje nisu zaista odgovorne za razdvajanje između grupa. Kao i u hemometrijskoj analizi uzoraka pacijenata sa shizofrenijom i u ovom slučaju korišćene su različite metode skaliranja. OPLS-



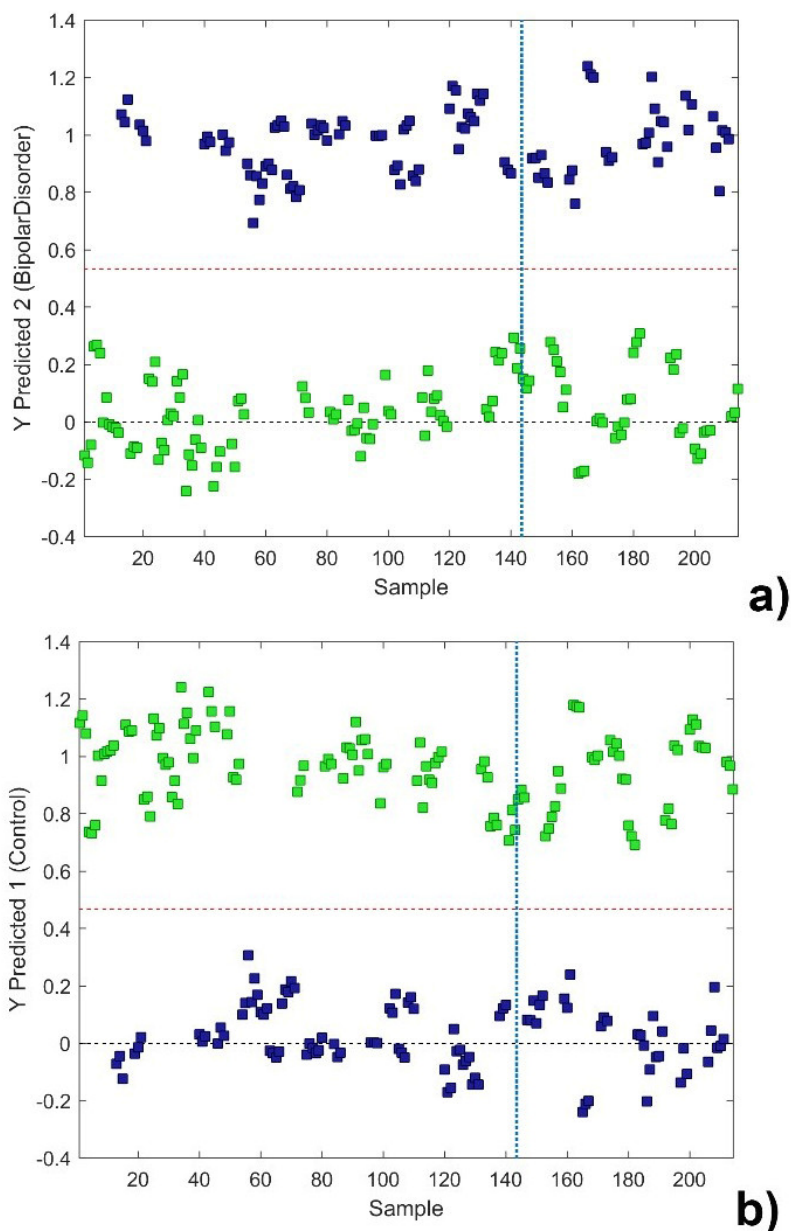
DA model, kao i svi drugi modeli regresije, osetljiv je na složenost modela. Za procenu relevantnog broja komponenata u svim OPLS-DA modelima, kao što je prikazano na slici 21, korišćena je sedmostruka unakrsna validacija, CV. Model je rađen sa 33 uzorka pacijenata sa bipolarnim poremećajem i 38 uzoraka kontrola, što predstavlja ukupno 71 uzorak. Greške pogrešne klasifikacije (deo uzoraka koji su pogrešno klasifikovani) i greška klase (prosečna stopa lažno pozitivnih i lažno negativnih stopa za klasu) korišćeni su kao primarni pokazatelj za poređenje performansi modela i broja izabranih komponenata. Kao rezultat, konačan broj komponenata je izabran kao kompromis između greške u klasifikaciji i greške klase, a minimalna vrednost RMSECV je dobijena za različit broj komponenata modela.

Svi OPLS-DA modeli dobijeni centriranjem i autoskaliranjem sadrže tri latentne promenljive, od kojih je jedna predikciona a dve ortogonalne. Grafik rezultata prve prediktivne komponente LV1 (varijansa 25,40%) i prve ortogonalne komponente LV2 (varijansa 29,43%), prikazan je na slici 21. Ukupna varijansa OPLS-DA modela iznosila je 61,74% po X bloku i 94,50% po Y bloku ispitivanog seta podataka. Projekcija prediktivne komponente na skali data je prema korelaciji opterećenja koju je predložio Viklund [231] i nazvana je S grafik. Na slici 22 prikazana su predviđanja zasnovana na CV za kalibracioni i test deo skupa podataka. Prag klasifikacije za svaki model izračunat je korišćenjem Bajesove metode [230]. Za klase bipolarni poremećaj i kontrolna grupa pragovi su 0,5326 i 0,4674, redom.





**Slika 21.** a) OPLS-DA model prve dve LV komponente dobijen centriranjem i autoskaliranjem podataka. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boje kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.

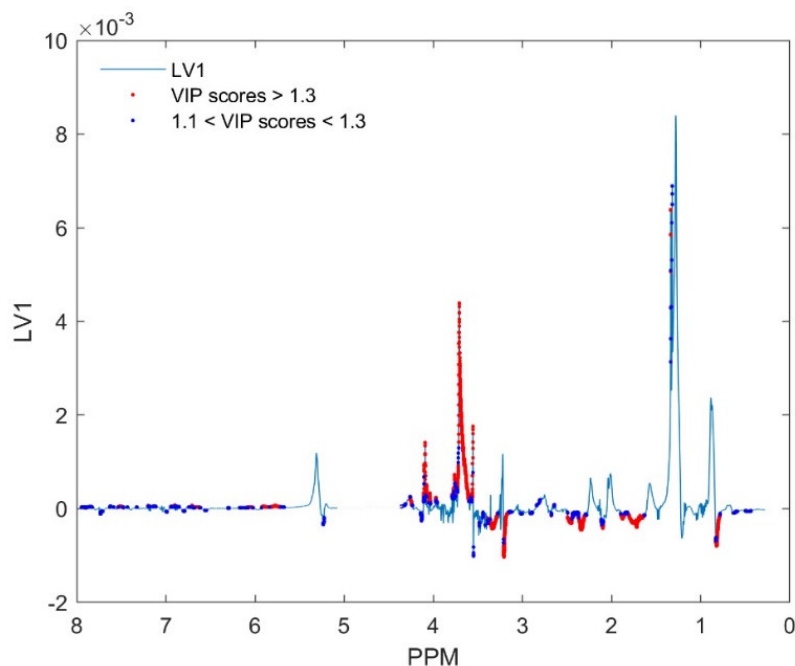


**Slika 22.** a) Y predikcija za klasu bipolarni poremećaj sa pragom vrednosti od 0,5326. b) Y predikcija za klasu kontrola, sa pragom vrednosti od 0,4674. Levi deo grafika, u odnosu na plavu isprekidanu liniju predstavlja kalibracioni deo, dok desni deo predstavlja test deo analiziranog skupa podataka. Kao preprocesioni parametri korišćeni su centriranje srednje vrednosti i autoskalaranje.

### Značajne promenljive i VIP skorovi

Postoje različite metode za odabir karakterističnih metabolita i najčešće su zasnovane na prediktivnim komponentama OPLS-DA modela [242]. Na slici 21b prikazana je projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1, koristeći apsolutnu vrednost vektora korelacije za kodiranje opterećenja u boji, takođe poznatog kao S grafik [236].

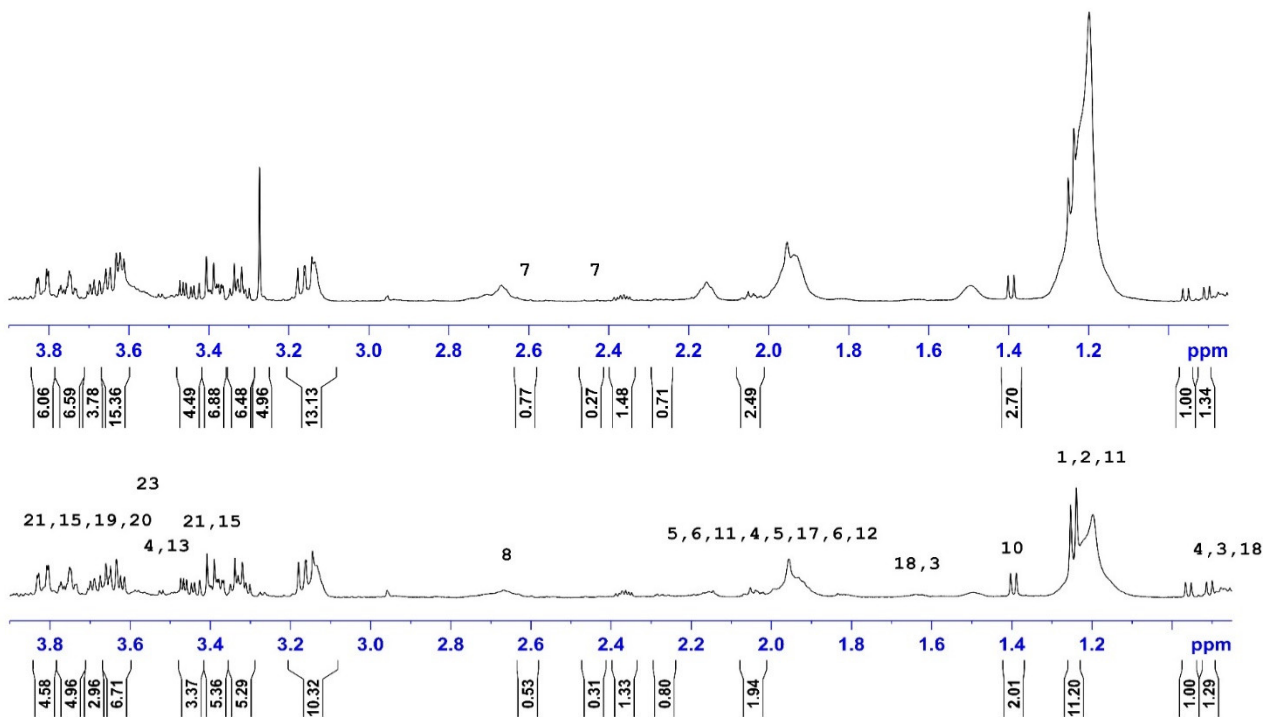
Na slici 23 prikazan je VIP skor, najčešće korišćena metoda za odabir značajnih promenljivih, za dva različita načina skaliranja, autoskaliranje i centriranje i skaliranje baziranim na centroidu klasa.



**Slika 23.** VIP rezultati, OPLS-DA modela dati u odnosu na vektor opterećenja LV1; VIP rezultati >1,3 su označeni crvenom bojom, dok su plavom bojom označeni VIP rezultati u rasponu od 1,1 do 1,3.

Dobijeni VIP rezultati uključuju vrednosti veće od 1,1. Rezultati VIP skorova u opsegu između 1,1 i 1,3 treba da se potvrde kroz dodatnu hemijsku validaciju. Sa druge strane, rezultati VIP skora veći od 1,33, smatraju se važnim za identifikaciju ključnih metabolita za razdvajanje klasa. Na taj način omogućeno je istovremeno ispitivanje VIP skorova za oba prethodno navedena modela i sticanje uvida u to kako je metoda skaliranja uticala na rezultate analize. Pošto i PLS modeli dobijeni različitim metodama skaliranja, daju slične rezultate, može se očekivati da će i VIP skorovi biti veoma slični. Projekcija povratne skale vektora opterećenja, LV1, i VIP skorovi, prikazani na slikama 21b i 23, ukazuju na skoro identične hemijske opsege u NMR spektru, kao potencijalne oblasti za identifikaciju biomarkera zaslužnih za razdvajanje dve klase uzoraka, bipolarne i kontrolne klase. Najizraženija razlika se može videti u opsegu od 3,61 ppm do 3,73 ppm, gde se nalaze signali koji pripadaju molekulima šećera, a na osnovu dijagrama vektora opterećenja LV1, prikazanom na slici 21b, može se videti da su ova hemijska pomeranja relevantnija za klasu bipolarni, nego za kontrolnu grupu. Iako dublet laktata, na 1,328 ppm ne pokazuje značajne rezultate u VIP skoru, kvartet, koji takođe potiče od laktata, na 4,11 ppm zaslužuje posebnu pažnju tokom hemijske validacije. Delovi spektra u opsegu hemijskih pomeranja 1,63–1,80 ppm, 2,30–2,50 ppm, 3,16–3,38 ppm mogu se identifikovati kao promenljive od značaja relevantnije za klasu kontrola. Skoro identičan zaključak može se izvesti iz grafika VIP skora većeg od 1,3, što sugerise da obe metode daju skoro identične promenljive. Rezultati dobijeni analizom PCA reskaliranih opterećenja, predstavljeni na slici 20, ukazuju na gotovo istu interpretaciju rezultata, nezavisno od načina skaliranja.

Na slici 24 grafički je prikazana razlika u koncentraciji značajnih metabolita. Prikazani su delovi spektra značajni za razdvajanje ispitivanih grupa, sa integraljenim signalima, radi lakšeg uočavanja razlika. Referentni signal pri integraljenju i u ovom slučaju bio je dublet na 0,98 ppm koji potiče od valina. Razlozi odabira ovog signala već su pomenuti u prethodnom poglavlju.



**Slika 24.** Reprezentativan <sup>1</sup>H NMR spektri sa integraljenim regionima ili signalima pripadajućih jedinjenja od značaja za kontrolnu grupu (gore) i pacijente obolele od bipolarnog poremećaja (dole).

#### 4.1.3. Hemometrijska analiza spektralnih podataka dobijenih NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije, bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola

Početni skup podataka sadržao je 367 uzoraka, sa pripadajućim triplikacijama za svaki uzorak i 32 K promenljivih. Svi uzorci koji su činili primarni skup podataka podeljeni su u tri grupe, odnosno klase. Jednu klasu činila je kontrolna grupa, od 116 uzoraka, odnosno 39 pacijenata, druga klasa se sastojala od 102 uzorka, odnosno 34 pacijenta i pripadala je grupi pacijenata sa bipolarnim poremećajem. Poslednja klasa sa 149 uzoraka, odnosno 50 pacijenata činila je grupu pacijenata sa shizofrenijom. Na osnovu prethodnih rezultata (poglavlja 4.1.1.) šest uzoraka, odnosno dva pacijenta sa dijagnostikovanom shizofrenijom, isključeno je iz daljeg toka analize. Pored navedenih uzoraka, sprovođenjem eksplorativne PCA analize identifikovana su još 4 autlajera i to jedan iz klase kontrola i tri iz klase bipolarnog poremećaja, koja su takođe isključena iz dalje analize. Nakon odstranjivanja autlajera, konačan skup podataka za hemometrijsku analizu sastojao se od 357 uzoraka i to 115 uzoraka kontrolne grupe, 99 uzoraka pacijanata sa bipolarnim poremećajem i 143 uzorka pacijenata sa shizofrenijom.

Za PCA analizu korišćen je kompletan skup podataka. Sa druge strane, u slučaju OPLS-DA, početni skup podataka, nakon uklanjanja autlajera, podeljen je na dva dela pritom zadržavajući isti odnos broja uzoraka unutar svake od klasa kao početni skup. Jedan deo čini kalibracioni set podataka sa približno dve trećine ukupnog broja uzoraka, a drugi deo test set koji se koristi za eksternu validaciju OPLS-DA modela i uključuje preostale uzorke, odnosno 1/3 uzoraka početnog seta. Kao rezultat

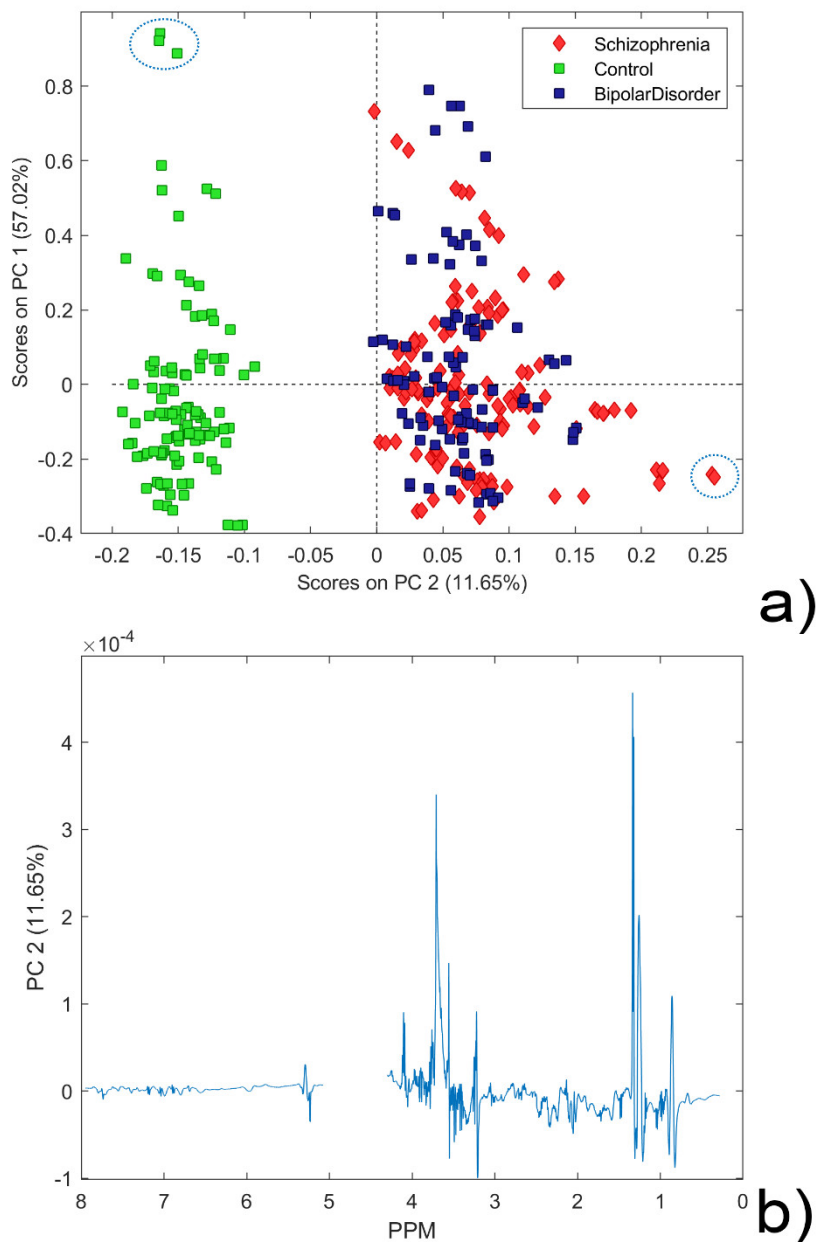
postupka razdvajanja, skup podataka za kalibraciju sastoji se od ukupno 238 uzoraka, 77 uzoraka kontrolne grupe, 66 uzoraka iz klase bipolarnog poremećaja i 95 uzoraka iz klase shizofrenija, dok test set obuhvata ukupno 119 uzoraka i to 38 uzoraka kontrolne grupe, 33 uzorka iz klase bipolarnog poremećaja i 48 uzoraka iz klase shizofrenija. Triplikatna struktura svakog pacijenta sačuvan je unutra oba seta.

Najčešće korišćenje metode skaliranja su Pareto skaliranje i autoskaliranje. Međutim, prethodni rezultati, hemometrijska analiza shizofrenije i kontrolne grupe (poglavlje 4.1.1.), kao i bipolarnog poremećaja i kontrolne grupe (poglavlje 4.1.2.), sa korišćenjem centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa dali su dobre rezultate, posebno za skupove podataka sa neuravnoteženim sadržajem klasa. Zbog toga je i prilikom hemometrijske analize sve tri klase, korišćeno srednje centriranje i centriranje klasnog centroida sa prethodno navedenim svim metodama skaliranja, Pareto skaliranje i autoskaliranje. Sve tri metode skaliranja testirane su istovremeno tokom pravljenja modela. Za validaciju modela korišćena je sedmostruka unakrsna validacija, CV.

### **Analiza glavnih komponenti, PCA modeli za razlikovanje obolelih od shizofrenije, obolelih od bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola**

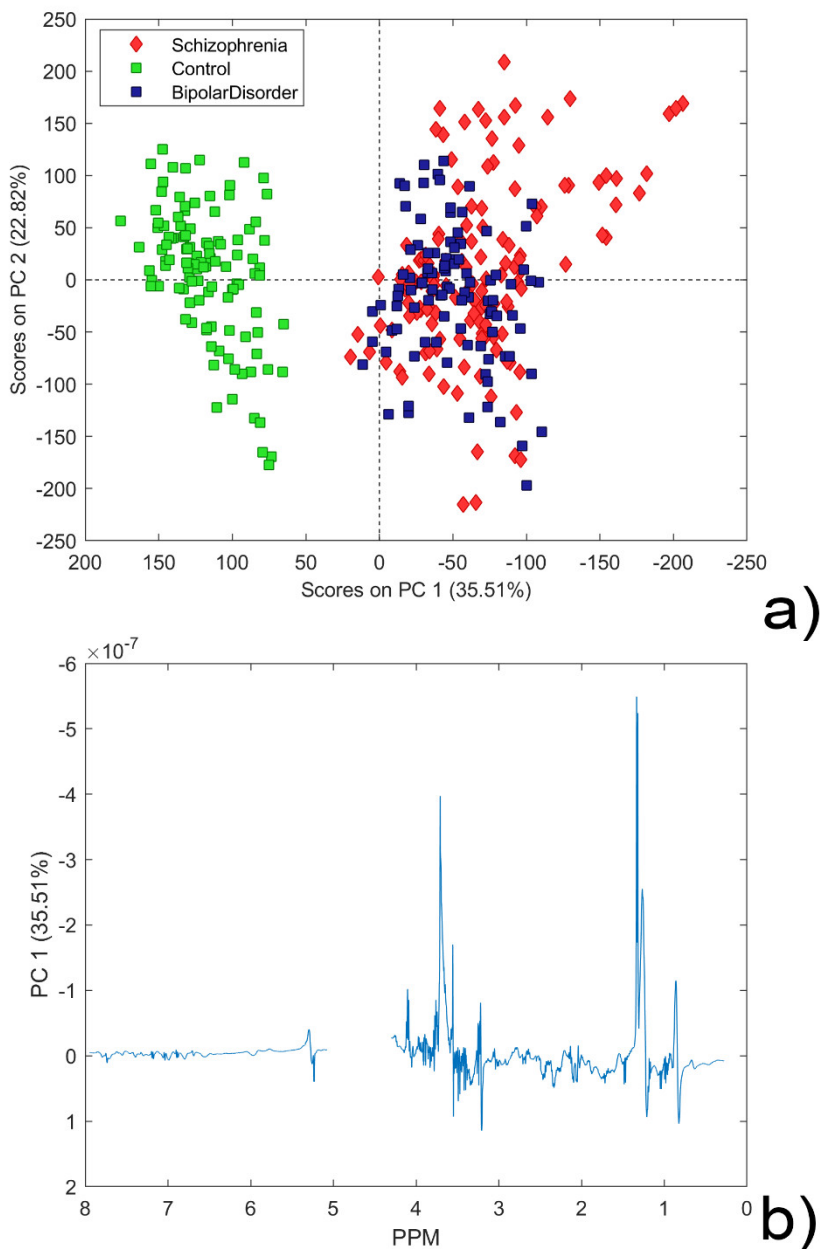
Prilikom obrade podataka procenjujane su mere asimetrije i spljoštenosti, kao pomoć pri određivanju metode skaliranja ili regiona promenljivih sa značajnim odstupanjem. Za utvrđivanje autlajera, neophodno je odrediti broj komponentata u svakom PCA modelu, što je i urađeno pomoću RMSECV i utvrđeno da su svi modeli treba da sadrže od šest glavnih komponentata.

PCA modeli dobijeni Pareto skaliranjem i centriranjem srednje vrednosti imali su ukupnu varijansu od 89,02%. Razdvajanje između klasa uočeno je duž PC 2 komponente (ukupna varijansa 11,65%), dok su prve dve komponente obuhvatale 68,67% ukupne varijanse, što je i prikazano na slici 25.



**Slika 25.** a) PCA modeli dobijeni centriranjem srednje vrednosti i Pareto skaliranjem ulaznih podataka. Uzorci obuhvaćeni plavom elipsom iz grupa kontrola i shizofrenija identifikovani su kao potencijalni autlajeri. b) Vektor opterećenja PC2 komponente dobijen centriranjem srednje vrednosti i Pareto skaliranjem ulaznih podataka.

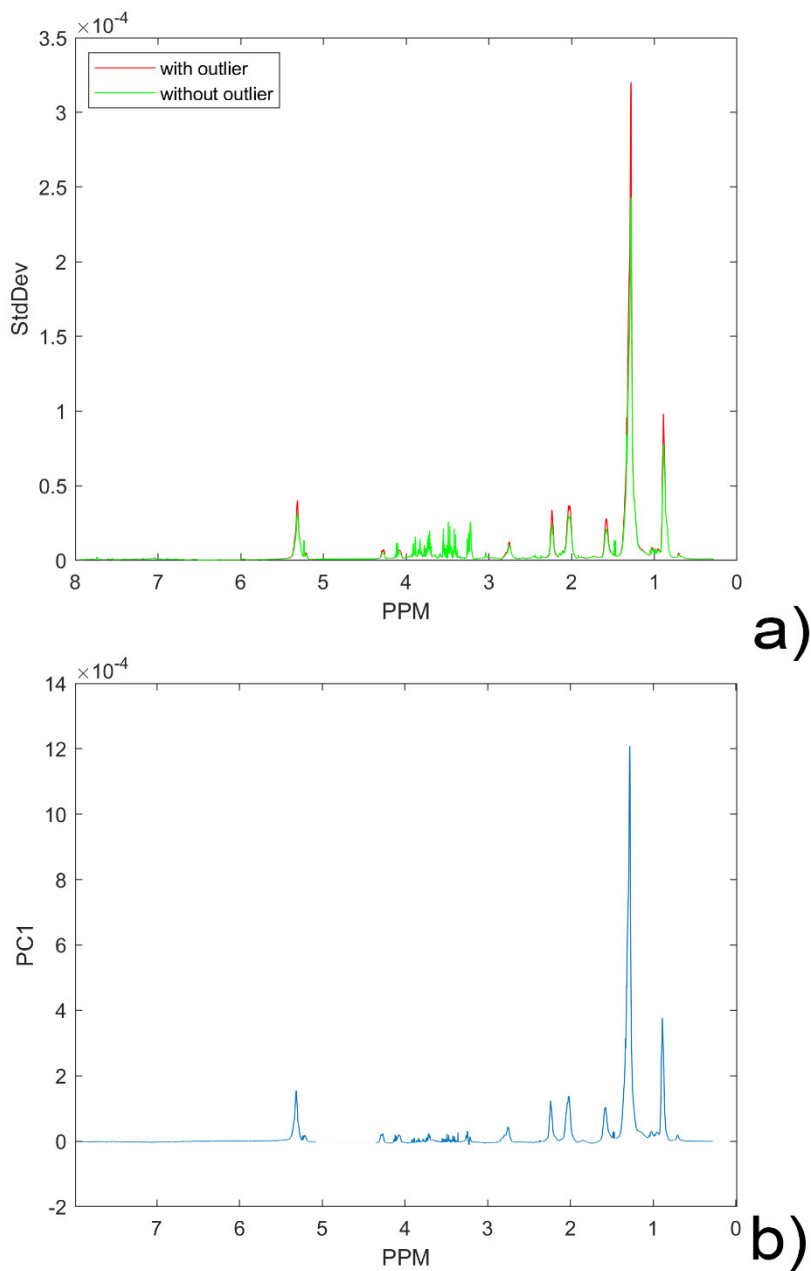
PCA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranom na centroidu klasa, bez identifikovanih autlajera, gde su svi ostali parametri preprocesiranja bili isti kao za model dobijen Pareto skaliranjem, sarži šest glavnih komponenta i ima ukupnu varijansu 83,83%. Jasno razdvajanje klasa je uočeno duž PC1 komponente (varijansa 35,51%). PCA model dobijen na ovaj način, prikazan je na slici 26.



**Slika 26.** a) PCA model dobijen centriranjem i skaliranjem baziranom na centroidu klasa bez identifikovanih autlajera. b) Vektor opterećenja PC1 komponente dobijen srednje centriranim skaliranjem ulaznih podataka.

Na slikama 25a i 26a može se primetiti jasno razdvajanje klase kontrolne grupe i grupisanje pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem. Takođe, može se primetiti da nema značajnih razlika u varijansama između dve grupe pacijenata. Na slikama 25b i 26b predstavljen je vektor opterećenja dobijen tokom pravljenja PCA modela koji ukazuje na skoro isti oblik komponenata značajnih za razdvajanje. Pomoću modela prikazanog na slici 25a mogu se identifikovati dva uzorka, sa pripadajućim triplikatima, iz klasa kontrolne grupe i shizofrenije, koja odstupaju od  $T^2$  Hotelling i predstavljaju autlajere. Poređenje standardne devijacije za uzorke iz kontrolne grupe sa i bez autlajera, prikazano je na slici 27a. Detaljnim analiziranjem grafika Hotellingovog  $T^2$  doprinosa izražajne razlike standardne devijacije mogu se pripisati sledećim hemijskim pomeranjima: 0,88; 1,28; 1,58; 2,02; 2,24; 5,21 i 5,23 ppm. U isto vreme, ova hemijska pomeranja imaju najpozitivniji doprinos u dijagramu opterećenja PC1 komponente (slika 26b) i predstavljaju promenljive odgovorne za razdvajanje klasa. Za uzorke koji pripadaju klasi shizofrenija, male razlike između standardnih

devijacija mogu se uočiti u oblasti hemijskog pomeranja 4,04; 4,08; 4,09 ppm i sve do 4,2 i 4,3 ppm. Ove promenljive takođe imaju najpozitivniji doprinos za razdvajanje pomenutih klasa. Na osnovu analize, oba uzorka, sa pripadajućim triplikacijama, mogu se smatrati blagim autlajerima.



**Slika 27.** a) Standardna devijacija skupa podataka koja uključuje sve promenljive, odnosno sva hemijska pomeranja, za sve uzorke koji pripadaju kontrolnoj grupi, sa uključenim autlajerima, označeno crvenom linijom u poređenju sa uzorcima iste klase ali bez autlajera, označeno zelenom linijom. b) Vektor opterećenja PC1 komponente dobijen centriranjem srednje vrednosti i Pareto skaliranjem.



### **OPLS-DA model za razlikovanje obolelih od shizofrenije, obolelih od bipolarnog afektivnog poremećaja i kontrola**

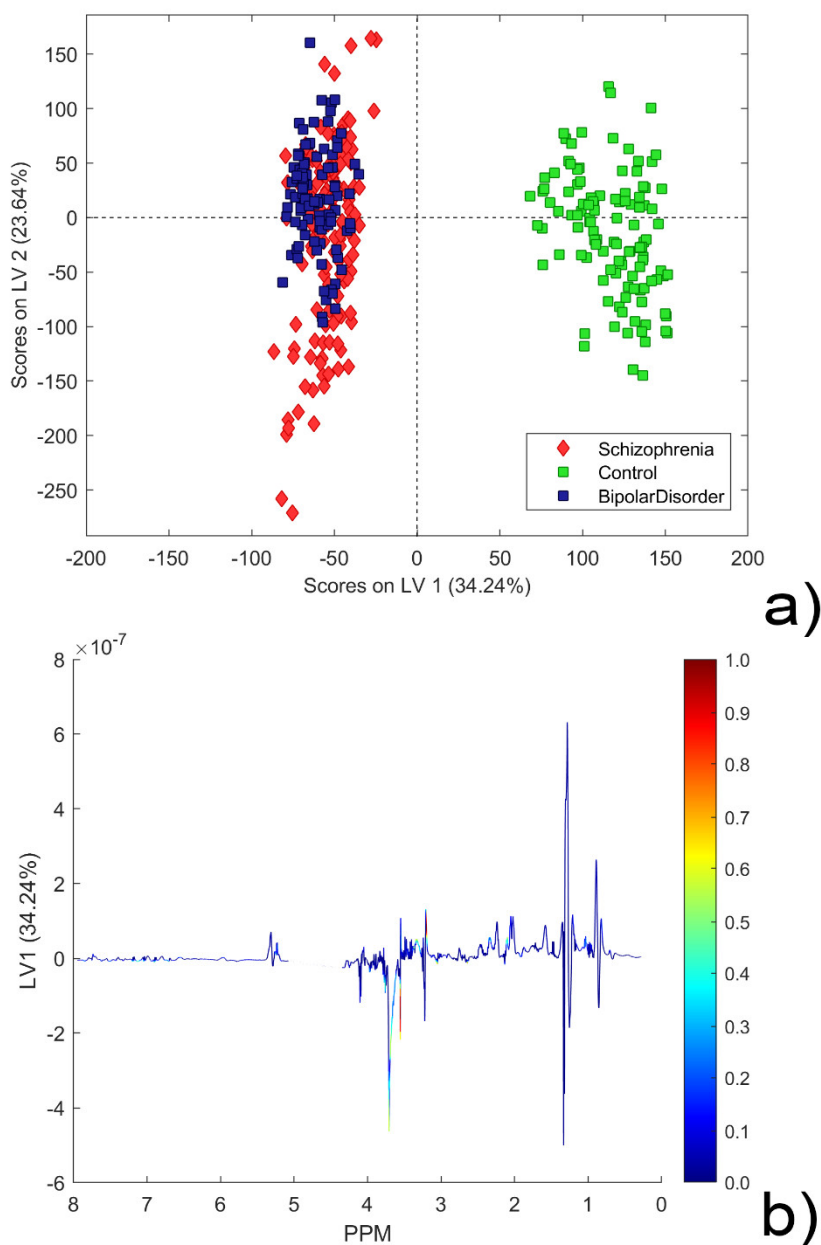
Na osnovu rezultata dobijenih PCA analizom, gde se jasno uočava razdvajanje između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, za razdvajanje sve tri klase najkorisnija je OPLS-DA analiza. Stoga, u svrhu pravljenja modela koji uključuje sve tri klase podataka, napravljena su dva odvojena OPLS-DA modela. Prvi uključuje sve tri klase i obezbeđuje razdvajanje između kontrolne grupe i druge dve klase, a u drugi su uključene klase iz prethodnog modela koje su pokazale slabo razdvajanje, u ovom slučaju shizofrenija i bipolarni poremećaj. Za identifikaciju potencijalnih biomarkera, odnosno promenljivih (specifična hemijska pomeranja u  $^1\text{H}$  NMR spektru karakteristična za obe grupe), i ovde je korišćen VIP skor.

### **OPLS-DA model koji razlikuje kontrolnu grupu u odnosu na grupisane klase, shizofrenija i bipolarni poremećaj**

U ovom slučaju, OPLS-DA model, bez obzira na način centriranja i skaliranja, pravljen je korišćenjem pristupa binarne klasifikacije, gde je jedna klasa kontrolna grupa, dok druga predstavlja grupisane klase shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Ukupan skup podataka podeljen je na dva dela od kojih jedan čini 1/3 ukupnog broja uzoraka – skup podataka za testiranje u svrhu eksterne validacije, a drugi preostale 2/3 ukupnog broja uzoraka – skup podataka za kalibraciju. Da bi se uradila CV, oba skupa podataka sastavljena na ovaj način su dodatno nasumično izmešana i rezultati su sačuvani kao nezavisna kategorija promenljivih unutar svakog skupa.

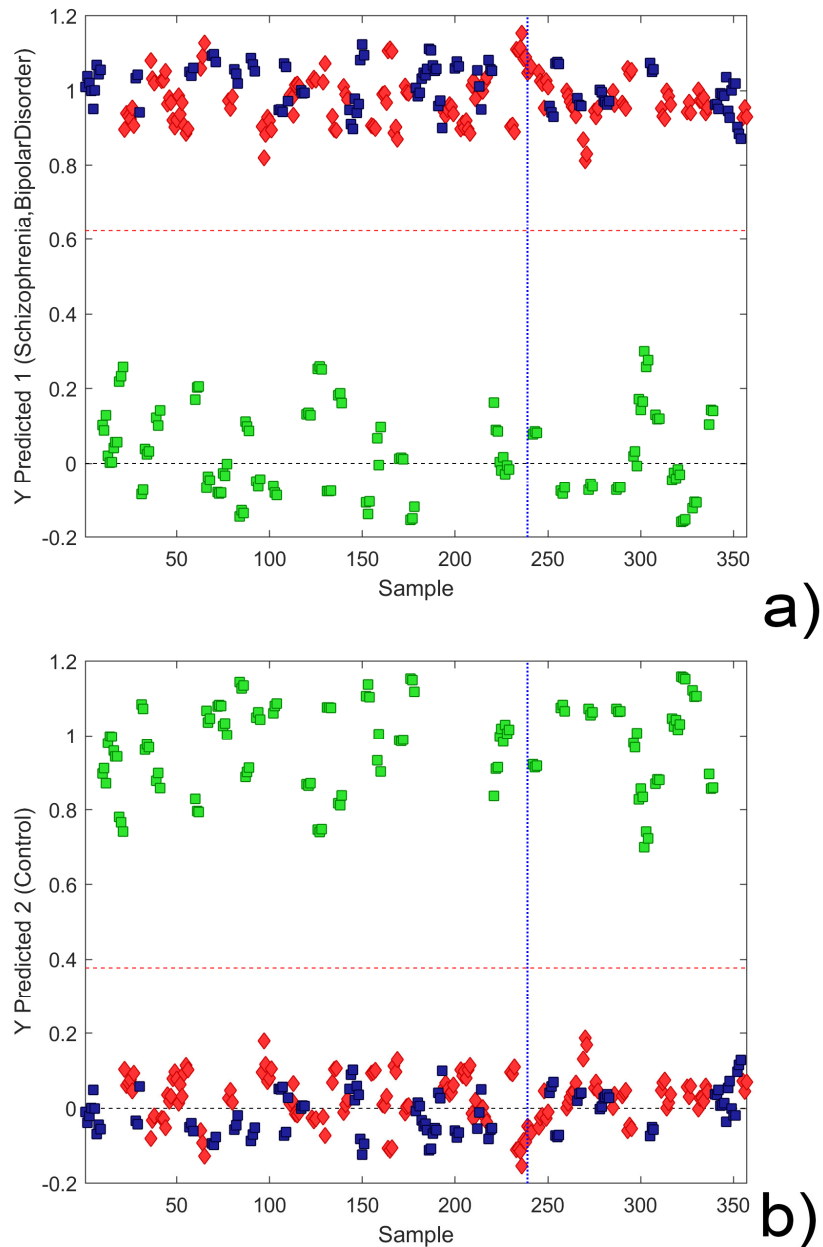
### **OPLS-DA modeli za razdvajanje kontrolne grupe od grupe pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem dobijeni centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa**

OPLS-DA model, dobijen dobijen centriranjem i skaliranjem baziranom na centroidu klasa sadrži tri latentne varijable, jednu prediktivnu i dve ortogonalne sa ukupnom varijansom 57,88%. Razdvajanje između kontrolne grupe i pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem uočeno je duž prve komponente. Na slici 28 prikazan je OPLS-DA model sa prve dve latentne prediktivne i ortogonalne promenljive, praćenjem projekcije povratne skale LV1, koja je odgovorna za razdvajanje klasa.

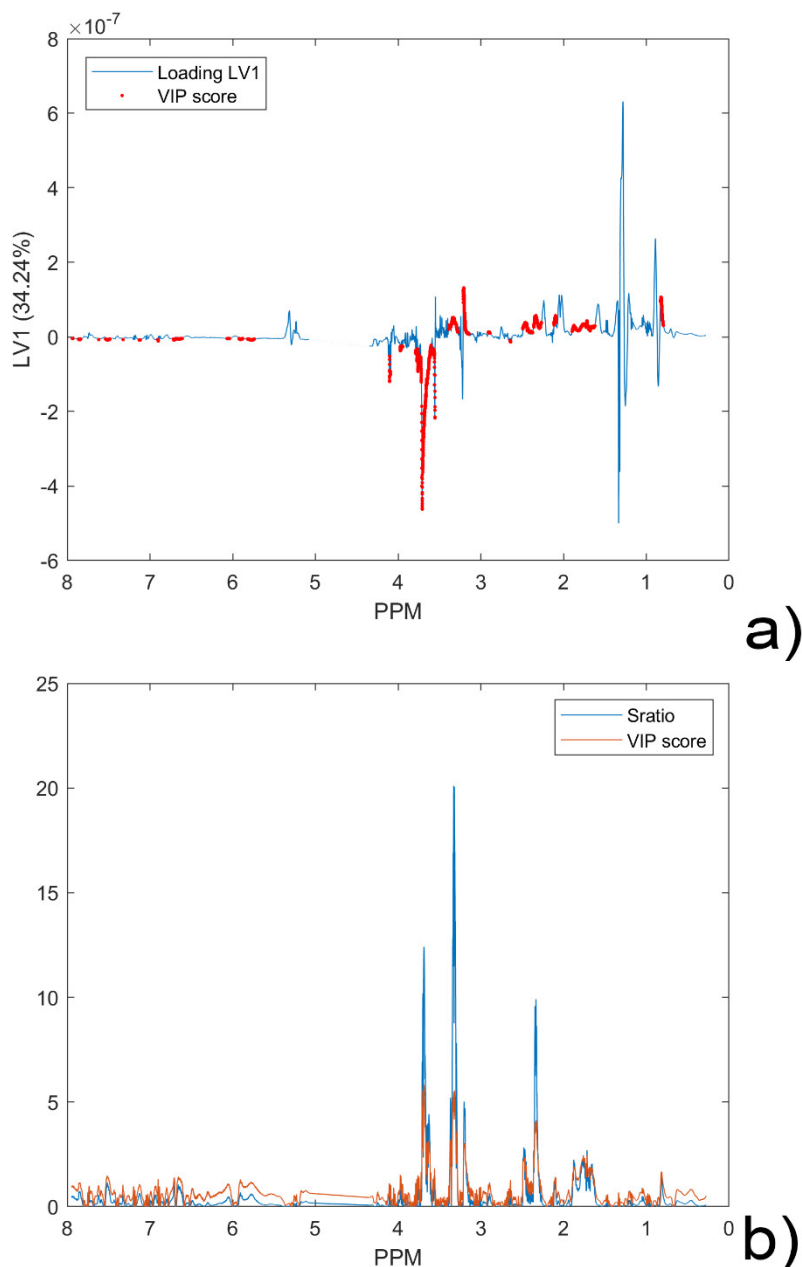


**Slika 28.** a) OPLS-DA model prve dve LV komponente dobijen centriranjem i skaliranjem baziranom na centroidu klasa. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boja kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.

U prikazanim rezultatima može se uočiti samo razdvajanje između kontrolne grupe i pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, ali ne postoji vidljiva razlika između dve grupe pacijenata prema ovom OPLS-DA modelu.



**Slika 29.** Y predikcija za grupisanu klasu pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, sa pragom vrednosti od 0,6231. b) Y predikcija za klasu kontrolne grupe, sa pragom vrednosti od 0,3769. Levi deo grafika u odnosu na isprekidanu liniju predstavlja kalibracioni skup, dok desni deo predstavlja test skup.



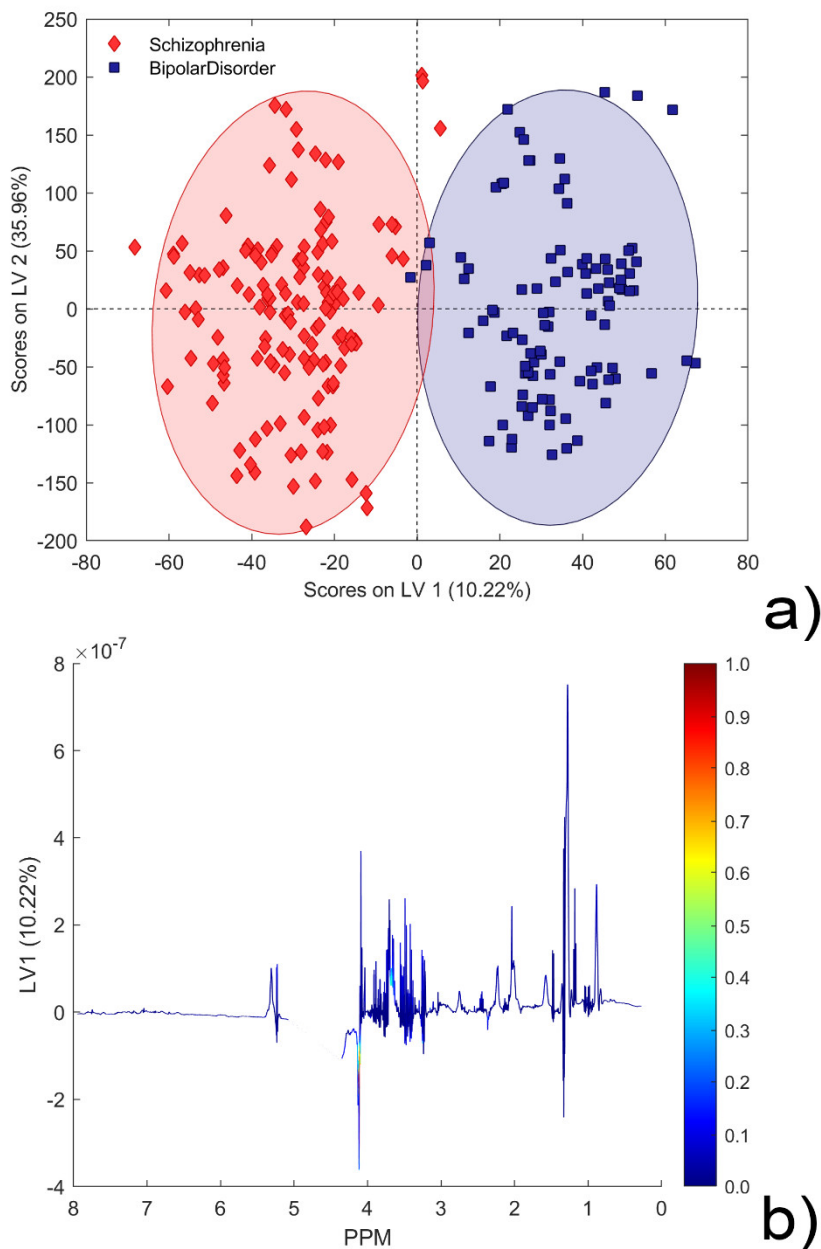
**Slika 30.** VIP skorovi za kontrolnu klasu i zajedničku klasu pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem u odnosu na vektor opterećenja LV1, dobijen centriranjem i skaliranjem baziranom na centroidu klasa. b) VIP skor i Sratio, odnos selektivnosti (Selectivity ratio) dobijen iz OPLS-DA modela sa centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa.

Dobijeni VIP rezultati uključuju vrednosti veće od 1. Ovi rezultati ukazuju na hemijska pomeranja u NMR spektru kao potencijalne oblasti za identifikaciju biomarkera zaslužnih za razdvajanje dve klase, u ovom slučaju kontrolne grupe i grupe pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem. Najizraženije razlike uočavaju se u opsegu 3,54 – 3,78 ppm, gde se nalaze signali koji pripadaju molekulima šećera, a na osnovu VIP dijagrama vidi se da su ova hemijska pomeranja relevantnija za klasu pacijenata, shizofrenija i bipolarni poremećaj. Takođe, signali u opsegu  $\delta_H$  6,86–6,92 i 7,18–7,24 koji pripadaju tirozinu su relevantniji za grupu pacijenata. Pored navedenih, opsezi  $\delta_H$  2,61–2,65 i 3,06–3,08 takođe su relevantniji za klasu pacijenata. Dublet laktata na  $\delta_H$  1,31 ne pokazuje značajne razlike u VIP skor, ali kvartet na  $\delta_H$  4,11 zaslužuje posebnu pažnju tokom hemijske validacije. Holin i njegovi signali koji se nalaze na  $\delta_H$  3,50 i  $\delta_H$  4,05 relevantniji su takođe za klasu pacijenata, što se uočava iz VIP skora. Delovi spektra u opsezima  $\delta_H$  1,61–1,92 i 3,12–3,23 mogu se

identifikovati kao promenljive od značaj za kontrolnu grupu. U navedenim opsezima hemijskih pomeranja nalaze se signali aminokiseline arginin, na osnovu čega se može zaključiti da ovaj metabolit ima važnu ulogu za razdvajanje klasa. Hemijska pomeranja u opsezima  $\delta_H$  2,07–2,11, 2,25–2,49 i 2,86–2,96 takođe su značajna za kontrolnu grupu, pa im treba posvetiti posebnu pažnju prilikom hemijske validacije.

### **OPLS-DA model za razlikovanje klasa pacijenata sa shizofrenijom od klase pacijenata sa bipolarnim poremećajem dobijen centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa**

Prilikom konstruisanja ovog OPLS-DA modela uključene su samo dve grupe pacijenata, tj. iz početnog skupa podataka isključena je kontrolna grupa. Ovaj korak je bio neophodan zbog toga što broj pacijenata, odnosno uzoraka koji se analizira u velikoj meri utiče na rezultat preprocesiranja kao što su centriranje i skaliranje. Smanjenje broja uzoraka dosta utiče i na performanse CV, koja takođe zavisi od broja uzoraka koji se analiziraju. Nakon uklanjanja autlajera iz posmatranog skupa podataka i nakon potpunog isključivanja kontrolne grupe, preostali uzorci, koji pripadaju isključivo grupi pacijenata sa shizofrenijom ili bipolarnim poremećajem, dodatno su nasumično podeljeni na novi skup podataka za validaciju i testiranje. Test skup uključuje ukupno 81 uzorak, sa triplikatima od 27 pacijenata i to 16 iz klase shizofrenija i 11 iz klase bipolarni poremećaj. Skup za validaciju čini 161 uzorak, sa triplikatima od 54 pacijenta, 32 iz klase shizofrenija i 22 iz klase bipolarni poremećaj.



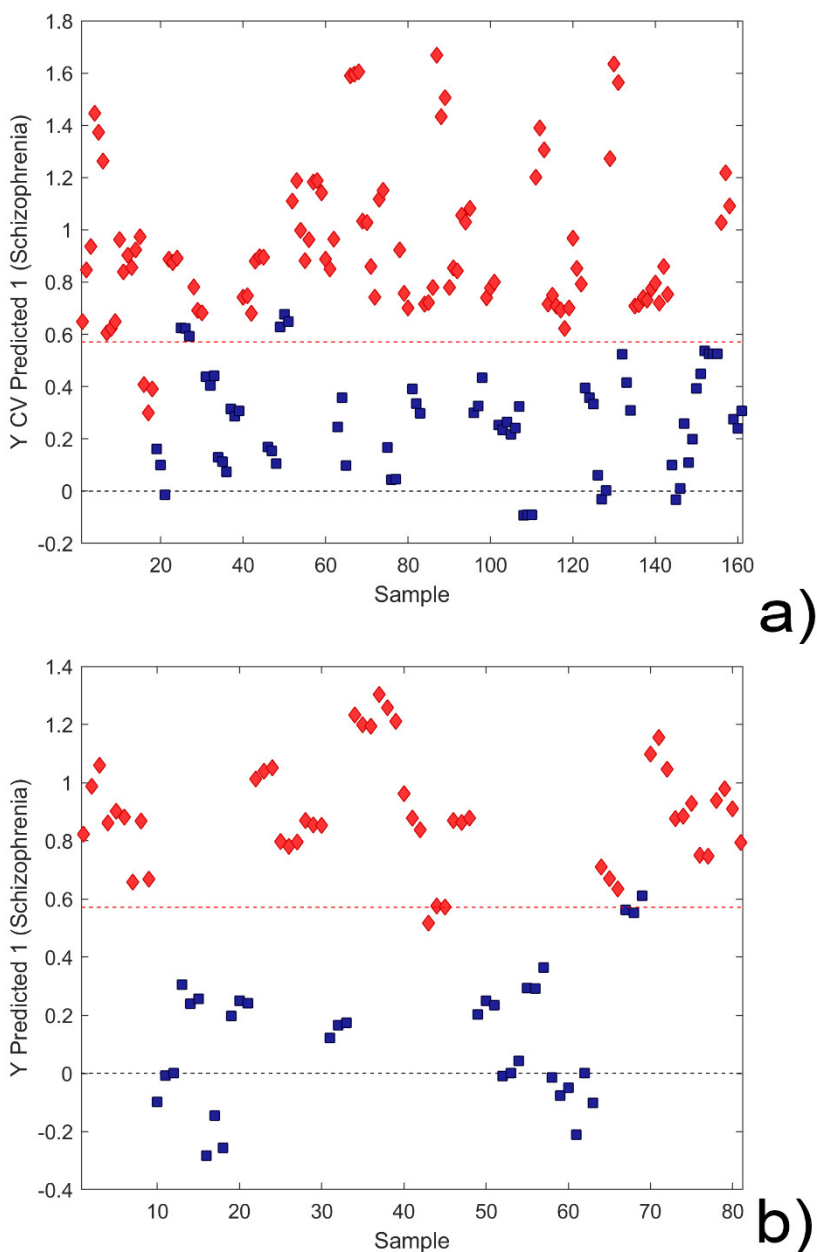
**Slika 31.** OPLS-DA model prve dve LV komponente sa centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klasa. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boja kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.

Odgovarajuća matrica konfuzije za klasifikaciju skupa podataka prema OPLS-DA modelu prikazana je u tabeli 12. Na osnovu dobijenih podataka može se uočiti da su tri uzorka shizofrenije pogrešno klasifikovana, dok je u slučaju bipolarnog poremećaja šest uzoraka pogrešno klasifikovano. Koeficijent tačnosti iznosi 0,9441, što ukazuje da model ima zadovoljavajuće sposobnosti predviđanja.

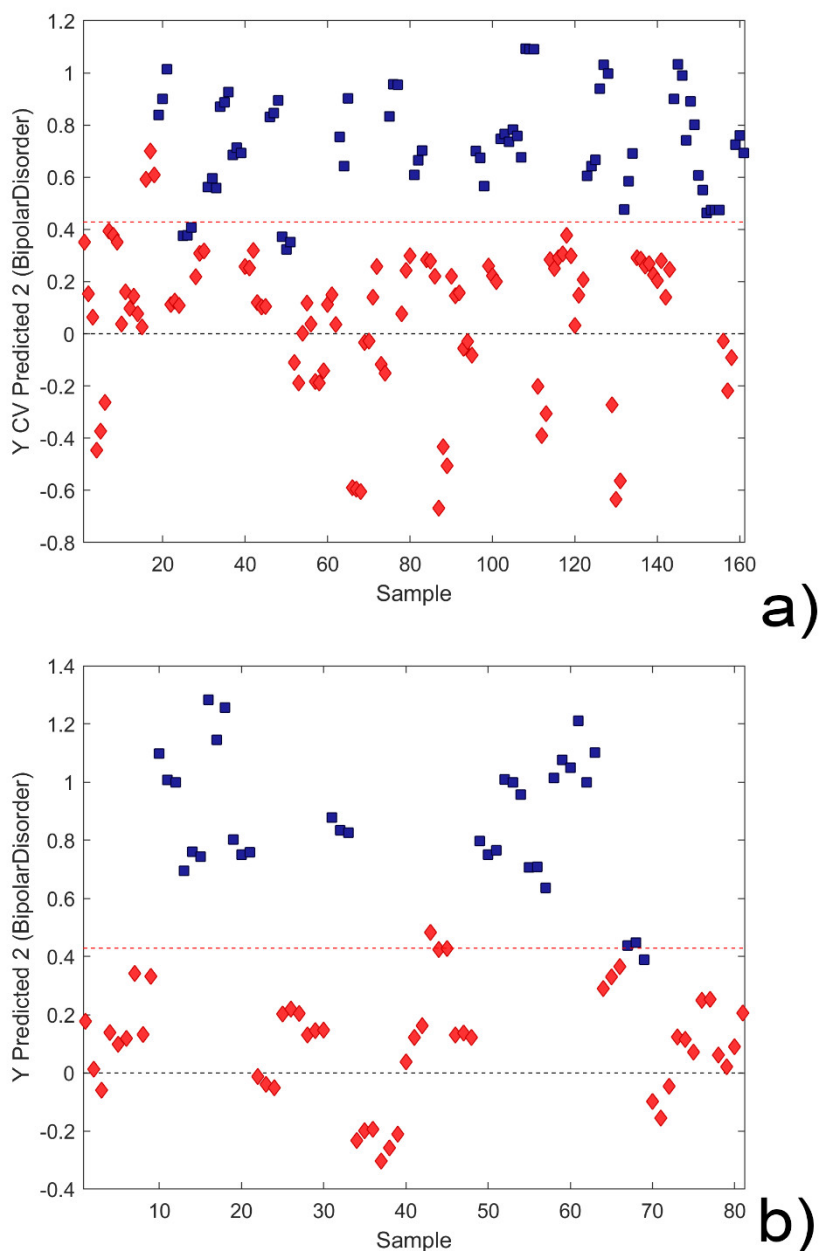
**Tabela 12.** Matrica konfuzije za klasifikaciju test podataka prema OPLS-DA modelu

	Prava klasa	
	Shizofrenija	Bipolarni poremećaj
klasifikovano kao shizofrenija	92	6
klasifikovano kao bipolarni poremećaj	3	60
neklasifikovano	0	0

Predviđanje za obe klase, dobijeno centriranjem i skaliranjem baziranim na centroidu klase, prikazano je na slikama 32 i 33.



**Slika 32.** a) Y CV predikcija za klasu shizofrenija, prikaz kalibracionog modela. b) Y predikcija za klasu shizofrenija sa pragom vrednosti od 0,5711 dobijena korišćenjem centriranja i skaliranja baziranog na centroidu klase, prikaz test modela. Grupa shizofrenija je označena crvenom bojom, a grupa bipolarni poremećaj plavom bojom.

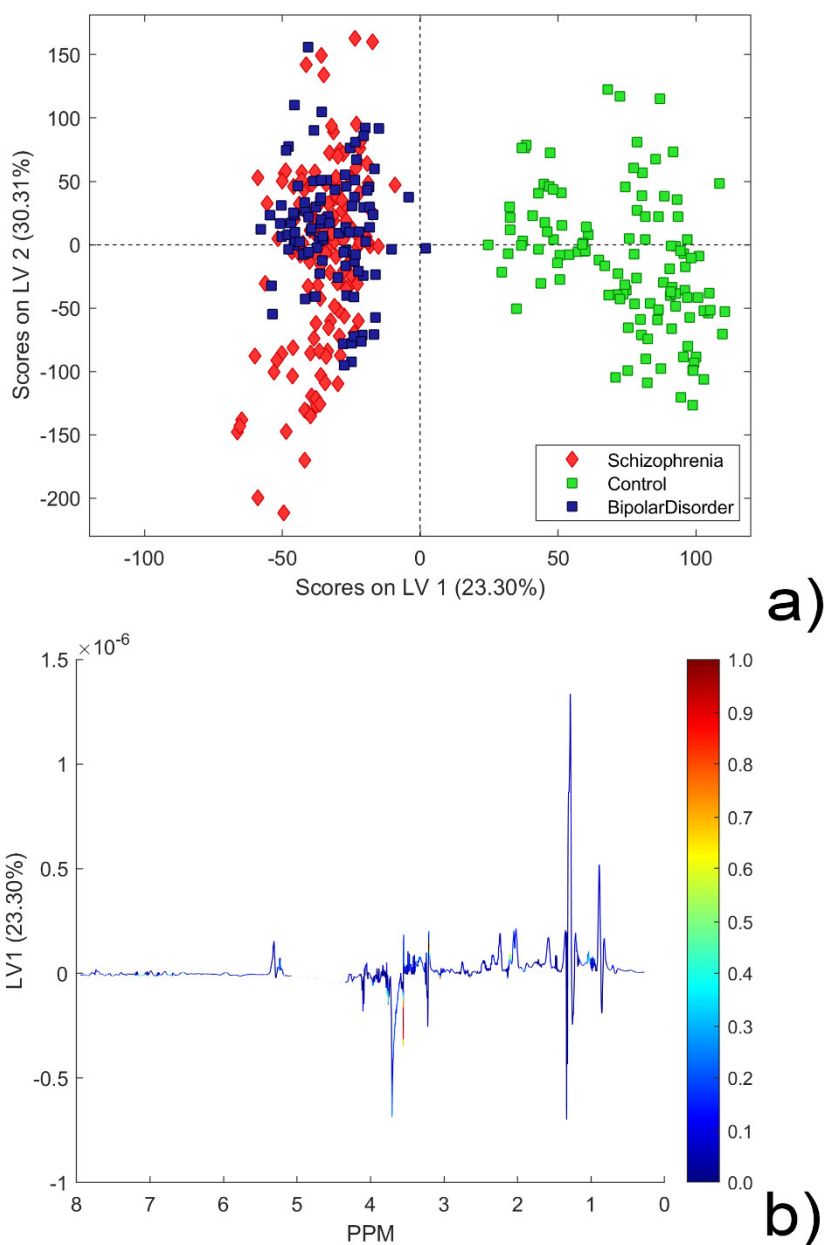


Slika 33. a) Y CV predikcija za klasu bipolarni poremećaj, prikaz kalibracionog modela. b) Y predikcija za klasu bipolarni poremećaj sa pragom vrednosti od 0,4289 dobijena korišćenjem centriranja i skaliranja baziranog na cetroidu klasa, prikaz test modela. Grupa shizofrenija je označena crvenom bojom, a grupa bipolarni poremećaj plavom bojom.

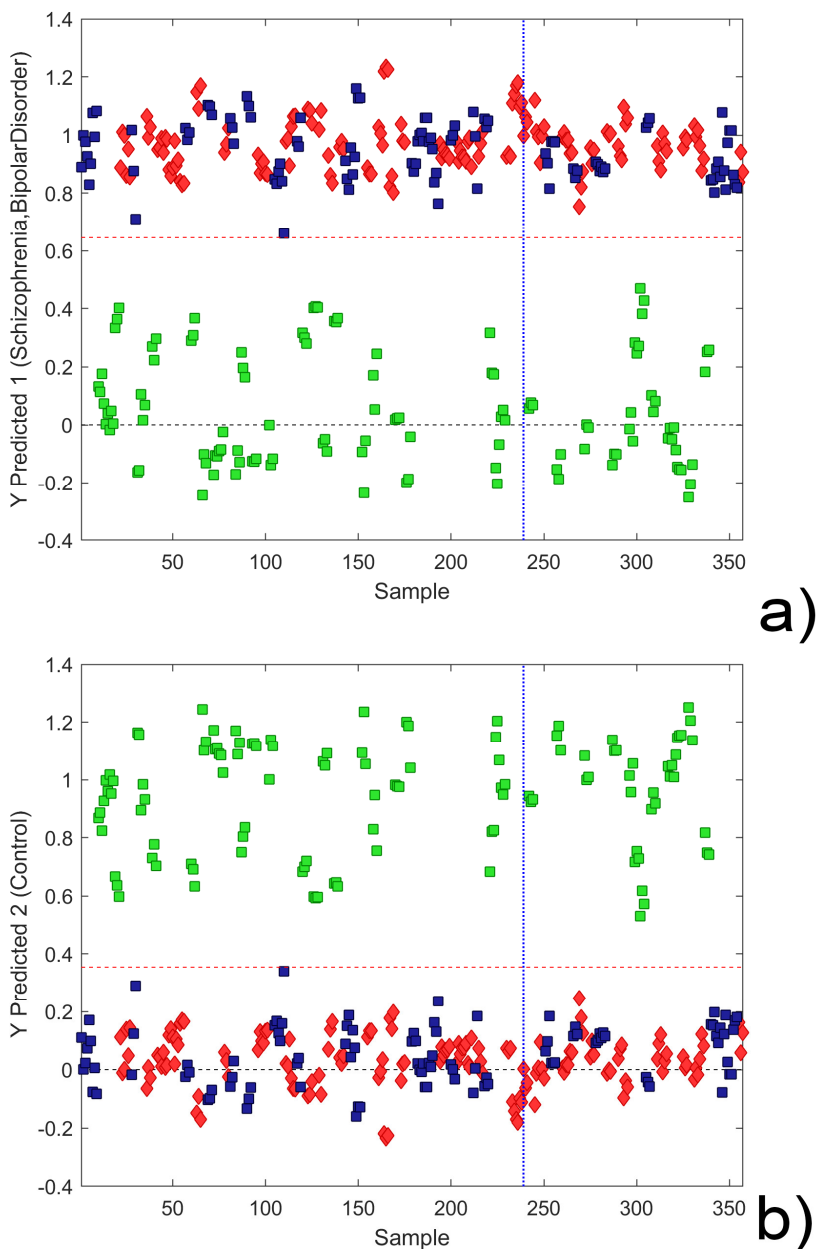
### OPLS-DA modeli za razdvajanje kontrolne grupe od grupe pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, dobijeni autoskaliranjem

OPLS-DA model dobijen autoskaliranjem sadrži tri latentne varijable, jednu prediktivnu i dve ortogonalne sa ukupnom varijansom od 53,61%. Razdvajanje između kontrolne grupe i pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem primećeno je duž prve komponente, LV1. Na slici 34 prikazan je OPLS-DA model sa prve dve latentne varijable, prediktivnom i ortogonalnom, praćen dijagramom projekcije povratne skale LV1 koja je odgovorna za razdvajanje klasa, kontrole i klase pacijenata.



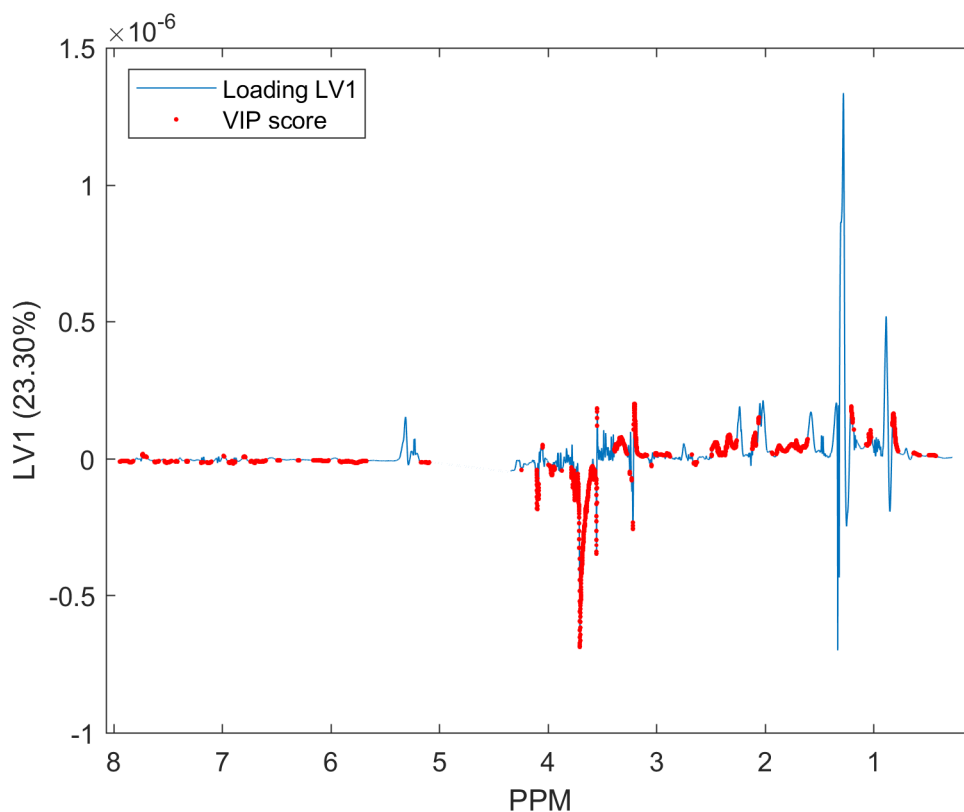


**Slika 34.** OPLS-DA model prve dve LV komponente dobijen autoskaliranjem ulaznih podataka. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boja kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.



**Slika 35.** a) Y predikcija za grupisanu klasu pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, sa pragom vrednosti od 0,6454. b) Y predikcija za klasu kontrolne grupe sa pragom vrednosti od 0,3546. Levi deo grafika u odnosu na isprekidanu liniju predstavlja kalibracioni skup, dok desni deo predstavlja test skup. U oba slučaja, prilikom pravljenja modela korišćeno je autoskaliranje ulaznih podataka.

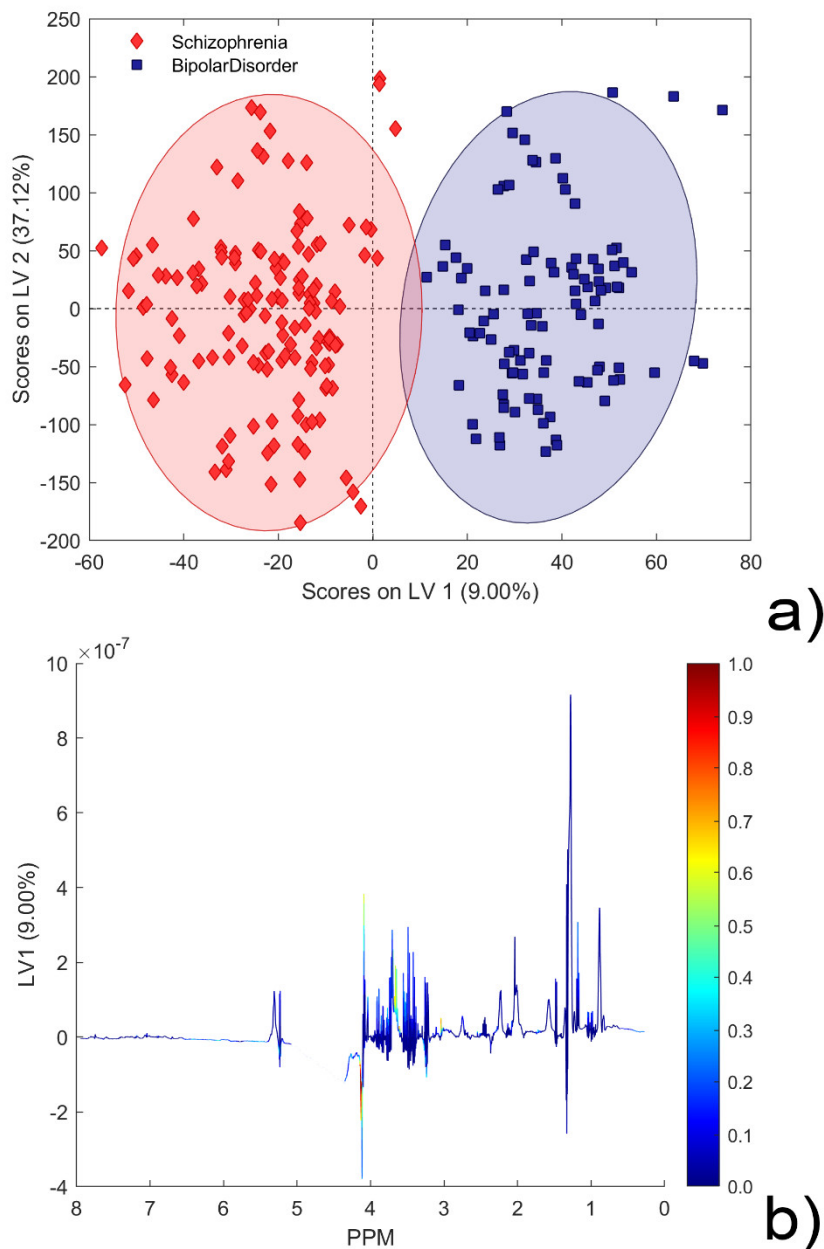
Za određivanje promenljivih značajnih za razdvajanje, odnosno karakterističnih hemijskih pomećajakorišćen je VIP skor, slika 36. Autoskaliranje, koje je korišćeno prilikom pravljenja ovog modela, daje skoro identične podatke VIP skorova kao centriranje i skaliranje bazirano na centroidu klasa.



**Slika 36.** VIP skorovi za kontrolnu klasu i klasu pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem, dobijeni autoskaliranjem ulaznih podataka, u odnosu na vektor opterećenja LV1.

### **OPLS-DA model za razlikovanje klase pacijenata sa shizofrenijom od klase pacijenata sa bipolarnim poremećajem dobijen autoskaliranjem**

OPLS-DA model dobijen autoskaliranjem sadrži tri latentne varijable, jednu prediktivnu i dve ortogonalne sa ukupnom varijansom od 46,12%. Razdvajanje između klasa primećeno je duž prve komponente, LV1. Na slici 37 prikazan je OPLS-DA model, praćen dijagramom projekcije povratne skale LV1, odgovorne za razdvajanje klasa, pacijenata sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem.

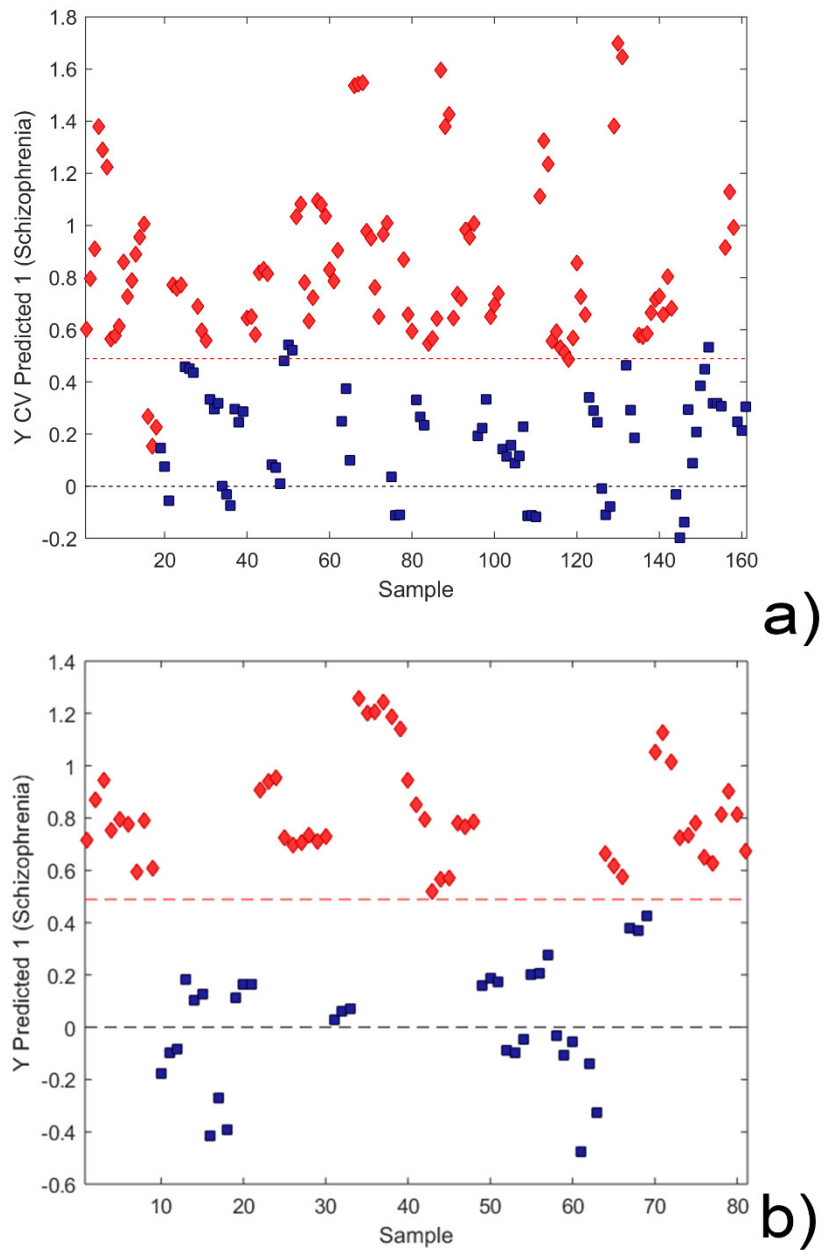


**Slika 37.** a) OPLS-DA model prve dve LV komponente dobijen autoskalaranjem ulaznih podataka. b) Projekcija povratne skale vektora opterećenja LV1 gde su nijanse boja kodirane prema apsolutnoj vrednosti određenog opterećenja ponderisanog korelacionim koeficijentima spektralnog skupa podataka i klasne matrice iz OPLS-DA modela. Izostavljeni deo spektra pripada signalu zaostale vode.

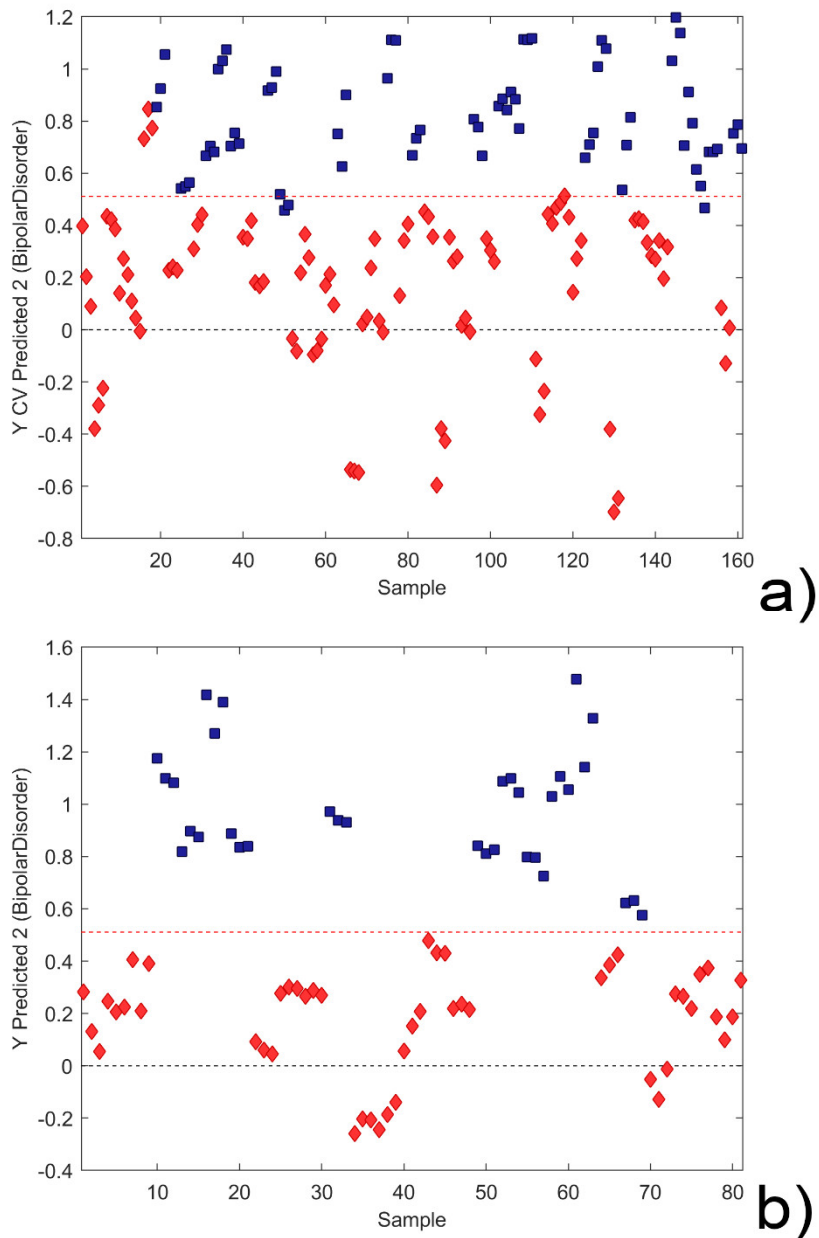
U sledećoj tabeli prikazana je matrica konfuzije korišćena za klasifikaciju podataka.

**Tabela 13.** Matrica konfuzije za klasifikaciju test podataka prema OPLS-DA modelu

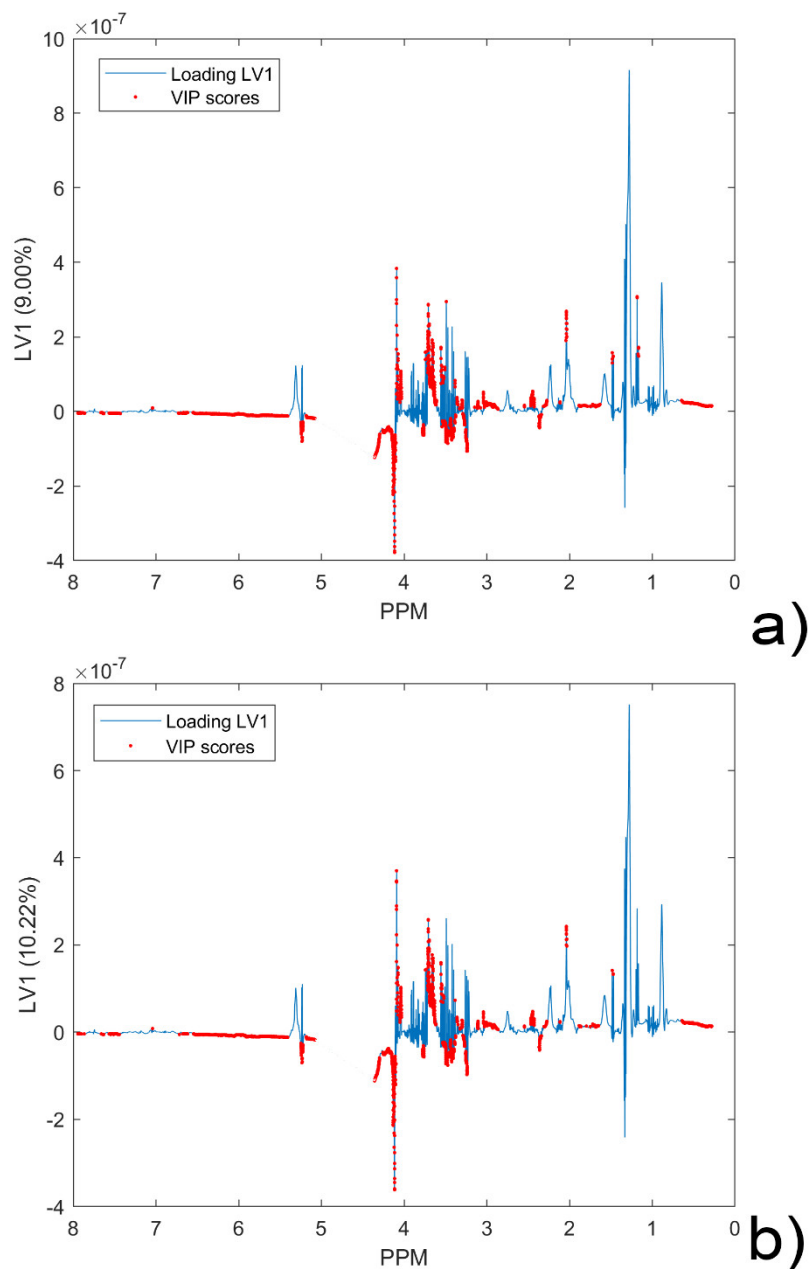
	Prava klasa	
	Shizofrenija	Bipolarni poremećaj
klasifikovano kao shizofrenija	91	3
klasifikovano kao bipolarni poremećaj	4	63
neklasifikovano	0	0



**Slika 38.** a) Y CV predikcija za klasu shizofrenija, prikaz kalibracionog modela. b) Y predikcija za klasu shizofrenija dobijena korišćenjem autoskaliranja i prag vrednost od 0,4890 prikaz test modela. Grupa shizofrenija je označena crvenom bojom, a grupa bipolarnog poremećaja plavom bojom.



**Slika 39.** a) Y CV predikcija za klasu bipolarni poremećaj, prikaz kalibracionog modela. b) Y CV predikcija za klasu bipolarni poremećaj dobijena autoskaliranjem i prag vrednost od 0,5110, prikaz test modela. Grupa shizofrenija je označena crvenom bojom, a grupa bipolarni poremećaj plavom bojom.



**Slika 40.** VIP skorovi za klasu shizofrenija i bipolarni poremećaj dobijeni autoskaliranjem u odnosu na vektor opterećenja LV1. b) VIP skorovi dobijeni na osnovu OPLS-DA modela sa centriranjem i skaliranjem baziranom na cetroidu klasa za pomenute klase uzoraka, u odnosu na vektor opterećenja LV1.

VIP rezultati uključuju vrednosti veće od 1. Na osnovu dijagrama uočavaju se opsezi hemijskih pomeranja  $\delta_H$  2,30–2,34, 3,20–3,26, 3,39–3,43, 4,12–4,35 i 5,06–5,29 koji su relevantniji za klasu pacijenata obolelih od shizofrenije, a gde se nalaze signali molekula šećera, glukoze i manoze. Signali na  $\delta_H$  2,30–2,34 i 4,12–4,35 takođe su identifikovani kao potencijalno značajni za klasu pacijenata.  $\gamma$ -Aminobuterna kiselina sa signalima na hemijskom pomeranju  $\delta_H$  1,61–1,92 i 2,84–3,04, valin i glicerol sa signalima na hemijskim pomeranjima  $\delta_H$  2,23–2,29 i 3,59–3,71 predstavljaju relevantnije metabolite za bipolarni poremećaj. Delovi spektra sa hemijskim pomeranjem  $\delta_H$  1,16–1,20, 1,45–1,49, 2,00–2,04, 2,40–2,47, 2,53–2,57 predstavljaju promenljive značajne za pacijente obolele od bipolarnog poremećaja.

#### 4.2. Identifikacija metabolita/potencijalnih biomarkera za shizofreniju i bipolarni poremećaj i razlikovanje ovih oboljenja

Na osnovu rezultata hemometrijske analize, identifikovani su metaboliti, potencijalni serumski biomarkeri za shizofreniju, bipolarni poremećaj i razlikovanje ovih oboljenja. Identifikacija biomarkera urađena je  $^1\text{H}$  NMR (CPMG pulsna sekvenca, slike 41 i 42) i 2D NMR (TOCSY, 2DJ i HSQC, slike 43–48) analizama, reprezentativnih spektara uzoraka obolelih i zdravih individua koje su prikazani u daljem tekstu. Ukupno je identifikovano 26 serumskih biomarkera za shizofreniju, 22 biomarkera za bipolarni poremećaj i 5 serumskih biomarkera za razlikovanje ovih oboljenja. 2DJ eksperimentima je utvrđeno 25 biomarkera, TOCSY eksperimenata identifikovano je 20 biomarkera, a HSQC eksperimentima 14 biomarkera. Svi navedeni biomarkeri potvrđeni su pomoću literaturnih podataka i pomoću HMDB baze podataka.

U tabeli 14 prikazani su spektroskopski podaci identifikovanih metabolita-biomarkera. Hemijska pomeranja,  $\delta$ , su izražena u ppm jedinicama, dok su konstante sprezanja,  $J$ , očitane iz 2DJ eksperimenata, izražene u hercima, Hz.



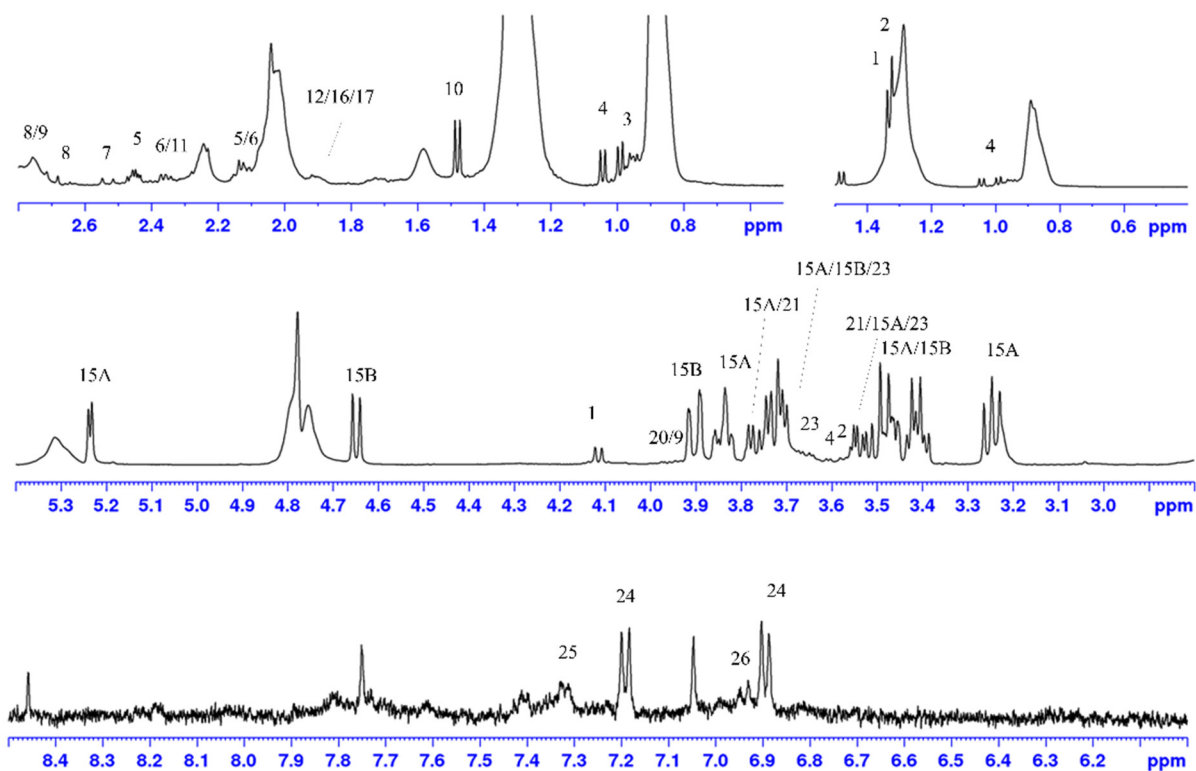
**Tabela 14.** Identifikovani metaboliti/potencijalni serumski biomarkeri za shizofreniju, bipolarni poremećaj i razlikovanje ovih oboljenja (na osnovu VIP skorova). Dati spektroskopski podaci odnose se na uzorke seruma osobe obolele od shizofrenije.

Redni broj	Metaboliti/biomarkeri	TOCSY ( $\delta_H$ , ppm)	2DJ ( $\delta_H$ (ppm), multiplicitet, $J$ (Hz))	HSQC ( $\delta_H/\delta_C$ (ppm))	Biomarkeri za		
					shizofreniju	bipolarni poremećaj	razlikovanje shizofrenije i bipolarnog poremećaja
1	Laktat/mlečna kiselina	4,10; 1,31	CH <sub>3</sub> : 1,31, d, 6,98 <sup>a</sup> ; CH: 4,10 q, 7,0	1,32/22,79; 4,098/71,25	+	+	-
2	Treonin	1,31; 3,56; 4,24	CH <sub>3</sub> : 1,32, d, <sup>a</sup> ; CH: 3,56 d, 5,0; CH <sub>2</sub> : 4,23 dd, 4,9, 6,6, <sup>b</sup>	1,34/22,54; 3,55/63,42	+	+	-
3	Leucin	0,95; 1,71; 3,71	CH <sub>3</sub> : 0,94, d, 6,24; CH <sub>3</sub> : 0,95, d, 6,24	0,94/23,41; 0,95/24,72, 1,71/42,70	+	+	-
4	Valin	0,98; 1,03; 2,27; 3,62	CH <sub>3</sub> : 0,97, d, 7,00; CH <sub>3</sub> : 1,03, d, 7,00; CH: 3,59 d, 4,39	0,97/19,26; 1,02/20,6, 3,59/63,27	+	+	+
5	Glutamin	2,12; 2,44; 3,74	CH <sub>2</sub> : 2,12 m; CH <sub>2</sub> : 2,44 m	2,12/29,27; 2,43/33,61, 3,74/57,11	+	+	-
6	Glutamat/glutaminska kiselina	2,05; 2,35; 3,75	CH <sub>2</sub> : 2,05, m 2,11 m	2,0/29,68; 2,34/36,28, 3,74/57,11	+	+	-
7	Citrat/limunska kiselina	2,51; 2,68	CH <sub>2</sub> : 2,51 d, 16,0; CH <sub>2</sub> : 2,68 d, 16,0	-	+	+	-
8	Aspartat	2,68; 2,80; 3,88	CH <sub>2</sub> : 2,66, dd, 8,8, 17,5 i 2,80, dd 3,8, 17,4	3,80/54,56	+	+	-
9	Asparagin	2,83; 2,92; 3,96	CH <sub>2</sub> : 2,82 <u>ABX</u> , m, 4,2, 17,0 i 2,93 <u>ABX</u> , m, 7,8, 16,6	-	+	-	-
10	Alanin	1,46; 3,77	CH <sub>3</sub> : 1,46, d, 7,26	3,76/53,21	+	+	-
11	3-Hidroksibuterna kiselina	1,19; 2,34; 4,12	CH <sub>3</sub> : 1,19 d, 6,4; CH <sub>2</sub> : 2,40, dd, 7,2, 14,4 i 2,29 dd, 6,4, 14,4	-	+	+	-
12	$\gamma$ -Aminobuterna kiselina	1,9; 3,03	CH <sub>2</sub> : 3,04, t, 7,6	-	+	+	+
13	Holin	3,50; 4,05	CH <sub>2</sub> : 4,05 m	4,05/58,35	+	+	-
14	Acilgliceroli	4,07; 4,27; 5,20	CH <sub>2</sub> : 4,10 m, 4,23 m <sup>b</sup>	4,26, 4,05/64,40; 5,19/71,58	+	-	-

Redni broj	Metaboliti/biomarkeri	TOCSY ( $\delta_H$ , ppm)	2DJ ( $\delta_H$ (ppm), multiplicitet, $J$ (Hz))	HSQC ( $\delta_H/\delta_C$ (ppm))	Biomarkeri za		
					shizofreniju	bipolarni poremećaj	razlikovanje shizofrenije i bipolarnog poremećaja
15	Glukoza ( $\alpha + \beta$ )	3,40; 3,52; 3,7; 3,75; 5,10; 5,22	$\alpha$ -Glc: CH-4: 3,40 m; CH-2: 3,52 dd, 3,7, 9,7; CH-3: 3,70 m <sup>c</sup> ; CH <sub>2</sub> -6: 3,75 dd, 5,1, 12,0 i 3,83 m; CH-5: 3,82 m; CH-1: 5,22 d, 3,9 $\beta$ -Glc: CH-2: 3,22 dd, 8,0, 9,3; CH-4: 3,39 m; CH-5: 3,45 m; CH-3: 3,48 t, 9,2; CH <sub>2</sub> -6: 3,71 m <sup>c</sup> ; 3,88 dd, 2,2, 12,4; CH-1: 4,63 d, 8,0	-	+	+	+
16	Arginin	1,64; 1,72; 1,90; 3,23; 3,73	3,23 t, 6,6; 1,70, m i 1,64, m <sup>d</sup>	-	+	+	-
17	Lizin	1,70; 1,91; 3,03; 3,74	1,91 m	-	+	+	-
18	2-Hidroksibuterna kiselina	-	CH <sub>3</sub> : 0,88, t, 7,50; CH <sub>2</sub> : 1,70, m i 1,64, m <sup>d</sup>	-	+	+	-
19	Izoleucin	-	CH <sub>3</sub> : 0,92, t, 7,4; CH <sub>3</sub> : 0,99, d, 7,0; 3,65 d, 4,04	-	+	+	-
20	Serin	-	CH <sub>2</sub> : 3,97, dd, 3,8, 12,2 i 3,92, dd 5,7, 12,2; CH: 3,82 preklapljeno	3,95/62,94; 3,81/59,2	+	+	-
21	Manoza	-	CH: 3,55 t, 9,4; CH: 3,79 m; CH: 3,84 dd, 2,2, 4,0; CH: 3,95 m; CH: 5,17, d 1,4	-	+	+	+
22	Glicin	-	CH <sub>2</sub> : 3,54 s	-	+	-	-
23	Glicerol	-	CH <sub>2</sub> : 3,64 i 3,55 m; CH: 3,70 m <sup>c</sup>	3,63, 3,55/65,31	+	+	+
24	Tirozin	6,88; 7,18	CH: 3,96, dd, 5,0, 8,1; ar: 6,88 and 7,18	3,95/58,78, 6,88/118,6; 7,18/133,4	+	+	-
25	Fenilalanin	7,30; 7,36; 7,42	ar: 7,30 m, 7,37 m, 7,41 m	7,31/132,01, 7,40/131,80	+	+	-
26	PABA	6,93; 7,80	-	-	+	-	-

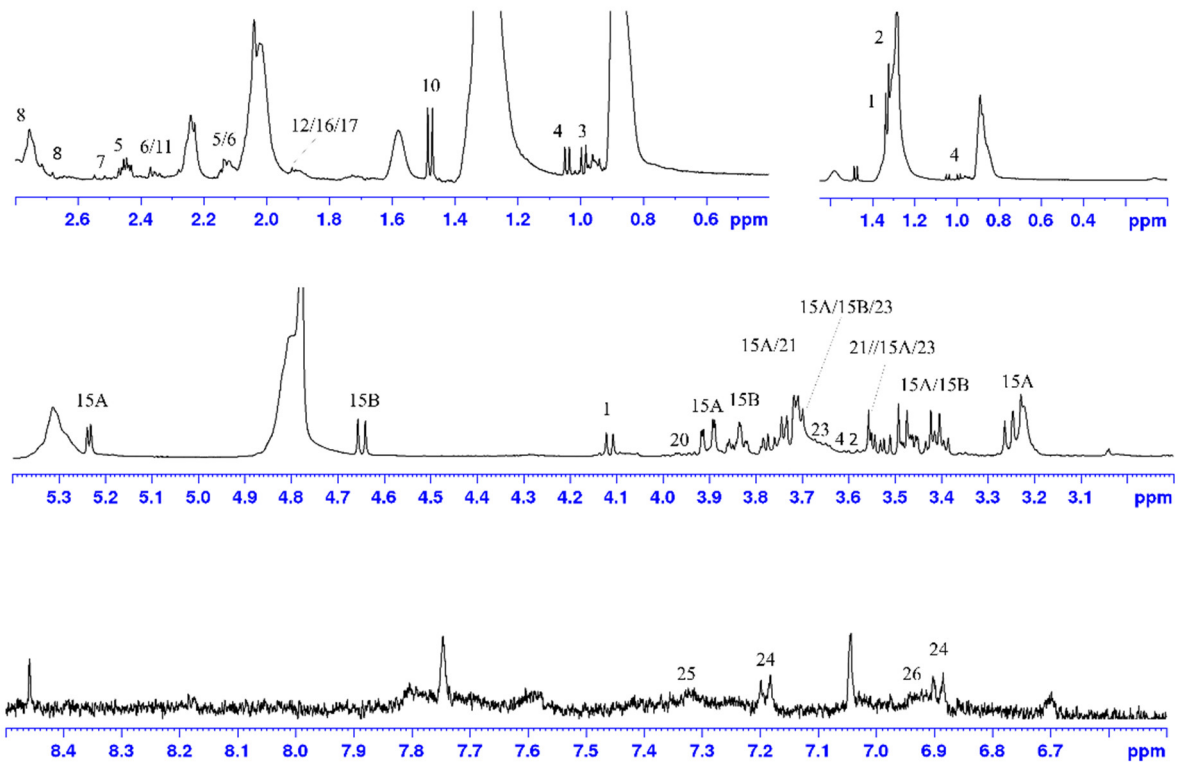
<sup>a,b,c,d</sup> Preklapljeni signali

BMKSZ0002/1

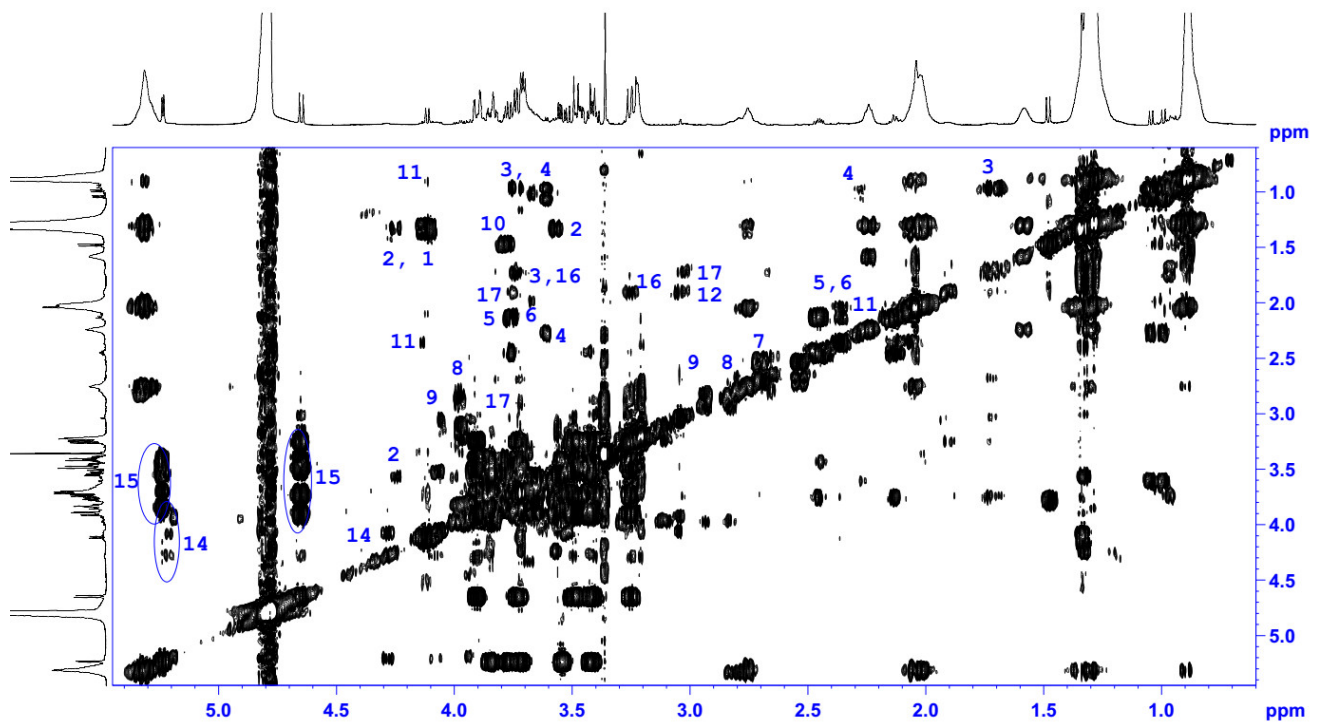


Slika 41. Reprezentativni  $^1\text{H}$  cpmg NMR spektar seruma pacijenata obolelih od shizofrenije, sa obeženim metabolitima.

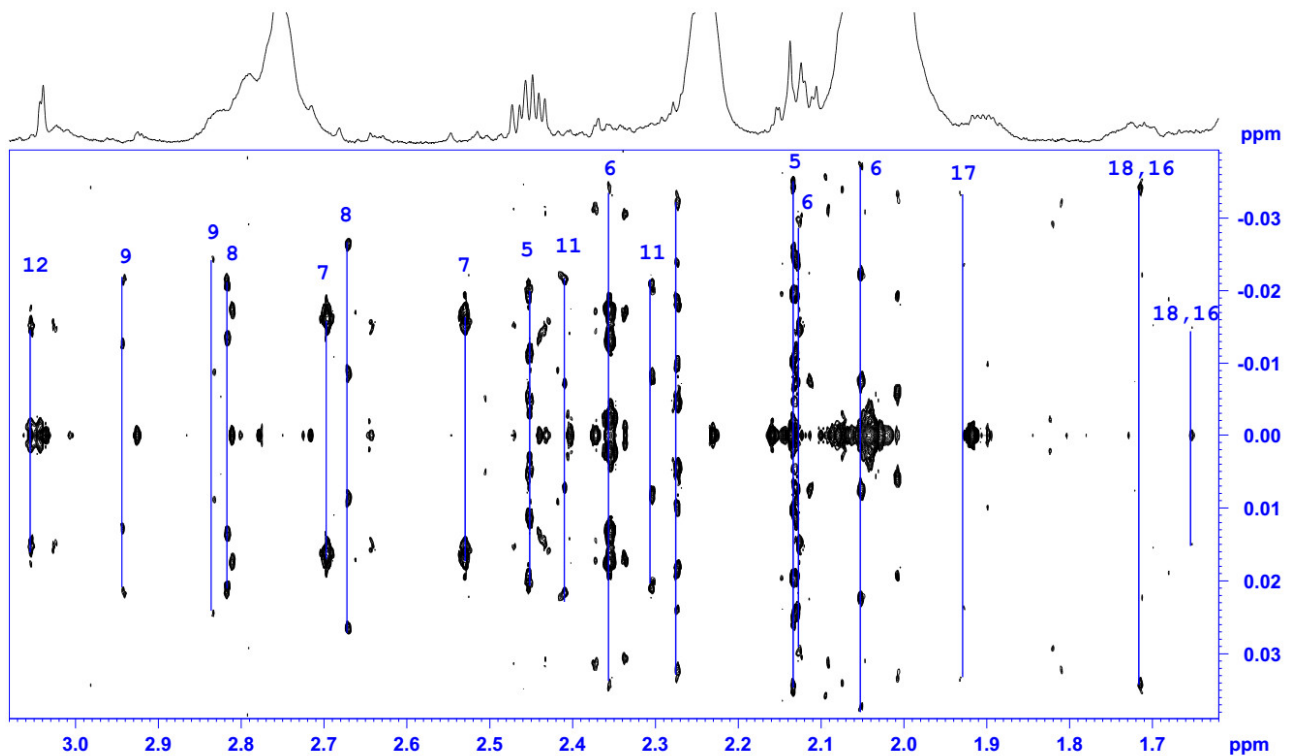
BMKBZ0006/2



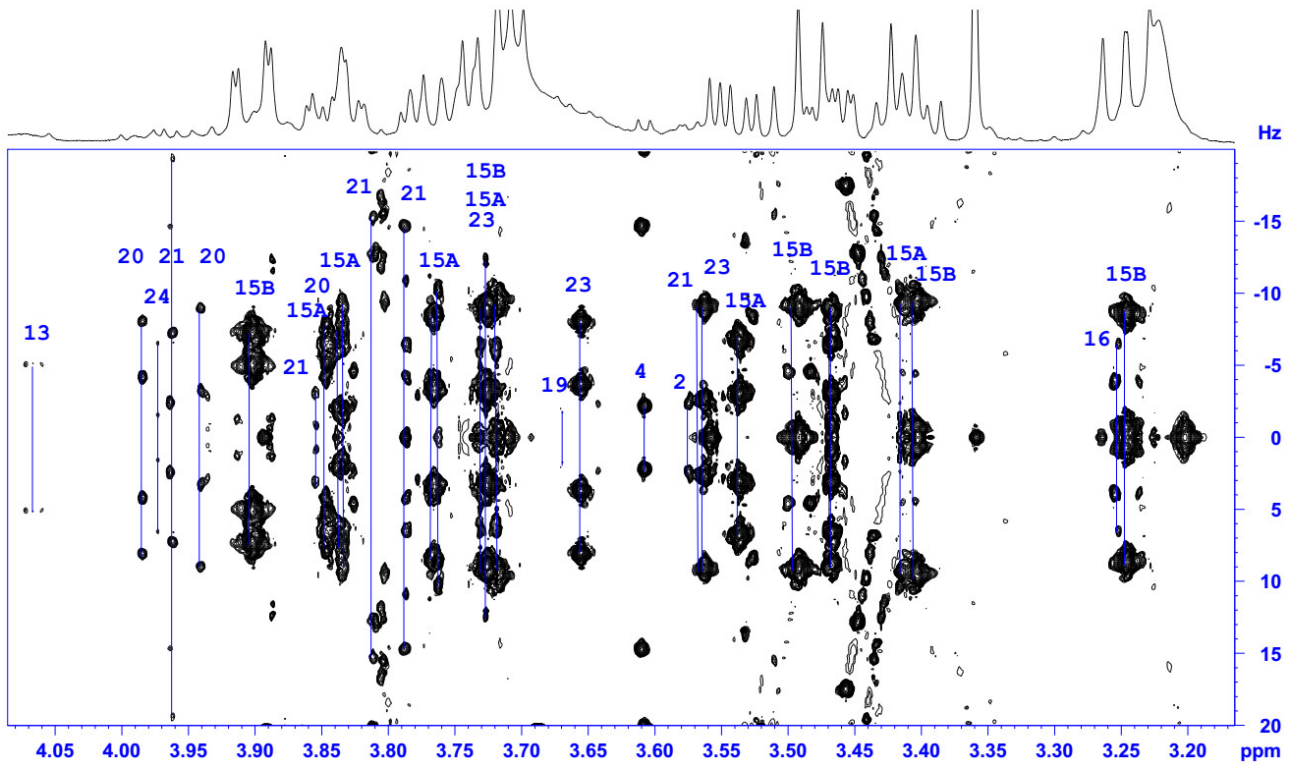
Slika 42. Reprezentativni  $^1\text{H}$  cpmg NMR spektar seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja, sa obeleženim metabolitima.



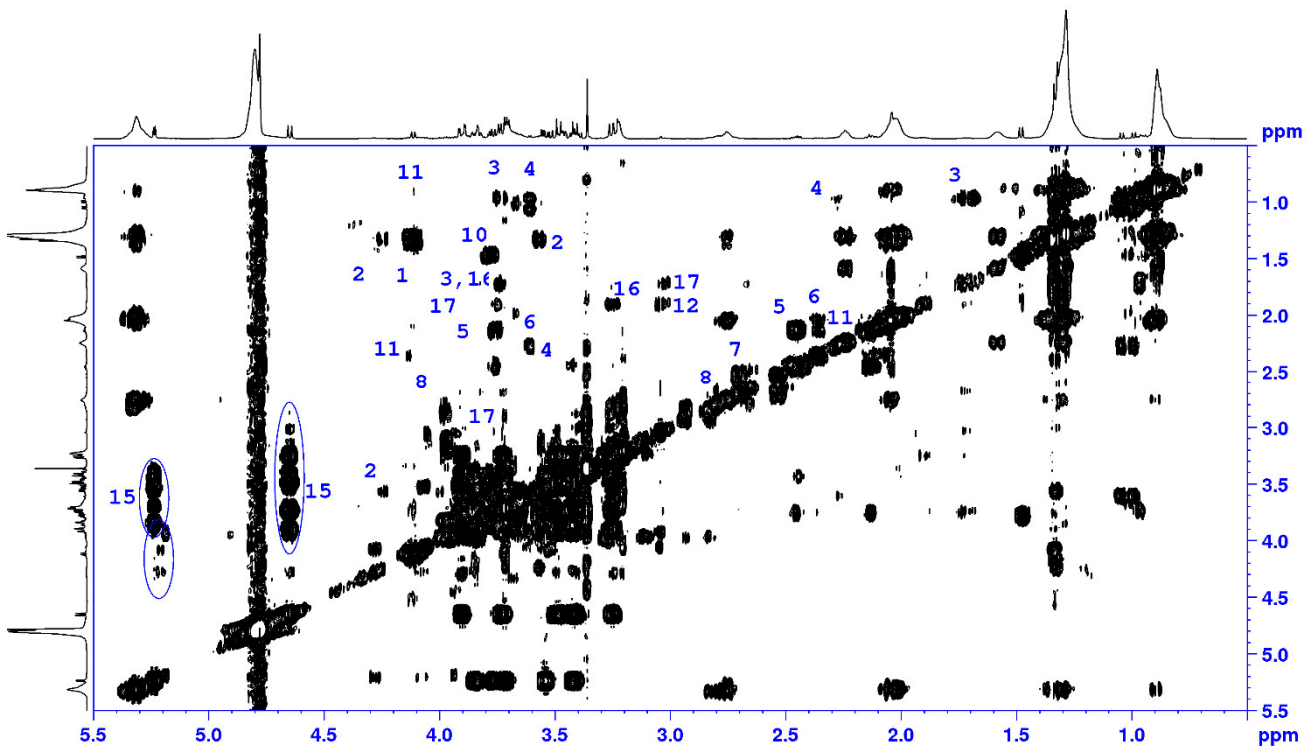
Slika 43. Reprezentativni TOCSY spektar pacijenata obolelih od shizofrenije sa obeleženim metabolitima (0–6 ppm).



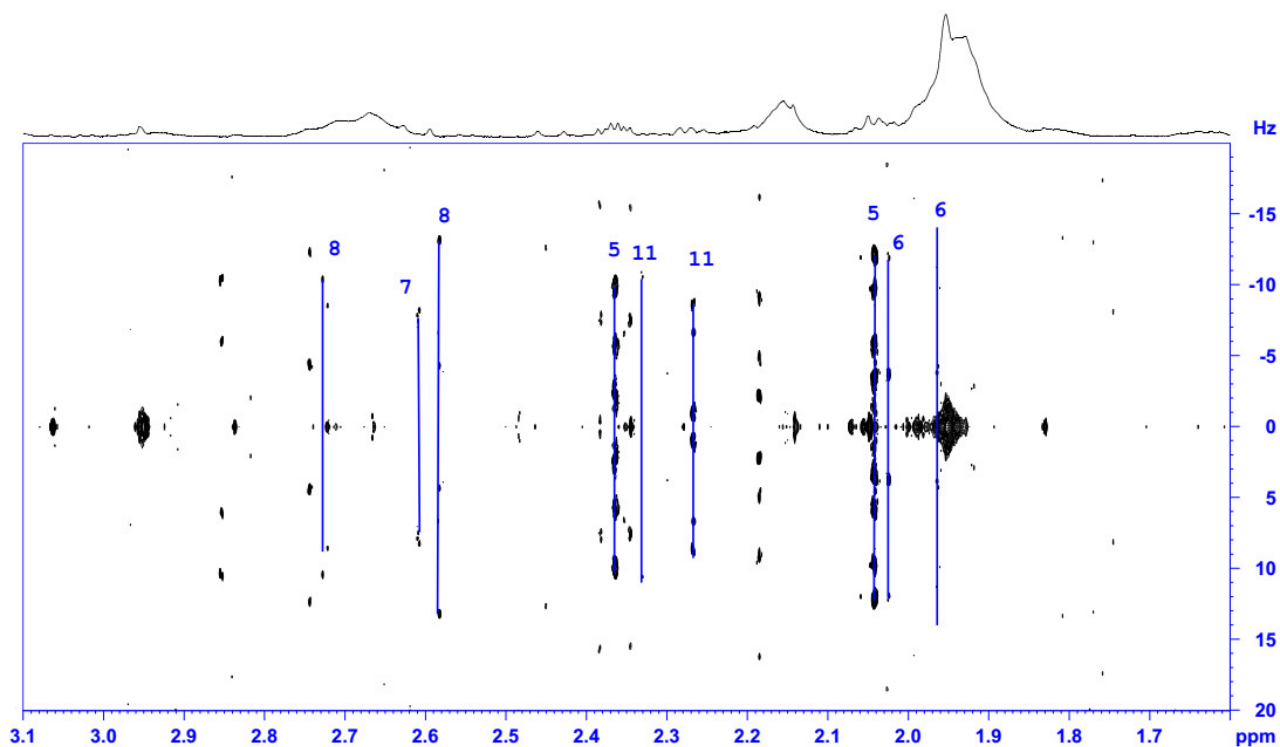
Slika 44. Reprezentativni 2DJ spektar pacijenata obolelih od shizofrenije sa obeleženim metabolitima (0–3,5 ppm).



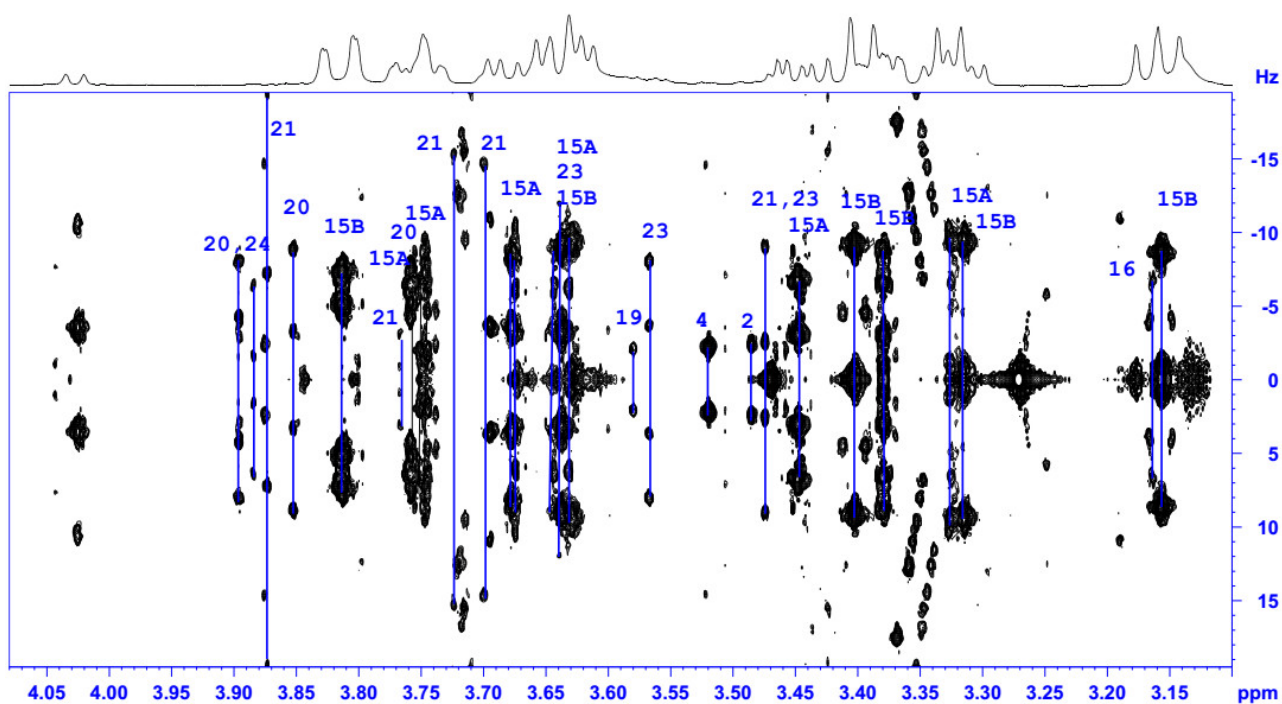
Slika 45. Reprezentativni 2DJ spektar pacijenata obolelih od shizofrenije sa obeleženim metabolitima (3,1–4,1 ppm).



Slika 46. Reprezentativni TOCSY spektra pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja sa obeleženim metabolitima (0–5,5 ppm).



Slika 47. Reprezentativni 2DJ spektar pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja sa obeleženim metabolitima (0–3,1 ppm).



Slika 48. Reprezentativni 2DJ spektar pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja sa obeleženim metabolitima (3,1–4,1 ppm).

### 4.3. Identifikacija biomarkera u serumu obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja GC-MS analizom

Pored NMR spektroskopije, za identifikaciju serumskih biomarkera obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja korišćena je i GC-MS analiza. Analizom dobijenih hromatografskih rezultata, poređenjem masenih spektara i retencionih vremena metabolita od interesa sa podacima u NIST-ovoj bazi podataka i literaturi, potvrđeno je prisustvo 16 biomarkera za shizofreniju i 15 biomarkera za bipolarni poremećaj, prethodno utvrđenih NMR analizom seruma obolelih i zdravih kontrola. U serumu pacijenata obolelih od shizofrenije potvrđeno je prisustvo: laktata, alanina,  $\alpha$ -hidroksibuterne kiseline, valina, serina, leucina, glicerola, izoleucina, glicina, treonina, fenilalanina, glutaminske kiseline, glutamina, limunske kiseline i glukoze. U serumu pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja potvrđeno je prisustvo: laktata, alanina,  $\alpha$ -hidroksibuterne kiseline, valina, serina, leucina, glicerola, izoleucina, treonina, fenilalanina, glutaminske kiseline, glutamina, limunske kiseline i glukoze.

U tabelama 15 i 16 prikazani su identifikovani biomarkeri u serumu obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja sa njihovim hromatografskim podacima (retenciono vreme i retencioni indeks) i masenim spektrima ( $m/z$  vrednosti najintenzivnijih jona).

**Tabela 15.** Biomarkeri identifikovani u serumu pacijenata obolelih od shizofrenije GC-MS analizom

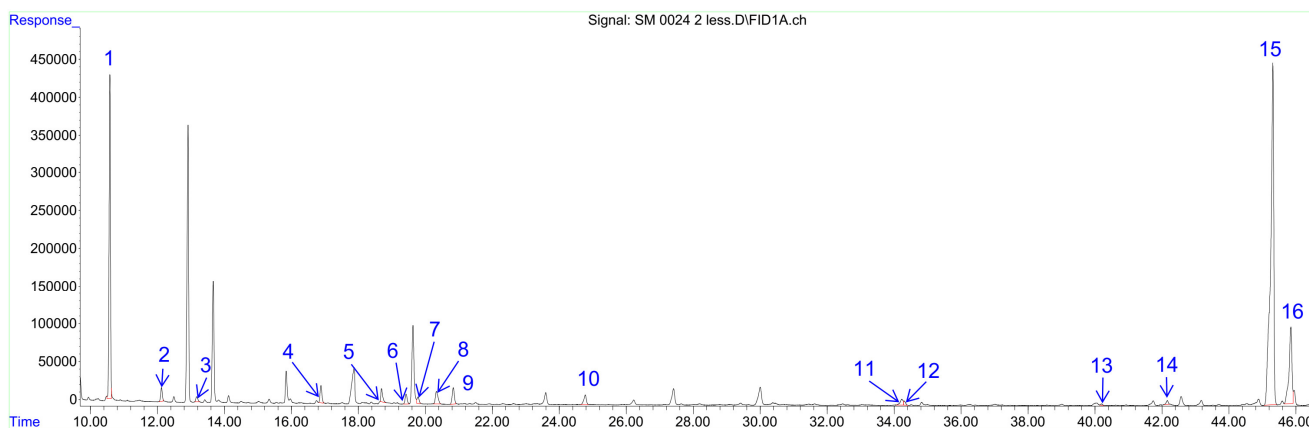
Redni broj	Naziv jedinjenja	Retenciono vreme (min)	Retencioni indeks	$m/z$ vrednosti
1	Laktat/mlečna kiselina	10.580	1073	147, 191
2	Alanin	12.121	1115	116, 218
3	$\alpha$ -Hidroksibuterna kiselina	13.168	1136	131, 147
4	Valin	16.884	1220	144, 218
5	Serin	18.658	1259	116, 132
6	Leucin	19.427	1278	158, 260
7	Glicerol	19.786	1289	147, 205
8	Izoleucin	20.337	1299	158, 218
9	Glicin	20.834	1310	174, 248
10	Treonin	24.774	1400	218, 291
11	Fenilalanin	34.231	1630	192, 218
12	Glutaminska kiselina	34.302	1631	246, 258
13	Glutamin	40.035	1787	156, 245
14	Limunska kiselina	42.162	1847	147, 273
15	<i>Anti</i> glukoza	45.308	1938	205, 319
16	<i>Syn</i> glukoza	45.851	1947	205, 319

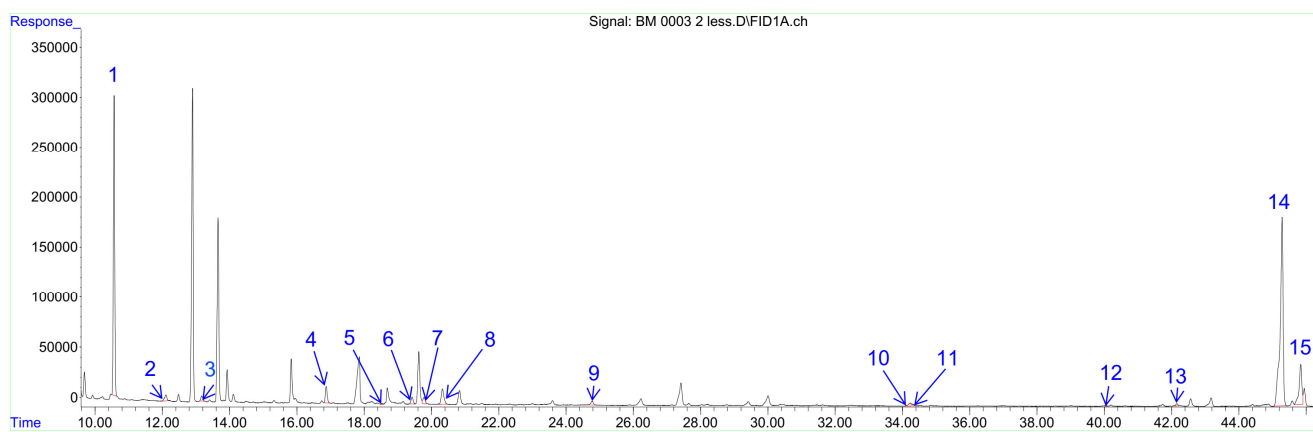


**Tabela 16.** Biomarkeri identifikovani u serumu pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja GC-MS analizom

Redni broj	Naziv jedinjenja	Retenciono vreme (min)	Retencioni indeks	<i>m/z</i> vrednosti
1	Laktat/mlečna kiselina	10.566	1073	147, 191
2	Alanin	12.107	1115	116, 218
3	$\alpha$ -Hidroksibuterna kiselina	13.163	1136	131, 147
4	Valin	16.872	1220	144, 218
5	Serin	18.523	1259	116, 132
6	Leucin	19.423	1278	158, 260
7	Glicerol	19.776	1289	147, 205
8	Izoleucin	20.347	1299	158, 218
9	Treonin	24.777	1400	218, 291
10	Fenilalanin	34.232	1630	192, 218
11	Glutaminska kiselina	34.306	1631	246, 258
12	Glutamin	40.055	1787	156, 245
13	Limunska kiselina	42.155	1847	147, 273
14	<i>Anti</i> glukoza	45.283	1938	205, 319
15	<i>Syn</i> glukoza	45.835	1947	205, 319

Na slikama 49 i 50 prikazani su hromatogrami sa obeleženim biomarkerima za obe grupe pacijenata.

**Slika 49.** Reprezentativni hromatogram seruma pacijenata obolelih od shizofrenije sa obeleženim jedinjenima iz tabele 15.



**Slika 50.** Reprezentativni hromatogram seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja sa obeleženim jedinjenima iz tabele 16.

#### 4.4. Univerzalnost biomarkera za shizofreniju i bipolarni poremećaj

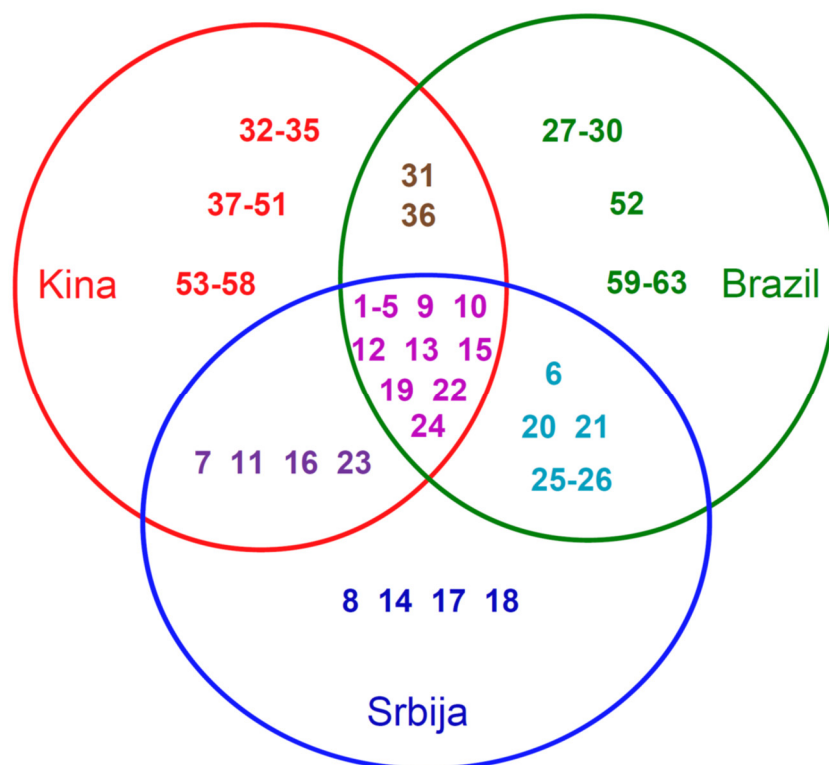
Dosadašnje studije su pokazale da su shizofrenija i bipolarni poremećaji posledica kombinacije genetskih i psiholoških faktora, kao i uticaja okruženja obolelih, ali uzroci nastanka ovih oboljenja još uvek nisu razjašnjeni [30]. Pored potrebe za boljim razumevanjem nastanka ovih bolesti, za pouzdanijom dijagnostikom zasnovanom na biomarkerima u krvi obolelih, savremena medicina takođe ima potrebu za personalizovanim pristupom lečenju koji podrazumeva optimizovan medicinski tretman i pouzdano praćenje delovanja terapije. Da bi se navedeni izazovi prevazišli neophodno je uspostavljanje univerzalnog seta biomarkera za psihijatrijska oboljenja, a za to je neophodno ispitivanje uzoraka pacijenata različitog geografskog i etničkog porekla primenom odgovarajuće sistematične metodologije.

U Tabeli 17 prikazani su potencijalni biomarkeri za shizofreniju dobijeni NMR metabolomičkim ispitivanjem seruma obolelih srpskog, kineskog i brazilskog geografskog porekla. U srpskim uzorcima seruma obolelih od shizofrenije po prvi put su utvrđena četiri nova potencijalna biomarkera: aspartat/asparaginska kiselina, lizin, 2-hidroksibuterana kiselina i acilgliceroli (slika 52). Ostala 22 biomarkera utvrđena u srpskim uzorcima su prisutna u predloženim setovima biomarkera dobijenim analizom kineskih i/ili brazilskih uzoraka. Srpski i brazilski predloženi setovi biomarkera imaju 18 zajedničkih metabolita, srpski i kineski setovi biomarkera se preklapaju u 17 metabolita, a kineski i brazilski setovi biomarkera imaju 15 zajedničkih metabolita. Trinaest biomarkera: laktat/mlečna kiselina, treonin, leucin, izoleucin, valin, glutamin, asparagin, alanin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, holin, glukoza, glicin i tirozin, su zajednički za sva tri seta i mogli bi predstavljati osnovu za univerzalni set serumskih biomarkera ovog oboljenja (slika 51).

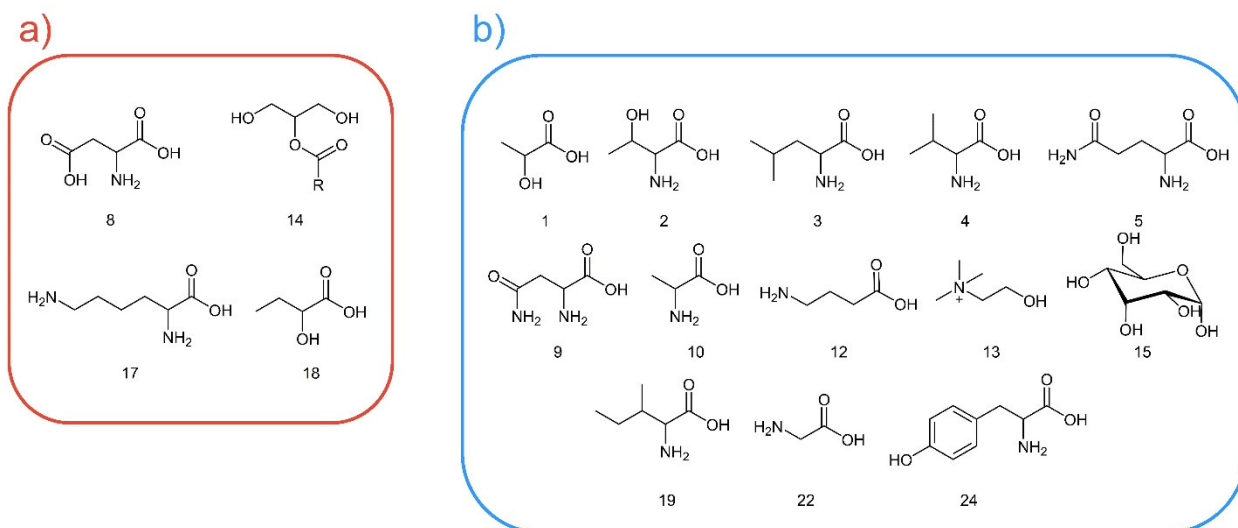
**Tabela 17.** Potencijalni serumski biomarkeri shizofrenije identifikovani NMR analizom u uzorcima pacijenata srpskog, brazilskog i kineskog geografskog porekla.

Redni broj	Metaboliti/Biomarkeri	Geografsko poreklo analiziranih seruma			Reference
		srpsko	brazilsko	kinesko	
1	Laktat/mlečna kiselina	+	+	+	[109–111,240]
2	Treonin	+	+	+	[109,110, 240]
3	Leucin	+	+	+	[110,111, 240]
4	Valin	+	+	+	[109–112, 240]
5	Glutamin	+	+	+	[109–111, 240]
6	Glutamat/glutaminska kiselina	+	+	–	[109, 240]
7	Citrat/limunska kiselina	+	–	+	[110, 240]
8	Aspartat	+	–	–	[243]
9	Asparagin	+	+	+	[109,110,112, 240]
10	Alanin	+	+	+	[109–112, 240]
11	3-Hidroksibuterna kiselina	+	–	+	[110, 240]
12	$\gamma$ -Aminobuterna kiselina	+	+	+	[109,111,112, 240]
13	Holin	+	+	+	[110,111, 240]
14	Acilglicerol	+	–	–	[243]
15	Glukoza ( $\alpha + \beta$ )	+	+	+	[109–111, 240]
16	Arginin	+	–	+	[110, 240]
17	Lizin	+	–	–	[243]
18	2-Hidroksibuterna kiselina	+	–	–	[243]
19	Izoleucin	+	+	+	[109–111, 240]
20	Serin	+	+	–	[109, 240]
21	Manoza	+	+	–	[109, 240]
22	Glicin	+	+	+	[109–111, 240]
23	Glicerol	+	–	+	[110,112, 240]
24	Tirozin	+	+	+	[110,111, 240]
25	Fenilalanin	+	+	–	[109,111, 240]

Redni broj	Metaboliti/Biomarkeri	Geografsko poreklo analiziranih seruma			Reference
		srpsko	brazilsko	kinesko	
26	PABA	+	+	-	[109, 240]
27	Acetilholin	-	+	-	[113]
28	Manitol	-	+	-	[111,113]
29	Amigdalin	-	+	-	[111]
30	Lipoamid	-	+	-	[113]
31	Mioinozitol	-	+	+	[112,113]
32	Prolin	-	-	+	[112]
33	Acetil-glikoprotein	-	-	+	[112]
34	Piruvat	-	-	+	[112,114]
35	Dimetilamin	-	-	+	[112,114]
36	Kreatin	-	+	+	[112,113]
37	Taurin	-	-	+	[112,114][
38	3-Metilhistidin	-	-	+	[112]
39	Hipotaurin	-	-	+	[114]
40	Malonat	-	-	+	[114]
41	Guanidinacetat	-	-	+	[114]
42	Propilen glikol	-	-	+	[114]
43	Treitol	-	-	+	[114]
44	Acetoacetat	-	-	+	[114]
45	Metilmalonska kiselina	-	-	+	[114]
46	Maleinska kiselina	-	-	+	[114]
47	N-Acetilglicin	-	-	+	[114]
48	Dimetilglicin	-	-	+	[114]
49	Betain	-	-	+	[114]
50	Arabitol	-	-	+	[114]
51	Ksilitol	-	-	+	[114]
52	Fosfoholin	-	+	-	[113,114]
53	2-Metilglutarna kiselina	-	-	+	[114]
54	Fruktoza	-	-	+	[114]
55	D-Glukarna kiselina	-	-	+	[114]
56	Galaktinol	-	-	+	[114]
57	Homovanilinska kiselina	-	-	+	[114]
58	Metilamin	-	-	+	[114]
59	6-Hidroksidopamin	-	+	-	[113]
60	2Metilbutil-karnitin	-	+	-	[113]
61	Pantotenska kiselina	-	+	-	[111,113]
62	Guanin	-	+	-	[111]
63	3-Metil-2-oksobuterna kiselina	-	+	-	[111]



**Slika 51.** Serumski biomarkeri shizofrenije identifikovani NMR analizom u uzorcima pacijenata srpskog, brazilskog i kineskog geografskog porekla.



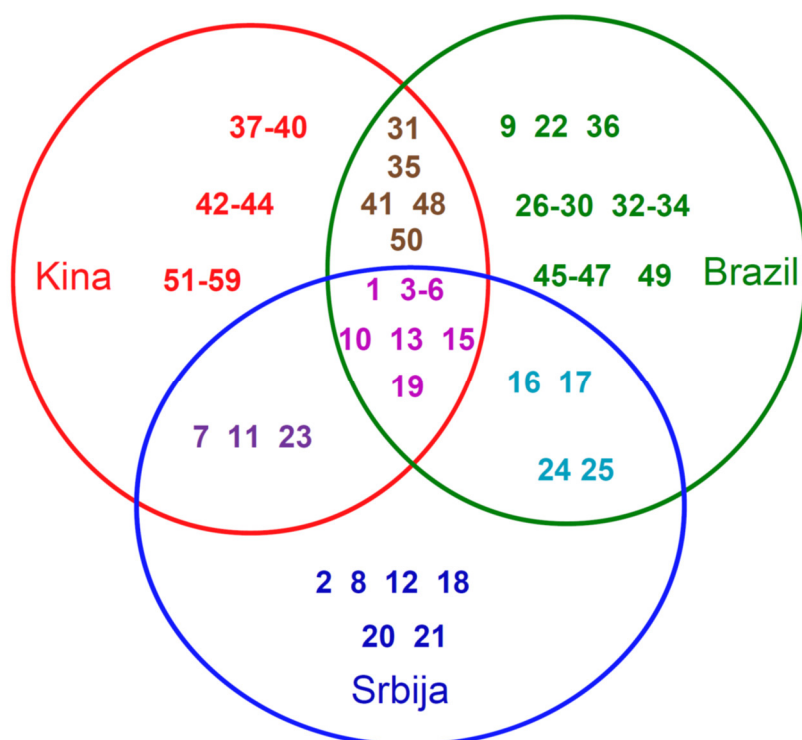
**Slika 52.** a) Strukturne formule biomarkera prvi put identifikovanih u serumu obolelih od shizofrenije: aspartat/asparaginska kiselina (8), acilgliceroli (14), lizin (17), 2-hidroksibuterana kiselina (18). b) Strukturne formule potencijalnog univerzalnog seta biomarkera za shizofreniju: laktat/mlečna kiselina (1), treonin (2), leucin (3), valin (4), glutamin (5), asparagin (9), alanin (10),  $\gamma$ -aminobuterna kiselina (12), holin (13), glukoza (15), izoleucin (19), glicin (22) i tirozin (24).

U Tabeli 18 prikazani su potencijalni biomarkeri utvrđeni NMR metabolomičkim ispitivanjem seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja u Srbiji, Kini i Brazilu. U srpskim uzorcima obolelih od bipolarnog poremećaja je utvrđeno šest novih potencijalnih biomarkera: treonin, aspartat,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, 2-hidroksibuterna kiselina, serin i manoza (slika 54). Poređenjem dobijenih rezultata utvrđeno je da su po tri metabolita zajednička isključivo za srpski i brazilski, odnosno za srpski i kineski set biomarkera, dok kineski i brazilski set biomarkera imaju devet zajedničkih metabolita. Devet biomarkera: laktat, alanin, valin, leucin, izoleucin, glutamin, glutamat, glukoza i holin zajednički su u sva tri seta i mogli bi predstavljati osnovu za univerzalni set serumskih biomarkera za bipolarni poremećaj (slika 53).

**Tabela 18.** Potencijalni serumski biomarkeri bipolarnog poremećaja identifikovani NMR analizom u uzorcima pacijenata srpskog, brazilskog i kineskog geografskog porekla.

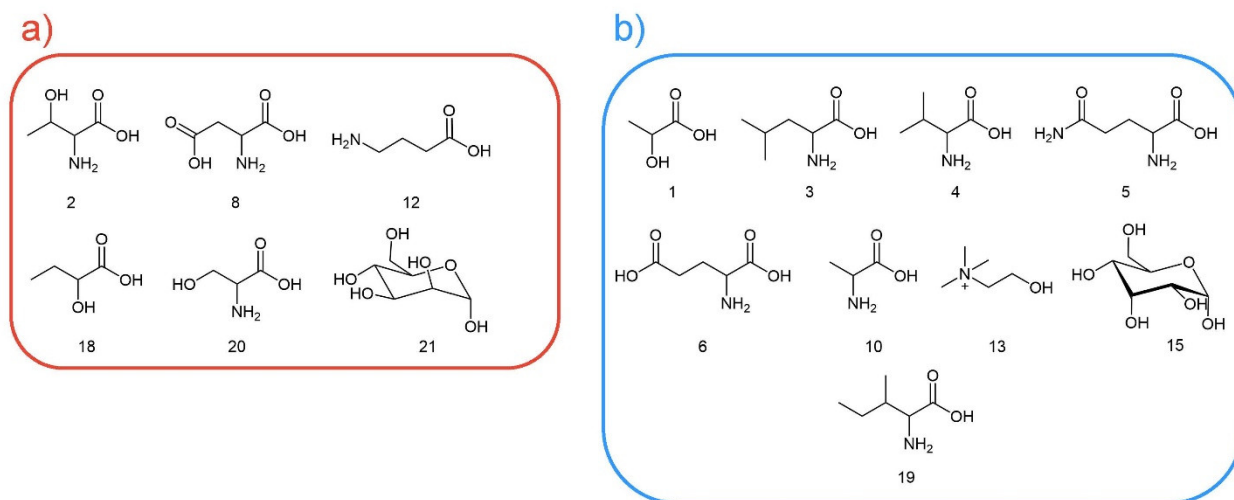
Redni broj	Metaboliti/Biomarkeri	Geografsko poreklo analiziranih seruma			Reference
		srpsko	brazilsko	kinesko	
1	Laktat/mlečna kiselina	+	+	+	[111,120,123,128, 241]
2	Treonin	+	-	-	[244]
3	Leucin	+	+	+	[111,123,128, 241]
4	Valin	+	+	+	[111,120,123,128, 241]
5	Glutamin	+	+	+	[111,120,123,128, 241]
6	Glutamat/glutaminska kiselina	+	+	+	[111,120,123,128, 241]
7	Citrat/limunska kiselina	+	-	+	[128, 241]
8	Aspartat	+	-	-	[244]
9	Asparagin	-	+	-	[120]
10	Alanin	+	+	+	[111,120,123,128, 241]
11	3- Hidroksibuterna kiselina	+	-	+	[128, 241]
12	$\gamma$ -Aminobuterna kiselina	+	-	-	[244]
13	Holin	+	+	+	[120,123,128, 241]
14	Acilgliceroli	-	-	-	-
15	Glukoza ( $\alpha + \beta$ )	+	+	+	[123,128, 241]
16	Arginine	+	+	-	[120, 241]
17	Lizin	+	+	-	[120, 241]
18	2-Hidroksibuterna kiselina	+	-	-	[244]
19	Izoleucin	+	+	+	[111,128, 241]
20	Serin	+	-	-	[244]
21	Manoza	+	-	-	[244]
22	Glicin	-	+	-	[111]
23	Glicerol	+	-	+	[128, 241]
24	Tirozin	+	+	-	[111, 241]
25	Fenilalanin	+	+	-	[111, 241]
26	N-Acetil-aspartat-glutaminska kiselina	-	+	-	[113,125]
27	N-Acetil-fenilalanin	-	+	-	[125]
28	Etanol	-	+	-	[113]
29	$\alpha$ -Ketoglutarna kiselina	-	+	-	[125]
30	Lipoamidi	-	+	-	[122,125]
31	Mioinozitol	-	+	+	[113,122,125,130]
32	Lipidi	-	+	-	[113,122,125]
33	Prolin	-	+	-	[122,125]
34	Glikoproteini	-	+	-	[122]

Redni broj	Metaboliti/Biomarkeri	Geografsko poreklo analiziranih seruma			Reference
		srpsko	brazilsko	kinesko	
35	Acetat	–	+	+	[122,130]
36	$\alpha$ -Ketoizovalerna kiselina	–	+	–	[125]
37	Acetoacetat	–	–	+	[130]
38	Metionin	–	–	+	[130]
39	Gvanidinacetat	–	–	+	[130]
40	Uracil	–	–	+	[130]
41	Histidin	–	+	+	[113,130]
42	Taurin	–	–	+	[130]
43	Betain	–	–	+	[130]
44	Acetone	–	–	+	[130]
45	2,3-Difosfo-D-glicerna kiselina	–	+	–	[113]
46	Monoetil malonat	–	+	–	[113]
47	6-Hidroksidopamin	–	+	–	[113]
48	Acetil-holin	–	+	+	[113,130]
49	Masne kiseline	–	+	–	[113]
50	Kreatin	–	+	+	[113,125,130]
51	N-Acetil glikoproteini	–	–	+	[130]
52	O-Acetil glikoproteini	–	–	+	[130]
53	Vitamin B5	–	–	+	[130]
54	Dimetilglicin	–	–	+	[130]
55	Citrulin	–	–	+	[130]
56	Askorbat	–	–	+	[130]
57	HDL holesterol	–	–	+	[130]
58	Pirogroždana kiselina	–	–	+	[130]
59	Glutation disulfid	–	–	+	[130]



**Slika 53.** Serumski biomarkeri bipolarnog poremećaja identifikovani NMR analizom u uzorcima pacijenata srpskog, brazilskog i kineskog geografskog porekla.

Na slici 54 dat je grafički prikaz nekih od najvažnijih biomarkera.



**Slika 54.** a) Strukturalne formule biomarkera prvi put identifikovanih u serumu oboljelih od bipolarnog poremećaja: treonin (2), aspartat (8),  $\gamma$ -aminobuterna kiselina (12), 2-hidroksibuterna kiselina (18), serin (20) i manozna (21). b) Strukturalne formule potencijalnog univerzalnog seta biomarkera za bipolarni poremećaj: laktat (1), leucin (3), valin (4), glutamin (5), glutamat (6), alanin (10), holin (13), glukoza (15) i izoleucin (19).

Razlike u utvrđenim setovima serumskih biomarkera za shizofreniju i bipolarni poremećaj, dobijeni NMR analizom uzoraka krvi pacijenta iz Srbije, Kine i Brazila, mogu biti uzrokovane različitim geografskim i etničkim poreklom pacijenata i kontrola, a mogu biti i posledica različitih metodoloških strategija. Kako bi se utvrdio univerzalni set serumskih biomarkera ovih oboljenja neophodno je analizirati veći broj uzoraka seruma oboljelih i kontrolnih uzoraka različitog geografskog porekla i etničke pripadnosti primenom iste metodološke strategije u svim koracima metabolomičkog ispitivanja.



## 5. ZAKLJUČAK

Predmet i glavni cilj ove doktorske disertacije je utvrđivanje serumskih biomarkera shizofrenije i bipolarnog poremećaja, metabolomičkom analizom uzoraka krvi pacijenata sa područja Republike Srbije zasnovanom na NMR spektroskopiji i hemometrijskoj analizi. Postupci pripreme uzoraka i instrumentalni eksperimentalni parametri detaljno su opisani u ovom radu, kao i svi parametri obrade podataka prilikom pravljenja odgovarajućih hemometrijskih modela. Hemometrijska analiza je urađena na osnovu podataka dobijenih 1D NOESY NMR spektroskopskom analizom seruma obolelih i zdravih osoba, poređenjem grupa: shizofrenija i kontrola, bipolarni poremećaj i kontrola i shizofrenija i bipolarni poremećaj. Primenom PCA utvrđeni su obrasci između uzoraka, dok su PLS-DA i OPLS-DA analize korišćene za dobijanje klasifikacionih modela koji razlikuju uzorke iz različitih grupa. Identifikacija biomarkera urađena je na osnovu grafika promenljivih od značaja (VIP skor) dobijenih hemometrijskom analizom i spektralnih podataka dobijenih analizom seruma obolelih i zdravih kontrola primenom  $^1\text{H}$  NMR (CPMG pulsna sekvenca) i 2D NMR (TOCSY, 2DJ i HSQC) eksperimenata.

NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije sa područja Republike Srbije utvrđeno je 26 potencijalnih biomarkera: laktat/mlečna kiselina, treonin, leucin, valin, glutamin, glutamat/glutaminska kiselina, citrat/limunska kiselina, aspartat, asparagin, alanin, 3-hidroksibuterna kiselina,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, holin, acilgliceroli, glukoza, arginin, lizin, 2-hidroksibuterna kiselina, izoleucin, serin, manoza, glicin, glicerol, tirozin, fenilalanin, *p*-aminobenzoeva kiselina (PABA). Po prvi put su NMR analizom utvrđena četiri nova serumska biomarkera: aspartat/asparaginska kiselina, lizin, 2-hidroksibuterna kiselina i acilgliceroli. Analizom seruma obolelih od bipolarnog poremećaja sa područja Republike Srbije utvrđena su 22 potencijalna biomarkera: laktat/mlečna kiselina, treonin, leucin, valin, glutamin, glutamat/glutaminska kiselina, citrat/limunska kiselina, aspartat, alanin, 3- hidroksibuterna kiselina,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, holin, glukoza, arginin, lizin, 2-hidroksibuterna kiselina, izoleucin, serin, manoza, glicerol, tirozin, fenilalanin. Po prvi put je utvrđeno šest novih serumskih biomarkera NMR analizom: treonin, aspartat,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, 2-hidroksibuterna kiselina, serin i manoza. NMR analizom seruma obolelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja utvrđeno je pet potencijalnih biomarkera za razlikovanje ovih oboljenja:  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, valin, glicerol, manoza i glukoza.

Šesnaest potencijalnih biomarkera utvrđenih metabolomičkom NMR analizom seruma obolelih pacijenata od shizofrenije: laktat, alanin,  $\alpha$ -hidroksibuterna kiselina, valin, serin, leucin, glicerol, izoleucin, glicin, treonin, fenilalanin, glutaminska kiselina, glutamin, limunska kiselina i glukoza potvrđeno je i GC-MS analizom. GC-MS analizom seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja takođe je potvrđeno petnaest potencijalnih biomarkera: laktat, alanin,  $\alpha$ -hidroksibuterna kiselina, valin, serin, leucin, glicerol, izoleucin, treonin, fenilalanin, glutaminska kiselina, glutamin, limunska kiselina i glukoza.

Potencijalni serumski biomarkeri za shizofreniju i bipolarni poremećaj su prvi put utvrđeni NMR analizom uzoraka krvi obolelih sa područja Republike Srbije. Poređenjem setova biomarkera ovih oboljenja dobijenih analizom srpskih uzoraka, sa utvrđenim setovima potencijalnih biomarkera dobijenih NMR analizom seruma obolelih brazilskog i kineskog geografskog porekla, utvrđeno je preklapanje sa 13 biomarkera za shizofreniju (laktat/mlečna kiselina, treonin, leucin, izoleucin, valin, glutamin, asparagin, alanin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, holin, glukoza, glicin i tirozin) i devet biomarkera za bipolarni poremećaj (laktat, alanin, valin, leucin, izoleucin, glutamin, glutamat, glukoza i holin) koji mogu biti osnova za univerzalne setove biomarkera ovih oboljenja. Kako bi se uspostavili univerzalni setovi serumskih biomarkera za ove mentalne bolesti neophodno je analizirati veći broj uzoraka seruma obolelih i zdravih osoba različitog geografskog porekla i etničke pripadnosti, primenom iste metodološke strategije u svim koracima metabolomičkog ispitivanja.

## 6. LITERATURA

1. Volkan, K. Schizophrenia: Epidemiology, Causes, Neurobiology, Pathophysiology, and Treatment. *J. Heal. Med. Sci.* **2020**, 3, doi:10.31014/aior.1994.03.04.143.
2. Jašović Gašić, M.L.T.D. *Psihijatrija*; Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu: Beograd, 2014.
3. Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange (GHDx) Available online: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/> (accessed on Mar 23, 2023).
4. Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact. Geneva: World Health Organization; 2022 Available online: <https://www.who.int/campaigns/connecting-the-world-to-combat-coronavirus> (accessed on Mar 23, 2023).
5. World Health Organization Available online: <https://www.who.int/> (accessed on Mar 23, 2023).
6. Association, A.P. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; American P.; Washington, DC, 2000; Vol. 4th.
7. Godart, N.T.; Perdereau, F.; Rein, Z.; Berthoz, S.; Wallier, J.; Jeammet, P.; Flament, M.F. Comorbidity studies of eating disorders and mood disorders. Critical review of the literature. *J. Affect. Disord.* **2007**, 97, 37–49, doi:10.1016/j.jad.2006.06.023.
8. *Mental health action plan 2013-2020*; Organization, W.H., Ed.; 2013; ISBN 9789241506021.
9. Bloom, D.E., Cafiero, E.T., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R.; Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettnner, K.; Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z., & Weinstein, C. *The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases*; Forum, W.E., Ed.; Harvard School of Public Health, 2012.
10. Principles for the protection of persons with mental illness and the improvement of mental health care Available online: <https://www.ohchr.org/en/instruments-mechanisms/instruments/principles-protection-persons-mental-illness-and-improvement> (accessed on Mar 25, 2023).
11. Richards, D. Prevalence and clinical course of depression: A review. *Clin. Psychol. Rev.* **2011**, 31, 1117–1125, doi:10.1016/j.cpr.2011.07.004.
12. *Program o zaštiti mentalnog zdravlja u Republici Srbiji za period 2019-2026*; Službeni glasnik RS, broj 30/18, 2019.
13. Gustavsson, A.; Svensson, M.; Jacobi, F.; Allgulander, C.; Alonso, J.; Beghi, E.; Dodel, R.; Ekman, M.; Faravelli, C.; Fratiglioni, L.; et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2011**, 21, 718–779, doi:10.1016/j.euroneuro.2011.08.008.
14. *Policies and practices for mental health in Europe - meeting the challenges*; Organization, W.H., Ed.; WHO Regional Office for Europe, 2008; ISBN 978 92 890 4279 6.
15. *Mental health and development: targeting people with mental health conditions as a vulnerable group*; Organization, W.H., Ed.; 2010; ISBN 9789241563949.
16. Whiteford, H.A.; Degenhardt, L.; Rehm, J.; Baxter, A.J.; Ferrari, A.J.; Erskine, H.E.; Charlson, F.J.; Norman, R.E.; Flaxman, A.D.; Johns, N.; et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)* **2013**, 382, 1575–1586, doi:10.1016/S0140-6736(13)61611-6.

17. Trautmann, S.; Rehm, J.; Wittchen, H.-U. The economic costs of mental disorders. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1245–1249, doi:https://doi.org/10.15252/embr.201642951.
18. Hu, T. Perspectives: an international review of the national cost estimates of mental illness, 1990-2003. *J. Ment. Health Policy Econ.* **2006**, *9*, 3–13.
19. *Zakon o sprečavanju diskriminacije osoba sa invaliditetom*; Službeni glasnik RS, broj 33/2006; Vol. 2006.
20. *Strategija javnog zdravlja u Republici Srbiji, 2018-2026*; Službeni glasnik RS, broj 61/2018, 2018.
21. *Zakon o socijalnoj zaštiti*; Službeni glasnik RS, broj 24/2011, 2011.
22. *Zakon o javnom zdravlju*; Službeni glasnik RS, broj 72/2009, 2009.
23. Cummings, J. L., & Mega, M.S. *Neuropsychiatry and behavioral neuroscience*; Oxford University Press., 2003.
24. David, A.S.; Fleminger, S.; Kopelman, M.D.; Lovestone, S.; Mellers, J.D.C. *Organic Psychiatry: the Psychological Consequences of Cerebral Disorders*; 4th ed.; Blackwell Publishing, Oxford, 2003.
25. Sarkhel, S. Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry, 10(th) edition. *Indian J. Psychiatry* 2009, *51*, 331.
26. Sadock, B.J.; Sadock, V.A.; Ruiz, P.; Kaplan, H.I. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry*; 9th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia: Philadelphia SE - 2 volumes (lix, 4520, I-138 pages) : illustrations (some color), map ; 29 cm, 2009; ISBN 9780781768993; 0781768993.
27. Kalačanin P, L.-T.D. *Depresija*; Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1995.
28. Mueser, K.T.; McGurk, S.R. Schizophrenia. *Lancet (London, England)* **2004**, *363*, 2063–2072, doi:10.1016/S0140-6736(04)16458-1.
29. Costa, A.C.; Riça, L.B.; van de Bilt, M.; Zandonadi, F.S.; Gattaz, W.F.; Talib, L.L.; Sussulini, A. Application of Lipidomics in Psychiatry: Plasma-Based Potential Biomarkers in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Metabolites* **2023**, *13*, doi:10.3390/metabo13050600.
30. Thakore, J.H. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. *Br. J. Psychiatry. Suppl.* **2004**, *47*, S76-9, doi:10.1192/bjp.184.47.s76.
31. Jablensky, A. The 100-year epidemiology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* **1997**, *28*, 111–125, doi:10.1016/s0920-9964(97)85354-6.
32. Almeida, O.P.; Howard, R.J.; Levy, R.; David, A.S. Psychotic states arising in late life (late paraphrenia) psychopathology and nosology. *Br. J. Psychiatry* **1995**, *166*, 205–214, doi:10.1192/bjp.166.2.205.
33. McGrath, J.; Saha, S.; Chant, D.; Welham, J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol. Rev.* **2008**, *30*, 67–76, doi:10.1093/epirev/mxn001.
34. Kim, H.-S.; Choi, D.-Y.; Yun, S.J.; Choi, S.-M.; Kang, J.W.; Jung, J.W.; Hwang, D.; Kim, K.P.; Kim, D.-W. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 839–849, doi:10.1021/pr200682z.
35. Thomas, H. V; Dalman, C.; David, A.S.; Gentz, J.; Lewis, G.; Allebeck, P. Obstetric complications and risk of schizophrenia. Effect of gender, age at diagnosis and maternal

- history of psychosis. *Br. J. Psychiatry* **2001**, *179*, 409–414, doi:10.1192/bjp.179.5.409.
36. Peen, J.; Dekker, J. Admission rates for schizophrenia in The Netherlands: an urban/rural comparison. *Acta Psychiatr. Scand.* **1997**, *96*, 301–305, doi:10.1111/j.1600-0447.1997.tb10167.x.
37. Bleuler, E. *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*; International Universities Press, 1950.
38. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*; World Health Organization, Geneva, 1992; ISBN 92 4 154422 8.
39. Fenton, W.S.; McGlashan, T.H. Natural history of schizophrenia subtypes. II. Positive and negative symptoms and long-term course. *Arch. Gen. Psychiatry* **1991**, *48*, 978–986, doi:10.1001/archpsyc.1991.01810350018003.
40. Green, M.F.; Kern, R.S.; Braff, D.L.; Mintz, J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the “right stuff”? *Schizophr. Bull.* **2000**, *26*, 119–136, doi:10.1093/oxfordjournals.schbul.a033430.
41. Sayers, S.L.; Curran, P.J.; Mueser, K.T. Factor structure and construct validity of the Scale for the Assessment of Negative Symptoms. *Psychol. Assess.* **1996**, *8*, 269–280, doi:10.1037/1040-3590.8.3.269.
42. Weisman, A.G.; Nuechterlein, K.H.; Goldstein, M.J.; Snyder, K.S. Expressed emotion, attributions, and schizophrenia symptom dimensions. *J. Abnorm. Psychol.* **1998**, *107*, 355–359, doi:10.1037//0021-843x.107.2.355.
43. Kadakia, A.; Catillon, M.; Fan, Q.; Williams, G.R.; Marden, J.R.; Anderson, A.; Kirson, N.; Dembek, C. The Economic Burden of Schizophrenia in the United States. *J. Clin. Psychiatry* **2022**, *83*, doi:10.4088/JCP.22m14458.
44. Thaker, G.K.; Carpenter, W.T.J. Advances in schizophrenia. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 667–671, doi:10.1038/89040.
45. Chaiyakunapruk, N.; Chong, H.Y.; Teoh, S.L.; Wu, D.B.-C.; Kotirum, S.; Chiou, C.-F. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2016**, *357*, doi:10.2147/NDT.S96649.
46. Cloutier, M.; Aigbogun, M.S.; Guerin, A.; Nitulescu, R.; Ramanakumar, A. V; Kamat, S.A.; DeLucia, M.; Duffy, R.; Legacy, S.N.; Henderson, C.; et al. The Economic Burden of Schizophrenia in the United States in 2013. *J. Clin. Psychiatry* **2016**, *77*, 764–771, doi:10.4088/JCP.15m10278.
47. Brian Miller The Economic Burden of Schizophreni Available online: <https://www.psychiatrytimes.com/view/the-economic-burden-of-schizophrenia> (accessed on Mar 29, 2023).
48. Grande, I.; Berk, M.; Birmaher, B.; Vieta, E. Bipolar disorder. *Lancet (London, England)* **2016**, *387*, 1561–1572, doi:10.1016/S0140-6736(15)00241-X.
49. Alonso, J.; Petukhova, M.; Vilagut, G.; Chatterji, S.; Heeringa, S.; Üstün, T.B.; Alhamzawi, A.O.; Viana, M.C.; Angermeyer, M.; Bromet, E.; et al. Days out of role due to common physical and mental conditions: results from the WHO World Mental Health surveys. *Mol. Psychiatry* **2011**, *16*, 1234–1246, doi:10.1038/mp.2010.101.
50. Phillips, M.L.; Kupfer, D.J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions.

- Lancet (London, England)* **2013**, 381, 1663–1671, doi:10.1016/S0140-6736(13)60989-7.
51. Marohn, S. *The Natural Medicine Guide to Bipolar Disorder: New Revised Edition*; Hampton Roads Publishing, 2011; ISBN 9781612830360.
  52. Nierenberg, A.A.; Kansky, C.; Brennan, B.P.; Shelton, R.C.; Perlis, R.; Iosifescu, D. V Mitochondrial modulators for bipolar disorder: a pathophysiologically informed paradigm for new drug development. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **2013**, 47, 26–42, doi:10.1177/00048674124449303.
  53. Merikangas, K.R.; Jin, R.; He, J.-P.; Kessler, R.C.; Lee, S.; Sampson, N.A.; Viana, M.C.; Andrade, L.H.; Hu, C.; Karam, E.G.; et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, 68, 241–251, doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.12.
  54. Nivoli, A.M.A.; Pacchiarotti, I.; Rosa, A.R.; Popovic, D.; Murru, A.; Valenti, M.; Bonnin, C.M.; Grande, I.; Sanchez-Moreno, J.; Vieta, E.; et al. Gender differences in a cohort study of 604 bipolar patients: the role of predominant polarity. *J. Affect. Disord.* **2011**, 133, 443–449, doi:10.1016/j.jad.2011.04.055.
  55. Angst, J.; Gamma, A.; Benazzi, F.; Ajdacic, V.; Eich, D.; Rössler, W. Toward a re-definition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar-II, minor bipolar disorders and hypomania. *J. Affect. Disord.* **2003**, 73, 133–146, doi:10.1016/s0165-0327(02)00322-1.
  56. Valenti, M.; Pacchiarotti, I.; Undurraga, J.; Bonnin, C.M.; Popovic, D.; Goikolea, J.M.; Torrent, C.; Hidalgo-Mazzei, D.; Colom, F.; Vieta, E. Risk factors for rapid cycling in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* **2015**, 17, 549–559, doi:10.1111/bdi.12288.
  57. Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression, Second Edition. *Am. J. Psychiatry* **2008**, 165, 541–542, doi:10.1176/appi.ajp.2007.07121846.
  58. Innentitel. In *Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie*; Leonhard, K., Ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2003.
  59. Angst, J.; Perris, C. Zur Nosologie endogener Depressionen. *Arch. für Psychiatr. und Nervenkrankheiten Ver. mit Zeitschrift für die Gesamte Neurol. und Psychiatr.* **1968**, 210, 373–386, doi:10.1007/BF00342013.
  60. Perris, C. A study of bipolar (manic-depressive) and unipolar recurrent depressive psychoses. Introduction. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **1966**, 194, 9–14.
  61. Coll, P.G.; Bland, R. Manic Depressive Illness in Adolescence and Childhood: Review and Case Report. *Can. J. Psychiatry* **1979**, 24, 255–263, doi:10.1177/070674377902400311.
  62. Tondo, L.; Lepri, B.; Cruz, N.; Baldessarini, R.J. Age at onset in 3014 Sardinian bipolar and major depressive disorder patients. *Acta Psychiatr. Scand.* **2010**, 121, 446–452, doi:10.1111/j.1600-0447.2009.01523.x.
  63. Forty, L.; Smith, D.; Jones, L.; Jones, I.; Caesar, S.; Cooper, C.; Fraser, C.; Gordon-Smith, K.; Hyde, S.; Farmer, A.; et al. Clinical differences between bipolar and unipolar depression. *Br. J. Psychiatry* **2008**, 192, 388–389, doi:10.1192/bjp.bp.107.045294.
  64. Akiskal, H.S.; Bourgeois, M.L.; Angst, J.; Post, R.; Möller, H.; Hirschfeld, R. Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. *J. Affect. Disord.* **2000**, 59 Suppl 1, S5–S30, doi:10.1016/s0165-0327(00)00203-2.

65. Schaffer, A.; Cairney, J.; Veldhuizen, S.; Kurdyak, P.; Cheung, A.; Levitt, A. A population-based analysis of distinguishers of bipolar disorder from major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* **2010**, *125*, 103–110, doi:10.1016/j.jad.2010.02.118.
66. Munk-Olsen, T.; Jones, I.; Laursen, T.M. Birth order and postpartum psychiatric disorders. *Bipolar Disord.* **2014**, *16*, 300–307, doi:10.1111/bdi.12145.
67. Perlis, R.H.; Brown, E.; Baker, R.W.; Nierenberg, A.A. Clinical features of bipolar depression versus major depressive disorder in large multicenter trials. *Am. J. Psychiatry* **2006**, *163*, 225–231, doi:10.1176/appi.ajp.163.2.225.
68. Gonda, X.; Pompili, M.; Serafini, G.; Montebovi, F.; Campi, S.; Dome, P.; Duleba, T.; Girardi, P.; Rihmer, Z. Suicidal behavior in bipolar disorder: epidemiology, characteristics and major risk factors. *J. Affect. Disord.* **2012**, *143*, 16–26, doi:10.1016/j.jad.2012.04.041.
69. Tondo, L.; Isacson, G.; Baldessarini, R. Suicidal behaviour in bipolar disorder: risk and prevention. *CNS Drugs* **2003**, *17*, 491–511, doi:10.2165/00023210-200317070-00003.
70. Pompili, M.; Gonda, X.; Serafini, G.; Innamorati, M.; Sher, L.; Amore, M.; Rihmer, Z.; Girardi, P. Epidemiology of suicide in bipolar disorders: a systematic review of the literature. *Bipolar Disord.* **2013**, *15*, 457–490, doi:10.1111/bdi.12087.
71. Schaffer, A.; Isometsä, E.T.; Tondo, L.; H Moreno, D.; Turecki, G.; Reis, C.; Cassidy, F.; Sinyor, M.; Azorin, J.-M.; Kessing, L.V.; et al. International Society for Bipolar Disorders Task Force on Suicide: meta-analyses and meta-regression of correlates of suicide attempts and suicide deaths in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* **2015**, *17*, 1–16, doi:10.1111/bdi.12271.
72. Gardner, H.H.; Kleinman, N.L.; Brook, R.A.; Rajagopalan, K.; Brizee, T.J.; Smeeding, J.E. The economic impact of bipolar disorder in an employed population from an employer perspective. *J. Clin. Psychiatry* **2006**, *67*, 1209–1218, doi:10.4088/jcp.v67n0806.
73. Bessonova, L.; Ogden, K.; Doane, M.J.; O'Sullivan, A.K.; Tohen, M. The Economic Burden of Bipolar Disorder in the United States: A Systematic Literature Review. *Clinicoecon. Outcomes Res.* **2020**, *12*, 481–497, doi:10.2147/CEOR.S259338.
74. Cloutier, M.; Greene, M.; Guerin, A.; Touya, M.; Wu, E. The economic burden of bipolar I disorder in the United States in 2015. *J. Affect. Disord.* **2018**, *226*, 45–51, doi:10.1016/j.jad.2017.09.011.
75. Centorrino, F.; Mark, T.L.; Talamo, A.; Oh, K.; Chang, J. Health and economic burden of metabolic comorbidity among individuals with bipolar disorder. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2009**, *29*, 595–600, doi:10.1097/JCP.0b013e3181bef8a6.
76. Müller-Oerlinghausen, B.; Berghöfer, A.; Bauer, M. Bipolar disorder. *Lancet (London, England)* **2002**, *359*, 241–247, doi:10.1016/S0140-6736(02)07450-0.
77. Brietzke, E.; Rosa, A.R.; Pedrini, M.; Noto, M.N.; Kapczynski, F.; Scott, J. Challenges and developments in research of the early stages of bipolar disorder. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **2016**, *38*, 329–337, doi:10.1590/1516-4446-2016-1975.
78. Dumas, M.-E.; Maibaum, E.C.; Teague, C.; Ueshima, H.; Zhou, B.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Stamler, J.; Elliott, P.; Chan, Q.; et al. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2199–2208, doi:10.1021/ac0517085.
79. Nicholson, J.K.; Wilson, I.D. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1989**, *21*, 449–501, doi:10.1016/0079-

- 6565(89)80008-1.
80. Nicholson, J.K.; O'Flynn, M.P.; Sadler, P.J.; Macleod, A.F.; Juul, S.M.; Sönksen, P.H. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem. J.* **1984**, *217*, 365–375, doi:10.1042/bj2170365.
  81. Beckonert, O.; Keun, H.C.; Ebbels, T.M.D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2692–2703, doi:10.1038/nprot.2007.376.
  82. Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Holmes, E.; Everett, J.R. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn. Reson.* **2000**, *12*, 289–320, doi:10.1002/1099-0534(2000)12:5<289::AID-CMR3>3.0.CO;2-W.
  83. Lutz, N.W.; Cozzone, P.J. Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 1016–1025, doi:10.2174/138920111795909122.
  84. Sinclair, A.J.; Viant, M.R.; Ball, A.K.; Burdon, M.A.; Walker, E.A.; Stewart, P.M.; Rauz, S.; Young, S.P. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases--a diagnostic tool? *NMR Biomed.* **2010**, *23*, 123–132, doi:10.1002/nbm.1428.
  85. Ranjan, R.; Sinha, N. Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics for cancer research. *NMR Biomed.* **2019**, *32*, e3916, doi:10.1002/nbm.3916.
  86. Pontes, J.G.M.; Brasil, A.J.M.; Cruz, G.C.F.; de Souza, R.N.; Tasic, L. NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1078–1096, doi:10.1039/C6AY03102A.
  87. Wevers, R.; Engelke, U.; Moolenaar, S. Proton NMR Spectroscopy of Body Fluids. In *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; pp. 77–85.
  88. Scalbert, A.; Brennan, L.; Fiehn, O.; Hankemeier, T.; Kristal, B.S.; van Ommen, B.; Pujos-Guillot, E.; Verheij, E.; Wishart, D.; Wopereis, S. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* **2009**, *5*, 435–458, doi:10.1007/s11306-009-0168-0.
  89. Teahan, O.; Gamble, S.; Holmes, E.; Waxman, J.; Nicholson, J.K.; Bevan, C.; Keun, H.C. Impact of Analytical Bias in Metabonomic Studies of Human Blood Serum and Plasma. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4307–4318, doi:10.1021/ac051972y.
  90. Nagana Gowda, G.A.; Raftery, D. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5433–5440, doi:10.1021/ac5005103.
  91. Nagana Gowda, G.A.; Gowda, Y.N.; Raftery, D. Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 706–715, doi:10.1021/ac503651e.
  92. Zhao, S.; Dawe, M.; Guo, K.; Li, L. Development of High-Performance Chemical Isotope Labeling LC–MS for Profiling the Carbonyl Submetabolome. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6758–6765, doi:10.1021/acs.analchem.7b01098.
  93. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenár, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665,

- doi:10.1007/BF02192855.
94. McKay, R.T. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts Magn. Reson. Part A* **2011**, *38A*, 197–220, doi:10.1002/cmr.a.20223.
  95. Stonehouse, J.; Shaw, G.L.; Keeler, J. Improving solvent suppression in jump-return NOESY experiments. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 799–805, doi:10.1007/BF00398410.
  96. Meiboom, S.; Gill, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688–691, doi:10.1063/1.1716296.
  97. Carr, H.Y.; Purcell, E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630–638, doi:10.1103/PhysRev.94.630.
  98. de Graaf, R.A.; Prinsen, H.; Giannini, C.; Caprio, S.; Herzog, R.I. Quantification of (1)H NMR Spectra from Human Plasma. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1702–1707, doi:10.1007/s11306-015-0828-1.
  99. Aue, W.P.; Bartholdi, E.; Ernst, R.R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246, doi:10.1063/1.432450.
  100. Braunschweiler, L.; Ernst, R.R. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528, doi:https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90226-3.
  101. Venigalla, H.; Mekala, H.M.; Hassan, M.; Ahmed, R.; Zain, H. An Update on Biomarkers in Psychiatric Disorders-Are we aware , Do we use in our clinical practice ?; 2017.
  102. Fiehn, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171.
  103. Messerli, G.; Partovi Nia, V.; Trevisan, M.; Kolbe, A.; Schauer, N.; Geigenberger, P.; Chen, J.; Davison, A.C.; Fernie, A.R.; Zeeman, S.C. Rapid Classification of Phenotypic Mutants of Arabidopsis via Metabolite Fingerprinting. *Plant Physiol.* **2007**, *143*, 1484–1492, doi:10.1104/pp.106.090795.
  104. Boulton, A.A.; Pollitt, R.J.; Majer, J.R. Identity of a Urinary “Pink Spot” in Schizophrenia and Parkinson’s Disease. *Nature* **1967**, *215*, 132–134, doi:10.1038/215132a0.
  105. Lindon, J.C.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. So what’s the deal with metabonomics? *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 384A-391A, doi:10.1021/ac031386+.
  106. Lista, S.; Giegling, I.; Rujescu, D. Schizophrenia: Blood-Serum-Plasma Metabolomics. In; 2014; pp. 27–44.
  107. Yeung, P.K. Metabolomics and Biomarkers for Drug Discovery. *Metabolites* 2018, *8*.
  108. Yang, J.; Chen, T.; Sun, L.; Zhao, Z.; Qi, X.; Zhou, K.; Cao, Y.; Wang, X.; Qiu, Y.; Su, M.; et al. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **2013**, *18*, 67–78, doi:10.1038/mp.2011.131.
  109. Xuan, J.; Pan, G.; Qiu, Y.; Yang, L.; Su, M.; Liu, Y.; Chen, J.; Feng, G.; Fang, Y.; Jia, W.; et al. Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 5433–5443, doi:10.1021/pr2006796.
  110. Holmes, E.; Tsang, T.M.; Huang, J.T.-J.; Leweke, F.M.; Koethe, D.; Gerth, C.W.; Nolden, B.M.; Gross, S.; Schreiber, D.; Nicholson, J.K.; et al. Metabolic Profiling of CSF: Evidence



- That Early Intervention May Impact on Disease Progression and Outcome in Schizophrenia. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e327, doi:10.1371/journal.pmed.0030327.
111. Tasic, L.; Pontes, J.G.M.; Carvalho, M.S.; Cruz, G.; Dal Mas, C.; Sethi, S.; Pedrini, M.; Rizzo, L.B.; Zeni-Graiff, M.; Asevedo, E.; et al. Metabolomics and lipidomics analyses by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance of schizophrenia patient serum reveal potential peripheral biomarkers for diagnosis. *Schizophr. Res.* **2017**, *185*, 182–189, doi:10.1016/j.schres.2016.12.024.
  112. Liu, L.; Zhao, J.; Chen, Y.; Feng, R. Metabolomics strategy assisted by transcriptomics analysis to identify biomarkers associated with schizophrenia. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1140*, 18–29, doi:10.1016/j.aca.2020.09.054.
  113. Tasic, L.; Larcercda, A.L.T.; Pontes, J.G.M.; da Costa, T.B.B.C.; Nani, J. V.; Martins, L.G.; Santos, L.A.; Nunes, M.F.Q.; Adelino, M.P.M.; Pedrini, M.; et al. Peripheral biomarkers allow differential diagnosis between schizophrenia and bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* **2019**, *119*, 67–75, doi:10.1016/j.jpsychires.2019.09.009.
  114. Wang, T.; Li, P.; Meng, X.; Zhang, J.; Liu, Q.; Jia, C.; Meng, N.; Zhu, K.; Lv, D.; Sun, L.; et al. An integrated pathological research for precise diagnosis of schizophrenia combining LC-MS/(1)H NMR metabolomics and transcriptomics. *Clin. Chim. Acta.* **2022**, *524*, 84–95, doi:10.1016/j.cca.2021.11.028.
  115. Lavretsky, H. History of schizophrenia as a psychiatric disorder.; 2008.
  116. Orešič, M.; Tang, J.; Seppänen-Laakso, T.; Mattila, I.; Saarni, S.E.; Saarni, S.I.; Lönnqvist, J.; Sysi-Aho, M.; Hyötyläinen, T.; Perälä, J.; et al. Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study. *Genome Med.* **2011**, *3*, 19, doi:10.1186/gm233.
  117. Creveling, C.R.; Daly, J.W. Identification of 3,4-dimethoxyphenethylamine from schizophrenic urine by mass spectrometry. *Nature* **1967**, *216*, 190–191, doi:10.1038/216190a0.
  118. Baruah, S.; Waziri, R.; Hegwood, T.S.; Mallis, L.M. Plasma serine in schizophrenics and controls measured by gas chromatography-mass spectrometry. *Psychiatry Res.* **1991**, *37*, 261–270, doi:10.1016/0165-1781(91)90062-t.
  119. Kantrowitz, J.T.; Malhotra, A.K.; Cornblatt, B.; Silipo, G.; Balla, A.; Suckow, R.F.; D'Souza, C.; Saksa, J.; Woods, S.W.; Javitt, D.C. High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2010**, *121*, 125–130, doi:10.1016/j.schres.2010.05.012.
  120. Koike, S.; Bundo, M.; Iwamoto, K.; Suga, M.; Kuwabara, H.; Ohashi, Y.; Shinoda, K.; Takano, Y.; Iwashiro, N.; Satomura, Y.; et al. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e379, doi:10.1038/tp.2014.19.
  121. Liu, M.-L.; Zheng, P.; Liu, Z.; Xu, Y.; Mu, J.; Guo, J.; Huang, T.; Meng, H.-Q.; Xie, P. GC-MS based metabolomics identification of possible novel biomarkers for schizophrenia in peripheral blood mononuclear cells. *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 2398–2406, doi:10.1039/C4MB00157E.
  122. Sussulini, A.; Prando, A.; Maretto, D.A.; Poppi, R.J.; Tasic, L.; Banzato, C.E.M.; Arruda, M.A.Z. Metabolic profiling of human blood serum from treated patients with bipolar disorder employing <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9755–9763, doi:10.1021/ac901502j.

123. Chen, J.-J.; Zhou, C.-J.; Liu, Z.; Fu, Y.-Y.; Zheng, P.; Yang, D.-Y.; Li, Q.; Mu, J.; Wei, Y.-D.; Zhou, J.-J.; et al. Divergent Urinary Metabolic Phenotypes between Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder Identified by a Combined GC-MS and NMR Spectroscopic Metabonomic Approach. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 3382–3389, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00434.
124. Chen, J.; Huang, H.; Zhao, L.; Zhou, D.; Yang, Y.; Zheng, P.; Yang, D.; He, P.; Zhou, J.; Fang, L.; et al. Sex-specific urinary biomarkers for diagnosing bipolar disorder. *PLoS One* **2014**, *9*, e115221, doi:10.1371/journal.pone.0115221.
125. Sethi, S.; Pedrini, M.; Rizzo, L.B.; Zeni-Graiff, M.; Mas, C.D.; Cassinelli, A.C.; Noto, M.N.; Asevedo, E.; Cordeiro, Q.; Pontes, J.G.M.; et al. 1H-NMR, 1H-NMR T2-edited, and 2D-NMR in bipolar disorder metabolic profiling. *Int. J. Bipolar Disord.* **2017**, *5*, 23, doi:10.1186/s40345-017-0088-2.
126. Chen, J.; Liu, Z.; Fan, S.; Yang, D.; Zheng, P.; Shao, W.; Qi, Z.; Xu, X.; Li, Q.; Mu, J.; et al. Combined application of NMR- and GC-MS-based metabonomics yields a superior urinary biomarker panel for bipolar disorder. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5855, doi:10.1038/srep05855.
127. Yoshimi, N.; Futamura, T.; Kakumoto, K.; Salehi, A.M.; Sellgren, C.M.; Holmén-Larsson, J.; Jakobsson, J.; Pålsson, E.; Landén, M.; Hashimoto, K. Blood metabolomics analysis identifies abnormalities in the citric acid cycle, urea cycle, and amino acid metabolism in bipolar disorder. *BBA Clin.* **2016**, *5*, 151–158, doi:10.1016/j.bbacli.2016.03.008.
128. Zheng, P.; Wei, Y.; Yao, G.; Ren, G.; Guo, J.; Zhou, C.; Zhong, J.; Cao, D.; Zhou, L.; Xie, P. Novel urinary biomarkers for diagnosing bipolar disorder. *Metabolomics* **2013**, *9*, 800–808.
129. Davanzo, P.; Thomas, M.A.; Yue, K.; Oshiro, T.; Belin, T.; Strober, M.; McCracken, J. Decreased anterior cingulate myo-inositol/creatine spectroscopy resonance with lithium treatment in children with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2001**, *24*, 359–369, doi:10.1016/S0893-133X(00)00207-4.
130. Guo, X.; Jia, J.; Zhang, Z.; Miao, Y.; Wu, P.; Bai, Y.; Ren, Y. Metabolomic biomarkers related to non-suicidal self-injury in patients with bipolar disorder. *BMC Psychiatry* **2022**, *22*, 491, doi:10.1186/s12888-022-04079-8.
131. Hilty, D.M.; Leamon, M.H.; Lim, R.F.; Kelly, R.H.; Hales, R.E. A review of bipolar disorder in adults. *Psychiatry (Edgmont)*. **2006**, *3*, 43–55.
132. Cade, J.F. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. 1949. *Bull. World Health Organ.* **2000**, *78*, 518–520.
133. Geladi, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2003**, *58*, 767–782, doi:https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00037-5.
134. van Beek, J.D. matNMR: A flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®. *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 19–26, doi:10.1016/j.jmr.2007.03.017.
135. Wold, S.; Sjöström, M. SIMCA: A Method for Analyzing Chemical Data in Terms of Similarity and Analogy.; 1977.
136. Pirouette – Comprehensive Chemometrics Modeling Software Available online: <https://infometrix.com/pirouette/> (accessed on Apr 6, 2023).
137. Tasic, L.; Pontes, J.G.M.; Carvalho, M.S.; Cruz, G.; Dal Mas, C.; Sethi, S.; Pedrini, M.; Rizzo,

- L.B.; Zeni-Graiff, M.; Asevedo, E.; et al. Metabolomics and lipidomics analyses by 1H nuclear magnetic resonance of schizophrenia patient serum reveal potential peripheral biomarkers for diagnosis. *Schizophr. Res.* **2017**, *185*, 182–189, doi:10.1016/j.schres.2016.12.024.
138. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Marcu, A.; Guo, A.C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D608–D617, doi:10.1093/nar/gkx1089.
139. Ulrich, E.L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J.F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y.E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; et al. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D402–8, doi:10.1093/nar/gkm957.
140. Cui, Q.; Lewis, I.A.; Hegeman, A.D.; Anderson, M.E.; Li, J.; Schulte, C.F.; Westler, W.M.; Eghbalnia, H.R.; Sussman, M.R.; Markley, J.L. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 162–164.
141. Ellinger, J.J.; Chylla, R.A.; Ulrich, E.L.; Markley, J.L. Databases and Software for NMR-Based Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **2013**, *1*, doi:10.2174/2213235X11301010028.
142. DeJongh, D.C.; Radford, T.; Hribar, J.D.; Hanessian, S.; Bieber, M.; Dawson, G.; Sweeley, C.C. Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1728–1740, doi:10.1021/ja01035a022.
143. Gelpi, E.; Koenig, W.A.; Gibert, J.; Oró, J. Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Amino Acid Derivatives. *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 604–613, doi:10.1093/chromsci/7.10.604.
144. Kuksis, A.; Prioreschi, P. Isolation of Krebs cycle acids from tissues for gas chromatography. *Anal. Biochem.* **1967**, *19*, 468–480, doi:10.1016/0003-2697(67)90238-2.
145. Hagihara, H.; Horikawa, T.; Irino, Y.; Nakamura, H.K.; Umemori, J.; Shoji, H.; Yoshida, M.; Kamitani, Y.; Miyakawa, T. Peripheral blood metabolome predicts mood change-related activity in mouse model of bipolar disorder. *Mol. Brain* **2019**, *12*, 107, doi:10.1186/s13041-019-0527-3.
146. Babushok, V.I.; Linstrom, P.J.; Reed, J.J.; Zenkevich, I.G.; Brown, R.L.; Mallard, W.G.; Stein, S.E. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 414–421, doi:10.1016/j.chroma.2007.05.044.
147. Winnike, J.H.; Wei, X.; Knagge, K.J.; Colman, S.D.; Gregory, S.G.; Zhang, X. Comparison of GC-MS and GC×GC-MS in the Analysis of Human Serum Samples for Biomarker Discovery. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 1810–1817, doi:10.1021/pr5011923.
148. Lima-Oliveira, G.; Monneret, D.; Guerber, F.; Guidi, G.C. Sample management for clinical biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens? *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2018**, *55*, 480–500, doi:10.1080/10408363.2018.1499708.
149. Plebani, M.; Banfi, G.; Bernardini, S.; Bondanini, F.; Conti, L.; Dorizzi, R.; Ferrara, F.E.; Mancini, R.; Trenti, T. Serum or plasma? An old question looking for new answers. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 178–187, doi:10.1515/cclm-2019-0719.
150. Tuck, M.K.; Chan, D.W.; Chia, D.; Godwin, A.K.; Grizzle, W.E.; Krueger, K.E.; Rom, W.; Sanda, M.; Sorbara, L.; Stass, S.; et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 113–117, doi:10.1021/pr800545q.
151. Kiseleva, O.; Kurbatov, I.; Ilgisonis, E.; Poverennaya, E. Defining Blood Plasma and Serum

- Metabolome by GC-MS. *Metabolites* **2021**, *12*, 15, doi:10.3390/metabo12010015.
152. Chetwynd, A.J.; Dunn, W.B.; Rodriguez-Blanco, G. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *965*, 19–44, doi:10.1007/978-3-319-47656-8\_2.
  153. Castro-Perez, J.; Prakash, C. Recent advances in mass spectrometric and other analytical techniques for the identification of drug metabolites. In *Identification and Quantification of Drugs, Metabolites, Drug Metabolizing Enzymes, and Transporters*; Elsevier, 2020; pp. 39–71.
  154. A, J.; Trygg, J.; Gullberg, J.; Johansson, A.I.; Jonsson, P.; Antti, H.; Marklund, S.L.; Moritz, T. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8086–8094, doi:10.1021/ac051211v.
  155. Halket, J.M.; Zaikin, V.G. Derivatization in mass spectrometry --7. On-line derivatisation/degradation. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng.)* **2006**, *12*, 1–13, doi:10.1255/ejms.785.
  156. Kanani, H.; Chrysanthopoulos, P.K.; Klapa, M.I. Standardizing GC-MS metabolomics. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci.* **2008**, *871*, 191–201, doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.049.
  157. Wang, Y.; Zhou, L.; Zhou, Y.; Zhao, C.; Lu, X.; Xu, G. A rapid GC method coupled with quadrupole or time of flight mass spectrometry for metabolomics analysis. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci.* **2020**, *1160*, 122355, doi:10.1016/j.jchromb.2020.122355.
  158. Yang, J.; Chen, T.; Sun, L.; Zhao, Z.; Qi, X.; Zhou, K.; Cao, Y.; Wang, X.; Qiu, Y.; Su, M.; et al. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **2013**, *18*, 67–78, doi:10.1038/mp.2011.131.
  159. Cai, H.-L.; Zhu, R.-H.; Li, H.-D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 103–111, doi:10.1016/j.ab.2009.09.015.
  160. Al Awam, K.; Haußleiter, I.S.; Dudley, E.; Donev, R.; Brüne, M.; Juckel, G.; Thome, J. Multiplatform metabolome and proteome profiling identifies serum metabolite and protein signatures as prospective biomarkers for schizophrenia. *J. Neural Transm.* **2015**, *122 Suppl*, S111–22, doi:10.1007/s00702-014-1224-0.
  161. Ito, C. The role of the central histaminergic system on schizophrenia. *Drug News Perspect.* **2004**, *17*, 383–387, doi:10.1358/dnp.2004.17.6.829029.
  162. Hashimoto, K. Metabolomics of Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder: Overview and Future Perspective. *Adv. Clin. Chem.* **2018**, *84*, 81–99, doi:10.1016/bs.acc.2017.12.005.
  163. Xu, X.-J.; Zheng, P.; Ren, G.-P.; Liu, M.-L.; Mu, J.; Guo, J.; Cao, D.; Liu, Z.; Meng, H.-Q.; Xie, P. 2,4-Dihydropyrimidine is a potential urinary metabolite biomarker for diagnosing bipolar disorder. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 813, doi:10.1039/c3mb70614a.
  164. Macherone, A. The Future of GC/Q-TOF in Environmental Analysis. In; 2013; pp. 471–490.
  165. Stein, S.E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 770–781, doi:https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00047-1.

166. Szymańska, E.; Saccenti, E.; Smilde, A.K.; Westerhuis, J.A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* **2012**, *8*, 3–16, doi:10.1007/s11306-011-0330-3.
167. Pears, M.R.; Cooper, J.D.; Mitchison, H.M.; Mortishire-Smith, R.J.; Pearce, D.A.; Griffin, J.L. High Resolution <sup>1</sup>H NMR-based Metabolomics Indicates a Neurotransmitter Cycling Deficit in Cerebral Tissue from a Mouse Model of Batten Disease. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42508–42514, doi:10.1074/jbc.M507380200.
168. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285–294, doi:10.1016/j.trac.2004.11.021.
169. Grebe, S.K.; Singh, R.J. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin. Biochem. Rev.* **2011**, *32*, 5–31.
170. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64–71, doi:10.1126/science.2675315.
171. Want, E.J.; Cravatt, B.F.; Siuzdak, G. The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *Chembiochem* **2005**, *6*, 1941–1951, doi:10.1002/cbic.200500151.
172. Ramos, L.; Bakhtiar, R.; Tse, F.L.S. Liquid-liquid extraction using 96-well plate format in conjunction with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitative determination of methylphenidate (Ritalin) in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 740–745, doi:10.1002/(SICI)1097-0231(20000515)14:9<740::AID-RCM938>3.0.CO;2-C.
173. Leavens, W.J.; Lane, S.J.; Carr, R.M.; Lockie, A.M.; Waterhouse, I. Derivatization for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of tris(trimethoxyphenyl)phosphonium compounds and their derivatives of amine and carboxylic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 433–441, doi:10.1002/rcm.559.
174. Dunn, W.B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J.D.; Halsall, A.; Haselden, J.N.; et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1060–1083, doi:10.1038/nprot.2011.335.
175. Zelena, E.; Dunn, W.B.; Broadhurst, D.; Francis-McIntyre, S.; Carroll, K.M.; Begley, P.; O'Hagan, S.; Knowles, J.D.; Halsall, A.; Wilson, I.D.; et al. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1357–1364, doi:10.1021/ac8019366.
176. Want, E.J.; O'Maille, G.; Smith, C.A.; Brandon, T.R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S.A.; Siuzdak, G. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 743–752, doi:10.1021/ac051312t.
177. Bruce, S.J.; Tavazzi, I.; Parisod, V.; Rezzi, S.; Kochhar, S.; Guy, P.A. Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3285–3296, doi:10.1021/ac8024569.
178. Hennion, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 3–54, doi:10.1016/s0021-

- 9673(99)00832-8.
179. Buszewski, B.; Szultka, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *42*, 198–213, doi:10.1080/07373937.2011.645413.
180. Rappold, B.A. Review of the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Clinical Laboratories: Part I-Development. *Ann. Lab. Med.* **2022**, *42*, 121–140, doi:10.3343/alm.2022.42.2.121.
181. Han, X.; Gross, R.W. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 10635–10639, doi:10.1073/pnas.91.22.10635.
182. Sethi, S.; Hayashi, M.A.F.; Barbosa, B.S.; Pontes, J.G.M.; Tasic, L.; Brietzke, E. Lipidomics, Biomarkers, and Schizophrenia: A Current Perspective. In; 2017; pp. 265–290.
183. Adibhatla, R.M.; Hatcher, J.F. Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. *Future Lipidol.* **2007**, *2*, 403–422, doi:10.2217/17460875.2.4.403.
184. He, Y.; Yu, Z.; Giegling, I.; Xie, L.; Hartmann, A.M.; Prehn, C.; Adamski, J.; Kahn, R.; Li, Y.; Illig, T.; et al. Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. *Transl. Psychiatry* **2012**, *2*, e149–e149, doi:10.1038/tp.2012.76.
185. Fukushima, T.; Iizuka, H.; Yokota, A.; Suzuki, T.; Ohno, C.; Kono, Y.; Nishikiori, M.; Seki, A.; Ichiba, H.; Watanabe, Y.; et al. Quantitative Analyses of Schizophrenia-Associated Metabolites in Serum: Serum D-Lactate Levels Are Negatively Correlated with Gamma-Glutamylcysteine in Medicated Schizophrenia Patients. *PLoS One* **2014**, *9*, e101652, doi:10.1371/journal.pone.0101652.
186. Ribeiro, H.C.; Klassen, A.; Pedrini, M.; Carvalho, M.S.; Rizzo, L.B.; Noto, M.N.; Zeni-Graiff, M.; Sethi, S.; Fonseca, F.A.H.; Tasic, L.; et al. A preliminary study of bipolar disorder type I by mass spectrometry-based serum lipidomics. *Psychiatry Res.* **2017**, *258*, 268–273, doi:10.1016/j.psychres.2017.08.039.
187. Jadranin, M.; Avramović, N.; Miladinović, Z.; Gavrilović, A.; Tasic, L.; Tešević, V.; Mandić, B. Untargeted Lipidomics Study of Bipolar Disorder Patients in Serbia. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16025, doi:10.3390/ijms242216025.
188. Zeki, Ö.C.; Eylem, C.C.; Reçber, T.; Kır, S.; Nemitlu, E. Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *190*, 113509, doi:10.1016/j.jpba.2020.113509.
189. Domingo-Almenara, X.; Siuzdak, G. Metabolomics Data Processing Using XCMS. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2104*, 11–24, doi:10.1007/978-1-0716-0239-3\_2.
190. Behrends, V.; Tredwell, G.D.; Bundy, J.G. A software complement to AMDIS for processing GC-MS metabolomic data. *Anal. Biochem.* **2011**, *415*, 206–208, doi:10.1016/j.ab.2011.04.009.
191. *Processing Metabolomics and Proteomics Data with Open Software*; Winkler, R., Ed.; New Developments in Mass Spectrometry; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2020; ISBN 978-1-78801-721-3.
192. Wishart, D.S.; Knox, C.; Guo, A.C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D.D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D603–10, doi:10.1093/nar/gkn810.

193. Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)* **2008**, *1*, 45–69, doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.113026.
194. Nemutlu, E.; Zhang, S.; Xu, Y.-Z.; Terzic, A.; Zhong, L.; Dzeja, P.D.; Cha, Y.-M. Cardiac resynchronization therapy induces adaptive metabolic transitions in the metabolomic profile of heart failure. *J. Card. Fail.* **2015**, *21*, 460–469, doi:10.1016/j.cardfail.2015.04.005.
195. Bons, J.; Wodzig, W.; Boer, D.; Drent, M.; Diejjen-Visser, van M. Application of SELDI-TOF-MS in protein profiling: Promises and pitfalls. *Jugosl. Med. biohemija* **2006**, *25*, 201–210, doi:10.2298/JMB0603201B.
196. Soga, T.; Baran, R.; Suematsu, M.; Ueno, Y.; Ikeda, S.; Sakurakawa, T.; Kakazu, Y.; Ishikawa, T.; Robert, M.; Nishioka, T.; et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16768–16776, doi:10.1074/jbc.M601876200.
197. Fekete, S.; Guillarme, D.; Sandra, P.; Sandra, K. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 480–507, doi:10.1021/acs.analchem.5b04561.
198. Soga, T.; Sugimoto, M.; Honma, M.; Mori, M.; Igarashi, K.; Kashikura, K.; Ikeda, S.; Hirayama, A.; Yamamoto, T.; Yoshida, H.; et al. Serum metabolomics reveals  $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 896–905, doi:10.1016/j.jhep.2011.01.031.
199. Hirayama, A.; Kami, K.; Sugimoto, M.; Sugawara, M.; Toki, N.; Onozuka, H.; Kinoshita, T.; Saito, N.; Ochiai, A.; Tomita, M.; et al. Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4918–4925, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4806.
200. Luque-Garcia, J.L.; Neubert, T.A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1153*, 259–276, doi:10.1016/j.chroma.2006.11.054.
201. Coon, J.J.; Zürlbig, P.; Dakna, M.; Dominiczak, A.F.; Decramer, S.; Fliser, D.; Frommberger, M.; Golovko, I.; Good, D.M.; Herget-Rosenthal, S.; et al. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. *Proteomics. Clin. Appl.* **2008**, *2*, 964, doi:10.1002/prca.200800024.
202. Kageyama, Y.; Kasahara, T.; Morishita, H.; Mataga, N.; Deguchi, Y.; Tani, M.; Kuroda, K.; Hattori, K.; Yoshida, S.; Inoue, K.; et al. Search for plasma biomarkers in drug-free patients with bipolar disorder and schizophrenia using metabolome analysis. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2017**, *71*, 115–123, doi:10.1111/pcn.12461.
203. Ogruc Ildiz, G.; Arslan, M.; Unsalan, O.; Araujo-Andrade, C.; Kurt, E.; Karatepe, H.T.; Yilmaz, A.; Yalcinkaya, O.B.; Herken, H. FT-IR spectroscopy and multivariate analysis as an auxiliary tool for diagnosis of mental disorders: Bipolar and schizophrenia cases. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *152*, 551–556, doi:10.1016/j.saa.2014.12.114.
204. Kanagathara N1, M.T.; C, E.J.; P.Shenbagarajan FTIR and UV-VISIBLE spectral study on normal blood samples. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2011**, *1*.
205. Hackshaw, K. V.; Miller, J.S.; Aykas, D.P.; Rodriguez-Saona, L. Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples. *Molecules* **2020**, *25*, 4725, doi:10.3390/molecules25204725.

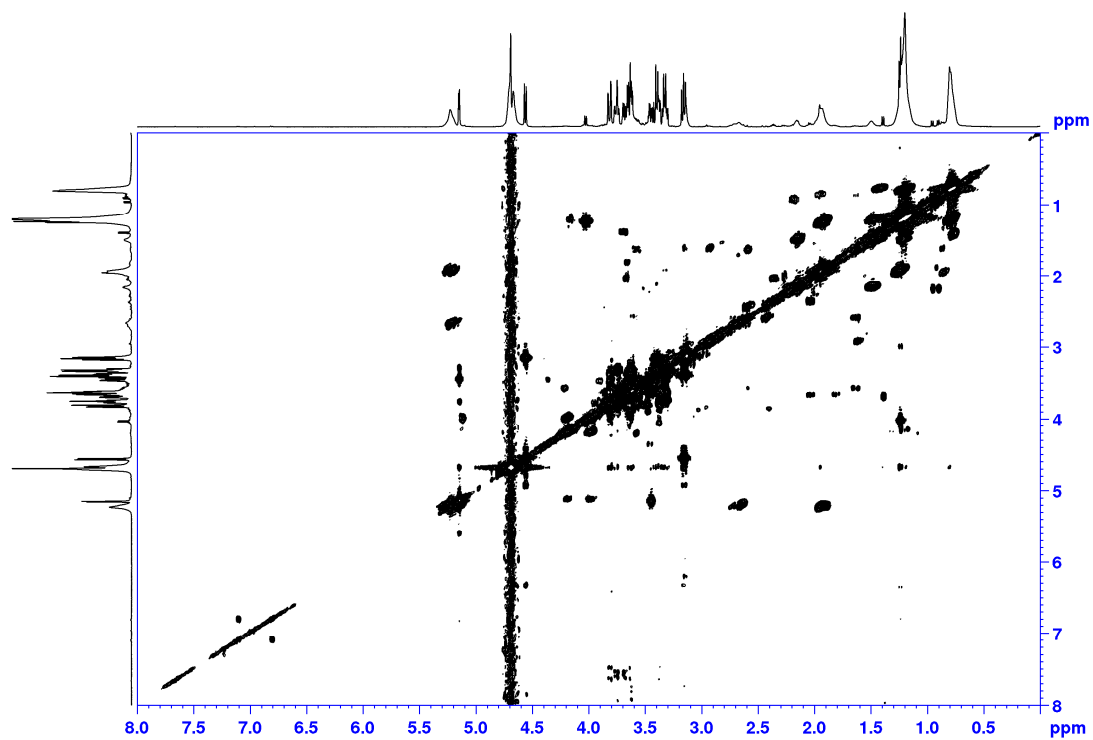
206. Dovbeshko, G.I.; Gridina, N.Y.; Kruglova, E.B.; Pashchuk, O.P. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* **2000**, *53*, 233–246, doi:10.1016/s0039-9140(00)00462-8.
207. Erukhimovitch, V.; Talyshinsky, M.; Souprun, Y.; Huleihel, M. FTIR spectroscopy examination of leukemia patients plasma. *Vib. Spectrosc.* **2006**, *40*, 40–46, doi:10.1016/j.vibspec.2005.06.004.
208. Utzinger, U.; Heintzelman, D.L.; Mahadevan-Jansen, A.; Malpica, A.; Follen, M.; Richards-Kortum, R. Near-Infrared Raman Spectroscopy for in vivo Detection of Cervical Precancers. *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 955–959, doi:10.1366/0003702011953018.
209. Diem, M.; Boydston-White, S.; Chiriboga, L. Infrared Spectroscopy of Cells and Tissues: Shining Light onto a novel Subject. *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 148A–161A.
210. Petrich, W.; Dolenko, B.; Früh, J.; Ganz, M.; Greger, H.; Jacob, S.; Keller, F.; Nikulin, A.E.; Otto, M.; Quarder, O.; et al. Disease pattern recognition in infrared spectra of human sera with diabetemellitus as an example. *Appl. Opt.* **2000**, *39*, 3372–3379, doi:10.1364/AO.39.003372.
211. Petibois, C.; Cazorla, G.; Cassaigne, A.; Déléris, G. Application of FT-IR Spectrometry to Determine the Global Metabolic Adaptations to Physical Conditioning in Sportsmen. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1259–1267.
212. Wold, S. Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 109–115, doi:https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00042-9.
213. *The Practice of Medicinal Chemistry*; Wermuth, C.G., Ed.; 2td ed.; 2003; ISBN 9780080497778.
214. Kurt Varmuza, P.F. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*; 1st ed.; 2009; ISBN 9780429145049.
215. Shulaev, V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief. Bioinform.* **2006**, *7*, 128–139, doi:10.1093/bib/bbl012.
216. Yuliana, N.D.; Khatib, A.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6902–6906, doi:10.1021/ac201458n.
217. Shyur, L.-F.; Yang, N.-S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 66–71, doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.032.
218. Cvetković, M.T. *Metabolomička studija balkanskih vrsta roda Amphoricarpos Vis. (Asteraceae), doktorska disertacija*; Univezitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Ed.; 2019.
219. Anđelković, B. *Primena rezultata NMR i FTIR spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi za klasifikaciju propolisa, doktorska disertacija*, Univezitet u Beogradu - Hemijski fakultet, 2017.
220. Puchades-Carrasco, L.; Palomino-Schätzlein, M.; Pérez-Rambla, C.; Pineda-Lucena, A. Bioinformatics tools for the analysis of NMR metabolomics studies focused on the identification of clinically relevant biomarkers. *Brief. Bioinform.* **2016**, *17*, 541–552, doi:10.1093/bib/bbv077.
221. Pearson, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1901**, *2*, 559–572, doi:10.1080/14786440109462720.
222. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ.*



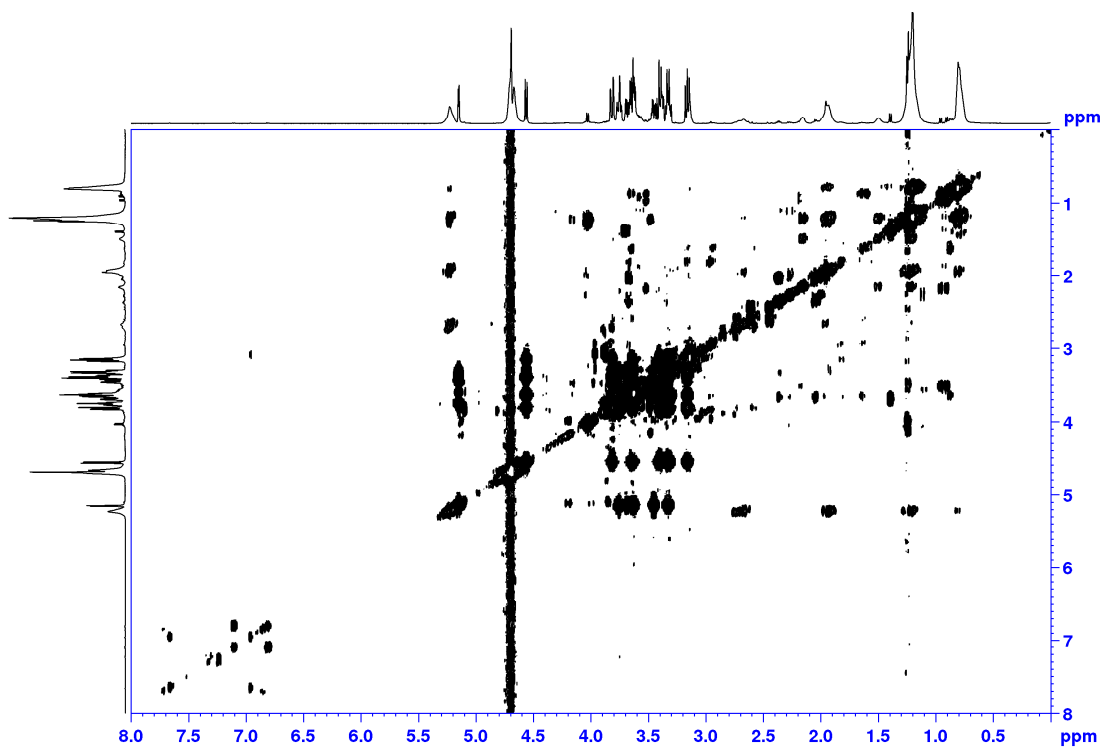
- Psychol.* **1933**, *24*, 417–441, doi:10.1037/h0071325.
223. Bro, R.; Smilde, A.K. Principal component analysis. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2812–2831, doi:10.1039/C3AY41907J.
224. Koprivica, M.R. *Hemijska karakterizacija semena breskve (Prunus persica L.), doktorska disertacija*; 2019.
225. Wold, H.O.A. *Research Papers in Statistics, Nonlinear estimation by iterative least squares procedures*; Wiley, N.Y., Ed.; 1966.
226. Chevallier, S.; Bertrand, D.; Kohler, A.; Courcoux, P. Application of PLS-DA in multivariate image analysis. *J. Chemom.* **2006**, *20*, 221–229, doi:10.1002/cem.994.
227. Ballabio, D.; Consonni, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3790, doi:10.1039/c3ay40582f.
228. Wiklund, J.; Patzelt, H.; Shepherd, D.A. Building an integrative model of small business growth. *Small Bus. Econ.* **2009**, *32*, 351–374, doi:10.1007/s11187-007-9084-8.
229. Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1 H NMR Metabonomics. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4281–4290, doi:10.1021/ac051632c.
230. Pérez, N.F.; Ferré, J.; Boqué, R. Calculation of the reliability of classification in discriminant partial least-squares binary classification. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2009**, *95*, 122–128, doi:10.1016/j.chemolab.2008.09.005.
231. Eigenvector Research Incorporated Available online: <https://eigenvector.com/> (accessed on Apr 25, 2023).
232. Brereton, R.G.; Lloyd, G.R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* **2014**, *28*, 213–225, doi:10.1002/cem.2609.
233. Mehmood, T.; Liland, K.H.; Snipen, L.; Sæbø, S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**, *118*, 62–69, doi:10.1016/j.chemolab.2012.07.010.
234. Cloarec, O.; Dumas, M.E.; Trygg, J.; Craig, A.; Barton, R.H.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Holmes, E. Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in 1 H NMR Spectroscopic Metabonomic Studies. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 517–526, doi:10.1021/ac048803i.
235. Cloarec, O.; Dumas, M.-E.; Craig, A.; Barton, R.H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J.C.; Holmes, E.; et al. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic 1 H NMR Data Sets. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1282–1289, doi:10.1021/ac048630x.
236. Eriksson, L.; Byrne, T.; Johansson, E.; Trygg, J.; Vikström, C. *Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications*; Umetrics Academy, 2013; ISBN 9789197373050.
237. Galindo-Prieto, B.; Eriksson, L.; Trygg, J. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). *J. Chemom.* **2014**, *28*, 623–632, doi:10.1002/cem.2627.
238. Rajalahti, T.; Arneberg, R.; Berven, F.S.; Myhr, K.-M.; Ulvik, R.J.; Kvalheim, O.M. Biomarker discovery in mass spectral profiles by means of selectivity ratio plot. *Chemom.*

- Intell. Lab. Syst.* **2009**, *95*, 35–48, doi:10.1016/j.chemolab.2008.08.004.
239. Ballabio, D.; Consonni, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3790–3798, doi:10.1039/C3AY40582F.
240. Bro, R.; Smilde, A.K. Principal component analysis. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2812–2831, doi:10.1039/C3AY41907J.
241. Kaiser, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* **1958**, *23*, 187–200, doi:10.1007/BF02289233.
242. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E.J.; Edlund, U.; Shockcor, J.P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 115–122, doi:10.1021/ac0713510.
243. Simić, K.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Miladinović, Z.; Gavrilović, A.; Jovanović, S.; Avramović, N.; Gođevac, D.; Vujisić, L.; Tešević, V.; et al. NMR Metabolomics in Serum Fingerprinting of Schizophrenia Patients in a Serbian Cohort. *Metabolites* **2022**, *12*, 707, doi:10.3390/metabo12080707.
244. Simić, K.; Miladinović, Z.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Avramović, N.; Gavrilović, A.; Jovanović, S.; Gođevac, D.; Vujisić, L.; Tešević, V.; et al. Metabolomic Profiling of Bipolar Disorder by <sup>1</sup>H-NMR in Serbian Patients. *Metabolites* **2023**, *13*, 607, doi:10.3390/metabo13050607.

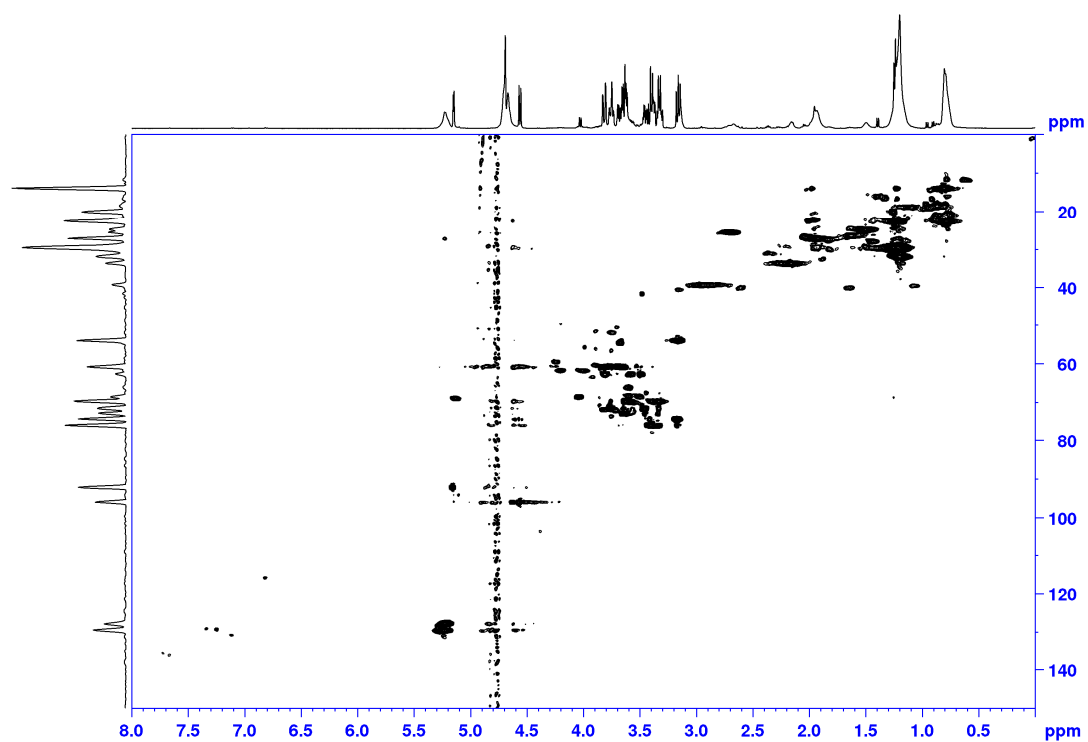
## 7. PRILOG



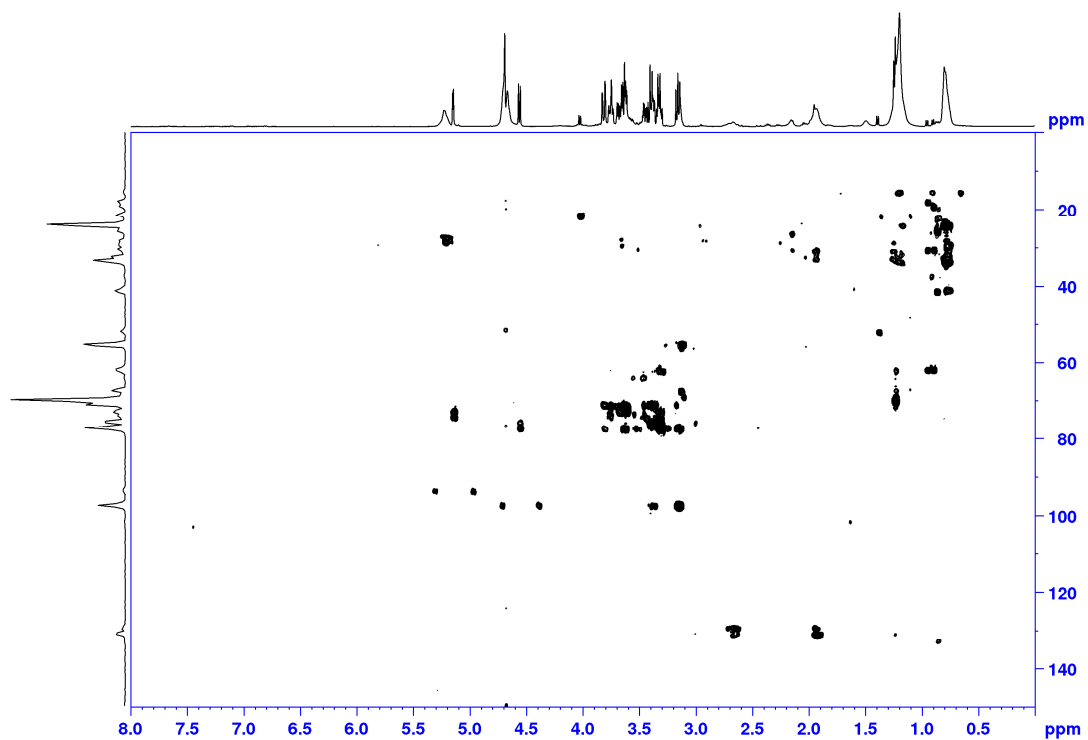
Prilog 1. Reprezentativni COSY spektar seruma pacijenata obolelih od shizofrenije



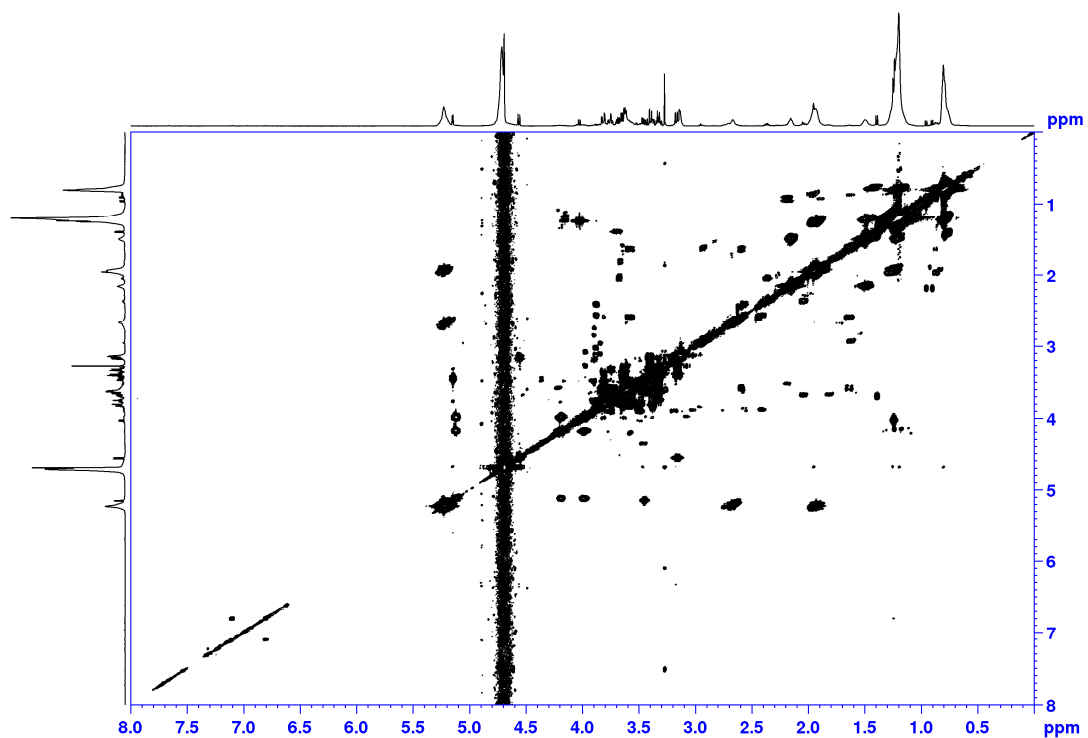
Prilog 2. Reprezentativni TOCSY spektar seruma pacijenata obolelih od shizofrenije



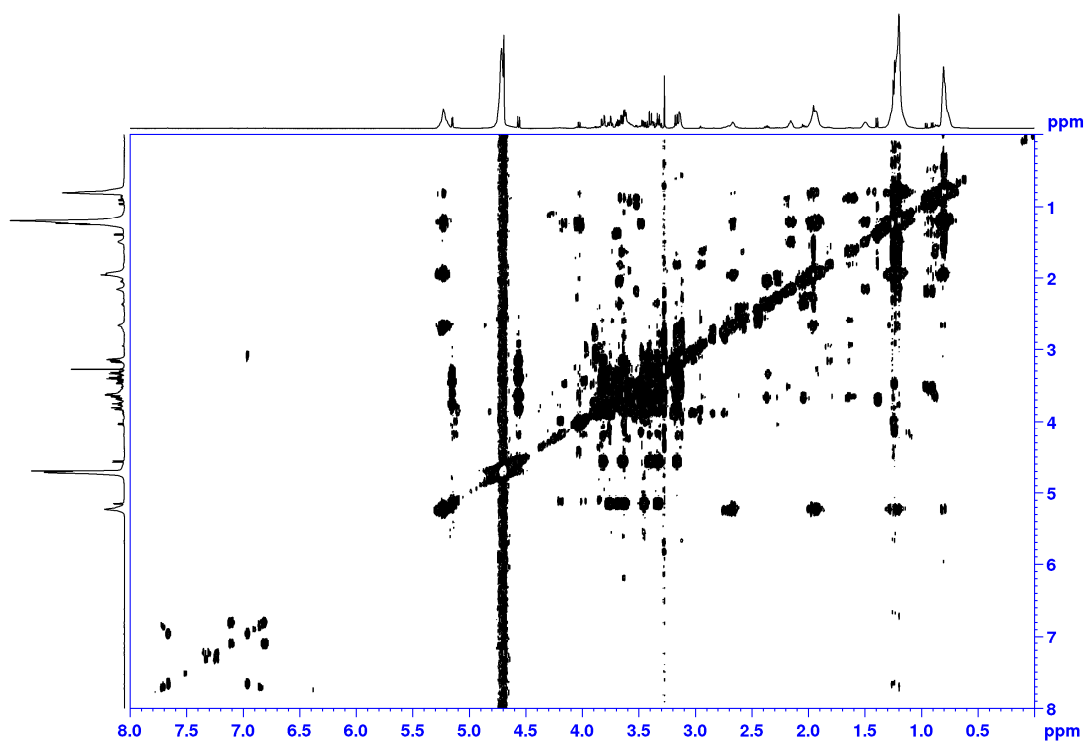
**Prilog 3.** Reprezentativni HSQC spektar seruma pacijenata obolelih od shizofrenije



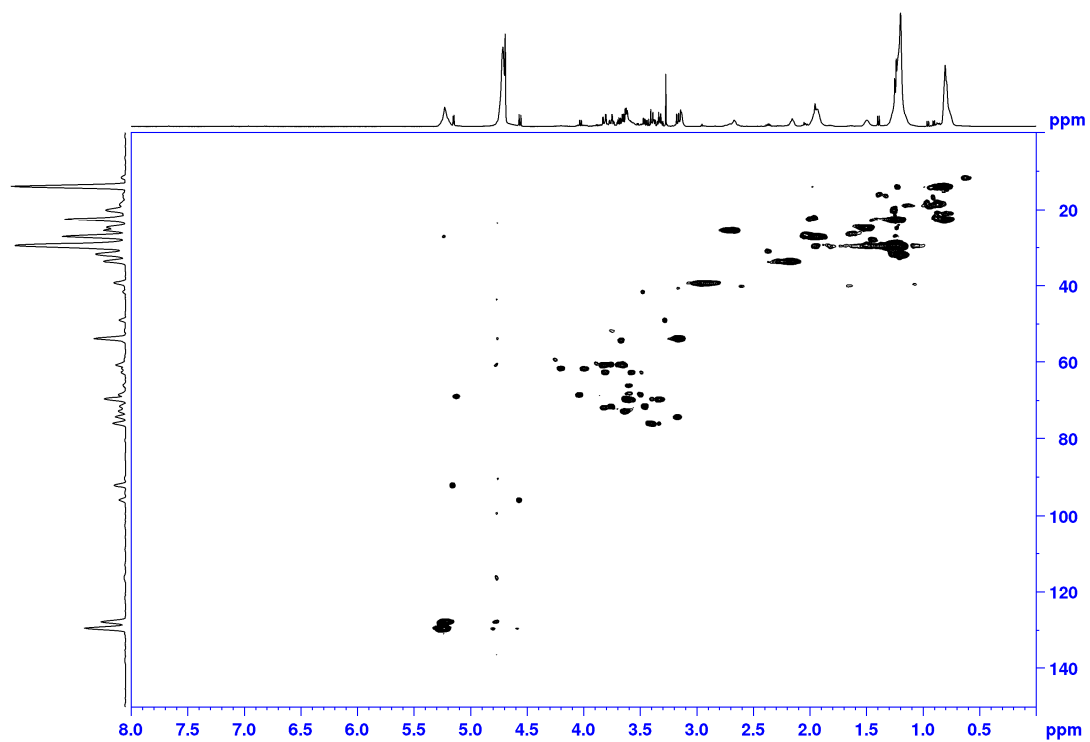
**Prilog 4.** Reprezentativni HMBC spektar seruma pacijenata obolelih od shizofrenije



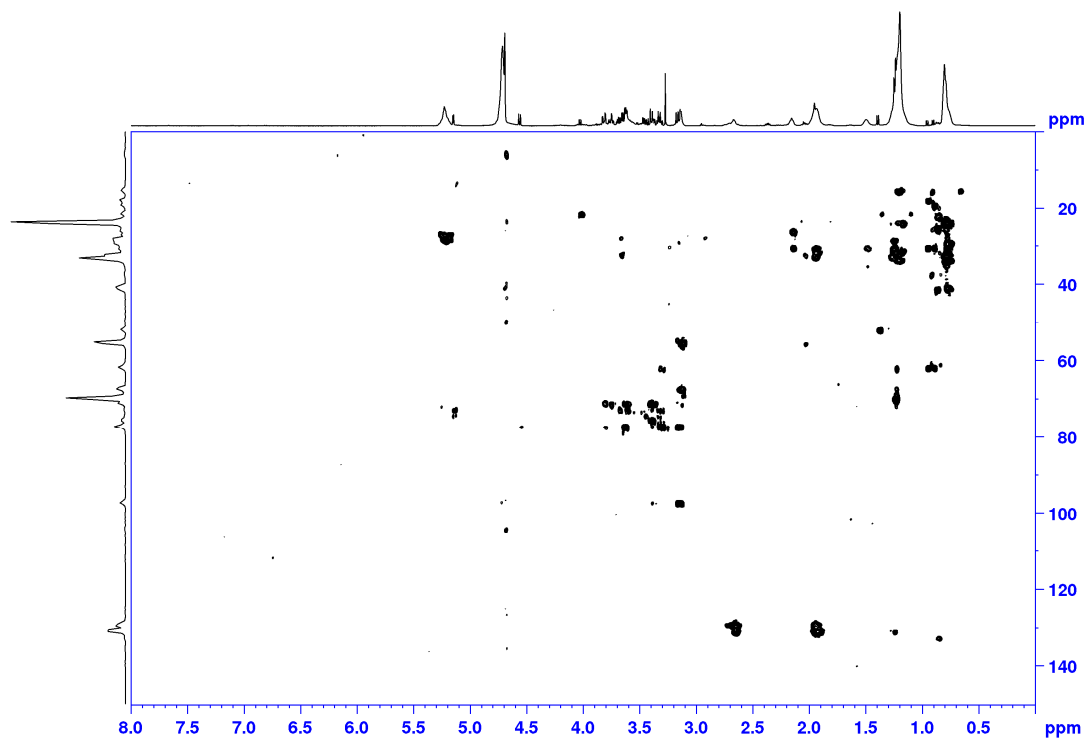
**Prilog 5.** Reprezentativni COSY spektar seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja



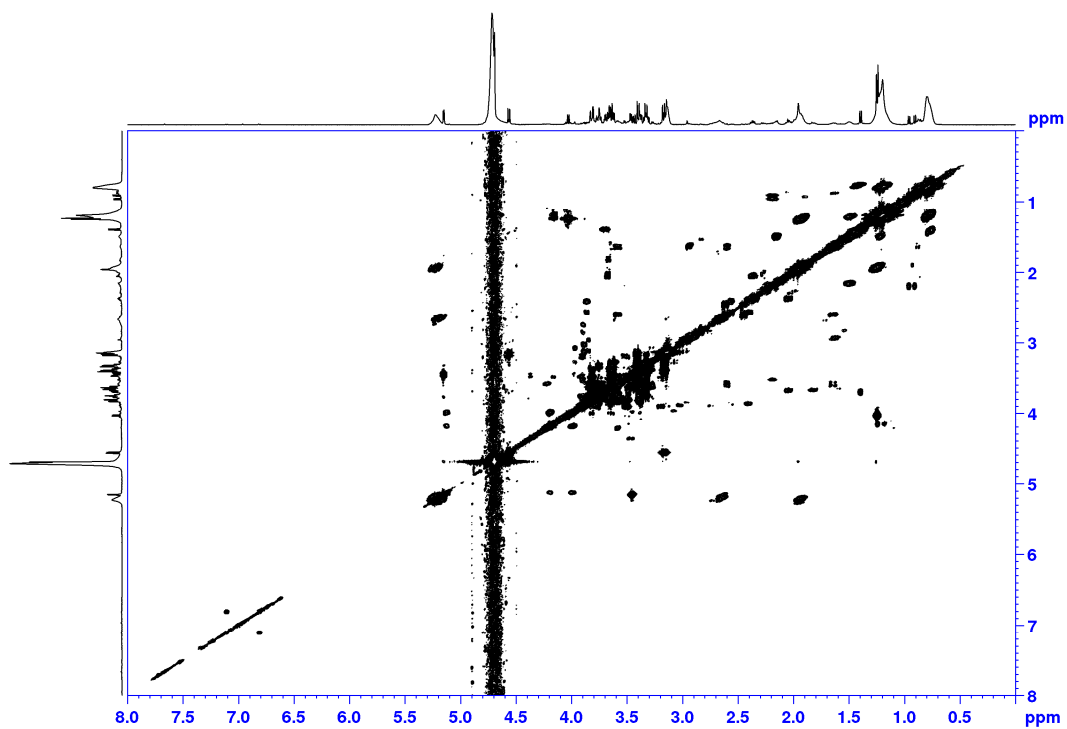
**Prilog 6.** Reprezentativni TOCSY spektar seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja



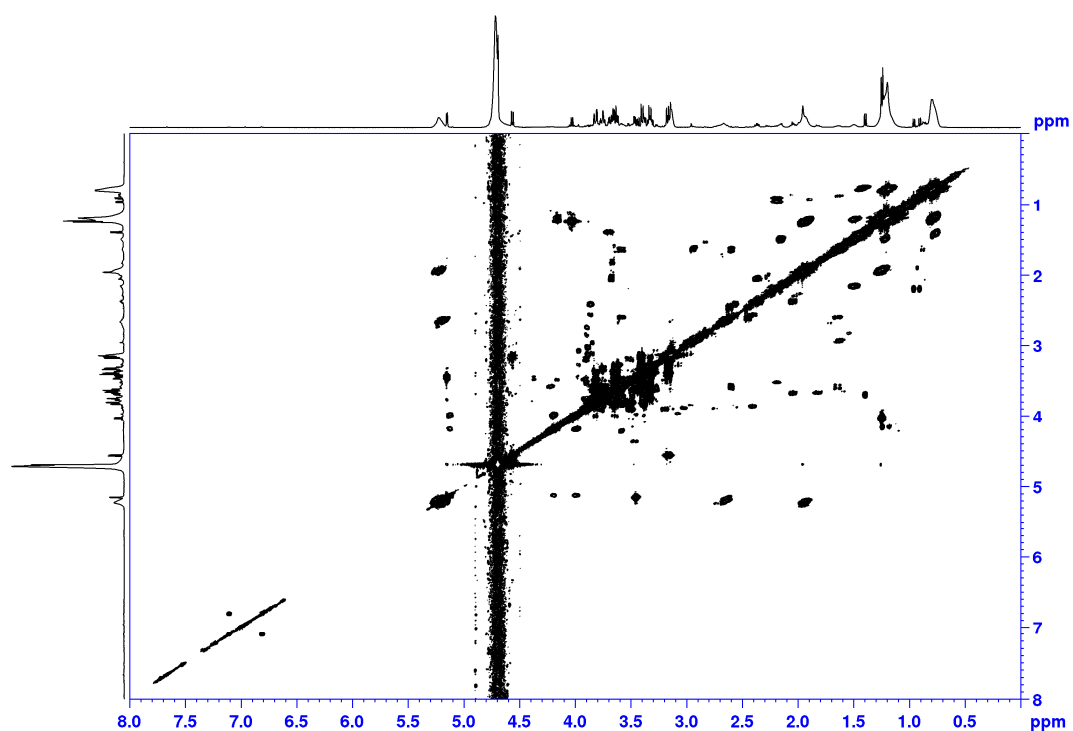
**Prilog 7.** Reprezentativni HSQC spektar seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja



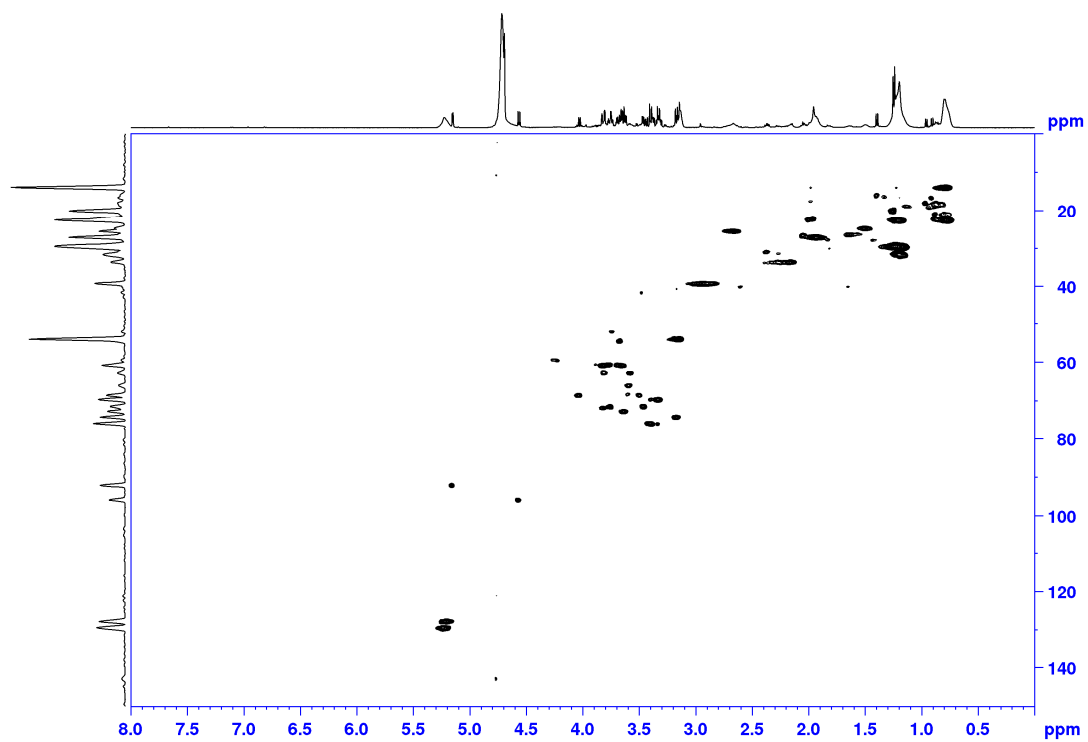
**Prilog 8.** Reprezentativni HMBC spektar seruma pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja



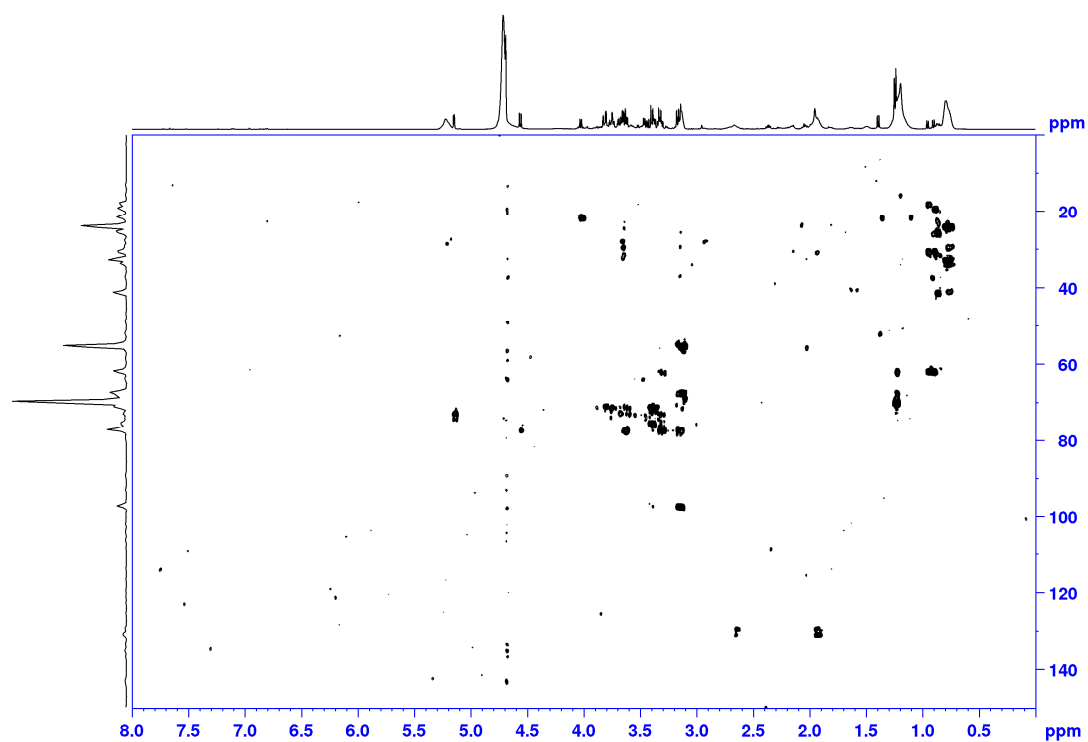
**Prilog 9.** Reprezentativni COSY spektar seruma kontrolne grupe



**Prilog 10.** Reprezentativni TOCSY spektar seruma kontrolne grupe



**Prilog 11.** Reprezentativni HSQC spektar seruma kontrolne grupe



**Prilog 12.** Reprezentativni HMBC spektar seruma kontrolne grupe



## Biografija

**Katarina Z. Simić** rođena je 29.07.1994. u Smederevu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, studijski program Hemija, upisala je 2013. godine, a završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 8,66 i ocenom 10 na završnom radu pod naslovom „Ispitivanje isparljivih komponenti šljivove rakije od sorti crvena ranka, požegača i trnovača“. Master akademske studije pri Katedri za organsku hemiju upisala je školske 2017. i završila 2018. sa ocenom 10 na završnom radu pod naslovom „Karakterizacija šljivove rakije od sorti požegača, crvena ranka, i trnovača primenom gasne hromatografije i multivarijantne analize“. Doktorske akademske studije upisala je školske 2018/19 na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu Od novembra 2018. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od juna 2021. godine kao istraživač saradnik Univerziteta u Beogradu – Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

Od 2018. do 2019. godine bila je angažovana na nacionalnom projektu osnovnih istraživanja „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti“, projekat broj 172053. Pored toga bila je angažovana i na međunarodnim projektima MECWA FCUB CIA, OPCW L/ICA/ICB/210502/17; CIA p-LABs, Twinning VERIFIN CIA, OPCW/L/ICA/ICB-75/21, projektu Metabolomski otisci prstiju šizofrenije i bipolarnog poremećaja. U aprilu 2022. godine kratkotrajno je boravila na VERIFIN Institutu Univerziteta u Helsinkiju.

Tokom doktorskih studija uključena je u izvođenju vežbi na predmetima Strukturne instrumentalne metode (221A2 i 221B2). Od 2020. godine angažovana je kao saradnik na poslovima alitičara na NMR instrumentu akreditovane Laboratorije Centra za hemiju IHTM-a.

**Objavljeni radovi u sklopu disertacije**

Katarina Simić je koautor 21 bibliografske jedinice (3 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 5 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 6 radova u međunarodnim časopisima (M23), 7 saopštenja sa međunarodnih i nacionalnih skupova) od kojih deo ove teze čine:

**Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):**

1. **Simić Katarina**, Todorović Nina, Trifunović Snežana, Miladinović Zoran, Gavrilović Aleksandra, Jovanović Silvana, Avramović Nataša, Gođevac Dejan, Vujisić Ljubodrag, Tešević Vele, Tasić Ljubica, Mandić Boris, NMR Metabolomics in Serum Fingerprinting of Schizophrenia Patients in a Serbian Cohort, *Metabolites*, **2022**, 12, 707, [10.3390/metabo12080707](https://doi.org/10.3390/metabo12080707).  
IF<sub>(2021)</sub> = 5,581
2. **Simić Katarina**, Miladinović Zoran, Todorović Nina, Trifunović Snežana, Gavrilović Aleksandra, Jovanović Silvana, Avramović Nataša, Gođevac Dejan, Vujisić Ljubodrag, Tešević Vele, Tasić Ljubica, Mandić Boris, Metabolomic Profiling of Bipolar Disorder by <sup>1</sup>H-NMR in Serbian Patients, *Metabolites*, **2023**, 13, 607, [10.3390/metabo13050607](https://doi.org/10.3390/metabo13050607).  
IF<sub>(2022)</sub> = 4,100

**Saopštenje sa međunarodnog skupa, štampano u izvodu (M34)**

1. Avramović Nataša, **Simić Katarina**, Miladinović Zoran, Todorović Nina, Trifunović Snežana, Gavrilović Aleksandra, Jovanović Silvana, Gođevac Dejan, Vujisić Ljubodrag, Tešević Vele, Tasić Ljubica, Mandić Boris, <sup>1</sup>H-NMR-based serum metabolomics of bipolar disorder patients, IAPC-10 Meeting, Belgrade, Serbia, September, 2023, <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/7390>.
2. Avramović Nataša, **Simić Katarina**, Miladinović Zoran, Todorović Nina, Trifunović Snežana, Gavrilović Aleksandra, Jovanović Silvana, Gođevac Dejan, Vujisić Ljubodrag, Tešević Vele, Tasić Ljubica, Mandić Boris, <sup>1</sup>H-NMR metabonomic view on schizophrenia, IAPC-10 Meeting, Belgrade, Serbia, September, 2023, <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/7392>.

**Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja, štampano u izvodu (64)**

1. **Simić Katarina**, Todorović Nina, Miladinović Zoran, Ivanović Stefan, Trifunović Snežana, Vujisić Ljubodrag, Tešević Vele, Jovanović Vesna, Avramović Nataša, Gavrilović Aleksandra, Jovanović Silvana, Costa Tassia, Huan Liu Leticia, Barros Pedro, Stanišić Danijela, Mandić Boris, Tasić Ljubica. Evaluation of the universality of NMR metabolic fingerprints of schizophrenia. 21th Annual Central European NMR Symposium & Bruker users meeting, Belgrade, September 4-5, 2019, ISSN: 978-86-7220-100-0, <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/7536>.
2. **Simić Katarina**, Ivanović Stefan, Trifunović Snežana, Mandić Boris, *Serum biomarkers of schizophrenia*, 8th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, October, 2022, ISBN: 978-86-7132-080-1, <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/5552>.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Катарина Симић**  
Број индекса **ДХ07/2018**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Метаболомичко испитивање биомаркера у серуму оболелих од шизофреније и биполарног афективног поремећаја**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Катарина Симић**

Број индекса **ДХ07/2018**

Студијски програм **Хемија**

Наслов рада **Метаболомичко испитивање биомаркера у серуму оболелих од шизофреније и биполарног афективног поремећаја**

Ментори: **др Веле Тешевић, др Борис Мандић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### **Метаболомичко испитивање биомаркера у серуму оболелих од схизофреније и биполарног афективног поремећаја**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
- ④. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.