



Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Culej

**POLIMORFIZMI GENA DOPAMINSKOGA
(COMT I DAT1) I SEROTONINSKOGA
(MAOA I 5-HTT) SUSTAVA TE DIMENZIJE
SIMPTOMA U BOLESNIKA SA
SHIZOFRENIJOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Dalibor Karlović

doc. dr.sc. Mario Štefanović

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jelena Culej

**GENE POLYMORPHISMS IN DOPAMINE
(COMT AND DAT1) AND SEROTONIN
(MAOA AND 5-HTT) SYSTEMS AND
DIMENSIONS OF SYMPTOMS IN
PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

prof. dr. sc. Dalibor Karlović

doc. dr.sc. Mario Štefanović

Zagreb, 2018.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području Biomedicina i zdravstvo, polje Farmacija, grana Medicinska biokemija.

Doktorski rad je izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Dalibora Karlovića i doc.dr.sc. Maria Štefanovića u sklopu projekta „Molekularno–biokemijski čimbenici u bolesnika s depresivnim poremećajem“ (MB 134-0000000-3372).

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Daliboru Karloviću i doc.dr.sc. Mariu Štefanoviću na savjetima i podršci.

Prof dr.sc. Nadi Vrkić, što je pomogla u ostvarenju praktičnog dijela rada.

Dr. sc. Nori Nikolac Gabaj na malim velikim stvarima.

Hvala mojim roditeljima jer su mi dali sve što su imali.

Hvala mom bratu Nikoli jer je hodao uz mene sve dok nisam potrčala.

Sažetak

Shizofrenija je teška psihička bolest koja zahvaća 1% opće populacije. Dijagnoza se postavlja prema kliničkoj slici i prisutnim simptomima. Premda sama biološka osnova nije razjašnjena, danas je najprihvaćenija dopaminska hipoteza prema kojoj dopamin ima centralnu ulogu u nastanku shizofrenije. Dopaminske puteve u mozgu velikim dijelom prati serotoninski put za koji je utvrđeno da ima inhibitorni učinak na dopaminski sustav. Djelovanje dopamina regulira dopaminski transporter i katekol-o-metil-transferaza, a djelovanje serotonina regulira serotoninski transporter i monoamino-oksidaza A, koja osim što sudjeluje u metabolizmu serotonina, sudjeluje i u metabolizmu dopamina.

Hipoteza ovog istraživanja je da bi funkcionalni polimorfizmi dopaminskog transportera (DAT-VNTR), katekol-o-metil transferaze (COMT Val158Met), serotoninskog transportera (5-HTTLPR) i monoamino-oksidaze A (MAOA-uVNTR) mogli biti povezani sa pojavom simptoma shizofrenije.

Ciljevi ovog istraživanja su: 1) ispitati povezanost pojedinih polimorfizama i kombinacija genotipova sa shizofrenijom. 2) u skupini ispitanika sa shizofrenijom ispitati povezanost polimorfizama sa simptomima bolesti. 3) uspostaviti regresijski model za predviđanje shizofrenije.

U istraživanje je uključeno 314 zdravih ispitanika i 306 ispitanika sa dijagnozom shizofrenije. Za ispravnu klasifikaciju zdravih ispitanika korišten je odgovarajući upitnik (engl. *Mini International Neuropsychiatric Intervju. M.I.N.I.*) i fizikalni pregled. Dijagnoza shizofrenije postavljena je prema DSM IV standardu, a simptomi shizofrenije ocijenjeni su PANSS i Calgary skalom. Genotipizacija ispitivanih polimorfizama rađena je PCR reakcijom uz elektroforetsko razdvajanje dobivenih fragmenata odnosno PCR-RFLP metodom za genotipizaciju COMT Val158Met polimorfizma.

Usporedbom zdravih i ispitanika sa shizofrenijom utvrđeno je sljedeće: na ukupnom uzorku utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji DAT-VNTR polimorfizma. U podskupini žena utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji COMT Val158Met polimorfizma a u podskupini muškaraca utvrđena je povezanost MAOA-uVNTR polimorfizma sa shizofrenijom. U skupini ispitanika sa shizofrenijom utvrđena je povezanost COMT Val158Met polimorfizma sa obiteljskim hereditetom. Utvrđen je regresijski model za predviđanje shizofrenije.

Ključne riječi: shizofrenija, serotoninski transporter, dopaminski transporter, monoamino oksidaza A, katekol-o-metil transferaza, 5-HTTLPR, DAT-VNTR, MAOA-uVNTR i COMT Val158Met

Summary

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder which affects 1% of general population. Diagnosis of schizophrenia is based on presence of clinical symptoms but its exact pathophysiology is still unknown. However, according to extensive research the most accepted is dopamine hypothesis by which dopamine plays central role in development of schizophrenia. Dopamine pathways in brain are followed by serotonin pathway which has inhibitory effect on dopamine. Dopamine action is regulated by dopamine transporter and catechol-o-methyltransferase, while serotonin action is regulated by serotonin transporter and monoamine-oxidase A which is also included in dopamine metabolism.

Hypothesis of this research is that polymorphisms of dopamine transporter (DAT-VNTR), catechol-o-methyltransferase (COMT Val158Met), serotonin transporter (5-HTTLPR) and monoamine oxidase A (MAOA-uVNTR) might be associated with symptoms of schizophrenia. The aims of this research were: To test association of polymorphisms and genotype combinations with schizophrenia. In a group of patients with schizophrenia, the aim was to test association of polymorphisms with schizophrenia symptoms. Also the aim was to establish regression model for prediction of schizophrenia.

314 healthy volunteers and 306 patients with schizophrenia were included in this research. Healthy volunteers were included based on MINI psychiatric questioner and physical exam. Schizophrenia was diagnosed based on DSM IV standard and symptoms of schizophrenia were assessed by PANSS and Calgary scale. For detection of polymorphisms we used PCR followed by electrophoresis with exception of COMT Val158Met polymorphism for which we used PCR-RFLP method.

Comparing healthy volunteers and patients with schizophrenia, the following was established: In overall sample there was statistically significant difference in distribution of DAT-VNTR polymorphisms. In female population we found statistically significant difference in distribution of COMT Val158Met polymorphism. In male population we found statistically significant distribution of MAOA-uVNTR polymorphism. In group of patients with schizophrenia we found association of COMT Val158Met polymorphism with family heritage of schizophrenia. Logistic regression model was established for predicting schizophrenia.

Key words: schizophrenia serotonin transporter , dopamine transporter, monoamine oxidase A, catechol-o-methyl transferase, 5-HTTLPR, DAT-VNTR, MAOA-uVNTR, COMT Val158Met

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 Shizofrenija	1
1.1.1 Biološka osnova shizofrenije	3
1.2 Dopaminski putevi	5
1.2.1 Dopaminski transporter i katekol-o-metil-transferaza	6
1.2.1.1 Dopaminski transporter (DAT-VNTR polimorfizam)	6
1.2.1.2 Katekol-o-metil-transferaza (COMT Val158Met polimorfizam)	7
1.3 Serotoninski put	9
1.3.1 Serotoninski transporter i monoamino-oksidaza A	10
1.3.1.1 Serotoninski transporter (5-HTTLPR polimorfizam)	10
1.3.1.2 Monoamino-oksidaza A (MAOA-uVNTR polimorfizam)	12
1.4 Interakcija dopaminskog i serotoninskog sustava	14
1.4.1 Serotonergična inhibicija dopaminske funkcije u srednjem mozgu	14
1.5 Kategorizacija mentalnih poremećaja	16
1.6 Dijagnoza shizofrenije	16
1.7 Dijagnoza i dimenzije simptoma	17
1.8 Terapija shizofrenije	18
2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
2.1 Hipoteza	20
2.2 Ciljevi istraživanja	20
2.2.1 Usporediti zdrave i bolesne ispitanike	20
2.2.2 Usporediti skupine ispitanika sa shizofrenijom	20
2.2.3 Uspostaviti regresijski model za predviđanje shizofrenije	20
3 MATERIJALI I METODE	21
3.1 Ispitanici	21
3.2 Genotipizacija	22
3.2.1 Izolacija DNA	22
3.3 Lančana reakcija polimeraze – PCR (<i>engl. Polymerase chain reaction</i>)	22
3.4 5-HTTLPR	24
3.5 DAT-VNTR	25
3.6 MAOA-uVNTR	26
3.7 COMT Val158Met	27
3.8 Postavljanje dijagnoze	28
3.9 Statistička obrada	29

4 REZULTATI	31
4.1 Demografski podaci	31
4.2 Rezultati genotipizacije	32
4.2.1 Polimorfizam COMT Val158Met	32
4.2.2 Polimorfizam DAT-VNTR	34
4.2.3 Polimorfizam MAOA-uVNTR	35
4.2.4 5-HTTLPR polimorfizam	36
4.3 Distribucija genotipova po skupinama	36
4.4 Usporedba distribucije genotipa između zdravih i bolesnih	39
4.4.1 MAOA-uVNTR	39
4.4.2 Serotoninski transporter	40
4.4.3 Katekol-o-metil-transferaza	41
4.4.4 Dopaminski transporter	42
4.5 Ispitanici sa dijagnozom shizofrenije	43
4.6 Logistička regresija	61
5 RASPRAVA	63
6 ZAKLJUČCI	74
6.1 Usporedba zdravih i bolesnih ispitanika	74
6.2 Usporedba skupina ispitanika sa shizofrenijom	74
6.3 Postavljanje regresijskog modela za predviđanje shizofrenije	74
7 LITERATURA	75
8 POPIS KRATICA	83
9 ŽIVOTOPIS	85
9.1 Popis radova	86
9.1.1 Radovi indeksirani u Current content časopisima	86
9.1.2 Radovi u ostalim časopisima:	86
9.1.3 Posterski sažeci	87

1 UVOD

1.1 Shizofrenija

Shizofrenija je psihički poremećaj čija biološka osnova još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Teorija o nastanku ovog poremećaja kroz povijest je privlačila interes mnogih stručnjaka te je s vremenom prolazila kroz mnoge promjene. Istaknuta imena koja su otvorila povijest ovog poremećaja su Emil Kraepelin (1856. – 1926.) i Eugen Bleuler (1857. – 1939.). E. Kraepelin prvi uvodi pojam *dementia precox* koji opisuje rani nastanak demencije praćen simptomima kao što su halucinacije i deluzije te počinje razlikovati pacijente sa simptomima paranoje, odnosno manično-depresivne psihoze. Primjećuje da pacijenti sa manično-depresivnom psihozom između epizoda bolesti prolaze kroz periode normalnog funkcioniranja, za razliku od pacijenata s paranojom čije je stanje bilo konstantno. E. Bleuler prvi put uvodi termin shizofrenija umjesto *dementia precox*, koji predstavlja raskol misli, emocija i ponašanja kod zahvaćenih pacijenata (1).

Danas je poznato da je shizofrenija moždani poremećaj koji zahvaća oko 1% populacije, međutim patogeneza ovog poremećaja još uvijek nije objašnjena. Na postojanje genetske osnove za nastanak shizofrenije, upućuju podaci epidemioloških istraživanja u kojima se pokazalo da veći rizik od nastanka ove bolesti imaju osobe koje u obiteljskoj anamnezi imaju zabilježen slučaj shizofrenije. 10% veći rizik imaju oni koji u prvom koljenu imaju srodnika sa shizofrenijom. Isto su pokazala istraživanja u kojima su praćena posvojena djeca. Ukoliko je biološki roditelj imao shizofreniju, ta djeca su imala veći rizik za razvoj shizofrenije, neovisno o okolini odrastanja. Ipak, nasljeđivanje ne prati jednostavan Mendelov model nasljeđivanja. Radi se o kompleksnom poremećaju i vrlo vjerojatno o skupini gena koji ne dolaze do izražaja ukoliko se ne pojavi okidač iz okoline (2, 3, 4).

Općenito, shizofrenija se manifestira kroz tri skupine simptoma: pozitivni, negativni i kognitivni. Pozitivne simptome najčešće karakteriziraju halucinacije i deluzije kao i abnormalnosti u govoru, razmišljanju i ponašanju. Halucinacije se definiraju kao pogrešna percepcija nečega što nije prisutno, a mogu biti vizualne, auditorne, taktilne ili olfaktorne. Deluzije se definiraju kao pogrešna vjerovanja ili uvjerenja koja nemaju veze sa stvarnošću (5). Od negativnih simptoma javljaju se problemi sa komunikacijom, razmišljanjem i izražavanjem osjećaja. Do izražaja dolazi asocijalno ponašanje, poteškoće u osjećanju zadovoljstva (ahedonija) nedostatak motivacije (avolucija) i afektivno zaravnavanje. Kognitivne simptome

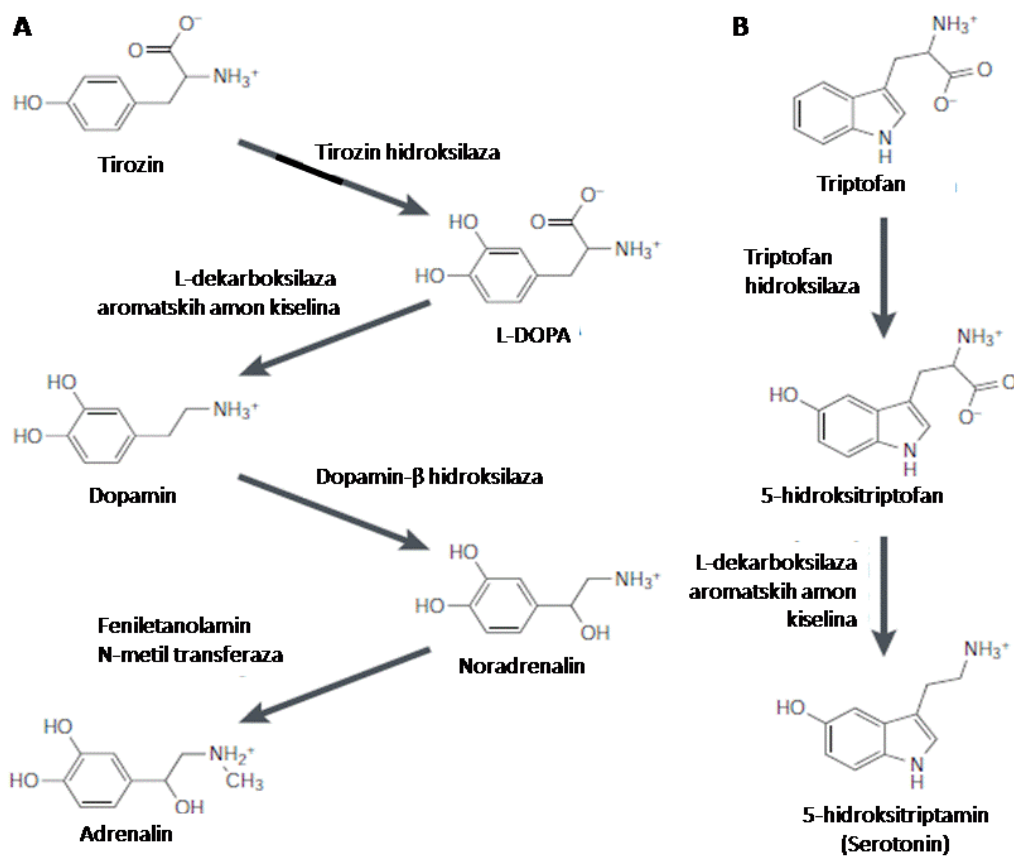
karakteriziraju poremećaj pamćenja, učenja te procesuiranja informacija. Također, od kognitivnih simptoma prisutni su pogrešno tumačenje događaja te pogrešno procesuiranje emocija (6).

Istraživanja provedena na mozgu oboljelih od shizofrenije pokazala su da se radi o poremećaju moždane funkcije. Provedena su slikovnim tehnikama koje ukazuju na značajne neuroanatomske promjene kao što je povećanje ventrikula, te smanjenje sive i bijele tvari. Neuroanatomske promjene karakteristične za shizofreniju su smanjen kortikalni volumen i smanjena debljina korteksa što je najviše izraženo u temporalnom korteksu i frontalnom režnju. Funkcionalnom magnetskom rezonancijom utvrđene su promjene u aktivaciji dorzolateralnog prefrontalnog korteksa, medijalnog temporalnog režnja, hipokampusu, striatumu i talamusu (7, 8).

Za psihijatrijske bolesti ne postoji biokemijski biljeg ili dijagnostički postupak na temelju kojeg bi se postavila dijagnoza. Psihološke promjene mogu biti povezane sa organskim uzrocima, stoga je bitno isključiti iste kako bi se postavila pravilna dijagnoza i primijenila odgovarajuća terapija. Sama etiologija shizofrenije do danas nije u potpunosti razjašnjena, ali uočene neuroanatomske promjene vjerojatno su rezultat poremećaja u razvoju mozga. Shizofrenija se danas povezuje sa promjenama dopaminskog sustava odnosno izmijenjenom koncentracijom dopamina u određenim dijelovima mozga u odnosu na zdravu populaciju. Bolest koja se također povezuje s dopaminskim sustavom je Parkinsonova bolest. Bolest zahvaća 2-3% populacije u dobi starijoj od 65 godina, a manifestira se kroz poremećaj motoričke funkcije kao što su tremor, bradikinezija (usporeni pokreti) i rigidnost (povećan mišićni tonus). Navedeni simptomi nastaju kao posljedica propadanja primarno dopaminergičkih neurona (9). Pacijenti osim simptoma Parkinsonove bolesti često dožive simptome psihoze kao što su halucinacije i deluzije. Simptomi psihoze mogu biti posljedica uzimanja lijekova, agonista dopamina, ili neovisno o terapiji, što ukazuje na lošiji tijek bolesti. Osim psihoze, kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću javlja se depresija (10). Kao što pacijenti sa Parkinsonovom bolešću mogu razviti simptome shizofrenije, tako i pacijenti sa shizofrenijom mogu razviti simptome karakteristične za Parkinsonovu bolest. Simptomi parkinsonizma kod oboljelih od shizofrenije mogu se objasniti dugotrajnim liječenjem shizofrenije antipsihoticima što dodatno podupire dopaminsku hipotezu shizofrenije. Neka istraživanja pokazala su da parkinsonizam kod shizofreničara ne mora biti nužno posljedica upotrebe blokatora D2 receptora, već da se kod oboljelih od shizofrenije mogu javiti lezije u nigro-strijatalnoj regiji koje su odgovorne za pojavu simptoma (11).

1.1.1 Biološka osnova shizofrenije

Kao što je već spomenuto, patogenetski procesi vezani uz nastanak shizofrenije do danas još nisu razjašnjeni. Još uvijek, najčvršća hipoteza koja je predmet istraživanja je dopaminska hipoteza nastanka shizofrenije prema kojoj centralnu ulogu ima neurotransmiter dopamin odnosno dopaminski sustav. Projekcije dopaminskog sustava, prate i projekcije serotoninog sustava zbog čega se ova dva neurotransmitera, dopamin i serotonin dovode u vezu sa shizofrenijom. Interakcija ova dva sustava bit će objašnjena kasnije.



Slika 1. Sinteza dopamina i serotonina. Ključni biosintetski enzim dopamina je tirozin hidroksilaza, a ključni biosintetski enzim serotonina je triptofan hidroksilaza. Posredovanjem dopamin-β hidroksilaze iz dopamina nastaje noradrenalin iz kojeg uslijed djelovanja feniletanolamin N-metil transferaze nastaje adrenalin. Preuzeto i prilagođeno iz (12).

Živčani sustav izuzetno je kompleksan i sastoji se od velikog broja živčanih stanica koje međusobno stupaju u interakciju. Kako bi se osigurala primjerena komunikacija među stanicama i sama funkcija neurološkog sustava, za vrijeme razvoja bitna je usklađenost procesa koji reguliraju sintezu neurotransmitera. Ekspresija enzima koji će sudjelovati u sintezi

neurotransmitera iz odgovarajuće molekule, kao i regulaciju ekspresije odgovarajućih transportera odgovornih za njihov transport, mehanizmi su koji reguliraju sintezu neurotransmitera te moraju biti usklađeni sa razvojem sinapsi i usmjeravanjem aksona (12).

Katekolaminergičnim neuronima pripadaju oni neuroni koji sintetiziraju katekolamine, odnosno dopamin, adrenalin i noradrenalin. Katekolamini i serotonin jednim imenom nazivaju se monoamini, a pripadajući neuroni monoaminergični neuroni.

Dopamin nastaje u crnom tijelu (substantia nigra) i ventralnom tegmentumu. Poremećaj koncentracije dopamina u crnom tijelu, ventralnom tegmentumu, striatumu, prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraz je poremećaja u dopaminskom sustvu (13).

Dopamin pripada skupini katekolamina i njegova sinteza započinje iz aminokiseline tirozina uz enzim tirozin hidroksilazu uslijed čega nastaje L-DOPA. Dekarboksilaza aromatskih aminokiselina posreduje konverziju L-DOPA u dopamin. Serotonin nastaje iz triptofana uz triptofan-hidroksilazu pri čemu nastaje 5-hidroksitriptofan. Enzim koji katalizira reakciju pretvorbe 5-hidroksitriptofana u 5-hidroksitriptamin (serotonin) je dekarboksilaza aromatskih aminokiselina, isti enzim koji sudjeluje u sintezi dopamina. Premda u biosintezi dopamina i serotonina sudjeluje isti enzim, dopaminergički i serotonergički neuroni razlikuju se po ekspresiji ključnog biosintetskog enzima, tirozi-hidroksilaze odnosno triptofan-hidroksilaze. Slika 1. prikazuje sintezu dopamina i serotonina.

Prva osnova za postavljanje dopaminske teorije temeljila se na otkriću antipsihotika za koje se pokazalo da blokiraju dopaminske D2 receptore čime dolazi do poboljšanja simptoma. Odnosno, pojačana aktivacija D2 receptora u subkortikalnoj regiji, dovodi do pojave simptoma psihoze (14). Kasnije je uočeno da nedovoljna aktivacija D1 receptora koji se nalaze u prefrontalnom korteksu uzrokuje negativne i kognitivne simptome (15). Shizofrenija se dugo smatrala jedinstvenom dijagnozom i u obzir se nije uzimala genetička komponenta niti dimenzije simptoma.

Razvoj slikovnih tehnika omogućio je nova saznanja o raspodjeli dopaminskih receptora koja nije jednaka u svim dijelovima mozga, odnosno D1 receptori pretežno su smješteni u korteksu, a D2 subkortikalno. Istraživanja provedena pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) pokazala su da je smanjen protok krvi u prefrontalnom korteksu popraćen smanjenom koncentracijom metabolita dopamina u likvoru što ukazuje na regionalni poremećaj moždane funkcije kod pacijenata sa shizofrenijom. Ovi rezultati počeli su ukazivati na to da je shizofrenija povezana sa sniženom koncentracijom dopamina u prefrontalnom korteksu (prefrontalna hipodopaminergija) i povišenom koncentracijom dopamina u subkortikalnoj

regiji (subkortikalna hiperdopaminergija). Simptomatologija shizofrenije je kompleksna, zbog čega su istraživanja usmjerena na simptomatologiju pokazala da se frontalna hipodopaminergija može povezati sa negativnim simptomima, a striatalna hiperdopaminergija sa pozitivnim simptomima (16).

Nakon što je utvrđena povezanost hipo i hiperdopaminergije u određenim djelovima mozga ispitanika sa shizofrenijom, u istraživanja su uključeni i genski čimbenici te utjecaj okoliša što je počelo ukazivati na dimenzijsku narav samog poremećaja. Danas su simptomi izdvojeni u dimenzije dobivene faktorskom analizom, a neki od njih su: pozitivni, negativni, afektivni i kognitivni simptomi te neorganiziranost.

Poremećena regulacija presinaptičkog dopamina ukazuje na neke bitne kliničke činjenice. Antipsihoticima se ne tretira primarni poremećaj već se radi blokada dopaminskih receptora (D2) kako bi se spriječio učinak neprikladnog oslobađanja dopamina. Paradoksalno, ovo može dovesti do pogoršanja jer kompenzatorno dolazi do porasta sinteze dopamina.

1.2 Dopaminski putevi

Projekcije dopaminskih neurona mogu se podijeliti na 4 dopaminska puta.

Nigrostrijatalni – kako sam naziv kaže, polazište projekcije ovog puta nalazi se u crnom tijelu (substantia nigra) te seže do corpus striatum. Nigrostrijatalni put pripada ekstrapiramidalnom živčanom sustavu te sudjeluje u regulaciji motorike. Propadanje neurona u ovom putu dovodi do nastanka Parkinsonove bolesti. Budući da se Parkinsonova bolest često povezuje sa depresijom, smatra se da je nigrostrijatalni put osim regulacije motorike uključen i u regulaciju raspoloženja.

Mezolimbički i mezokortikalni put obuhvaćaju tijelo aksona u ventralnom tegmentumu smješteno uz crno tijelo (substantia nigra) čije se projekcije šire prema velikom dijelu cerebralnog korteksa i limbičkog sustava. Mezolimbički put bitan je za emocije i ponašanje a posebnu ulogu ima kod poremećaja razmišljanja, deluzija i auditornih halucinacija. Smatra se da bi ova dva puta mogla bi biti uključena u posredovanje djelovanja antipsihotika.

Tuberoinfundibularni put započinje u luku nukleusa i periventrikularnom dijelu hipotalamusa te seže do prednjeg dijela hipofize. U ovom dijelu mozga, dopamin inhibira oslobađanje prolaktina te ukoliko dođe do nedostatka dopamina uslijed oštećenja ili primjene lijekova, može se javiti porast koncentracije prolaktina u serumu (1, 17).

Dopamin svoje djelovanje ostvaruje putem dopaminskih receptora grupiranih u dvije skupine. Skupini D1 pripadaju D1 i D5 a skupini D2 pripadaju D2, D3, i D4. Raspodjela tih receptora

nije jednaka u svim dijelovima mozga, tako su D1 najizraženiji u kortikalnoj regiji, D2 u striatumu, a D3 i D4 u limbičkoj regiji. Presinaptički dopaminski receptori reguliraju podražaj dopaminskog neurona ako su smješteni na staničnom tijelu. Ako se takvi receptori nalaze na završecima aksona dopaminskog neurona, reguliraju oslobađanje dopamina. Dopaminski receptori na postsinaptičkim neuronima reguliraju djelovanje dopamina na nedopaminergičnim neuronima (18).

Za regulaciju djelovanja dopamina odgovoran je dopaminski transporter koji vraća dopamin u presinaptički neuron i katekol-o-metil-transferaza koja sudjeluje u razgradnji dopamina.

Od tri dopaminska puta smatra se da promjene u mezolimbikom-mezokortikalnom putu imaju ulogu u patogenezi shizofrenije (19).

1.2.1 Dopaminski transporter i katekol-o-metil-transferaza

1.2.1.1 Dopaminski transporter (DAT-VNTR polimorfizam)

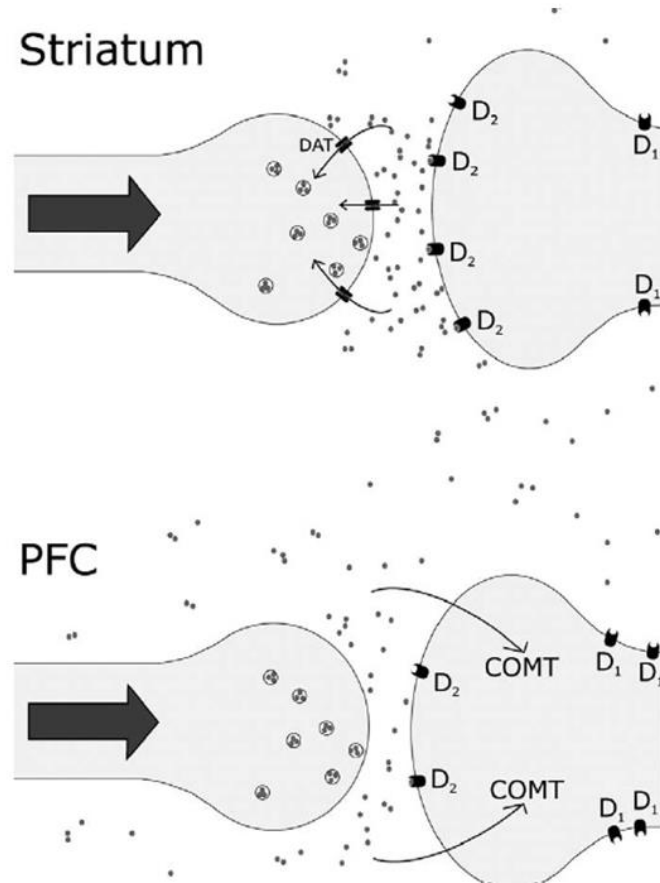
Gen za dopaminski transporter nalazi se na kromosomu 5p15.33, a odobreni simbol prema HUGO *Gene Nomenclature Committee* je SLC6A3. Često korišteni simboli su DAT1 ili DAT. Dopaminski transporter nalazi se na presinaptičkom završetku neurona gdje je odgovoran za vraćanje dopamina u presinaptički neuron. Na taj se način regulira prijenos signala posredovan dopaminom (20). Pripada skupini transportera ovisnih o natrijevim i kloridnim ionima, a djeluje tako da vraća dopamin u presinaptički neuron. Ovaj mehanizam kojim se regulira djelovanja dopamina dokazan je i u istraživanjima na životinjskim modelima. Štoviše, uočeno je da su miševi bez gena za dopaminski transporter razvili niz kompenzacijskih mehanizama u svrhu regulacije djelovanja dopamina što govori u prilog činjenici da dopaminski transporter ima bitnu ulogu u cijelom dopaminskom sustavu (21).

VNTR (engl. *Variable Number Tandem Repeats*) polimorfizam gena za dopaminski transporter nalazi se u 3' UTR (engl. *untranslated*) regiji, a čini ga sekvenca od 40 pb koja se ponavlja od najmanje 3 do najviše 11 puta. Premda se frekvencija alela sa različitim brojem ponavljanja značajno razlikuje među različitim populacijama, aleli sa 10 i 9 ponavljanja su najčešći (22, 23).

Ovaj polimorfizam povezuje se sa promjenom u ekspresiji gena na način da je ekspresija gena veća kod alela sa 10 ponavljanja u odnosu na alel 9 (24).

Dopaminski transporter u većoj se mjeri nalazi u striatumu u odnosu na njegovu količinu u prefrontalnom korteksu. S obzirom na njegovu ulogu u regulaciji dopamina, ovaj polimorfizam

povezuje se sa shizofrenijom i nekim njezinim simptomima (25) alel 10 ovog polimorfizma povezuje se sa poremećajem pažnje s hiperaktivnošću - ADHD (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*) (26). Osim sa ADHD, polimorfizam dopaminskog transportera povezuje se sa shizofrenijom i Parkinsonovom bolešću (27).



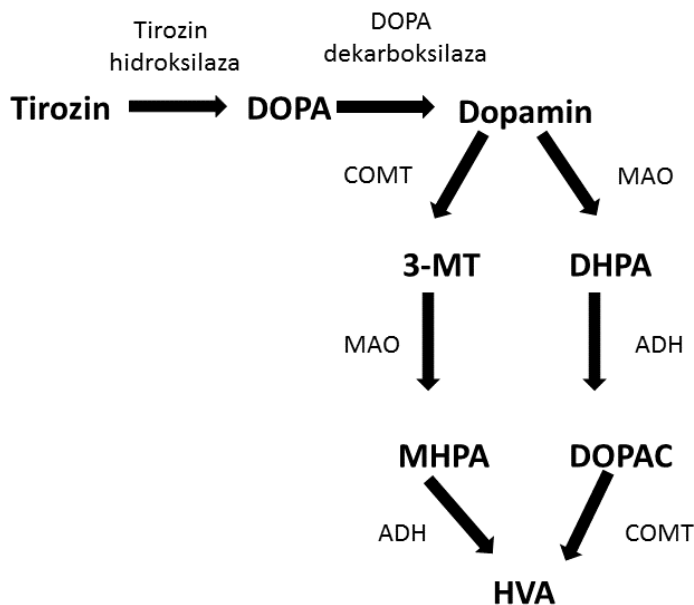
Slika 2. Uloga dopaminskog transportera (DAT) i katekol-o-metil transferaze (COMT) u striatumu i prefrontalnom korteksu (PFC). DAT je odgovoran za uklanjanje dopamina iz presinaptičke pukotine u striatumu. Zbog nedostatka dopaminskog transportera u sinaptičkoj pukotini striatuma, COMT ima glavnu ulogu u inaktivaciji dopamina. Preuzeto i prilagođeno iz (101).

1.2.1.2 Katekol-o-metil-transferaza (COMT Val158Met polimorfizam)

Gen za katekol-o-metil-transferazu nalazi se na kromosomu 22q11.21, a odobreni simbol prema HUGO, *Gene Nomenclature Committee* je COMT.

COMT je enzim koji sudjeluje u inaktivaciji dopamina na način da sudjeluje u metilaciji hidroksilne skupine katekolamina posredovanu S-adenozil-L-metioninom. Pri ovoj konverziji, dopamin prelazi u metanefrin te u konačni produkt – homovanilinsku kiselinu (28). U odnosu na dopaminski transporter COMT se u većoj mjeri nalazi u prefrontalnom korteksu, dok je

slabije zastupljen u striatumu. Postoje dvije izoforme: kraća S ili solubilna izoforma i duža MB-vezana na membrane koja je ujedno u najvećoj mjeri prisutna u mozgu. Polimorfizam koji se manifestira kao supstitucija valina na poziciji 158 u metionin, odnosno zamjena G>A dovodi do veće termolabilnosti enzima koji kao posljedicu ima smanjenu aktivnosti enzima. Supstitucija valina metioninom na poziciji 158 događa se u dužoj izoformi dok se ova supstitucija može naći i u kraćem obliku enzima ali na poziciji 108 (29,30).



Slika 3. Sinteza i razgradnja dopamina. U razgradnji dopamina sudjeluju: enzimi katekol-o-metil transferaza (COMT), monoamino oksidaza (MAO) i aldehyd dehidrogenaza (ADH). Međuprodukti koji nastaju su: 3-metoksitiramin (3-MT), 3,4-dihidroksifenilacetaldehyd (DHPA), 3-metoksi-4-hidroksifenilacetaldehyd (MHPA), 3,4-dihidroksifeniloctena-kiselina (DOPAC). Konačni produkt je homovanilinska kiselina (HVA)) Preuzeto i prilagođeno iz: (101).

Uočeno je da dopamin ima važnu ulogu u kognitivnim sposobnostima ispitanika sa shizofrenijom stoga je COMT postao predmet istraživanja biološke osnove shizofrenije (31, 32). Sljedeći razlog zbog kojeg se COMT počeo dovoditi u vezu sa shizofrenijom je mikrodelecija u regiji kromosoma 22q11.2, u kojoj se nalazi i gen za COMT, a dovodi do nastanka velokardiofacijalnog sindroma (VCFS). Ovaj se sindrom manifestira karakterističnom dismorfologijom, kongenitalnim srčanim bolestima i kognitivnim oštećenjem. Kod djece sa

VCFS uočena je anksioznost, poremećaji raspoloženje, ADHD i opsesivno kompulzivni poremećaj. Kod odraslih sa ovim sindromom vrlo često se uočava psihoza (33).

COMT Val158Met povezuje se s agresivnim ponašanjem u shizofreniji (34). Zbog preklapanja dopaminskog i serotoninskog sustava u limbičkoj regiji nameće se pretpostavka da su oba puta uključena u ponašanje. Mutacija MAOA gena povezuje se sa nižim stupnjem inteligencije, gubitkom kontrole impulsa i veća sklonost kriminalnim radnjama kod zahvaćenih muškaraca. Kako je MAOA uključen u metabolizam dopamina i serotonina, teško je reći koji je sustav neurotransmisije odgovoran za agresivno ponašanje (35).

1.3 Serotoninski put

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je neurotransmitter koji sudjeluje u regulaciji velikog broja neuroloških i fizioloških funkcija. Djeluje kao tkivni hormon, mitogen i neuromodulator (36). Njegova široka fiziološka uloga ispitana je na različitim životinjskim modelima koji ukazuju da je bitan u samom procesu razvoja mozga još u vrijeme embrionalnog razvoja. Na primatima je uočeno da prije formiranja *raphe nuclei* dolazi do opskrbe mozga serotoninom putem placente. Djelovanje serotonina ovisi o vrsti stanica i dijelovima mozga te o fazama razvoja (37). Osim što sudjeluje u procesu grananja neurona tako što niža koncentracija serotonina potiče grananje aksona, a viša koncentracija smanjuje grananje, serotonin je uključen i u proces sinaptičke plastičnosti (38, 39).

Serotoninski neuroni smješteni su u tegmentumu moždanog debla u jezgrama zvanim *raphe nuclei* iz kojeg polaze dva uzlazna i dva silazna puta. Projekcije koje polaze iz dorzalnog dijela *raphe nuclei* sežu do korteksa i strijatalne regije. Projekcije medijalne *raphe nuclei* sežu do limbičke regije (18).

5-HT₁ skupina receptora je najbrojnija, a uključuje podtipove A, B, D i F. 5-HT_{1A} receptori u najvećoj mjeri nalaze se u limbičkom području i *raphe nuclei*. Na životinjskom modelu otkriveno je da se 5-HT_{1B} receptori nalaze se na serotonergičkim i nesorotonergičkim neuronima. Oba tipa ovih receptora osim na postsinaptičkoj membrani mogu biti smješteni i na presinaptičkom neuronu gdje imaju ulogu regulatora otpuštanja serotonina.

Dok se 5-HT_{1A} receptori nalaze na tijelu neurona i dendritima, 5-HT_{1B} nalaze se na neuronima različitih neuroloških puteva i sudjeluju u regulaciji različitih neurotransmitera.

5-HT₂ receptori smješteni su u kortikalnom području. Na životinjskim modelima otkrivena je njegova uloga modulatora u procesu sinaptičke plastičnosti. Put kojim se ostvaruje regulacija

sinaptičke plastičnosti polazi od aktivacije fosfolipaze A2 što dovodi do oslobađanja arahidonske kiseline i stimulacije MAP kinaze uključujući Erk1 i Erk2.

5-HT₃ receptor jedini je vezan na ionske kanale, a smješteni su kao presinaptički ili postsinaptički neuroni u korteksu i još nekim drugim strukturama mozga. U limbičkoj regiji sudjeluju u oslobađanje GABA-e (40).

Serotonin svoje djelovanje izražava preko serotoninских receptora koji su klasificirani u 7 skupina. Skupine 5HT₁ i 5HT₅ pripadaju inhibicijskim receptorima, a skupine 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₆ i 5HT₇ pripadaju ekscitacijskim receptorima. Serotoninski receptori podijeljeni su u 3 grupe. U 5-HT₁ grupu spadaju receptori koji za prijenos signala koriste G-protein (5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}). U grupu 5-HT₂ spadaju receptori koji koriste fosfoinozitol kao posrednik prijenosa signala (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} i 5-HT₄). Ove skupine receptora pripadaju grupi metabotropnih receptora, za razliku od treće skupine koja pripada ionotropnim receptorima – 5-HT₃ receptor. Ovako velik broj receptora omogućava širok spektar djelovanja serotonina.

Serotoninski transporter u većoj je mjeri odgovoran za uklanjanje serotonina iz sinaptičke pukotine dok se MAOA koji sudjeluje u metabolizmu serotonina nalazi u mitohondrijima (41).

1.3.1 Serotoninski transporter i monoamino-oksidaza A

1.3.1.1 Serotoninski transporter (5-HTTLPR polimorfizam)

Serotonin kao neurotransmiter posreduje mnoge fiziološke funkcije kao što su spavanje, motorička aktivnost, reproduktivna aktivnost, unos hrane. Trajanje i jačinu serotoninskog podražaja regulira serotoninski transporter čija je uloga vraćanje serotonina u presinaptičku pukotinu. Aktivnost serotoninskog transportera posebno dolazi do izražaja u limbičkom sustavu koji je odgovoran za emocionalno ponašanje (42).

Serotoninski transporter ovisan je o Na⁺ i Cl⁻ ionima tako što se na jedno dostupno mjesto sa vanjske strane stanice, simultano vežu serotonin, Na⁺ i Cl⁻. Ovo vezanje omogućava konformacijsku promjenu što dovodi do zatvaranja vanjskog dijela i otvaranja pristupnog mjesta na citoplazmatskoj strani membrane. Kada serotonin, Na⁺ i Cl⁻ disociraju, K⁺ ioni, vežu se na njihovo mjesto što dovodi do nove konformacijske promjene, odnosno vraćanja transportera u položaj gdje je mjesto vezanja serotonina dostupno na vanjskoj strani membrane (43). Serotoninski transporter nalazi se na presinaptičkom neuronu i odgovoran je za vraćanje

serotonina čime se prekida daljnji podražaj. Ova uloga serotoninskog transportera čini ga glavnim regulatorom djelovanja neurotransmitera serotonina (44).

U ovom radu ispitan je insercijsko delecijski polimorfizam u promotorskoj regiji gena za serotoninski transporter smješten na kromosomu 17q11.2. Sam gen opisan je u GeneBank bazi podataka pod brojem: X76753 uz odobreni naziv: *solute carrier family 6 member 4* (odobreni simbol: SLC6A4) (45). Sinonim pod kojima se ovaj gen opisuje su: SERT1, 5-HTT.

Funkcionalni polimorfizam (5-HTTLPR – engl. *serotonin-transporter-linked polymorphic region*) koji čini 44pb duga sekvenca, utječe na transkripcijsku aktivnost gena gdje je «long» (L) alel odgovoran za 2 puta učinkovitiju ekspresiju u odnosu na «short» (S) alel. Istraživanja su pokazala da se sinteza mRNA i ekspresija serotoninskog transportera razlikuju kod S alela u odnosu na L alel (46).

U populaciji bijelaca, frekvencije L alela iznose 57% te 43% za S-alel (43). Frekvencije ovih alela značajno se razlikuju u populaciji Afroamerikanaca i Azijata. U jednom istraživanju za populaciju Afroamerikanaca utvrđena je frekvencija S-alela od 13%, a L-alela 87% (47), dok je u drugom istraživanju na populaciji Azijata frekvencija L alela iznosila 19%, a S-alela 81% (48).

Istraživanja su pokazala da serotonin kao modulator ponašanja ima značajnu ulogu u nastanku depresivnog poremećaja, naročito serotoninski transporter koji regulira koncentraciju serotonina u sinaptičkoj pukotini, a time i njegovo djelovanje. Drugi mehanizam koji serotoninski transporter povezuje sa depresijom je činjenica da je upravo on mjesto djelovanja nekih lijekova – selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (engl. *SSRI, Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) pa se navedeni polimorfizam u nekim istraživanjima povezuje sa smanjenim odgovorom na terapiju selektivnim inhibitorima ponovne pohrane serotonina (49, 50).

S alel povezuje se sa povećanom aktivnošću amigdale kao odgovor na strah ili neugodna iskustva te sa anksioznim poremećajem. Smatra se da S-alel predisponira razvoju depresije kod djece koja su proživjela zlostavljanje (51, 52).

Serretti i suradnici proveli su meta analizu kojom su ispitali povezanost odgovora na terapiju SSR inhibitorima sa polimorfizmom serotoninskog transportera. Njihova analiza pokazala je da uzevši u obzir opću populaciju bijelaca i azijata, postoji povezanost između dobrog odgovora na terapiju i LL genotipa. Također, ispitivanje je pokazalo da SS nositelji teže postižu remisiju. Kod populacije bijelaca, čini se da postoji blaga povezanost lošijeg odgovora na terapiju i S alela (LS i SS genotip). Kada je testirana povezanost SS genotipa sa odgovorom na terapiju u

populaciji bijelaca, ta povezanost nije uočena (53). Treba uzeti u obzir populaciju na kojoj se vrši ispitivanje jer je frekvencija S alela značajno veća u Azijskoj populaciji (79%) u odnosu na populaciju bijelaca (42%) što je u spomenutom istraživanju dovelo do povezanosti S alela sa lošijim odgovorom kada su analizirane obje populacije dok povezanost samo u populaciji bijelaca nije uočena. Bilo bi logično očekivati da će pacijenti s lošim odgovorom na SSRI pokazati bolji odgovor na drugu vrstu terapije kao što su inhibitori ponovne pohrane noradrenalina (NARI, engl. *noradrenaline reuptake inhibitor*). Međutim istraživanje koje su proveli Lewis i suradnici ukazuje na to da ne postoji povezanost polimorfizma sa odgovorom na terapiju antidepressivima (54).

Osim depresije, 5-HTTLPR polimorfizam povezuje se sa lošijim odgovorom na terapiju antipsihoticima posebno ukoliko je prisutan SNP polimorfizam L alela gdje dolazi do supstitucije adenina gvaninom (A>G). Ovaj polimorfizam koji može biti prisutan samo u L-alelu funkcionalno je sličan S alelu (55). Osim odgovora na terapiju, predmet istraživanja bila je i povezanost polimorfizma sa samim poremećajem pa je L_AL_A genotip povezan sa opsesivno kompulzivnim poremećajem, a LL genotip neovisno o prisutnosti SNP polimorfizma povezan je sa podtipovima shizofrenije (56, 57, 58).

1.3.1.2 Monoamino-oksidaza A (MAOA-uVNTR polimorfizam)

Monoamino-oksidaza jest mitohondrijski enzim koji sadrži flavin, a katalizira degradaciju bioloških amina kao što su serotonin, norepinefrin i dopamin (59). Kod ljudi se javlja u dva izoenzima kao MAOA koji oksidira serotonin i MAOB koji kao supstrat preferira feniletilamin i benzilamin. Dopamin podjednako razgrađuju oba izoenzima. U mozgu čovjeka, MAOB pretežno je zastupljen u astrocitima i serotonergičnim neuronima, dok su visoke razine MAOA nađene u katekolaminergičnim neuronima. Oba izoenzima nalaze se na vanjskoj strani mitohondrija smještenih u presinaptičkom i postsinaptičkom neuronu te okolnim glija stanicama. Zbog navedenog, njihovo djelovanje moguće je nakon unosa supstrata u neuron odnosno glija stanice (60, 61).

Odobreni naziv gena za MAOA prema HUGO Gene Nomenclature Committee je MAOA uz pripadajući broj: m89636. Lociran je na kratkom kraku kromosoma X, lokacija Xp11.3 (59).

U ovom radu ispitivan je MAOA-u VNTR (engl. *upstream variable number tandem repeats*) polimorfizam smješten je 1.2 kb uzvodno od kodirajuće regije za MAOA. Ovaj polimorfizam opisuje sekvenca od 30 pb koja se uzastopno ponavlja u 3, 3.5, 4 ili 5 kopija. Motiv od 30 ponavljanja sastoji se od 5 ponavljanja središnje sekvence: ACC(A/G/C)G(C/T). U konačnici ponavljajuća sekvenca izgleda ovako: ACCGGCACCGGCACCAGTACCCGCACCAGT. a

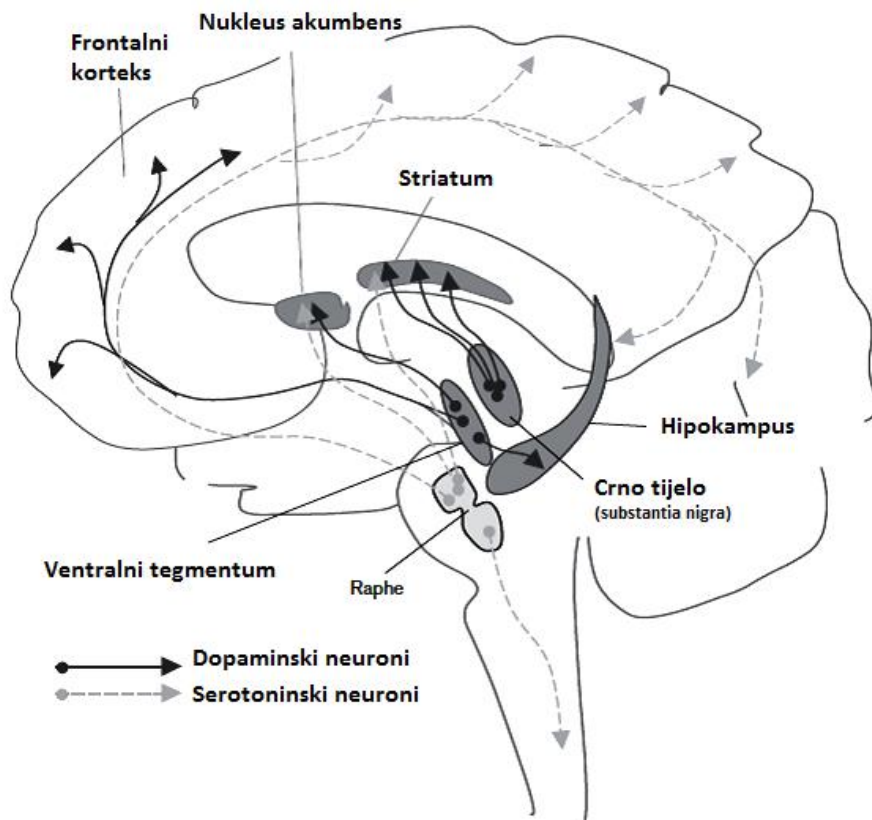
može se pojavljivati u 3; 3,5; 4 ili 5 kopija sekvence od 30pb. Pokazalo se da ovaj polimorfizam utječe na transkripcijsku aktivnost gena pa je transkripcija alela sa 3,5 (alel 2) i 4 (alel 3) ponavljanja 2-10 puta učinkovitija u odnosu na alele sa 3 (alel 1) ili 5 (alel 4) ponavljanja. Prema literaturnim podacima, frekvencije alela 1, 2, 3, i 4 redom iznose: 33,1%; 0,5%; 64,8% i 1,6% (59). Radi jednostavnijeg razumijevanja daljnjeg teksta aleli sa 3,5 i 4 ponavljanja označavat ćemo kao alele visoke aktivnosti - *High*, a alele sa 3 i 5 ponavljanja kao alele niske aktivnosti *Low*.

Bruner i suradnici opisali su mutaciju gena za MAOA u eksonu 8 koja dovodi do deficita enzima. Muški članovi obitelji koja je opisana pokazivali su znakove abnormalne agresije i granične mentalne retardacije, a slični rezultati dobiveni su na životinjskom modelu. Laboratorijski miševi bez MAOA pokazivali su znakove agresije (62, 63).

Ovakvi rezultati potaknuli su istraživanja povezanosti MAOA polimorfizama sa poremećajima ponašanja. MAOA-uVNTR polimorfizam nije smješten u samom genu već u njegovoj kodirajućoj regiji koja za posljedicu ima smanjenu transkripciju gena. Pod hipotezom da bi smanjena transkripcija dovela do smanjene količine dostupnog enzima, a time posljedično smanjene razgradnje bioloških amina, provedena su istraživanja povezanosti psihijatrijskih poremećaja i MAOA-uVNTR polimorfizma. U jednom istraživanju ovaj polimorfizam povezan je sa depresijom kod žena koje su već imale epizodu depresivnog poremećaja (64), dok je u drugom istraživanju uočena značajna povezanost u prisutnosti drugih polimorfizama MAOA gena (65). Kod pacijenata sa shizofrenijom uočena je povezanost MAOA-uVNTR polimorfizma sa alogijom (slabost govora) i afektivnim zaravnavanjem (66).

1.4 Interakcija dopaminskog i serotoninskog sustava

Kako je već ranije navedeno do sada najzastupljenija hipoteza koja objašnjava patogenezu shizofrenije je dopaminiska hipoteza prema kojoj se disfunkcija dopaminskog sustava objašnjava prefrontalnom hipodopaminergijom i subkortikalnom hiperdopaminergijom. Međutim, projekcije dopaminskog puta, prate i projekcije serotoninskog puta za koji se pokazalo da ima inhibitorni učinak na dopaminski sustav.



Slika 4. Interakcija serotoninskog i dopaminskog puta. Crna strelica označava projekcije dopaminskog puta dok isprekidana siva strelica prikazuje projekcije serotoninskog puta. Preuzeto i prilagođeno iz (111).

1.4.1 Serotonergična inhibicija dopaminske funkcije u srednjem mozgu

U raphe nucleu prisutni su 5-HT_{1A} autoreceptori koji reguliraju podražaj serotoninskog neurona. Projekcije serotoninskog puta koje sežu do crnog tijela (substantia nigra), odnosno serotonin koji se oslobađa u crnom tijelu inhibira dopamin. U substantia nigra, na somatodendritičkoj površini dopaminergičkog neurona nalaze se 5-HT₂ preko kojih se odvija inhibicija dopaminergičkih neurona. Prema navedenom agonisti 5-HT_{1A} autoreceptora i 5-

HT2 antagonisti remete fiziološku inhibiciju dopamina. Prema David i suradnici, SS genotip serotoniniskog transportera dovode do smanjene ekspresije 5-HT1A receptora (18). S alel povezuje se sa smanjenom sintezom serotoniniskog transportera zbog čega je uklanjanje serotoninina iz sinaptičke pukotine smanjeno. Ako je koncentracija serotoninina povišena bilo bi za očekivati da će se povećati inhibicija dopaminskog sustava. Međutim, kako se smanji ekspresija 5-HT1A receptora, moguće je da će izostati inhibični učinak na dopamin ili će ostati isti (manji potencijal vezanja na 5-HT1A receptore može se objasniti kompenzacijom. David i suradnici dokazali su da je potencijal vezanja 5-HT1A receptora najveći je u limbičkoj i kortikalnoj regiji (67). Kako 5-HT1A receptori u raphe nuclei imaju ulogu autoreceptora i posreduju u negativnoj povratnoj sprezi serotoniniskih neurona, zbog slabog potencijala vezanja tih receptora izostaje negativna povratna sprega i nastavlja se podražaj. 5-HT1A receptori smješteni su na postsinaptičkim neuronima posebno u limbičkoj regiji dok su 5-HT2 prisutni u motoričkoj regiji (18).

Istraživanja su pokazala da serotonergički neuroni koji polaze iz dorzalne raphe nuclei prolaze kroz medijalni snop prednjeg mozga prema striatumu i korteksu. Stimulacija ovih neurona (raphe-striatum) ili primjena agonista serotoninina u striatumu, uzrokuje inhibiciju podražaja striatalnih neurona, vjerojatno zbog pada sinaptičkog dopamina. Ovaj je učinak čini se posredovan 5-HT2 receptorima i može biti rezultat smanjenog otpuštanja ili smanjene sinteze dopamina na završecima. PET studije provedene na pavijanima pokazale su da altaserin, antagonist 5-HT2 receptora, povećava oslobađanje endogenog dopamina dok citalopram (SSRI) smanjuje oslobađanje endogenog dopamina.

U skladu s navedenim, zbog lezije serotoniniskih projekcija izostaje inhibicija dopaminskog sustava što dovodi do porasta koncentracije dopamina.

Slično, antagonisti 5-HT2 receptora, blokiraju inhibični učinak serotoninina što dovodi do porasta dopamina u striatumu.

Ukratko, dva su načina djelovanja serotoninina na dopaminski sustav. Jedan način djelovanja je na razini srednjeg mozga gdje serotoniniske projekcije inhibiraju podražaj dopaminskih stanica čije projekcije polaze iz crnog tijela (substantia nigra). Drugi način djelovanja je inhibicija oslobađanja dopamina iz sinapse u predjelu striatuma i korteksa pri čemu vjerojatno dolazi do inhibicije sinteze dopamina.

Dopaminski transporter (DAT), čija je aktivnost najizraženija u subkortikalnoj regiji mozga sudjeluje u uklanjanju dopamina.

Polimorfizam serotoninskog transportera (5-HTTLPR) čija je uloga ukloniti serotonin iz sinaptičke pukotine, povezuje se sa depresijom i anksioznim poremećajima. S alel povezan je sa smanjenom ekspresijom transportera i smanjenim odgovorom na terapiju SSRI.

Monoamino oksidaza A (MAOA) sudjeluje u razgradnji serotonina, ali supstrat joj je i dopamin. 30pb VNRT polimorfizam povezan je sa ekspresijom proteina gdje se aleli sa 3,5 i 4 ponavljanja transkribiraju (prepisuju 2-10 puta učinkovitije od 3 i 5 ponavljanja).

1.5 Kategorizacija mentalnih poremećaja

Dijagnoza mentalnih poremećaja postavlja se na temelju prisutnih simptoma, a diferencijalna dijagnostika temelji se na Dijagnostičko statističkom priručniku mentalnih poremećaja (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM)) u kojem su kategorizirani simptomi svih psihijatrijskih bolesti. Premda je prihvaćen na svjetskoj razini, vrijeme je pokazalo nedostatke ove kategorizacije psihijatrijskih bolesti. Glavni nedostatak ovog pristupa je taj što znanstvenici nisu uspjeli povezati genetičke i neurološke biljege sa ovakvom kategorizacijom. Drugi nedostatak je taj što su sami psihijatri uočili da se simptomi čak petine pacijenata ne uklapaju u postojeću podjelu. Umjesto kategorija, nova saznanja upućuju na to da bi psihijatrijske bolesti trebalo promatrati kao spektar u kojem se nalaze svi psihijatrijski poremećaji što bi omogućilo kliničarima da bolje opišu stanje pacijenta (68). U praksi postavljanje dijagnoze prema kategorijskom principu često dovodi do pogrešne dijagnostike na što se nadovezuje pogrešan terapijski pristup. Nadalje, kod većine psihijatrijskih poremećaja uočena je genetička predispozicija, ali neki do sada ispitivani geni povezuju se sa više odvojenih poremećaja (69).

1.6 Dijagnoza shizofrenije

Službeni Dijagnostički kriterij za postavljanje dijagnoze je Dijagnostičko statistički priručnik (engl. *Diagnostic and statistical manual – DSM*) koji je do danas prošao nekoliko ponovljenih izdanja. U svrhu ovog istraživanja, dijagnoza je postavljena prema četvrtom izdanju DSM-IV. Prema samom priručniku dijagnoza shizofrenije se može postaviti ako bolesnik zadovoljava određene kriterije, odnosno ima prisutne simptome karakteristične za shizofreniju koji traju određeno vrijeme.

Kriteriji za postavljanje dijagnoze su sljedeći:

- Ima prisutna dva ili više simptoma u koji spadaju deluzije, halucinacije, nepovezan govor, izrazita neorganiziranost (zbog čega bolesnici nisu u stanju normalno se hraniti i/ili održavati higijenu) ili katatonija te prisutnost negativnih simptoma (alogija – nesposobnost govora zbog zbunjenosti ili nedostatka intelekta, avolicija – nedostatak volje, afektivna ravnodušnost).
- Od samog početka simptoma mora doći do ozbiljnog narušavanja u jednom ili više područja djelovanja. Posao, veze sa drugim ljudima ili briga za sebe. Ako se poremećaj javi u ranijoj životnoj dobi, promatra se nemogućnost postizanja razvojnog ili sociološkog stupnja karakterističnog za tu dob.
- Simptomi moraju biti prisutni 6 mjeseci ili duže.
- Isključeni su shizoafektivni poremećaji i poremećaji ponašanja ako se nisu javili simptomi tih poremećaja ili ako je pojava takvih simptoma kratka u odnosu na cijeli period.
- Upotreba lijekova ili droga može se isključiti
- Ako već postoji autistični ili neki drugi poremećaj, dodatna dijagnoza shizofrenije postavlja se samo ako istaknuti simptom traje dulje od mjesec dana (1).

1.7 Dijagnoza i dimenzije simptoma

U svrhu ovog istraživanja, dijagnoza shizofrenije postavljena je prema DSM IV standardu, ali zbog heterogenosti samog poremećaja, javlja se problem kategorizacije prema simptomima. Kako bi se omogućila bolja sistematizacija, predložen je koncept dimenzija simptoma koji se temelji na opažanju da se neki simptomi javljaju zajedno, a ne uklapaju se nužno u predložene kategorije (70). PANSS (engl. *Positive and Negative Syndrome Scale*) je instrument za identifikaciju i mjeru sindroma prisutnih u shizofreniji. Razvijen je za tipološku i dimenzionalnu procjenu shizofrenije. Ocjenjuje se ukupno 30 karakteristika odnosno simptoma ocjenama od 1 do 7 pri čemu ocjena 1 znači da simptom nije prisutan, a 7 znači da je maksimalno izražen. Tih 30 simptoma podijeljeno je na pozitivne, negativne i opće koji se

možu na taj način ocijeniti. Dodatno se mogu izvući simptomi kao što su anergija, poremećaj razmišljanja, aktivacija, paranoja i depresija. Ovakva podjela simptoma omogućava opis prirode poremećaja svakog pacijenta odnosno profil dimenzije koja je najizraženija. Razumijevanje dominacije jednog sindroma nad drugim i ocjena težine omogućava lakši odabir u terapijskom pristupu. Blokatori dopamina učinkovitiji su kod pozitivnih simptoma dok atipični antipsihotici koji posjeduju svojstva antagonista serotonina, bolje djeluju na negativne simptome (71, 72).

PANSS je instrument koji je okarakteriziran vrlo dobrim mjeriteljskim performansama. Odlikuju ga visoka pouzdanost između ispitivača, dobra konstruktivna validnost što znači da mjeri ono za što je predviđen, interna pouzdanost, odgovarajuća test-retest pouzdanost, i eksterna validnost (73, 74).

Pokazalo se da nasljedni čimbenici imaju veliku ulogu u sklonosti prema nastajanju shizofrenije. Istraživanja u tom području dala su često kontradiktorne podatke, a glavna prepreka je heterogenost fenotipa shizofrenije, odnosno dva pacijenta koja boluju od shizofrenije mogu imati različite simptome. Da bi se reducirala takva heterogenost predložen je model dimenzija simptoma pri čemu valja naglasiti da se riječ dimenzija ne odnosi na veličinu ili intenzitet simptoma. Premda model nije savršen, on ipak pruža objašnjenje za dobar dio varijacija između pacijenata sa shizofrenijom. Dimenzije simptoma predstavljaju grupu simptoma koji se najčešće javljaju zajedno te su do sada predloženi modeli sa dvije, tri i pet dimenzija. Valja naglasiti da se dimenzije simptoma ne mogu zamijeniti tipovima shizofrenije jer se dijagnoza postavlja prema DSM IV standardima na temelju kojeg nije moguće odrediti kategoriju mentalnog poremećaja sa jasno definiranim granicama (75). Ako usporedimo dijagnostiku psihijatrijskih poremećaja sa dijagnostikom dijabetesa, onda je dijabetes tipa 1 koji je inzulin ovisan, jasno razdvojen od tipa 2 upravo na temelju ovisnosti o inzulinu dok kod psihijatrijskih bolesti tako jasne granice nema.

1.8 Terapija shizofrenije

Shizofrenija je heterogena skupina poremećaja što znači da se prikaz simptoma, tijekom bolesti i odgovor na terapiju mogu razlikovati između pacijenata. Simptomi mogu rasti i padati, a psihoza je najčešći simptom premda mogu biti prisutni i drugi simptomi. Osnovna terapija koja se primjenjuje su antipsihotici i njihova upotreba ovisi o odgovoru na terapiju, fazi bolesti i eventualnim nuspojavama. Preporuke za primjenu terapije temelje se na tome radi li se o prvoj

epizodi, akutnom pogoršanju, održavanju stanja, terapiji rezistentnog oblika, terapija kod rezistencije na klorzapin ili se radi o specifičnim simptomima (76).

Farmakoterapija shizofrenije otkrivena je slučajno nakon što je uočeno da klorpromazn koji je korišten kao antihistaminik ima antipsihotični učinak kod oboljelih od shizofrenije. Uočeno je da antipsihotici imaju neuroleptički učinak (usporenost ili odsutnost motoričke aktivnosti) i da se antipsihotički utjecaj ostvaruje kroz blokadu D2 receptora. Blokada D2 receptora u mezolimbickom dopaminskom putu reducira pozitivne simptome. Međutim, D2 receptori rasprostranjeni su u cijelom mozgu i zapravo blokator D2 receptora neselektivno blokiraju sve receptore. Blokada mezokortikalnih receptora, gdje je koncentracija dopamina već snižena, može dovesti do pogoršanja negativnih i kognitivnih simptoma. Blokada u nigrostrijatalnom putu može uzrokovati poremećaj motorike, odnosno parkinsonizam uzrokovan terapijom. Osim dopaminskih, neki od ovih antipsihotika blokiraju muskarinske kolinergičke receptore što može uzrokovati nuspojave kao što su suhoća usta, konstipacija, zamućen vid, kognitivno zatupljivanje.

Atipični antipsihotici su antagonisti serotonina i dopamina te simultano blokiraju serotoninske A2 receptore i dopaminske D2 receptore. Serotonin ima inhibitorni učinak na oslobađanje dopamina, ali se njegov utjecaj različito manifestira u različitim dopaminskim putevima. U nigrostrijatalnom putu blokada A2 receptora na dopaminskom neuronu dovodi do pojačanog oslobađanja dopamina. Taj dopamin umanjuje antipsihotičko djelovanje na D2 receptore jer se „natječe“ s djelovanjem antipsihotika zbog čega se smanjuje pojava ekstrapiramidalnih simptoma. U mezokortikalnom putu gustoća serotoninskih A2 receptor veća je nego dopaminskih D2 receptora. Atipični antipsihotici djeluju kao i u nigrostrijatalnom putu, odnosno blokada serotoninskog A2 receptora dovodi do pojačanog otpuštanja dopamina. Kako je gustoća dopaminskih D2 receptora u ovom putu niska, otpušteni dopamin nadjača blokadu D2 receptora, što dovodi do poboljšanja negativnih simptoma (17).

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 Hipoteza

Dosadašnja istraživanja pokazala su:

- Patofiziološki proces shizofrenije povezuje se sa prefrontalnom hipodopaminergijom i subkortikalnom hiperdopaminergijom.
- Djelovanje dopamina reguliraju dopaminski transporter (koji se pretežno nalazi u subkortikalnom području) i katekol-o-metil transferaza (koja se pretežno nalazi u frontalnom korteksu).
- Dopaminske projekcije prate projekcije serotoninskog sustava koji ima inhibitorni učinak na dopaminski sustav.
- Djelovanje serotonina reguliraju serotoninski transporter i monoamino-oksidaza A

Hipoteza ovog istraživanja: funkcionalni polimorfizmi dopaminskog transportera (DAT-VNTR), katekol-o-metil-transferaze (COMT Val158Met), serotoninskog transportera (5-HTTLPR) i monoamino-oksidaze A (MAOA-uVNTR) povezani su sa shizofrenijom čija je dijagnoza postavljena na temelju prisutnih simptoma te s pojedinim dimenzijama simptoma shizofrenije.

2.2 Ciljevi istraživanja

2.2.1 Usporediti zdrave i bolesne ispitanike

Ispitati povezanost pojedinih polimorfizama sa shizofrenijom.

Ispitati povezanost kombinacije genotipova i shizofrenije.

2.2.2 Usporediti skupine ispitanika sa shizofrenijom

Ispitati povezanost genotipa sa brojem epizoda i trajanjem bolesti.

Ispitati povezanost genotipa i obiteljskog herediteta, sklonosti suicidu i pokušaju suicida.

Ispitati povezanost pojedinog genotipa i dimenzija simptoma prema PANSS skali.

Ispitati povezanost kombinacija genotipa i dimenzija simptoma prema PANSS skali.

Ispitati povezanost genotipa i depresije ocijenjene Calgary skalom.

2.2.3 Uspostaviti regresijski model za predviđanje shizofrenije

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Ovo istraživanje provedeno je u suradnji Klinike za psihijatriju i Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Statističkom analizom utvrđen je broj ispitanika potreban za istraživanje (engl. *Power for Association With Error – PAWE*) (77). Da bi postigli snagu istraživanja $\beta=0.80$ uz razinu značajnosti $\alpha=0.05$, prema načinjenoj analizi u istraživanje je trebalo uključiti 315 zdravih ispitanika i 315 ispitanika sa shizofrenijom. Od ukupno 325 obrađenih uzoraka ispitanika sa shizofrenijom, u istraživanje je uključeno njih 306. Njih 19 isključeno je zbog nedostatka podataka o pacijentima ili propadanja uzorka (zbog loše kvalitete uzorka krvi nije bilo moguće provesti genotipizaciju svih polimorfizama). Od 330 zdravih ispitanika 314 je uključeno u analizu. 16 ispitanika je isključeno zbog neispunjenog upitnika, ili nisu zadovoljili kriterij uključivanja u istraživanje. Također, na nekoliko uzoraka nije bilo moguće provesti genotipizaciju za sva četiri polimorfizama zbog dužeg stajanja uzorka. Ispitanici sa shizofrenijom uključeni su na temelju postavljene dijagnoze shizofrenije pri prvoj epizodi bolesti ili zbog recidiva uslijed prekida terapije. Dijagnoza shizofrenije postavljena je na temelju Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja – 4. izdanje (engl. *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders DSM IV*), a procjena simptoma načinjena je koristeći ocjensku ljestvicu pozitivnih i negativnih simptoma (engl. *Positive and Negative Syndrome Scale PANSS*) i Calgary ljestvicu. Zdravstveni status zdravih ispitanika procijenjen je na temelju anamneze, fizikalnog pregleda te kratkog međunarodnog neuropsihijatrijskog upitnika (engl. *Mini International Neuropsychiatric Interview MINI*), tzv. MINI upitnik.

Prisutnost fizičkog oboljenja bio je kriterij isključivanja za sve ispitanike. Bolesnici sa shizofrenijom kod kojih je bila prisutna zloupotreba droga i/ili alkohola te prisutnost drugog psihijatrijskog poremećaja, nisu uključeni u istraživanje.

Za genotipizaciju polimorfizama, svim ispitanicima uzeta je venska krv u epruvetu sa antikoagulansom K_3EDTA (engl. *Ethylene-diamine-tetra-acetic-acid*, etilen-diamino-tetraoctena kiselina) proizvođača Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija.

3.2 Genotipizacija

Iz uzorka pune venske krvi izolirana je DNA nakon čega je takav uzorak pospremljen na +4°C do genotipizacije polimorfizma.

3.2.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA načinjena je pomoću komercijalog kita High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Švicarska).

200 µL pune krvi pomiješa se sa proteinazom K i puferom za vezanje (engl. *Binding buffer*), pri čemu uz snažno miješanje (vorteksiranje) dolazi do lize stanica, i inaktivacije endogenih DNaza. Takva smjesa nanosi se na kolonu gdje dolazi do vezanja DNA, a ostali sadržaj se centrifugiranjem izdvaja i baca. U sljedećim koracima s kolone se pomoću pufera uklanjaju inhibitori i ostaci staničnih proteina koji bi mogli ometati dalju obradu uzorka. Na kraju, DNA se ispire sa kolone pomoću pufera za ispiranje (engl. *Elution buffer*) te se čuva u sterilnoj epruvetici do obrade.

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

Genotipizacija svih polimorfizama DAT, 5-HTTLPR, MAOA, COMT započela je PCR reakcijom, nakon čega je uslijedilo razdvajanje fragmenata elektroforezom. Genotipizacija polimorfizma COMT Val158Met zahtijeva obradu dobivenog PCR produkta restriksijskom endonukleazom (PCR-RFLP metoda) nakon čega slijedi razdvajanje fragmenata na gelu.

Princip PCR reakcije temelji se na djelovanju enzima polimeraze koja ima sposobnost sintetizirati novi DNA lanac prema dostupnom kalupu u smjeru 5' → 3'. Da bi polimeraza započela djelovanje, potrebne su joj početnice (engl. *primer*) – kratki slijedovi nukleotida (20-30 baza) komplementarni kalupu, na čiju se 3'-OH skupinu nastavlja sinteza DNA lanca. Upotrebom specifičnih početnica omogućava se sinteza točno određenog dijela gena u kojem se nalazi polimorfizam koji se ispituje. Sama reakcija odvija se kroz 30 – 40 ciklusa, a svaki ciklus može se podijeliti na 3 koraka. U prvom koraku – denaturaciji, pri temperaturi većoj od

90°C dolazi do razdvajanja DNA lanaca što omogućava sljedeći korak, a to je vezanje početnica (engl. *annealing*). Vezanje početnica odvija se na nižoj temperaturi 40°C – 65°C nakon čega slijedi sinteza lanca (engl. *extension*) na približno 72°C. Uzastopnim ponavljanjem ciklusa dobije se 2ⁿ kopija dvolančane DNA, gdje n predstavlja broj ciklusa.

Svaka reakcijska smjesa sadrži vodu, pufer, početnice (uzvodna i nizvodna), magnezijeve ione, smjesu sva 4 deoksinukleozidtrifosfata (dNTP) i polimerazu te dimetilsulfoksid (DMSO) za genotipizaciju dopaminskog transportera. Tako pripremljena otopina za željeni broj uzoraka podijeli se u epruvetice kojima se dodaje uzorak DNA. Sastav reakcijske smjese prikazuje Tablica 1. PCR reakcija svih polimorfizama provedena je na Master Cycler Gradient uređaju (Eppendorf Hamburg, Njemačka), a korištene početnice i uvjete prikazuje Tablica 2.

Tablica 1. Prikaz uvjeta PCR reakcije

Reagens i početne koncentracije	5-HTTLPR (μL)	MAOA (μL)	COMT (μL)	DAT (μL)
H ₂ O	11,25	20,70	25,53	20,9
10XPCR pufer bez Mg ²⁺	1,54	3	/	/
Mg ²⁺ 25 mM	0,97	2		
10XPCR pufer sa 15 mM Mg ²⁺	/	/	3,30	3,00
dNTP 2 5mM	0,18	0,24	0,26	0,24
Početnice Radna otopina 5 μM	1,76	1,20	1,32	1,20
Taq polimeraza 5 U/μL	/	0,15	0,17	0,18
Fast start Highfidelity Taq 6 U/μL	0,15	/	/	/
DMSO 100 jedinica	/	/	/	1,8
DNA	4,00	1,50	1,10	1,50
Ukupni volumen smjese	20	30	30	30

Tablica 2. Prikaz korištenih početnica za polimorfizme 5-HTTLPR, DAT-VNTR, COMT Val158Met i MAO-VNTR

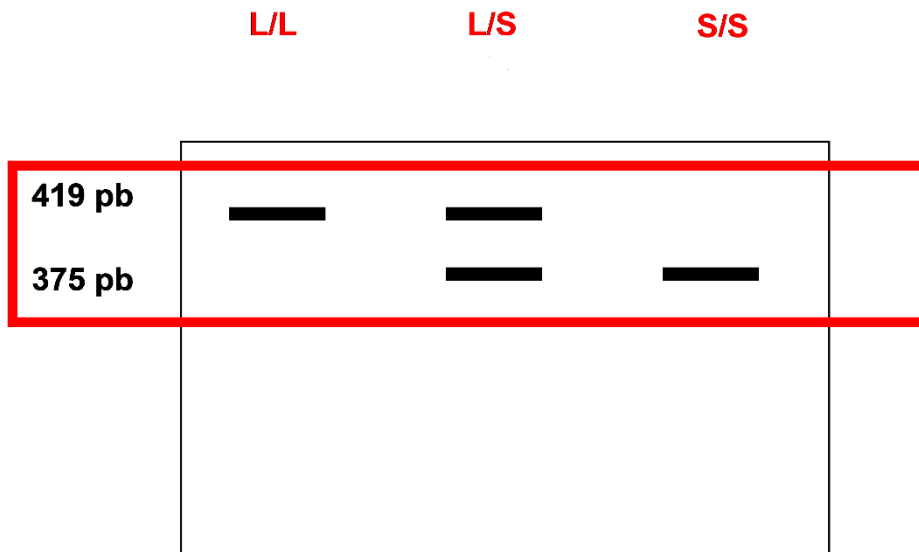
POLIMORFIZAM	POČETNICE	UVJETI
5-HTTLPR	HTT419F: 5'-ATG CCA GCA CCT	Inicijalna denaturacija - 94°C/2 min;
	AAC CCC TAA TGT-3'	Ekstenzija - 38 ciklusa: 94°C/45 s,
	HTT419R: 5'-GGA CCG CAA GGT	63°C/40 s, 72°C/60 s
	GGG CGG GA-3'.	Završna elongacija - 72°C/10 min.
MAOA-uVNTR	MAOAF: 5'-ACA GCC TGA CCG	Inicijalna denaturacija - 95°C /2 min
	TGG AGA AG-3'	Ekstenzija - 37 ciklusa: 95°C/45 s,
	MAOAR: 5'-GAA CGG ACG CTC	70°C/30 s, 72°C/40 s
	CAT TCG GA -3'.	Završna elongacija - 72°C/10 min.
COMT	COMTf: 5'-CTC ATC ACC ATC	Inicijalna denaturacija - 94°C/2 min
	GAG ATC AA-3'	Ekstenzija - 35 ciklusa: 94°C/30 s,
	COMTr: 5'-CAG TGA ACG TGG	60°C/30 s, 72°C/120 s
	TGT GAA CAC-3'.	Završna elongacija - 72°C/10min.
DAT	DAT1F: 5'-TGT GGT GTA GGG	Inicijalna denaturacija - 95°C/2min
	AAC GGC CT GAG-3'	Ekstenzija - 35 ciklusa :95°C/60 s,
	DAT1R: 5'-CTT CCT GGA GGT	68°C/60 s, 72°C/60 s
	CAC GGC TCA AGG-3'.	Završna elongacija - 72°C/10 min.

Detekcija genotipa za 5-HTTLPR, DAT i MAOA provedena je elektroforetskim razdvajanjem umnoženih fragmenata na gelu.

3.4 5-HTTLPR

Dobiveni PCR produkti, uključujući 3 kontrolna uzorka, detektirani su gel elektroforezom uz DNA marker V (Roche, Basel, Switzerland) pri naponu od 110V u trajanju od 45 minuta na gelu NuSieve 3:1 (Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Germany).

Dobiveni razdvojeni fragmenti (S alel veličine 375 pb i L alel veličine 419 pb) očitani su prema navedenoj shemi [Slika 5](#):

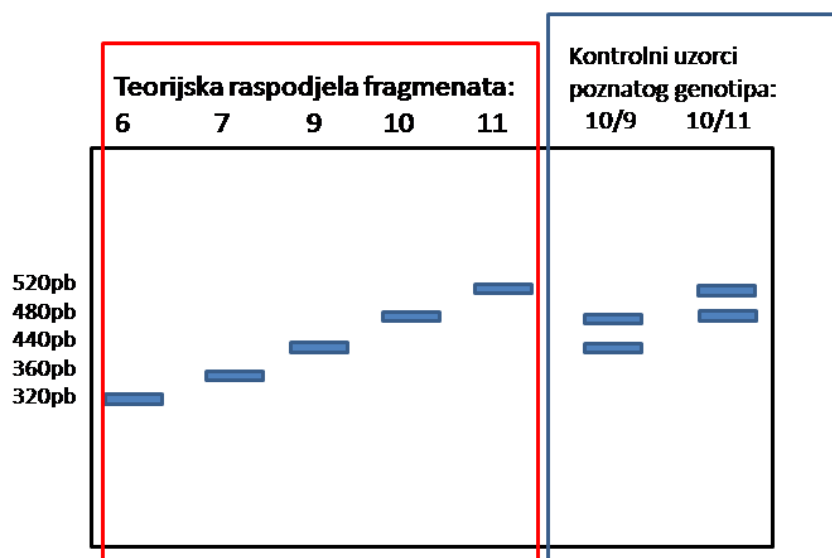


Slika 5. Shema očitavanja genotipa polimorfizma serotoninskog transportera. Sa lijeve strane su navedene očekivane veličine fragmenata, a ispod oznake svakog genotipa L/L, L/S i S/S obilježena je pozicija fragmenata razdvojenih elektroforezom.

3.5 DAT-VNTR

Dobiveni PCR produkti, uključujući kontrolne uzorke, detektirani su gel elektroforezom uz DNA marker XIII (Roche, Basel, Switzerland) pri naponu od 110 V u trajanju od 60 minuta na 2 % gelu NuSieve GP agarozu (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Njemačka) kojem je dodano 27 μ L etidij-bromida.

Razlika u duljini fragmenata iznosi 40 pb (VNTR polimorfizam: VNTR 11 ponavljanja (520 pb), VNTR 10 ponavljanja (480 pb), VNTR 9 ponavljanja (440 pb), VNTR 7 ponavljanja (360 pb), VNTR 6 ponavljanja (320 pb). Genotip je očitao prema navedenoj shemi Slika 6.

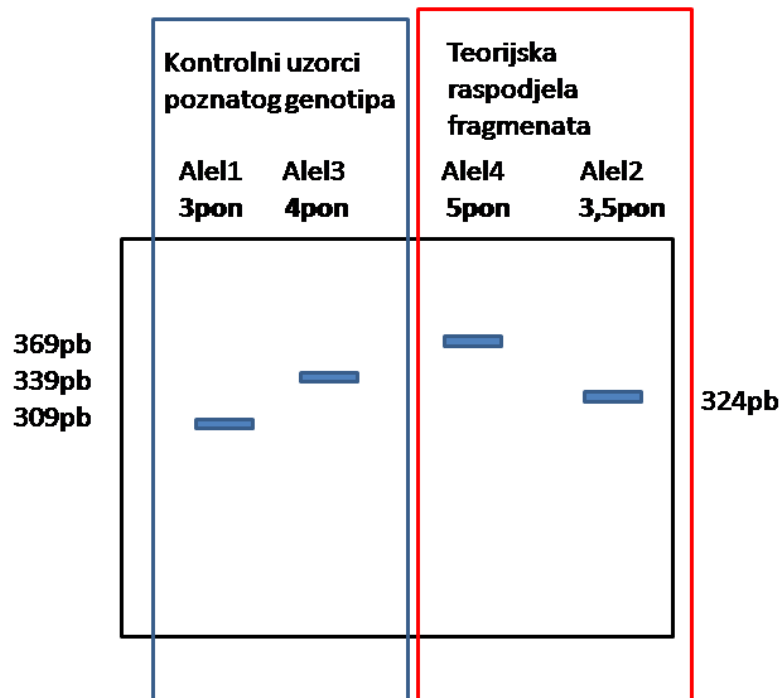


Slika 6. Shema očitavanja genotipa polimorfizma dopaminskog transportera. Sa lijeve strane, uokvirano crvenom bojom, navedene su pozicije fragmenata koje su otkrivene u drugim istraživanjima, a njihova distribucija je vrlo niska u populaciji. U plavom okviru označene su pozicije fragmenata dostupnog kontrolnog uzorka nakon elektroforetskog razdvajanja.

3.6 MAOA-uVNTR

Dobiveni PCR produkti, uključujući kontrolne uzorke, detektirani su gel elektroforezom uz DNA marker XIII (Roche, Basel, Switzerland) pri naponu od 110V u trajanju od 75 minuta na 1,8 % gelu NuSieve 3:1 agarozu (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Njemačka) kojem je dodano 27 μ L etidij bromida.

Razlika u duljini fragmenata iznosi 30 pb te se razlikuju VNTR polimorfizmi sa 3; 4; 5 ponavljanja. Izuzetak je alel sa 3,5 ponavljanja čiji posljednji fragment iznosi 15pb. Genotip je očitao prema navedenoj shemi Slika 7.

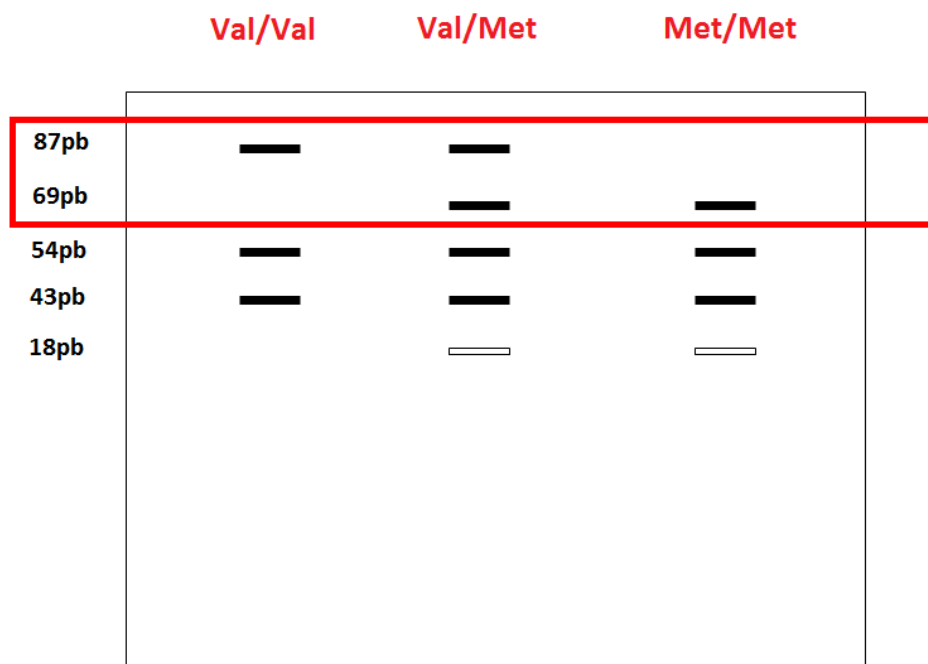


Slika 7. Shema očitavanja polimorfizma MAOA. Sa lijeve strane slike navedene su očekivane veličine fragmenata. U plavom okviru prikazana je očekivana raspodjela fragmenata dostupnih kontrolnih uzoraka nakon elektroforeze. U crvenom okviru označene su teoretske pozicije fragmenata rijetkih alela koji su opisani u literaturi.

3.7 COMT Val158Met

Nakon PCR reakcije provedena je provjera umnoženog fragmenata DNA (184pb). Provedena je elektroforeza na komercijalnom gelu uz EtBr – PCR-checkit (ElchromScientific AG, Cham, Švicarska) uz napon od 110 V u trajanju od 15 minuta. Navedeni polimorfizam kreira mjesto koje prepoznaje restriksijska nukleaza *NlaIII*. 10 µL dobivenog PCR produkta cijepano je preko noći na 37°C sa 6 U restriksijskog enzima *NlaIII* (New England BioLabs, Ipswich-MA, SAD) u odgovarajućem puferu (u konačnoj koncentraciji 1,2X) i razdvojeno elektroforetski u gelu Spreadex EL 300 (Elchrom Scientific AG, Cham, Švicarska) -50 minuta na 100 V/cm.

Nakon bojenja bojom SYBR® Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA SAD) u usporedbi prema markeru V (Roche, Basel, Switzerland) očitani su polimorfizmi prema shemi Slika 8 (Val158 se cijepa u fragmente veličine 87 pb, 54 pb i 43 pb; a 158 Met u fragmente veličine 69 pb, 54 pb, 43 pb i 18 pb).



Slika 8. Shema očitavanja polimorfizma COMT Val158Met. Sa lijeve strane navedene su veličine očekivanih fragmenata. Svaki genotip očitava se prema karakterističnim vrpčama koje se dobiju elektroforetskim razdvajanjem fragmenata nakon inkubacije sa restrikcijskom endonukleazom *NlaIII*. Posljednji fragmenti od 18 pb označeni su praznim kvadratima jer se nakon vremenski dugog elektroforetskog razdvajanja i male veličine, ne mogu vidjeti na gelu.

3.8 Postavljanje dijagnoze

Dijagnoza je postavljena prema DSM - IV izdanje.

Podvrste i dimenzije simptoma dobivene su ocjenjivanjem ispitanika pomoću PANSS ljestvice. PANSS je ocjenska ljestvica koja se sastoji od 3 skupine pitanja. 7 pozitivnih, 7 negativnih i 16 općih. U skupini pozitivnih simptoma ispituju se deluzije, konceptualna neorganizacija, halucinacije, uzbuđenje, grandioznost, sumnjičavost, neprijateljstvo. U skupini negativnih simptoma ispituju se: smanjen emocionalni odgovor, emocionalno povlačenje, smanjena prisnost, pasivno socijalno povlačenje, teškoće u apstraktnom razmišljanju, nedostatak spontanosti i tečnosti u konverzaciji, stereotipno razmišljanje (konstantno ponavljanje fraza i izraza). Kod općih simptoma ocjenjuju se: anksioznost, osjećaj krivnje, napetost, ponašanje i držanje, depresija, motorička retardacija, nedostatak suradnje, neobičan sadržaj misli, dezorijentiranost, nedostatak pažnje, nedostatak prosuđivanja (odnosi se na vlastito stanje pacijenta), poremećaj volicije, slaba kontrola impulsa, preokupacija, aktivno socijalno

izbjegavanje. Svaki od simptoma ocjenjuje se ocjenama od 1 do 7 gdje je 1 = simptom nije prisutan, 2 = minimalan, 3 = blagi, 4 = umjeren, 5 = umjeren/ozbiljan, 6 = ozbiljan, 7 = ekstreman. Maksimalni zbroj bodova za pozitivnu i negativnu ljestvicu iznosi 49, a za opću 112 što čini ukupni maksimalni zbroj 210. Minimalni zbroj bodova za pozitivnu, negativnu, opću i ukupnu redom iznosi: 7, 7, 16, 30. Zbrajanjem odabranih simptoma mogu se ocijeniti i drugi simptomi kao što su: anergija, poremećaj razmišljanja, aktivacija, paranoja i depresija. Kao referenca za sve navedene simptome korišten je PANSS priručnik (71). Depresija kao izdvojeni simptom u shizofreniji posebno je ispitana koristeći Calgary ljestvicu za depresiju. Calgary ljestvica ocjenjuje 9 značajki od kojih se svaka može ocijeniti ocjenama od 0 = nije prisutno, 1 = blago, 2 = umjeren, 3 = jako. Ukupni zbroj veći od 6 povezuje se sa specifičnošću od 82% i osjetljivošću od 85% za predviđanje prisutnosti depresivne epizode. Rezultati su obrađeni tako da je korišten zbroj i *cut off* od 7 za podjelu ispitanika sa shizofrenijom na one sa depresijom i bez depresije.

Objekti skale namijenjene su stručnom osoblju – specijalistu psihijatrije koji je vršio ocjenjivanje. Psihičko stanje zdravih ispitanika ocijenjeno je MINI upitnikom te je isključena prisutnost fizičkih oboljenja.

3.9 Statistička obrada

Podaci su prikupljeni i pripremljeni za analizu u programu Microsoft Excel Office 2010, a statistička obrada podataka rađena je u statističkom programu MedCalc (Frank Schoonjans, Mariakerke, Belgija verzija 11.2.0.0).

Demografski podaci opisani kao kategoričke varijable (spol, bračni status i stručna sprema obiteljski hereditet, sklonost suicidu i pokušaj suicida) prikazane su cijelim brojem i postotkom N (%). Postojanje statistički značajne razlike između kategorijskih varijabli, ispitana je χ^2 -testom, ili testom razlike proporcija ukoliko je broj podataka u ćelijama bio manji od 5.

Hardy-Weinbergova ravnoteža ispitana je χ^2 -testom: Nakon što su izračunate teorijske frekvencije genotipova, iste su uspoređene sa dobivenim frekvencijama genotipa. Ukoliko nije bilo statistički značajne razlike između dobivenih i teorijskih frekvencija ($P > 0,05$), zaključeno je da su dobivene frekvencije genotipova u Hardy-Weinberg ravnoteži.

Kvantitativne varijable (broj, epizoda, trajanje bolesti te simptomi shizofrenije) prikazane su ovisno o vrsti razdiobe koju slijede navedeni podaci. Dob je izražena kao medijan uz minimalnu i maksimalnu vrijednost. Normalnost kvantitativnih varijabli ispitana je Kolmogorov-

Smirnovljevim testom te je za ispitivanje razlike između skupina, ovisno o normalnosti razdiobe korišten odgovarajući test odnosno prikaz podataka. Za podatke koji nisu slijedili normalnu razdiobu, odnosno - distribucija podataka odstupala je značajno od teorijske normalne razdiobe ($P < 0,05$) korišteni su neparametrijski testovi, a podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (25 i 75 percentila). Za podatke koji su slijedili normalnu razdiobu, odnosno distribucija podataka se nije statistički značajno razlikovala od teoretske normalne razdiobe ($P > 0,05$) korišteni su parametrijski testovi, a podaci prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

Za ispitivanje razlike između genotipova (3 skupine) korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test za podatke koji nisu slijedili normalnu razdiobu i ANOVA za podatke koji su slijedili normalnu razdiobu. Kod ispitivanja razlike među skupinama koje su formirane prema genotipu (2 skupine) korišten je neparametrijski Mann-Whitney test jer podaci nisu slijedili normalnu razdiobu, a u nekim skupinama broj uzoraka bio je manji od 30.

Logističkom regresijom pokušalo se utvrditi može li se na temelju statistički značajnih čimbenika upredvidjeti ishod, odnosno prisutnost shizofrenije. U prvom koraku univarijantnim modelom ispitani su pojedinačni čimbenici koji su se u prethodnoj statističkoj obradi pokazali statistički značajnima ($P < 0,1$). Varijable kojima je P bio manji od 0,1 uvrštene su u multivarijantni model gdje je kao statistički značajna uzeta P vrijednost manja od 0,05. Varijable su opisane omjerom izgleda (OR) uz pripadajući 95 % interval pouzdanosti (CI 95 %) i P vrijednost. OR veći od 1 ukazuje na to da je ispitivana varijabla rizični čimbenik, odnosno povećava izgled za nastanak ispitivanog ishoda, pod uvjetom da interval pouzdanosti ne obuhvaća vrijednost 1 (obje granice intervala pouzdanosti su veće od 1). OR manji od 1 ukazuje na to da ispitivana varijabla ima protektivni učinak, odnosno smanjuje izgled za nastanak ispitivanog ishoda, pod uvjetom da interval pouzdanosti ne obuhvaća vrijednost 1 (obje granice intervala pouzdanosti su manje od 1).

4 REZULTATI

4.1 Demografski podaci

Tablica 3. Prikaz usporedbe zdravih i shizofreničara po spolu, dobi i stručnoj spremi.

	Zdravi N (%) N _{ukupno} =314	Sch. N (%) N _{ukupno} =306	P
Spol: M	164 (52,2)	222 (72,5)	< 0,001
Ž	150 (47,8)	84 (27,5)	
Dob [medijan] (min-max)	36 (18-68)	38 (18-84)	0,281
Niska i SSS	80 (36,7%)	220 (80,9%)	< 0,001
VSS	138 (63,3%)	52 (18,3%)	

Tablica 4. Prikaz zaposlenosti radno aktivnih ispitanika prema dijagnozi.

	Zdravi N (%) N _{ukupno} =217	Sch. N (%) N _{ukupno} =271	P
Zaposlen	187 (86,2)	86 (31,7)	< 0,001
Nezaposlen	23 (10,6)	111 (40,9)	
U mirovini	7 (3,2)	74 (27,3)	

Uočena je statistički značajna razlika između zdravih i bolesnih ispitanika podijeljenih prema spolu, stručnoj spremi i zaposlenju. U ispitivanje povezanosti zaposlenja i dijagnoze nisu uključeni studenti, odnosno ispitanici koji nisu nikada bili u radnom odnosu. Nije uočena statistički značajna razlika s obzirom na dob zdravih i bolesnih ispitanika. Statistički značajna razlika u dobi uočena je između muških i ženskih ispitanika sa dijagnozom shizofrenije ($P < 0,0001$). Pripadajući medijan te minimalna i maksimalna vrijednost za mušku populaciju s dijagnozom shizofrenije iznose: 34 (18-84), a za žensku populaciju 47 (22-73).

Tablica 5. Prikaz usporedbe zdravih i ispitanika sa shizofrenijom s obzirom na bračni status

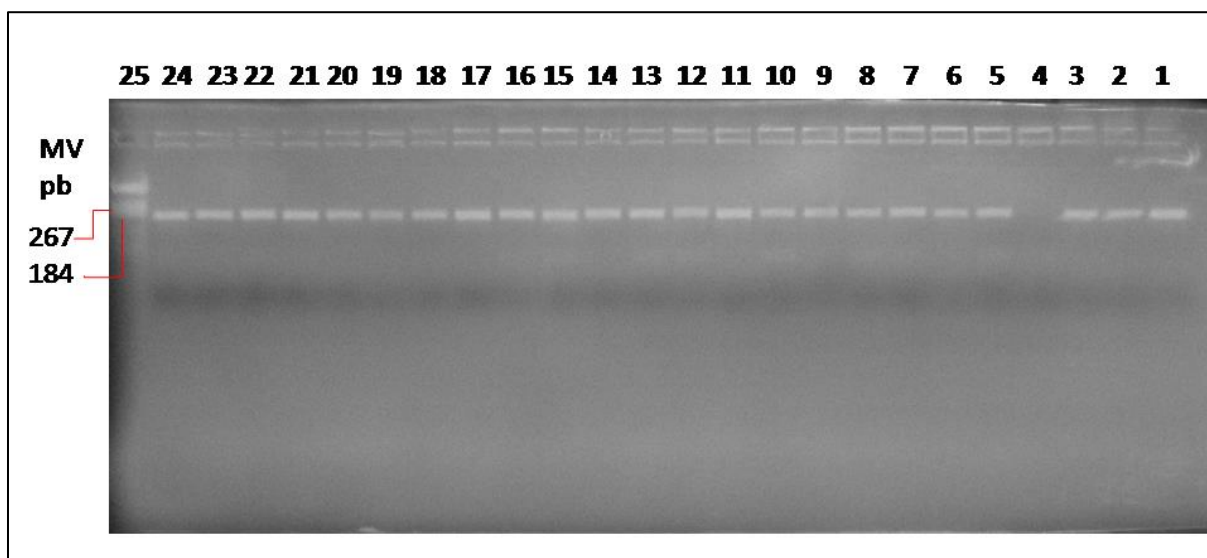
	Zdravi N (%) N _{ukupno} =217	Sch. N (%) N _{ukupno} =271	P
U braku	135 (62,2)	81 (29,8)	
Nije u braku	75 (34,5)	170 (62,7)	< 0,001
Razveden	7 (3,2)	20 (7,4)	

Uočena je statistički značajna razlika između zdravih i bolesnih ispitanika prema spolu i stručnoj spremi. Za ispitanike za koje je bio dostupan podatak o bračnom statusu, uočili smo statistički značajnu razliku s obzirom na bračni status. Nije utvrđena statistički značajna razlika prema dobi ispitanika.

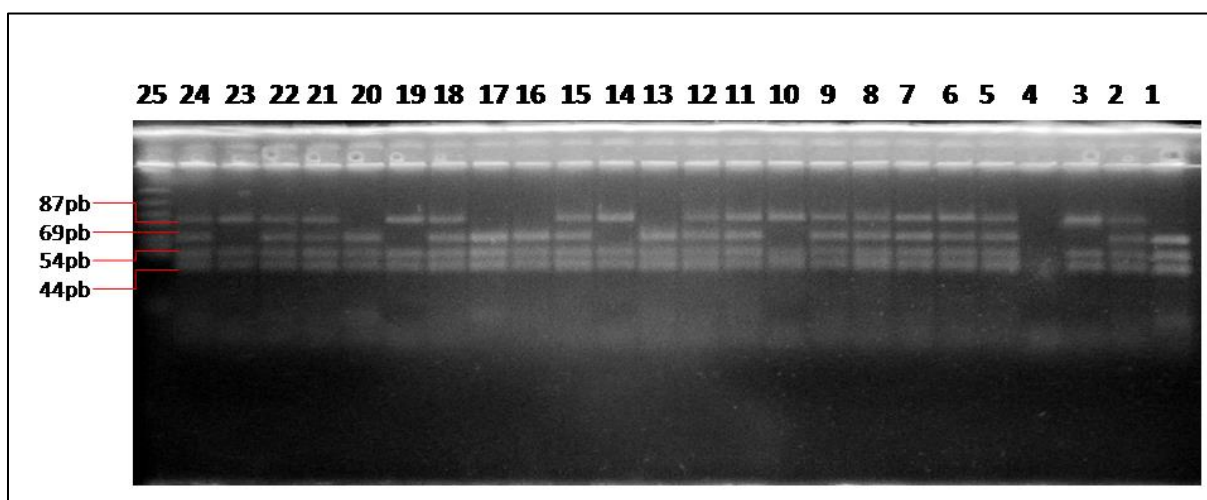
4.2 Rezultati genotipizacije

4.2.1 Polimorfizam COMT Val158Met

Rezultati su dobiveni PCR-RFLP metodom koja se sastoji od umnažanja PCR produkta i cijepanja tog produkta u fragmente uz pomoć restrikcijskog enzima. Uvjeti su opisani u poglavlju materijali i metode. Slika 9 prikazuje fotografiju umnoženih PCR produkata, a Slika 10 prikazuje fotografiju gela sa razdvojenim fragmentima nakon cijepanja PCR produkta restrikcijskom endonukleazom. Na temelju dobivenih fragmenata određen je genotip prema shemi.



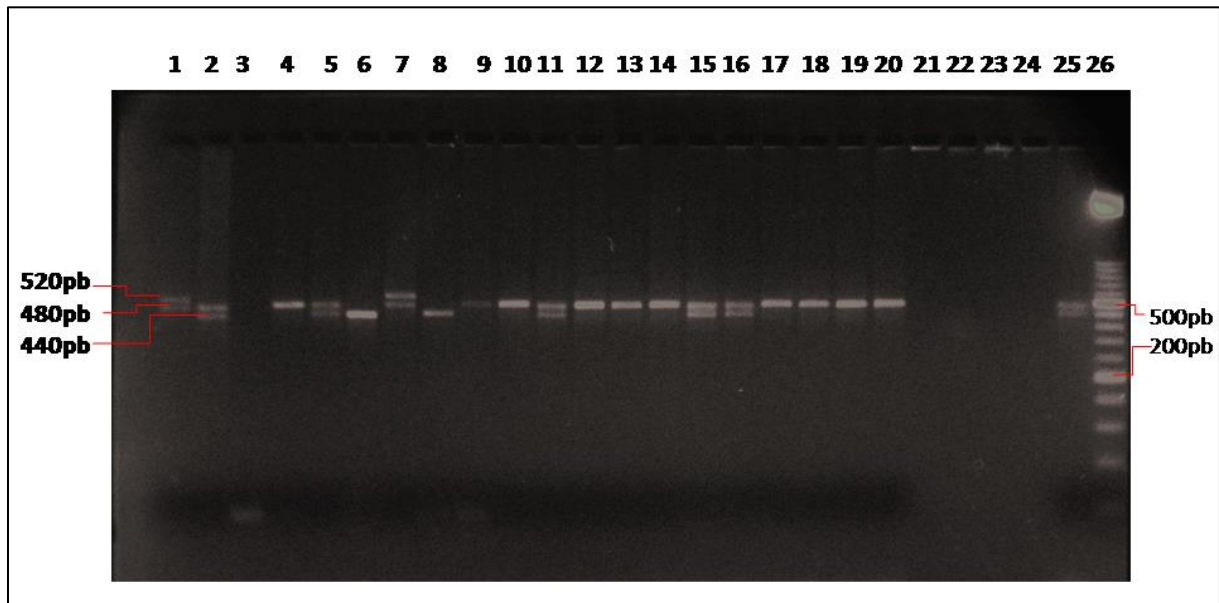
Slika 9. prikazuje provjeru uspješnosti umnažanja PCR produkta koji obuhvaća COMT Val158Met polimorfizam. Veličina PCR produkta iznosi 184 pb. Na pozicijama 1 – 3 nalaze se kontrolni uzorci, a na poziciji 4 nalazi se negativna kontrola (voda). Na pozicijama 5 – 24 nalaze se uzorci ispitanika, a na poziciji 25 marker (*Molecular weight marker V*).



Slika 10. prikazuje PCR produkte umnoženih fragmenata nakon cijepanja restriksijskom endokukleazom *Nla III*. Na prve tri pozicije nalaze se kontrolni uzorci. Pozicija 1: Met/Met; pozicija 2: Val/Met i pozicija 3: Val/Val. Na poziciji 4 je negativna kontrola (voda). Uzorci koji se nalaze na sljedećim pozicijama odgovaraju genotipu Val/Met: 5 – 9, 11,12, 15,18, 21,22, 24. Uzorci na pozicijama 10, 14, 19, 23 odgovaraju genotipu Val/Val, a uzorci na pozicijama 13, 16, 17 i 20 odgovaraju genotipu Met/Met. Na poziciji 25 nalazi se marker (*Molecular weight marker V*).

4.2.2 Polimorfizam DAT-VNTR

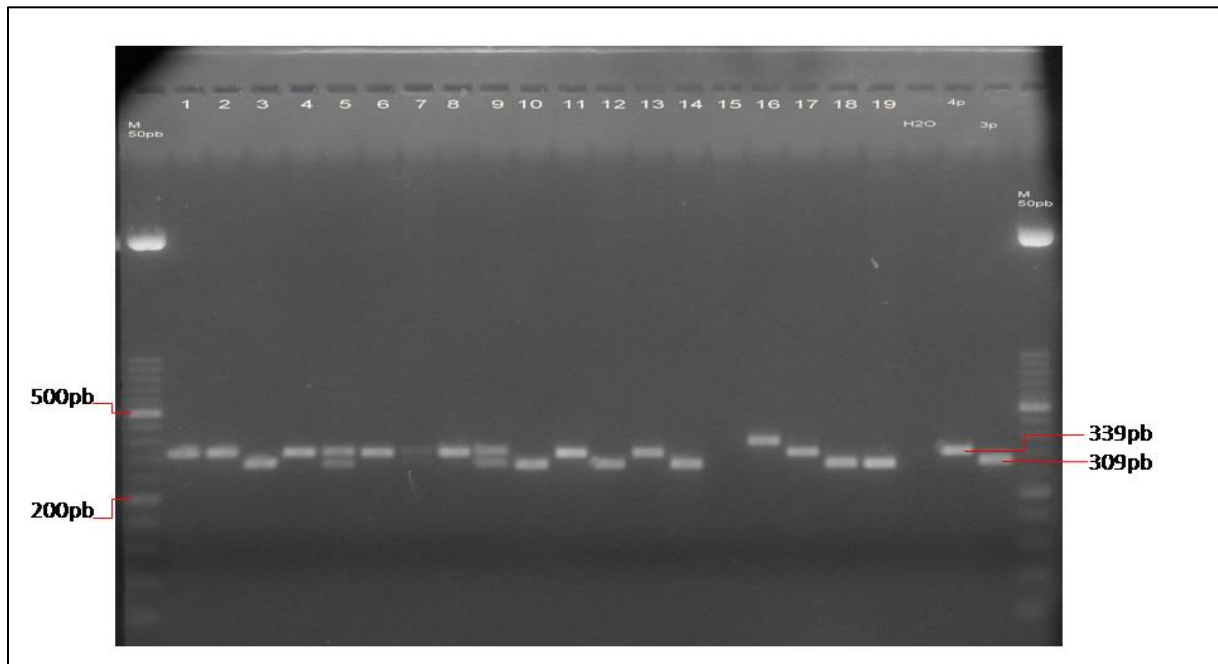
Dobiveni PCR fragmenti razlikuju se po veličini te se njihovim razdvajanjem na gelu može odrediti genotip. Slika 11 prikazuje gel sa dobivenim i razdvojenim PCR produktima na temelju kojih je rađena genotipizacija. Shema očitavanja prema kojoj smo odredili genotip prikazana je u poglavlju Materijali i metode.



Slika 11. prikazuje elektroforezu PCR produkata genotipizacije DAT-VNTR polimorfizma. Na pozicijama 1 i 2 nalaze se kontrolni uzorci genotipa 10/11 i 10/9. Na poziciji 3 nalazi se negativna kontrola (voda). Uzorci koji odgovaraju genotipu 10/10 nalaze se na sljedećim pozicijama: 4, 9, 10, 12 – 14, 17 – 20. Genotipu 10/9 odgovaraju uzorci na pozicijama: 5, 11, 15, 16 i 25. Genotipu 9/9 odgovaraju uzorci na pozicijama 6 i 8, a genotipu 10/11 odgovara uzorak na poziciji 7. Marker (50 pb DNA Ladder) nalazi se na poziciji 26.

4.2.3 Polimorfizam MAOA-uVNTR

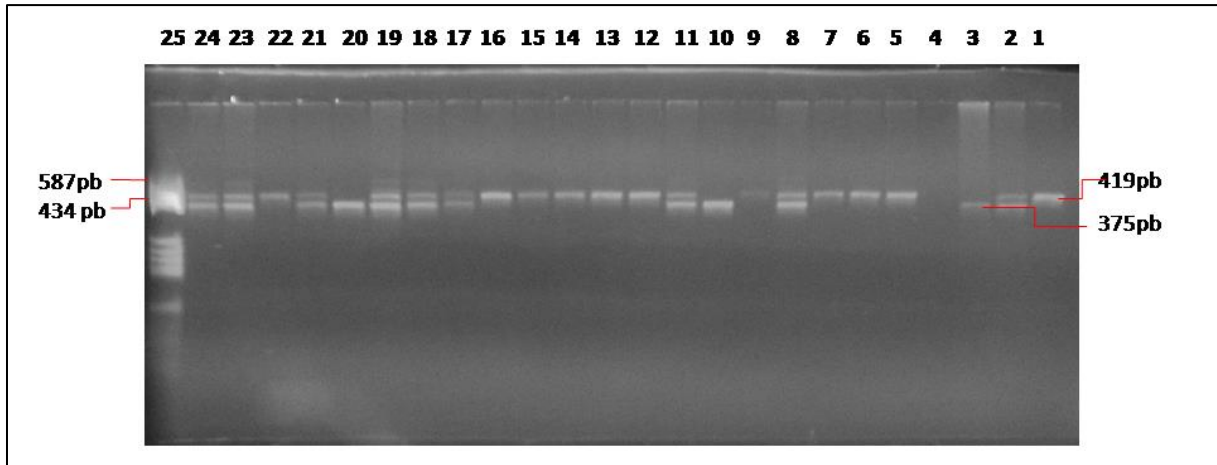
Kao i u slučaju dopaminskog transportera, umnoženi PCR fragmenti razlikuju se prema veličini. Genotip je očitao prema ranije opisanoj shemi, a Slika 12 prikazuje fragmente razdvojene elektroforezom prema kojima je određen genotip.



Slika 12. prikazuje PCR produkte genotipizacije MAOA-uVNTR polimorfizma. Na krajnjim pozicijama, lijevo i desno nalazi se marker (50 pb DNA Ladder). Od desne na lijevu stranu nalaze se kontrolni uzorci 3p (3 ponavljanja), 4p (4 ponavljanja) i voda. Uzorci na pozicijama 1, 2, 4, 6, 8, 11, 13 i 17 odgovaraju genotipu sa 4 ponavljanja. Uzorci na pozicijama 3, 10, 12, 14, 18 i 19 odgovaraju genotipu sa 3 ponavljanja. Pozicije 5 i 9 odgovaraju genotipu 4/3.

4.2.4 5-HTTLPR polimorfizam

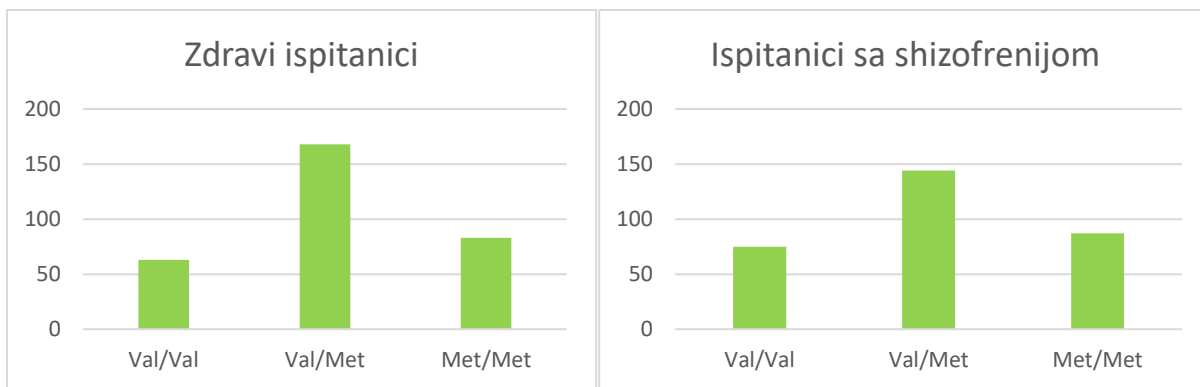
PCR-om umnoženi fragmenti 5-HTTLPR polimorfizma razlikuju se po veličini te su razdvojeni elektroforezom. Genotip je očitao prema unaprijed definiranoj shemi. Slika 13 prikazuje elektroforezu razdvojenih PCR produkata.



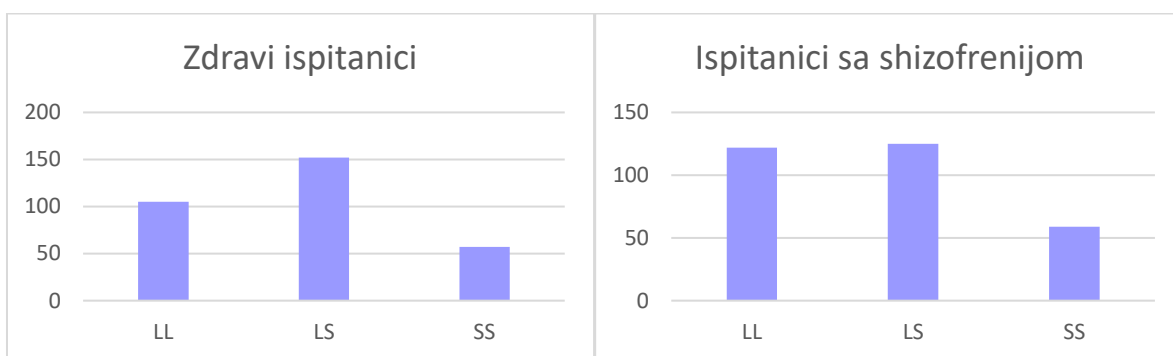
Slika 13. prikazuje PCR produkte genotipizacije 5-HTTLPR polimorfizma. Na pozicijama 1, 2 i 3 nalaze se kontrolni uzorci genotipa LL, LS, i SS. Na poziciji 4 nalazi se negativna kontrola (voda). Uzorci na pozicijama 5 – 7, 12 – 16 i 22 odgovaraju LL genotipu. Uzorci na pozicijama 9, 11, 17 – 19, 21 23 i 24 odgovaraju LS genotipu. Na pozicijama 10 i 20 nalaze se uzorci koji odgovaraju SS genotipu.

4.3 Distribucija genotipova po skupinama

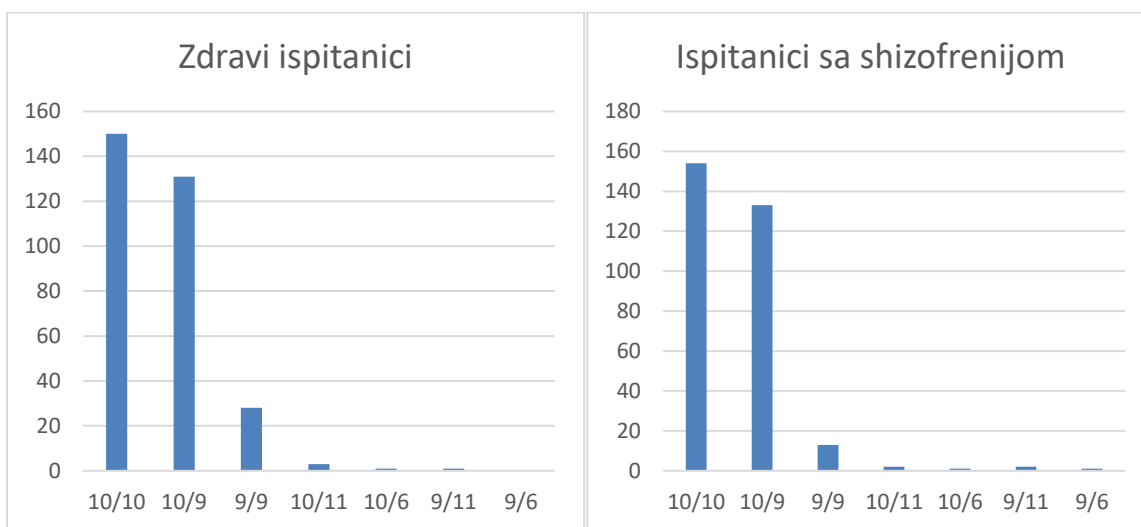
U ovom istraživanju ispitivani su polimorfizmi dopaminskog i serotoninskog transportera te polimorfizmi monoamino-oksidaze A i katekol-o-metil transferaze. Distribucija polimorfizama prikazana je grafičkim prikazima za polimorfizme COMT Val158Met, 5-HTTLPR i DAT-VNTR (Slika 14, Slika 25, Slika 16). Distribucija MAOA-uVNTR polimorfizma prikazana je odvojeno prema spolu (Slika 17, Slika 18).



Slika 14 Grafički prikaz distribucije COMT Val158Met polimorfizma u skupini zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

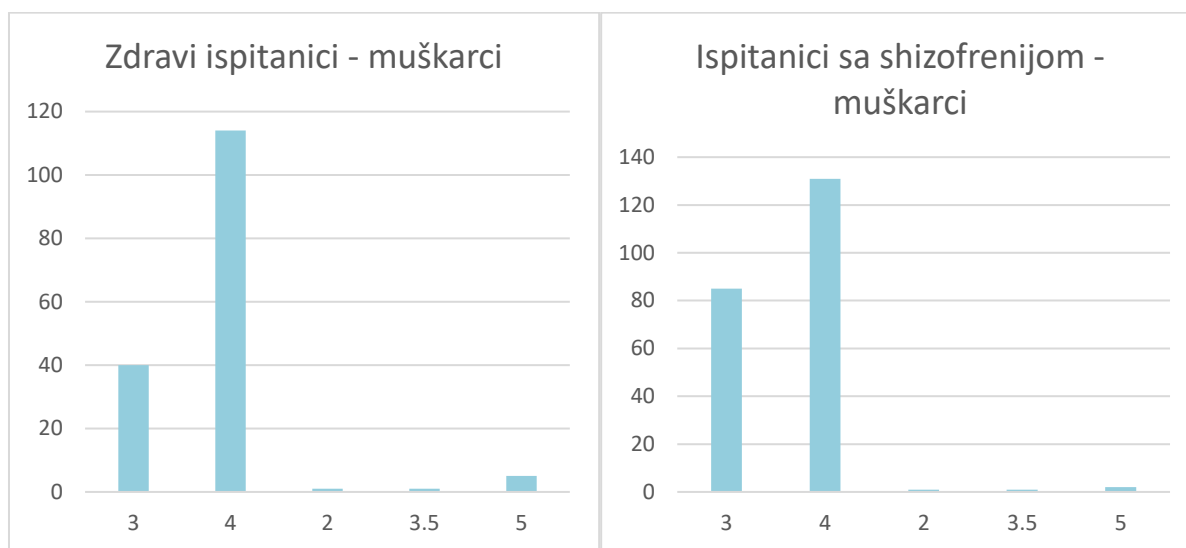


Slika 15 Grafički prikaz distribucije 5-HTTLPR polimorfizma u skupini zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom

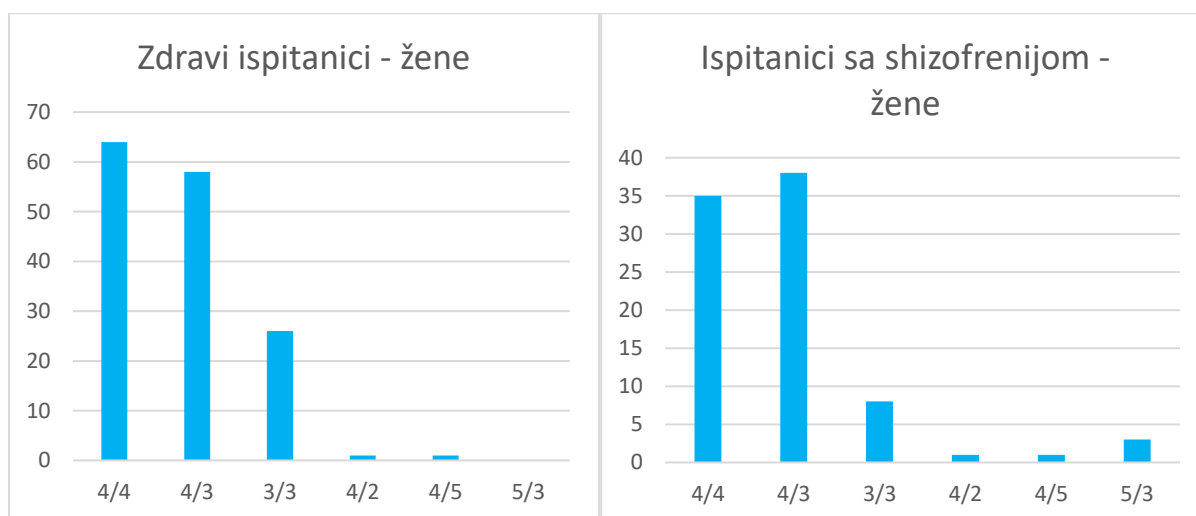


Slika 16 Grafički prikaz distribucije DAT-VNTR polimorfizma u skupini zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom

MAOA-uVNTR polimorfizam prikazan je odvojeno na muškoj i ženskoj populaciji jer se polimorfizam od interesa nalazi na kratkom kraku kromosoma X stoga muškarci ne mogu biti heterozigoti, odnosno oni su hemizigoti.



Slika 17 Grafički prikaz distribucije MAOA-uVNTR polimorfizma u skupini zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom u populaciji muškaraca.



Slika 18 Grafički prikaz distribucije MAOA-uVNTR polimorfizma u skupini zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom u populaciji žena.

Ispitivani polimorfizmi su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži na temelju čega se mogu isključiti pogreške nastale zbog uzorkovanja ili pogrešaka u genotipizaciji. MAOA-uVNTR P=0,986; DAT-VNTR P=0,937; 5-HTTLPR P=0,878; COMT Val158Met P=0,187

4.4 Usporedba distribucije genotipa između zdravih i bolesnih

U prvom dijelu statističke obrade pristupljeno je usporedbi ispitanika sa shizofrenijom sa kontrolnom zdravom populacijom. U ovom dijelu statističke obrade shizofrenija je promatrana kao jedinstveni poremećaj koji se manifestira kroz simptome na temelju kojih je postavljena dijagnoza.

4.4.1 MAOA-uVNTR

Kako je za optimalnu transkripciju potreban određen broj ponavljanja, genotipovi za MAOA-uVNTR polimorfizam grupirani su u one visoke aktivnosti (engl. *high*) prema alelima sa 4 i 3.5 ponavljanja te niske aktivnosti (engl. *low*) prema alelima sa 3 i 5 ponavljanja. U skladu s tim prikazana je distribucija genotipa ali samo za alele sa 3 i 4 ponavljanja za koje su bili dostupni kontrolni uzorci.

Ostali, rijetki aleli nisu uključeni u analizu..

Tablica 6. Usporedba distribucije genotipa MAOA-uVNTR polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom u podskupini muškaraca. Aleli su prikazani prema aktivnosti High (aleli sa 4 ponavljanja) i Low (3 ponavljanja).

MAOA High i Low muškarci	Zdravi – N (%) N _{ukupno} =154	Sch. – N (%) N _{ukupno} =216	P
High	114 (74,0)	131 (61,6)	0,010
Low	40 (26,0)	85 (39,4)	

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom u muškoj populaciji.

Tablica 7. Usporedba distribucije genotipa MAOA-uVNTR polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom u podskupini žena. Aleli su prikazani prema aktivnosti High (aleli sa 4 ponavljanja) i Low (3 ponavljanja).

MAOA High i Low žene	Zdravi – N (%) N _{ukupno} =148	Sch. – N (%) N _{ukupno} =81	P
High/High	64 (43,2)	35 (43,2)	0,134
High/Low	58 (39,2)	38 (46,9)	
Low/Low	26 (17,6)	8 (9,9)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između zdravih i bolesnih ispitanika u ženskoj populaciji.

4.4.2 Serotoninski transporter

Funkcionalni polimorfizam serotoninskog transportera karakterizira smanjena transkripcijska aktivnost S alela. Statistička obrada uključuje usporedbu pacijenata i kontrolne skupine u ukupnoj populaciji te razdvojeno prema spolu.

Tablica 8. Usporedba genotipa 5-HTTLPR polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom.

5-HTTLPR	Zdravi N (%)	Sch N(%)	P
	N _{ukupno} =314	N _{ukupno} =306	
LL	105 (33,4)	122 (39,9)	0,147
LS	152 (48,4)	125 (40,8)	
SS	57 (18,2)	59 (19,3)	

Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između zdrave populacije i ispitanika sa shizofrenijom neovisno o spolu.

Tablica 9. Distribucija genotipa 5-HTTLPR polimorfizma prema spolu

5-HTTLPR	Muškarci		Žene	
	Zdravi N (%)	Sch. N(%)	Zdravi N(%)	Sch. N(%)
	N _{ukupno} =161	N _{ukupno} =220	N _{ukupno} =150	N _{ukupno} =86
LL	57 (35,4)	88 (40,0)	48 (32,0)	34 (39,5)
LS	81 (50,3)	88 (40,0)	71 (47,3)	37 (43,0)
SS	23 (14,4)	44(20,0)	31 (20,7)	15 (17,4)
	P = 0,107		P = 0,495	

Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom nakon što su podijelili prema spolu.

4.4.3 Katekol-o-metil-transferaza

Met alel ispitivanog polimorfizma povezuje se sa sintezom termolabilnog proteina katekol-o-metil transferaze čija je katalitička aktivnost snižena. Ispitana je distribucija genotipa između kontrolne skupine i pacijenata neovisno o spolu te za svaki spol posebno

Tablica 10. Distribucija genotipa COMT Val158Met polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom

COMT	Zdravi N (%)	Sch. N (%)	P
	N _{ukupno} =314	N _{ukupno} =306	
Val/Val	63 (20,0)	75 (24,8)	0,237
Val/Met	168 (53,5)	144 (47,1)	
Met/Met	83 (26,4)	87 (28,4)	

Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa COMT Val158Met polimorfizma neovisno o spolu.

Tablica 11. Distribucija genotipa COMT Val158Met prema spolu

COMT	Muškarci		Žene	
	Zdravi N (%)	Sch N(%)	Zdravi N(%)	Sch. N(%)
	N _{ukupno} =161	N _{ukupno} =220	N _{ukupno} =150	N _{ukupno} =86
Val/Val	36 (22,4)	50 (22,7)	27(18)	25 (29,1)
Val/Met	81 (50,3)	111 (50,5)	85 (56,7)	33 (38,4)
Met/Met	44 (27,3)	59 (26,8)	38 (25,3)	38 (44,2)
	P = 0,992		P = 0,021	

U skupini muškaraca nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između zdravih i bolesnih. Međutim, statistički značajna razlika uočena je u skupini ženske populacije.

4.4.4 Dopaminski transporter

Alel 9 DAT-VNTR polimorfizma povezuje se sa smanjenom ekspresijom proteina dopaminskog transportera u odnosu na alel 10. Ispitana je razlika u distribuciji genotipa između kontrole i pacijenata ukupno i prema spolu.

Tablica 12. Distribucija genotipa DAT-VNTR polimorfizma između zdrave populacije i ispitanika sa shizofrenijom.

DAT	Zdravi N (%)	Sch. N (%)	P
	N _{ukupno} =314	N _{ukupno} =306	
10/10	150 (47,8)	154 (50,3)	0,028
10/9	131 (41,7)	133 (43,5)	
9/9	28 (8,9)	13 (4,2)	
Ostalo	5 (1,6)	6 (1,9)	

Test razlike proporcija ukazuje da postoji statistički značajna razlika u proporciji 9/9 genotipa između populacije zdravih i bolesnih ispitanika

Tablica 13. Distribucija genotipa DAT-VNTR polimorfizma prema spolu

DAT	Muškarci		Žene	
	Zdravi N (%)	Sch. N(%)	Zdravi N(%)	Sch. N(%)
	N _{ukupno} =161	N _{ukupno} =220	N _{ukupno} =150	N _{ukupno} =86
10/10	78 (48,4)	114(51,8)	72 (48,0)	40 (46,5)
10/9	68 (42,2)	94 (42,7)	63 (42,0)	39 (45,3)
9/9	13 (8,1)	9 (4,1)	14 (9,3)	4 (4,6)
ostalo	2 (1,2)	3 (1,4)	1 (0,7)	3 (3,5)
	P=0,338		P=0,831	

Testom razlike proporcija nije utvrđena statistički značajna razlika kao kod testiranja neovisno o spolu. Ostali rijetki genotipovi dodani su 9/9 genotipu te je izračunat hi-kvadrat test.

4.5 Ispitanici sa dijagnozom shizofrenije

U drugom dijelu statističke obrade, analizirani su samo podaci ispitanika sa shizofrenijom. Kako je shizofrenija bolest koja se često javlja kod osoba koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu, ispitana je povezanost genotipa i obiteljskog nasljeđivanja. Također, ispitana je

povezanost sklonosti suicidu te pokušaj suicida sa polimorfizmima 5-HTTLPR, MAOA-uVNTR, DAT-VNTR, COMT Val158Met.

Tablica 14. Distribucija genotipa 5-HTTLPR prema obiteljskom hereditetu, sklonosti i pokušaju suicida.

		5-HTTLPR N _{ukupno} =266			P
		LL N (%)	LS N (%)	SS N (%)	
Obiteljsko nasljeđe	Da	42 (16,2)	42 (16,2)	23 (8,6)	0,748
	Ne	63 (23,7)	66 (24,8)	30 (11,3)	
Sklonost suicidu	Da	19 (7,1)	21 (7,9)	11 (4,1)	0,919
	Ne	86 (32,3)	87 (32,7)	42 (15,8)	
Pokušaj suicida	Da	10 (3,8)	17 (6,4)	8 (3,0)	0,365
	Ne	95 (35,7)	91 (34,2)	45 (16,9)	

Tablica 15. Distribucija genotipa MAOA-uVNTR prema obiteljskom nasljeđu, sklonosti i pokušaju suicida.

		MAOA-uVNTR N _{ukupno} =266			P
		High/High N (%)	High/Low N (%)	Low/Low +ostali N (%)	
Obiteljsko nasljeđe	Da	53 (19,9)	16 (6,0)	38 (14,3)	0,299
	Ne	90 (33,8)	20 (7,5)	49 (18,4)	
Sklonost suicidu	Da	29 (10,9)	7 (2,6)	15 (5,6)	0,850
	Ne	114 (42,9)	29 (10,9)	72 (27,1)	
Pokušaj suicida	Da	19 (7,1)	6 (2,3)	10 (3,8)	0,764
	Ne	124 (46,6)	30 (11,3)	77 (28,9)	

Tablica 16. Distribucija genotipa DAT-VNTR prema obiteljskom nasljeđu, sklonosti i pokušaju suicida.

		DAT-VNTR $N_{\text{ukupno}}=266$			P
		10/10 N (%)	10/9 N (%)	9/9 + ostali N (%)	
Obiteljsko nasljeđe	Da	57 (21,4)	44 (16,5)	6 (2,3)	0,574
	Ne	79 (29,7)	70 (26,3)	10 (3,8)	
Sklonost suicidu	Da	25 (9,4)	24 (9,0)	2 (0,8)	0,708
	Ne	111 (41,7)	90 (33,8)	14 (5,3)	
Pokušaj suicida	Da	16 (6,0)	17 (6,4)	2 (0,8)	0,773
	Ne	120 (45,1)	97 (36,5)	14 (5,3)	

Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova 5-HTTLPR (Tablica 14), MAOA-uVNTR (Tablica 15) i DAT VNTR (Tablica 19) polimorfizama uzevši u obzir obiteljski hereditet, sklonost suicidu i pokušaj suicida.

Tablica 17. Distribucija genotipa COMT Val158Met prema obiteljskom nasljeđu, sklonosti i pokušaju suicida.

		COMT Val158Met $N_{\text{ukupno}}=266$			P
		Val/Val N (%)	Val/Met N (%)	Met/Met N (%)	
Obiteljsko nasljeđe	Da	23 (8,6)	48 (18,0)	36 (13,5)	0,033
	Ne	49 (18,4)	73 (27,4)	37 (13,9)	
Sklonost suicidu	Da	16 (6,0)	23 (8,6)	12 (4,5)	0,675
	Ne	56 (21,1)	98 (36,8)	61 (22,9)	
Pokušaj suicida	Da	8 (3,0)	18 (6,8)	9 (3,4)	0,733
	Ne	64 (24,1)	103 (38,7)	64 (24,1)	

Na primjeru COMT Val158Met polimorfizma nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa promatranu kroz sklonost suicidu i pokušaj suicida, ali utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa uzevši u obzir obiteljsko nasljeđe (Tablica 17).

Povezanost genotipa ispitivanih polimorfizama sa brojem epizoda i trajanjem bolesti ispitana je Kruskal-Wallisovim testom. Dostupni su bili podaci za 266 ispitanika sa shizofrenijom, a

podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Nije utvrđena povezanost genotipa sa brojem epizoda ili trajanjem bolesti što je prikazano u sljedećim tablicama (Tablica 18, Tablica 19, Tablica 20, Tablica 21).

Tablica 18. Povezanost polimorfizma serotoninskog transportera sa brojem epizoda i trajanjem bolesti.

5-HTTLPR	LL (N=105)	LS (N=108)	SS (N=53)	P
Broj epizoda	3 (3-6)	4 (3-7)	4 (3-6)	0,630
Trajanje bolesti (mj)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,939

*Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlika je ispitana Kruskal-Wallisovim testom.

Tablica 19. Povezanost polimorfizma MAOA-uVNTR sa brojem epizoda i trajanjem bolesti.

MAOA-uVNTR	High/High (N=143)	High/Low (N=36)	Low/Low+ ostali (N=87)	P
Broj epizoda	3 (3-6)	5 (3-8)	4 (3-6)	0,321
Trajanje bolesti (mj)	2 (1-2)	2 (2-2)	2 (1-2)	0,471

*Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlika je ispitana Kruskal-Wallisovim testom.

Tablica 20. Povezanost polimorfizma DAT-VNTR sa brojem epizoda i trajanjem bolesti

DAT-VNTR	10/10 (N=136)	10/9 (N=114)	9/9 + ostali (N=16)	P
Broj epizoda	4 (3-6)	4 (3-6)	6 (3-8)	0,607
Trajanje bolesti (mj)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (2-2)	0,163

*Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlika je ispitana Kruskal-Wallisovim testom.

Tablica 21. Povezanost Polimorfizma COMT Val158Met sa brojem epizoda i trajanjem bolesti

COMT Val158Met	Val/Val (N=72)	Val/Met (N=121)	Met/Met (N=73)	P
Broj epizoda	4 (3-7)	4 (3-7)	3 (3-6)	0,604
Trajanje bolesti (mj)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,440

*Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlika je ispitana Kruskal-Wallisovim testom.

Prema dosadašnjim istraživanjima, shizofrenija se povezuje sa poremećajem koncentracije dopamina u dopaminskom sustavu. Projekcije dopaminskog sustava prate projekcije serotoninskog sustava pa je na temelju podataka iz literature formirano 6 teorijskih kombinacija genotipova.

- Prva kombinacija trebala bi rezultirati povišenom koncentracijom dopamina u svim dijelovima mozga jer su izdvojeni genotipovi dopaminskog transportera i katekol-o-metil-transferaze povezani sa niskom aktivnošću transportera odnosno enzima.
- Druga kombinacija trebala bi rezultirati povišenom koncentracijom serotonina zbog genotipa koji dovodi do snižene ekspresije serotoninskog transportera i snižene aktivnosti MAOA, s time da su uključeni samo homozigoti – genotipovi niske aktivnosti.
- Treća kombinacija vođena je istom hipotezom kao i druga ali su u obzir uzeti heterozigoti i aleli niske frekvencije.
- U četvrtoj i petoj kombinaciji u obzir su uzeti genotipovi MAOA-uVNTR polimorfizma koji dovode do niske aktivnosti enzima te genotip serotoninskog transportera koji rezultira normalnom ekspresijom. MAOA-uVNTR osim serotonina kao supstrat koristi i dopamin, stoga su na ovaj način izolirane kombinacije koje bi bile odraz učinka MAOA-uVNTR polimorfizma uz pretpostavku da polimorfizmi dopaminskog transportera i katekol-o-metil transferaze nemaju učinak na koncentraciju dopamina.
- Šestom kombinacijom uključen je MAOA-uVNTR genotip niske aktivnosti, COMT genotip niske aktivnosti (Met/Met) te heterozigoti (Val/Met) jer je uočeno da i heterozigoti iskazuju nižu aktivnost enzima u odnosu na Val/Val genotip. MAOA je enzim koji jednim dijelom sudjeluje u razgradnji dopamina stoga je pretpostavka pri formiranju ove kombinacije da ovi polimorfizmi rezultiraju sniženom razgradnjom dopamina. Pretpostavka je da u ovoj kombinaciji, polimorfizmi transportera nemaju učinak.

Tablica 22. Prikaz 6 teorijskih kombinacija genotipa formiranih prema funkciji polimorfizma. Kombinacije su označene brojevima 1 do 6 uz pripadajuće objašnjenje očekivane funkcije transportera ili enzima. Za svaku kombinaciju, ispitanici su grupirani u skupinu 1 u koju su grupirani ispitanici sa genotipovima koji doprinose funkciji, a u skupinu 2 su grupirani svi ostali ispitanici.

Kombinacije	Funkcija	Raspored genotipova po skupinama	
1	Porast dopamina	DAT 9/9 + DAT aleli niske frekvencije + COMT Val/Met + Met/Met	Skupina 1
		ostale kombinacije	Skupina 2
2	Porast serotonina	5-HTTLPR SS + MAOA Low/Low + MAOA aleli niske frekvencije	Skupina 1
		Ostale kombinacije	Skupina 2
3	Porast serotonina	5-HTTLPR SS + LS + MAOA Low/Low + Low/High + MAOA aleli niske frekvencije	Skupina 1
		Ostale kombinacije	Skupina 2
4	MAOA niske aktivnosti	MAOA Low/Low + Low/High + MAOA aleli niske frekvencije + 5-HTTLPR LL	Skupina 1
		Ostale kombinacije	Skupina 2
5	MAOA niske aktivnosti	MAOA Low/Low + MAOA aleli niske frekvencije + 5-HTTLPR LL	Skupina 1
		Ostale kombinacije	Skupina 2
6	Enzimi niske aktivnosti	MAOA Low/Low + MAOA aleli niske frekvencije + COMT Val/Met + Met/Met	Skupina 1
		Ostale kombinacije	Skupina 2

Tablica 23. Distribucija 6 kombinacija genotipa između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom.

Kombinacija		Shizofrenija N _{ukupno} =306	Zdravi N _{ukupno} =314	P
1	Skupina 1	16 (5,2%)	29 (9,2%)	0,077
	Skupina 2	290 (94,8%)	285 (90,8%)	
2	Skupina 1	16 (5,2%)	14 (4,5%)	0,795
	Skupina 2	290 (94,8%)	300 (95,5%)	
3	Skupina 1	84 (27,5%)	83 (26,4%)	0,845
	Skupina 2	222 (72,5%)	231 (73,6%)	
4	Skupina 1	55 (18,0%)	52 (16,5%)	0,719
	Skupina 2	251 (82,0%)	262 (83,4%)	
5	Skupina 1	39 (12,7%)	28 (8,9%)	0,159
	Skupina 2	267 (87,2%)	286 (91,1%)	
6	Skupina 1	78 (25,5%)	61 (19,4%)	0,087
	Skupina 2	228 (74,5%)	253 (80,6%)	

PANSS ljestvicom ocijenjen je intenzitet ispitivanih dimenzija simptoma za svakog pacijenta. Ispitano je postoji li statistički značajna razlika u intenzitetu simptoma između genotipova polimorfizma serotoninskog transportera, monoamino-oksidaze A, katekol-o-metil transferaze i dopaminskog transportera.

Za podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu korišten je Kruskal-Wallisov test, a podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (medijan (25- 75 percentila)). Za podatke koji su pratili normalnu razdiobu rađena je analiza varijance (ANOVA), a podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (srednje vrijednost ± standardna devijacija).

Tablica 24. Intenzitet izdvojenih simptoma izražen kao srednja vrijednost ili medijan uz pripadajući raspon, prema genotipu 5-HTTLPR polimorfizma.

	5-HTTLPR			P
	LL N _{ukupno} =117	LS N _{ukupno} =122	SS N _{ukupno} =54	
Negativni	27 ± 6	27 ± 6	27 ± 5	0,532
Pozitivni	18 (16-23)	17 (14-22)	21 (16-23)	0,138
Opći	55±12	54±12	56±10	0,704
Ukupni	102 ±21	102±23	103±18	0,920
Aktivacija	10 (8-12)	9 (8-12)	10 (9-12)	0,673
Anergija	13 (11-15)	13 (12-15)	13 (11-14)	0,599
Depresija	14±4	13±4	13±3	0,731
Paranoja	5 (4-8)	6 (4-7)	6 (5-8)	0,376
Poremećaj razmišljanja	12 (9-15)	10 (8-14)	12 (10-15)	0,185

Nije utvrđena povezanost intenziteta simptoma sa polimorfizmom serotoninskog transportera.

Tablica 25. Intenzitet izdvojenih simptoma, izražen kao srednja vrijednost ili medijan uz pripadajući raspon, prema genotipu MAOA-uVNTR polimorfizma.

	MAOA			P
	High/High N _{ukupno} =158	High/Low N _{ukupno} =39	Low/Low +ostalo N _{ukupno} =96	
Negativni	27±6	26±5	28±7	0,367
Pozitivni	19 (15-23)	18 (15-21)	18 (14-23)	0,681
Opći	55±11	56±10	53±13	0,342
Ukupni	103±20	102±20	101±23	0,795
Aktivacija	10 (8-12)	9 (8-11)	10 (8-12)	0,218
Anergija	13 (12-15)	13 (11-14)	13 (11-15)	0,784
Depresija	14±4	14±3	13±4	0,659
Paranoja	6 (4-8)	5 (4-7)	6 (4-8)	0,540
Poremećaj razmišljanja	12 (9-15)	12 (9-13)	12 (8-15)	0,790

Nije utvrđena povezanost intenziteta simptoma sa MAOA-uVNTR polimorfizmom neovisno o spolu ispitanika. Budući da je ranije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između zdravih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom u muškoj populaciji, ispitali smo povezanost dimenzija simptoma i MAOA-uVNTR polimorfizma u skupini muških ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 26. Intenzitet izdvojenih simptoma, izražen kao srednja vrijednost ili medijan uz pripadajući raspon, prema genotipu MAOA-uVNTR polimorfizma u skupini muških ispitanika sa shizofrenijom.

	High N _{ukupno} =123	Low N _{ukupno} =84	P
Negativni	27±5	28±7	0,469
Pozitivni	20±6	20±7	0,591
Opći	55±11	55±13	0,193
Ukupni	102±19	101±24	0,126
Aktivacija	10 (8-12)	10 (8-12)	0,764
Anergija	13(12-15)	13 (11-15)	0,328
Depresija	13±4	13±4	0,202
Paranoja	6 (5-8)	6 (4-8)	0,370
Poremećaj razmišljanja	12 (9-15)	12 (8-15)	0,429

Nije utvrđena povezanost intenziteta simptoma sa alelima niske i visoke aktivnosti MAOA-uVNTR polimorfizma u skupini muških ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 27. Intenzitet izdvojenih simptoma izražen kao srednja vrijednost ili medijan uz pripadajući raspon, prema genotipu COMT Val158Met polimorfizma.

	COMT Val158Met			P
	Val/Val N=73	Val/Met N=137	Met/Met N=83	
Negativni	27±5	28±6	26±6	0,158
Pozitivni	17(15-23)	19(15-23)	18 (14-23)	0,623
Opći	54±12	55±12	55±12	0,835
Ukupni	101±22	103±21	101±21	0,719
Aktivacija	10 (8-12)	10 (8-12)	10 (8-12)	0,262
Anergija	13 (11-14)	13 (12-15)	13 (11-14)	0,308
Depresija	13±4	13±4	14±4	0,827
Paranoja	5 (4-8)	6(5-7)	6(4-8)	0,961
Poremećaj razmišljanja	11 (7-9)	12 (9-15)	12 (9-15)	0,794

Nije utvrđena povezanost intenziteta simptoma sa COMT Val158Met polimorfizmom.

Tablica 28. Intenzitet izdvojenih simptoma izražen kao srednja vrijednost ili medijan uz pripadajući raspon, prema genotipu DAT-VNTR polimorfizma.

	DAT-VNTR			P
	10/10 N _{ukupno} =146	10/9 N _{ukupno} =128	9/9 +ostalo N _{ukupno} =19	
Negativni	27±6	28±6	29±8	0,318
Pozitivni	18 (15-22)	19 (15-23)	18 (14-25)	0,244
Opći	54±12	56±12	56±14	0,373
Ukupni	100±21	104±21	105±26	0,278
Aktivacija	10 (8-12)	10 (8-12)	9 (7-12)	0,980
Anergija	13 (11-15)	13 (12-15)	13 (11-15)	0,667
Depresija	9±4	10±3	11±4	0,147
Paranoja	6 (4-7)	6 (5-8)	5 (4-9)	0,593
Poremećaj razmišljanja	11 (9-14)	13 (9-15)	11(9-14)	0,138

Nije utvrđena povezanost intenziteta simptoma sa DAT-VNTR polimorfizmom.

Neparametrijskim Man-Whitney testom ispitano je postoji li statistički značajna razlika u intenzitetu ispitivanih dimenzija simptoma između ranije definiranih kombinacija genotipova. Kombinacije ispitivanih genotipova grupirane su u dvije skupine. U skupinu označenu sa 1 uključene su kombinacije koje bi mogle imati utjecaj na serotonininski ili dopaminski sustav, a u skupinu 2 uključene su sve ostale kombinacije, kao što je prikazano u tablici (Tablica 25). Zbog malog broja uzorka po skupinama (manje od 30) koristili smo navedeni neparametrijski test a podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 29. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma s 1. kombinacijom genotipova.

1. KOMBINACIJA			
Simptomi	Skupina 1	Skupina 2	P
	N _{ukupno} =16	N _{ukupno} =277	
Negativni	28 (25-37)	27 (23-32)	0,201
Pozitivni	19 (15-25)	18 (15-23)	0,995
Opći	55 (50-60)	56(47-64)	0,779
Ukupni	102 (92-117)	102 (89-116)	0,481
Aktivacija	10 (8-13)	10 (8-12)	0,642
Anergija	14 (13-17)	13 (11-15)	0,135
Depresija	15 (13-17)	13 (11-16)	0,089
Paranoja	5 (4-9)	6 (4-7)	0,920
Poremećaj razmišljanja	12 (10-15)	12 (9-15)	0,632

Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 1. kombinacije genotipa

Tablica 30. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma s 2. kombinacijom genotipova.

2. KOMBINACIJA			
Simptomi	Skupina 1	Skupina 2	P
	N _{ukupno} =14	N _{ukupno} =279	
Negativni	28 (25-32)	27 (23-32)	0,822
Pozitivni	22 (17-27)	18 (15-23)	0,089
Opći	53 (45-62)	56 (48-64)	0,569
Ukupni	105 (91-111)	102 (89-116)	0,930
Aktivacija	10 (9-12)	10 (-12)	0,437
Anergija	13 (11-14)	13 (12-15)	0,500
Depresija	14 (12-16)	14 (11-16)	0,874
Paranoja	6 (6-9)	6 (4-7)	0,196
Poremećaj razmišljanja	13 (10-15)	12 (9-15)	0,521

Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 2. kombinacije genotipa

Tablica 31. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma sa 3. kombinacijom genotipova.

3. KOMBINACIJA			
Simptomi	Skupina 1	Skupina 2	P
	N _{ukupno} =82	N _{ukupno} =211	
Negativni	28 (24-32)	27 (23-31)	0,500
Pozitivni	18 (14-22)	18 (15-23)	0,387
Opći	56 (45-63)	56 (48-64)	0,364
Ukupni	101 (90-113)	102 (89-117)	0,823
Aktivacija	9 (8-12)	10 (8-12)	0,243
Anergija	13 (11-15)	13 (12-15)	0,750
Depresija	13 (10-16)	14 (11-17)	0,313
Paranoja	6 (4-7)	6 (4-8)	0,971
Poremećaj razmišljanja	11 (8-14)	12 (9-15)	0,218

Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 3. kombinacije genotipa.

Tablica 32. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma s 4. kombinacijom genotipova.

4. KOMBINACIJA

Simptomi	Skupina 1 N _{ukupno} =53	Skupina 2 N _{ukupno} =240	P
Negativni	27 (23-31)	27 (24-32)	0,470
Pozitivni	18 (15-23)	18 (15-23)	0,947
Opći	55 (47-64)	56 (47-63)	0,953
Ukupni	102 (87-117)	102 (90-115)	0,738
Aktivacija	10 (8-11)	10 (8-12)	0,432
Anergija	13 (11-14)	13 (12-15)	0,799
Depresija	14 (12-17)	13 (11-16)	0,287
Paranoja	5 (4-7)	6 (4-8)	0,393
Poremećaj razmišljanja	13 (9-15)	12 (9-15)	0,581

Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 4. kombinacije genotipa

Tablica 33. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma s 5. kombinacijom genotipova.

5. KOMBINACIJA

Simptomi	Skupina 1 N _{ukupno} =37	Skupina 2 N _{ukupno} =295	P
Negativni	28 (23-32)	27 (24-31)	0,835
Pozitivni	18 (14-23)	18 (15-23)	0,818
Opći	54 (46-63)	56 (49-63)	0,740
Ukupni	105 (81-118)	102 (90-115)	0,711
Aktivacija	10 (8-12)	10 (8-12)	0,814
Anergija	13 (11-15)	13 (12-15)	0,981
Depresija	14 (10-17)	14 (11-1)	0,970
Paranoja	6 (4-7)	6 (4-8)	0,724
Poremećaj razmišljanja	12 (8-16)	12 (9-14)	0,992

Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 5. kombinacije genotipa.

Tablica 34. Povezanost intenziteta izdvojenih simptoma s 6. kombinacijom genotipova.

6. KOMBINACIJA			
Simptomi	Skupina 1 N _{ukupno} =74	Skupina 2 N _{ukupno} =219	P
Negativni	28 (23-33)	27 (23-31)	0,183
Pozitivni	19 (14-23)	18 (15-23)	0,871
Opći	54 (46-42)	56 (49-64)	0,302
Ukupni	103 (85-116)	102 (90-116)	0,996
Aktivacija	10 (8-12)	18 (8-12)	0,969
Anergija	13 (12-15)	13 (12-15)	0,654
Depresija	14 (10-16)	14 (11-16)	0,521
Paranoja	6 (5-8)	6 (4-7)	0,639
Poremećaj razmišljanja	12 (8-15)	12 (9-15)	0,853

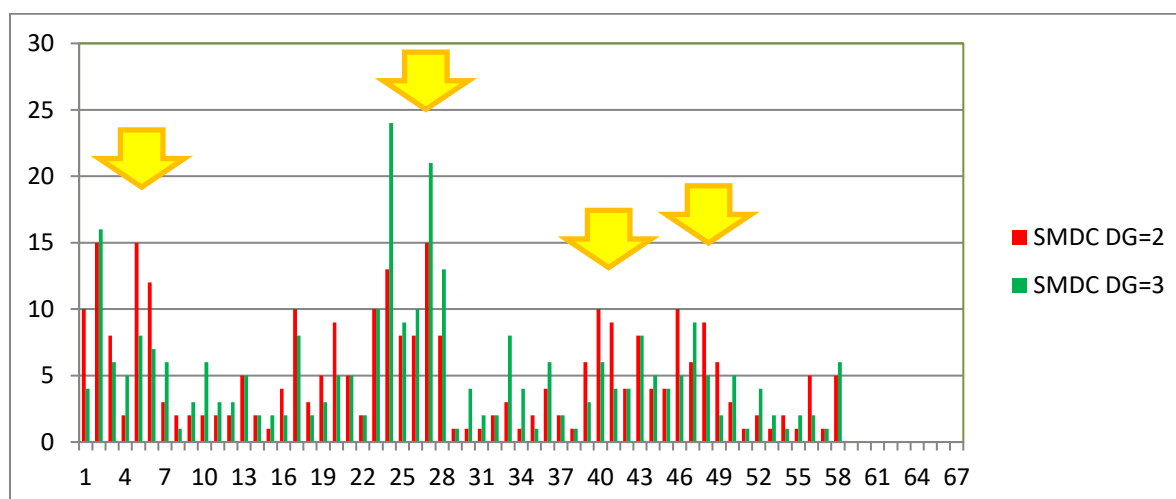
Nije utvrđena povezanost između intenziteta simptoma i 6. kombinacije genotipa.

Grupiranjem genotipova prema literaturnim podacima nismo uspjeli utvrditi povezanost niti jedne od 6 kombinacija s intenzitetom izdvojenih simptoma. Prema dobivenim rezultatima, u skupini ispitanika sa shizofrenijom pronađene su 63 kombinacije, a u kontrolnoj zdravoj skupini 66 kombinacija genotipova 5-HTTLPR, MAOA-uVNTR, DAT VNTR i COMT Val158Met. Izdvojene su kombinacije genotipova koje se češće javljaju u skupini zdravih i ispitanika sa shizofrenijom (Slika 19). Zelenom bojom označena je kontrolna skupina zdravih ispitanika, a crvenom ispitanici sa shizofrenijom. Žute strelice označavaju kombinacije genotipova koje se češće javljaju u zdravoj populaciji odnosno kod ispitanika sa shizofrenijom.

Objašnjenje šifri za kombinaciju genotipova 5-HTTLPR (S), MAOA (M), COMT (C), DAT (D) prikazano je u tablici (Tablica 38). Od svih dobivenih kombinacija, izdvojili smo one za koje smo procijenili da se češće javljaju u jednoj od skupina (Tablica 39). Testom razlike proporcija ispitali smo postoji li statistički značajna razlika u distribuciji na ovaj način izabranih kombinacija

Tablica 35. Objašnjenje šifri za kombinacije genotipova koji se najčešće javljaju u zdravoj ili populaciji shizofreničara.

Šifra SMDC	5-HTTLPR (S)	MAO (M)	DAT (D)	COMT (C)
0000	LL	High/High	10/10	Val/Val
0011	LL	High/High	10/9	Val/Met
0012	LL	High/High	10/9	Met/Met
0101	LL	High/Low	10/10	Val/Met
1001	LS	High/High	10/10	Val/Met
1011	LS	High/High	10/9	Val/Met
1012	LS	High/High	10/9	Met/Met
1101	LS	High/Low	10/10	Val/Met
1201	LS	Low/Low	10/10	Val/Met
1202	LS	Low/Low	10/10	Met/Met
2000	SS	High/High	10/10	Val/Val
2001	SS	High/High	10/10	Val/Met
2002	SS	High/High	10/10	Met/Met
2011	SS	High/High	10/9	Val/Met
2101	SS	High/Low	10/10	Val/Met
2201	SS	Low/Low	10/10	Val/Met



Slika 19. Prikaz broja ispitanika sa shizofrenijom (crveno, DG=2) i zdravih ispitanika (zeleno DG=3) prema nađenim kombinacijama genotipa. Strelice označavaju kombinacije genotipa koje se po ukupnom broju razlikuju između kontrolne skupine i skupine ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 36. Izdvojene su kombinacije za koje je prema grafičkom prikazu uočeno da se češće javljaju kod ispitanika sa shizofrenijom ili u kontrolnoj skupini.

SMDC	Kontrolna skupina	Ispitanici sa shizofrenijom	P
	N _{ukupno} =314 N (%)	N _{ukupno} =306 (%)	
0000	4 (1,3)	10 (3,3)	0,163
0011	8 (2,5)	15 (4,9)	0,170
0012	7 (2,2)	12 (3,9)	0,318
0101	6 (1,9)	2 (0,7)	0,336
1001	24 (7,6)	13 (4,2)	0,105
1011	21 (6,7)	15 (4,9)	0,432
1012	13 (4,1)	8 (2,6)	0,416
1101	8 (2,5)	3 (1,0)	0,265
1201	6 (1,9)	10 (3,3)	0,399
1202	4 (1,3)	9 (2,9)	0,266
2000	5 (1,6)	10 (3,3)	0,266
2001	9 (2,9)	6 (2,0)	0,642
2002	5 (1,6)	9 (2,9)	0,411
2011	2 (0,6)	6 (2,0)	0,235
2101	4 (1,3)	2 (0,7)	0,729
2201	2 (0,6)	5 (1,6)	0,418
UKUPNO	128 (40,7)	135 (44,1)	

Testom razlike proporcija nije utvrđena statistički značajna razlika između proporcija kombinacije genotipa u zdravoj odnosno skupini ispitanika sa shizofrenijom.

Ranije su opisane teorijske kombinacije genotipova dobivene koristeći literaturne podatke o povezanosti polimorfizma i funkciji transportera odnosno enzima. Analiza kojom bi se ispitala povezanost drugih kombinacija, kao što je kombinacija u kojoj su prisutni svi genotipovi divljeg tipa ili mutiranog tipa nije bila moguća zbog premalog broja takvih uzorka. Koliko zapravo dolazi do raspršenja frekvencija različitih kombinacija genotipova, vidljivo je iz tablice (

Tablica 36) u kojoj su prikazane kombinacije za koje je uočeno da se češće javljaju u skupini zdravih odnosno u skupini ispitanika sa shizofrenijom.

Calgary skalom ocijenjen je stupanj depresije kod ispitanika sa shizofrenijom.

Koeficijent korelacije od 0,790 ($P < 0,0001$) prema Coltonu ukazuje na vrlo dobru povezanost između vrijednosti depresije ocijenjene PANSS skalom i depresije ocijenjene Calgary skalom ispitanika. Kako je Calgary skala validirana za ocjenu depresije kod pacijenata sa shizofrenijom, pretpostavljeno je da se ovim instrumentom može točnije dijagnosticirati depresija kod ispitanika sa shizofrenijom. Za ukupni zbroj veći od 6 definirana je osjetljivost od 85 % i specifičnost od 82 % za predikciju depresivne epizode (78). Ispitanici kod kojih je zabilježen zbroj ocjena iznosio 7 ili više, definirani su kao ispitanici sa prisutnim depresivnom epizodom, dok su oni sa ocjenom manjom od 7 definirani kao ispitanici bez depresije.

Kruskal-Wallisovim testom ispitali smo povezanost genotipa sa rezultatima Calgary ljestvice.

Tablica 37 tablica prikazuje povezanost genotipa polimorfizama serotoninskog transportera, monoamino-oksidge A, dopaminskog transportera i katekol-o-metil transferaze s intenzitetom depresivnih simptoma ocijenjenih Calgary ljestvicom.

	Genotip			P
	5-HTTLPR (LL) $N_{\text{ukupno}}=117$	5-HTTLPR (LS) $N_{\text{ukupno}}=122$	5-HTTLPR (SS) $N_{\text{ukupno}}=54$	
Calgary	9 (3-12)	8 (3-12)	9 (5-11)	0,875
	MAOA (High/High) $N_{\text{ukupno}}=158$	MAOA (High/Low) $N_{\text{ukupno}}=39$	MAOA (Low/Low+ostali) $N_{\text{ukupno}}=96$	
Calgary	8 (3-11)	10 (5-12)	9 (3-13)	0,524
	DAT (10/10) $N_{\text{ukupno}}=146$	DAT (10/9) $N_{\text{ukupno}}=128$	DAT (9/9+ostali) $N_{\text{ukupno}}=19$	
Calgary	8 (2-12)	9 (3-12)	9 (4-12)	0,587
	COMT (Val/Val) $N_{\text{ukupno}}=73$	COMT (Val/Met) $N_{\text{ukupno}}=137$	COMT (Met/Met) $N_{\text{ukupno}}=83$	
Calgary	8 (3-11)	9 (3-13)	8 (3-11)	0,735

Nije utvrđena statistički značajna razlika u intenzitetu depresivnih simptoma ovisno o genotipu ispitivanih polimorfizama.

U sljedećem dijelu statističke obrade, ispitanici sa shizofrenijom podijeljeni su u skupinu sa prisutnom depresijom ($\text{Calgary} \geq 7$) i skupinu u kojoj nije zabilježena depresija

(Calgary < 7). Hi kvadrat testom ispitano je postoji li statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između ove dvije skupine.

Tablica 38. Povezanost COMT Val158Met polimorfizma s depresijom u skupini ispitanika sa shizofrenijom.

COMT				
	Val/Val N (%)	Val/Met N (%)	Met/Met N (%)	P
Calgary <7	28 (9,6)	51 (17,4)	33 (11,3)	0,932
Calgary ≥7	45 (15,4%)	86 (29,4)	50 (17,1)	

Tablica 39. Povezanost DAT-VNTR polimorfizma s depresijom u skupini ispitanika sa shizofrenijom.

DAT				
	10/10 N (%)	10/9 N (%)	9/9 N (%)	P
Calgary <7	61 (20,8)	45 (15,4)	6 (2,0)	0,439
Calgary ≥7	85 (29,0)	83 (28,3)	13 (4,4)	

Tablica 40. Povezanost MAOA-uVNTR polimorfizma s depresijom u skupini ispitanika sa shizofrenijom.

MAOA				
	High/High N (%)	High/Low N (%)	Low/Low N (%)	P
Calgary <7	63 (21,5)	14 (4,8)	35 (11,9)	0,820
Calgary ≥7	95 (32,4)	25 (8,5)	61 (20,8)	

Tablica 41. Povezanost 5-HTTLPR polimorfizma s depresijom u skupini ispitanika sa shizofrenijom.

5-HTTLPR				
	LL N (%)	LS N (%)	SS N (%)	P
Calgary <7	42 (14,3)	54 (18,4)	16 (5,5)	0,147
Calgary ≥7	75 (25,6)	68 (23,2)	38 (13,0)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa između ispitanika sa shizofrenijom kod kojih je prema Calgary ljestvici bila prisutna depresija i ispitanika kod kojih depresija nije bila prisutna.

U nastavku statističke obrade ispitana je povezanost ranije definiranih kombinacija polimorfizama (Tablica 22) s prisutnošću depresije kod ispitanika sa shizofrenijom. Korišten je test razlike proporcija zbog malog broja uzoraka po skupinama.

Tablica 42. Povezanost kombinacija genotipa sa depresijom u skupini ispitanika sa shizofrenijom. Skupine su opisane u tablici (Tablica 22).

Kombinacija	Skupine	Calgary		P
		<7 (nema depresiju) N(%)	≥7 (ima depresiju) N (%)	
1	Skupina 1	4 (1,4)	12 (4,1)	0,303
	Skupina 2	108 (36,9)	169 (57,7)	
2	Skupina 1	5 (1,7)	9 (3,1)	0,933
	Skupina 2	107 (36,5)	172 (58,7)	
3	Skupina 1	32 (10,9)	50 (17,1)	0,967
	Skupina 2	80 (27,3)	131 (44,7)	
4	Skupina 1	17 (5,8)	36 (12,3)	0,389
	Skupina 2	95 (32,4)	145 (49,5)	
5	Skupina 1	12 (4,1)	25 (8,5)	0,552
	Skupina 2	100 (34,1)	156 (53,2)	
6	Skupina 1	28 (9,6)	46 (15,7)	0,953
	Skupina 2	84 (28,7)	135 (46,1)	

*Genotipovi koji su uključeni u navedene kombinacije, opisani su u tablici (Tablica 22)

Nije utvrđena statistički značajna razlika između definiranih kombinacija genotipova i depresije kod ispitanika sa shizofrenijom.

4.6 Logistička regresija

Logističkom regresijom utvrđen je model prema kojem bi korištenjem nezavisnih varijabli bilo moguće predvidjeti ishod, odnosno prepoznati ispitanike koji boluju od shizofrenije.

U model su univarijatnom analizom uključene varijable koje su se pokazale značajnima u prethodnoj obradi te polimorfizme COMT, DAT, 5-HTTLPR i MAOA. Prisutnost polimorfnog alela (heterozigote i nositelje dva polimorfna alela) uključili smo u model kao rizični faktor (COMT: Met alel; DAT: 9-alel; 5-HTTLPR: S-alel; MAOA: alel niske aktivnosti). Prema prethodnim analizama gdje je χ^2 -kvadrat testom uočena statistički značajna razlika, kao rizične proglašene su one varijable koje su bile zastupljenije u skupini shizofreničara. Varijable koje bi

mogle pridonijeti razlikovanju zdravih ispitanika su: spol – muški; bračni status – nije u braku; stručna sprema – srednja i niska; zaposlenje – nezaposlen.

Za sve ispitanike napravljena je univarijatna logistička regresija.

Tablica 43. Prikaz univarijatna i multivarijatne logističke regresije.

varijabla	Univarijatna analiza		Multivarijatna analiza	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
spol	2,38 (1,71 – 3,33)	< 0,001	1,05 (0,64 – 1,72)	0,849
Bračni status	3,88 (2,66 – 5,67)	< 0,001	2,35 (1,48 – 3,73)	<0,001
Stručna sprema	7,19 (4,78 – 10,83)	< 0,001	3,93 (2,45 – 6,30)	<0,001
Zaposlenje	13,27 (8,35 – 21,07)	< 0,001	8,59 (5,17 – 14,29)	<0,001
COMT	0,96 (0,76 - 1,97)	0,699		
DAT1	0,87 (0,68 - 1,12)	0,278		
5-HTTLPR	0,92 (0,74 - 1,15)	0,469		
MAOA	1,17 (0,98 – 1,41)	0,083	1,41 (1,08 – 1,84)	0,010
Ispravno klasificirano: 80,45%				

Nakon univarijatne analize rađena je multivarijatna analiza gdje su uključeni svi parametri čija je P vrijednost bila manja od 0,1. MAOA se u multivarijatnom modelu pokazao kao statistički značajan (P=0,010), za razliku od spola ispitanika (P=0,849).

5 RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi postoji li povezanost između polimorfizma serotoninskog transportera (5-HTTLPR), dopaminskog transportera (DAT), katekol-o-metil-transferaze (COMT), monoamino-oksidge A (MAOA) i shizofrenije.

Kao što je ranije spomenuto, shizofrenija je težak psihijatrijski poremećaj koji nastaje kao posljedica poremećaja moždane funkcije. Zahvaća oko 1% populacije čime se nameće kao javno zdravstveni problem. Bolest onemogućava normalno funkcioniranje pojedinca zbog čega predstavlja socioekonomski teret, kako za cjelokupno društvo tako i za obitelj odnosno skrbnike (79). U odnosu na druge psihijatrijske poremećaje kao što je depresija, oboljeli od shizofrenije u najvećoj su mjeri radno nesposobni i posljedično tome nezaposleni što je vidljivo iz naših rezultata. U skupini ispitanika sa shizofrenijom bilo je više nezaposlenih i ispitanika u mirovini. Prema nekim istraživanjima, ispitanici sa shizofrenijom su prema vlastitoj procjeni u odnosu na bolesnike sa depresijom, bili spremniji za rad, ali je njihova realna radna sposobnost umanjena (80). Prema dobivenim rezultatima, veći broj umirovljenih ispitanika sa shizofrenijom može se objasniti prijevremenim odlaskom u mirovinu zbog bolesti, ali i širim rasponom dobi ispitanika sa shizofrenijom koji su uključeni u ispitivanje. Nadalje, rezultati ukazuju da postoji statistički značajna razlika s obzirom na stručnu spremu gdje je u skupini ispitanika oboljelih od shizofrenije bilo više onih koji su imali srednju ili nisku stručnu spremu. Ovi rezultati mogu biti posljedica smanjenih kognitivnih funkcija koje su uočene kod ispitanika sa shizofrenijom što se u konačnici odrazilo na stupanj njihovog obrazovanja. Statistički značajna razlika uočena je u bračnom statusu između zdravih i ispitanika oboljelih od shizofrenije ($P < 0,001$). U skupini ispitanika sa shizofrenijom može se uočiti veći broj razvedenih i onih koji nisu bili u braku u vrijeme prikupljanja podataka. Ovakvi rezultati mogu se objasniti otežanim sklapanjem i održavanjem međuljudskih odnosa kod oboljelih od shizofrenije (81). U jednom prospektivnom istraživanju provedenom na kineskoj populaciji uočeno je da su ispitanici u braku brže i lakše postizali remisiju što ukazuje na važnost okoline na oporavak i integraciju oboljelih u društvo što između ostalog ukazuje i na potrebu za razvojem programa za njihovim zapošljavanjem (82).

Statistički značajna razlika dobivena je usporedbom spolova ($P < 0,001$) gdje je u skupini ispitanika sa shizofrenijom bilo više muškaraca. Ovi rezultati u skladu su sa ranije objavljenim podacima prema kojima se shizofrenija češće javlja kod muškaraca te nastupa ranije uz izražene simptome. Zabilježeno je da se shizofrenija najčešće javlja kod muškaraca u dobi od 15 – 25

godina, a kod žena između 20 i 29 sa prosječnom razlikom od 5 godina. Istraživanja pokazuju da oko 25 % oboljelih ima više od 40 godina ali zato 75% tih bolesnika čine žene što ide u prilog protektivnom utjecaju estrogena (83, 84). Nije uočena statistički značajna razlika u dobi između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom, međutim uočili smo statistički značajnu razliku u dobi između muških i ženskih ispitanika sa shizofrenijom. Medijan dobi za žene u našem istraživanju iznosi 47 godina, a za muškarce 34 godine što je u skladu s prethodnim istraživanjima prema kojima shizofrenija nastupa kasnije kod žena. Ovo istraživanje je postavljeno kao istraživanje parova, koje je uzevši u obzir vremensku dimenziju, retrospektivno istraživanje. Medijan dobi ispitanika sa shizofrenijom u ovom istraživanju je viši iz razloga što se radi o dobi u trenutku uključivanja, a ne nužno o dobi nastanka shizofrenije. U ovo istraživanje uključeni su ispitanici kod kojih je nastupio recidiv zbog prekida terapije, kao i ispitanici sa prvom epizodom shizofrenije zbog čega je i raspon između minimalne i maksimalne dobi visok 18 – 84 godine za muškarce i 22 – 73 godine za žene.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bilo je ispitati povezanost polimorfizama dopaminskog transportera, serotoninog transportera, monoamino-oksidge A, i katekol-o-metiltransferaze sa shizofrenijom. Polimorfizam MAOA-uVNTR nalazi se na kratkom kraku kromosoma X zbog čega su heterozigoti mogući samo u ženskoj populaciji. Muškarci kao hemizigoti mogu biti nositelji samo jednog alela pa je ova analiza rađena odvojeno na muškoj i ženskoj populaciji. Statistički značajna razlika uočena je samo u muškoj populaciji za MAOA-uVNTR polimorfizam. U drugim istraživanjima, povezanost MAOA-uVNTR polimorfizma povezuje se s agresivnim ponašanjem nakon izloženosti vanjskim agresivnim utjecajima i sa shizofrenijom kod muškaraca (85, 86). Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da je gen za MAOA povezan s agresivnim ponašanjem, odnosno genetski modificirani miševi bez gena za MAOA pokazivali su visok stupanj agresije (87). Točkasta mutacija MAOA gena koja je otkrivena i opisana u jednoj nizozemskoj obitelji dovodi do sindroma koji karakterizira blaga mentalna retardacija i agresivno ponašanje kod muškaraca, dok ženski nositelji jednog mutiranog alela nisu pokazivali znakove agresije i mentalne retardacije. Radi se o C936T mutaciji u genu za MAOA koja je otkrivena kod zahvaćenih muškaraca, a dovodi do deficita enzima MAOA (88). MAOA-uVNTR polimorfizam ne dovodi do deficita enzima već do snižene aktivnosti. Supstrati za enzim MAOA su serotonin ali i dopamin koji se povezuju s agresivnim ponašanjem. Pretpostavlja se da bi MAOA mogao imati modifikacijsku ulogu u formiranju mozga u razvoju djece koja su izložena zlostavljanju (89). Istraživanje provedeno na kohorti djece pokazalo je da su nositelji Low alela koji su bili zlostavljani u djetinjstvu imali

veću šansu razviti agresivan oblik ponašanja u odrasloj dobi u odnosu na nositelje alela visoke aktivnosti (90). Uočena je povezanost shizofrenije i MAOA-uVNTR polimorfizma u muškoj populaciji, što se slaže sa istraživanjem koje su proveli Jonsson i suradnici (91) međutim, nije uočena povezanost ovog polimorfizma sa simptomima shizofrenije. Simptomi koje smo ispitivali ocjenjivani su PANSS ocjenskom skalom, a dimenzije simptoma izdvojene su prema opisu u priručniku za procjenu. Izdvojene dimenzije obuhvaćaju po nekoliko simptoma ali ne opisuju stupanj agresije kod naših ispitanika. U slučaju ovog istraživanja, u muškoj populaciji uočena je veća frekvencija *Low* alela u skupini ispitanika sa shizofrenijom. U ranijim istraživanjima, uočeno je da se alel niske aktivnosti povezuje se s većim stupnjem agresije kod muškaraca što ide u prilog našem istraživanju. Međutim, instrument ispitivanja simptoma shizofrenije – PANSS nije adekvatna skala za ispitivanje stupnja agresije kod ispitanika sa shizofrenijom zbog čega ne možemo utvrditi direktnu povezanost naših rezultata s agresivnim simptomima (92). Nadalje, MAOA sudjeluje u razgradnji serotonina, ali i dopamina što može upućivati na doprinos MAOA- uVNTR polimorfizma na promjene u serotoninskom i/ili dopaminskom sustavu (93).

Polimorfizam dopaminskog transportera, DAT-VNTR polimorfizam povezuje se sa alelom 9 dopaminskog transportera koji je povezan s nižom ekspresijom samog transportera što u konačnici rezultira njegovom nižom aktivnošću i posljedičnim smanjenim uklanjanja dopamina iz sinaptičke pukotine (24, 94, 95). Navedeno rezultira povećanom koncentracijom dopamina u sinaptičkoj pukotini i samim time intenzivnijim podražajem koji je posredovan dopaminom. Istraživanja koja su provedena koristeći slikovne tehnike pokazala su da je dopaminski transporter pretežno zastupljen u području striatuma, a manje u predjelu prefrontalnog korteksa. Slijedom navedenog, valja napomenuti da shizofreniju karakterizira povećana koncentracija dopamina u striatumu, praćena prefrontalnom hipodopaminergijom zbog čega bi bilo za očekivati da će alel 9 biti zastupljeniji u populaciji ispitanika sa shizofrenijom. Prema našim rezultatima 4,2 % ispitanika sa shizofrenijom bili su nositelji genotipa 9/9 u odnosu na zdravu populaciju u kojoj je bilo zastupljeno 8,9 % nositelja istog genotipa što čini statistički značajnu razliku ($P=0,028$). Ovakav rezultat nije u skladu sa očekivanim i može upućivati na drugačiju ulogu dopaminskog transportera od navedene. Razmatranjem dopaminske hipoteze shizofrenije, niska aktivnost alela 9 pogodovala bi višoj koncentraciji dopamina u striatumu. Međutim u nekim istraživanjima pokazalo se da je ekspresija alela 10 zapravo niža od ekspresije alela 9. Jacobsen i suradnici su koristeći SPECT (engl. *Single Photon Computed Tomography*) tehniku slikovnog prikaza mozga, pokazali da je ekspresija alela 10 bila niža u odnosu na

ekspresiju alela 9 što su mjerili kao mogućnost vezanja radioobilježivača ($[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$). Kao nedostatak istraživanja naveli su mali broj ispitanika, nisku rezoluciju SPECT analize i korištenje radioobilježivača koji se veže i na serotoninški transporter (96). Slični rezultati SPECT analize dobiveni su i u drugim istraživanjima gdje je alel sa 9 ponavljanja povezan sa većim stupnjem vezanja radioobilježivača u odnosu na alel 10 kao što je to u slučaju istraživanja koje su proveli van Dyck i suradnici. Veće vezanje radioobilježivača znači više dopaminskog transportera u striatumu. (97). U istraživanju provedenom na post mortem tkivu mozga ispitanika sa shizofrenijom i zdravih donora koje su proveli Wondi i suradnici, uočeno je da je 10/10 genotip povezan sa višom ekspresijom mRNA u skupini ispitanika sa shizofrenijom nego u kontrolnoj skupini. U ovakvom tipu istraživanja nije mjerena gustoća dopaminskog transportera već je ekspresija mRNA logično smatrana pokazateljem genske ekspresije, pa se ne može isključiti utjecaj vanjskih čimbenika ili zlouporabe lijekova koji su mogli potaknuti ekspresiju (98). Prema navedenim ispitivanjima, razlika u rezultatima istraživanja ekspresije alela DAT-VNTR polimorfizma, mogla bi se objasniti upotrebom različitih metoda ispitivanja, međutim kontradiktorni rezultati dobiveni su korištenjem istih metoda (slikovnih i *in vitro*). Činjenica je da se ovaj polimorfizam nalazi u 3' UTR regiji koja se ne prepisuje i time ne utječe na samu proteinsku strukturu dopaminskog transportera. Ono na što može utjecati je transkripcija mRNA, stabilnost transkripta i regulacija sinteze proteina, stoga postoji mogućnost da su prisutni neki drugi regulacijski elementi potrebni za samu translaciju (23).

Sljedeći bitan čimbenik u regulaciji funkcije dopamina je katekol-o-metil-transferaza, enzim koji inaktivira dopamin i time regulira njegovo djelovanje. Zbog uloge ovog enzima u metabolizmu dopamina, COMT se dovodi u vezu sa shizofrenijom (99). U našem istraživanju nismo uočili statistički značajnu razliku u distribuciji genotipa između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom ($P=0,237$), ali smo u skupini ispitanika sa shizofrenijom uočili povezanost COMT Val158Met polimorfizma sa obiteljskim hereditetom ($P=0,033$). Shizofrenija je bolest uz koju se danas povezuje veći broj gena i poznato je da postoji genetička predispozicija, ali ne treba zanemariti utjecaj vanjskih čimbenika u ranom razvoju kao što su zlostavljanje, zanemarivanje, disfunkcionalni odnosi u obitelji itd.(100). Premda poznata, genska osnova nije razjašnjena, tako da nije u svim istraživanjima potvrđena povezanost COMT Val158Met polimorfizma sa shizofrenijom. Povezanost ovog polimorfizma s cjelokupnim poremećajem kao što je shizofrenija je zapravo pojednostavljen model kompleksnog poremećaja kojem doprinosi više čimbenika (101). Kognitivne sposobnosti povezuju se s kompleksnom regulacijom aktivnosti dopamina u prefrontalnom korteksu. Kako je već ranije spomenuto,

kognitivne sposobnosti često su smanjene kod pacijenata sa shizofrenijom, a regulator funkcije dopamina u prefrontalnom korteksu je COMT. Upravo je ovo razlog zbog kojeg se smatra da bi funkcionalni polimorfizam Val158Met mogao biti povezan s nastankom kognitivnih simptoma ali isto tako se povezuje s odgovorom na terapiju istih. Jedan od pristupa liječenju kognitivnih simptoma je CCR terapija (engl. *computerized cognitive remediation*) kojom se kroz različite kognitivne zadatke nastoji utjecati na povlačenje kognitivnih simptoma. U istraživanju koje su proveli Lindenmayer i suradnici Met alel povezali su sa boljim odgovorom na liječenje (102). Nasuprot ovakvom pristupu, upotreba inhibitora COMT-a je jedan od potencijalnih oblika terapije kognitivnih simptoma. S farmakogenetičkog stajališta, Met alel povezan je sa lošijim odgovorom na terapiju (101).

Unatoč biokemijskoj ulozi COMT-a u metabolizmu dopamina, dio istraživanja nije uspio povezati COMT Val158Met polimorfizam sa shizofrenijom što se može objasniti prisutnošću drugih polimorfizama u genu za COMT ili kombinaciji više genskih i/ili okolišnih čimbenika. U ovom istraživanju ispitan je polimorfizam dopaminskog transportera koji također regulira koncentraciju sinaptičkog dopamina, pa je logično očekivati da bi interakcija ova dva gena mogla biti povezana sa shizofrenijom. Kako se radi o funkcionalnom polimorfizmu, za očekivati je da će kombinacija alela niske (Met-158 i alel 9) aktivnosti rezultirati visokom koncentracijom dopamina dok će kombinacija alela visoke aktivnosti (Val-158 i alel 10) rezultirati niskom koncentracijom. Prata i suradnici u svom su istraživanju uočili da su obje navedene kombinacije povezane sa povećanom aktivacijom u supramarginalnom girusu na što upućuju ranije publikacije prema kojima „previše“ ili „premalo“ dopamina remeti kortikalnu funkciju (103, 104, 105). Osim kognitivnih simptoma, u nekim istraživanjima ispitana je i uočena povezanost COMT Val158Met polimorfizma sa nasiljem kod ispitanika sa shizofrenijom (106)

U provedenom ispitivanju, statistički značajnu razliku uočena je između zdravih i bolesnih ispitanika u podskupini žena. Na početku ove rasprave spomenuta je povezanosti spola i shizofrenije odnosno protektivnog utjecaja estrogena. U skupini zdravih ispitanica uočili smo veću frekvenciju Val/Met genotipa u odnosu na ispitanice sa shizofrenijom. Kako se radi o kodominantnom polimorfizmu čiji nositelji imaju COMT enzim srednje aktivnosti, možemo pretpostaviti da aktivnost enzima koja nije niti previsoka niti normalna, ima povoljniji učinak u odnosu na visoku ili normalnu aktivnost u ženskoj populaciji. Sljedeći razlog kojim se mogu objasniti ovakvi rezultati je relativno visoka frekvencija Met alela i posljedično tome visok je udio heterozigota. Utvrđena povezanost može se pripisati molekularnoj heteroziji gdje je zbog

relativno visoke frekvencije oba alela, udio heterozigota visok što je moglo doprinijeti uočenoj razlici (107)

Do sada opisani rezultati u ovom istraživanju ukazuju na povezanost polimorfizama MAOA-uVNTR, COMT Val158Met i DAT-VNTR sa shizofrenijom bilo u ukupnoj populaciji ili po spolu. Navedeni polimorfizmi dovode do promjene u aktivnosti enzima i transportera koji sudjeluju u metabolizmu i transportu dopamina i serotonina. Nekoliko puta smo spomenuli dopaminsku teoriju kao do sada najprihvaćeniju hipotezu o patogenezi shizofrenije, stoga je povezanost ovih polimorfizama bila očekivana. Međutim, literaturni podaci su po pitanju ispitivanih polimorfizama kontradiktorni te dobiveni rezultati nisu u potpunosti ispunili očekivanja. Poznato je da serotoninski put ulazi u interakciju s dopaminskim putem i da na njega ima inhibitorni učinak. Unatoč ovoj povezanosti dopamina i serotonina nije uočena povezanost polimorfizma serotoninskog transportera 5-HTTLPR i shizofrenije koji se najviše povezuje sa depresijom.

Dopaminski sustav u interakciji je sa serotoninskim što upućuje na to da bi promjene u serotoninskom sustavu mogle imati utjecaja na dopaminski. Projekcije serotoninskog sustava koje polaze iz dorzalnog dijela raphe nuclei direktno inhibiraju podražaj dopaminskih neurona u crnom tijelu, a projekcije serotoninskog sustava koje sežu do striatuma i korteksa dovode do inhibicije dopaminskog sustava u tim regijama mozga (108, 109). U ovom istraživanju kao komponente serotoninskog sustava ispitani su polimorfizam serotoninskog transportera 5-HTTLPR i ranije spomenuti MAOA-uVNTR polimorfizam. S alel serotoninskog transportera povezuje se sa smanjenom transkripcijskom aktivnošću gena za serotoninski transporter te posljedičnom smanjenom sintezom serotoninskog transportera. Kako je serotoninski transporter jedan od glavnih regulatora funkcije serotonina, smanjeno uklanjanje iz sinaptičkog prostora dovodi do povećane koncentracije serotonina u sinaptičkoj pukotini. U ovom istraživanju nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji 5-HTTLPR genotipa između zdravih i bolesnih ispitanika. Nedostatak statistički značajne razlike može biti posljedica djelovanja monoamino- oksidaze koja metabolizira serotonin i time ograničava njegovo djelovanje. Međutim, treba uzeti u obzir i kompenzatorne mehanizme koji zbog povišene koncentracije serotonina u sinaptičkom prostoru dovode do smanjene sinteze serotoninskih receptora. Sljedeći razlog nedostatka statističke povezanosti 5-HTTLPR polimorfizma sa shizofrenijom u ovom istraživanju može biti postojanje (engl. *single nucleotide polymorphism*) SNP polimorfizma koji se nalazi u sekvenci L alela. Radi se o zamjeni adenina gvaninom A>G zbog čega je transkripcijska aktivnost L_G alela snižena kao i kod S alela (58, 110).

Uzevši u obzir interakciju serotoninskog i dopaminskog sustava, kao i učinak samih polimorfizama navedenih u literaturi, formirane su kombinacije polimorfizama koje bi dovele do promjene koncentracije dopamina odnosno serotonina. Kombinacije su detaljnije opisane u materijalima i metodama, a opis kategorija nalazi se u tablici (Tablica 22). Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji ovako formiranih kombinacija između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom. Također, nije uočena statistički značajna razlika u izraženosti ispitivanih dimenzija simptoma između genotipova pojedinih polimorfizama niti između kombinacija genotipova.

Nedostatak statistički značajne razlike u distribuciji kombinacija genotipova između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom, može se objasniti aktivacijom kompenzatornih mehanizama. Moguće je da nositelji S alela polimorfizma serotoninskog transportera suvišak serotonina u sinaptičkom prostoru zbog smanjenog uklanjanja serotoninskim transporterom, kompenziraju manjom ekspresijom serotoninskih receptora kao što je otkriveno za 5-HT_{1A} receptor (67). Sustav serotoninskih receptora izrazito je kompleksan kao što je opisano u uvodnom dijelu i treba uzeti u obzir činjenicu da promjena u funkciji receptora može dovesti do promjene u aktivaciji serotoninskog sustava s posljedičnim utjecajem na dopaminski sustav. (111) Također, opisani su i drugi polimorfizmi koji za posljedicu imaju promjenu funkcije dopaminskog transportera, serotoninskog transportera, katekol-o-metil transferaze i monoamino-oksidge A. Osim u ovom radu opisanom 5-HTTLPR polimorfizmu, u genu za serotoninski transporter nađen je i VNTR polimorfizam označen kao SERTin2. SERTin2 je polimorfizam otkriven u intronu 2, a istraživanja su pokazala da duži alel pokazuje veću transkripcijsku aktivnost u odnosu na kraći. Ovaj polimorfizam povezan je i sa shizofrenijom (112). Promjene u dopaminskim receptorima također se povezuju s nastankom shizofrenije ili barem nekim segmentom bolesti. Amfetamini kao agonisti dopamina pojačavaju psihotične simptome karakteristične za shizofreniju, a antagonisti D₂ receptora danas se koriste kao terapija shizofrenije. Štoviše, gustoća D₂ receptora u striatumu veća je kod ispitanika sa shizofrenijom (113). Dva polimorfizma D₂ receptora pokazala su se značajnima u ispitivanjima povezanosti sa shizofrenijom. Radi se o supstituciji na kodonu 311 (Cys311Ser) i insercijsko delecijском polimorfizmu (114). U sklopu dopaminskog sustava ispitane su promjene u genu za COMT. Delecija koja se povezuje sa velokardiofacijalnim sindromom za koji je karakteristična pojava psihoze, ali i neki drugi SNP polimorfizmi (rs737865, rs4680 rs165599) koji su povezivani sa shizofrenijom (115, 116). Osim ispitivanog VNTR polimorfizma dopaminskog transportera u genu za dopaminski transporter nađeni su i SNP polimorfizmi koji su u nekim istraživanjima

dovedeni u vezu sa promjenom ekspresije dopaminskog transportera (117). Sam mehanizam neurotransmisije u koji je uključen velik broj komponenti, izuzetno je kompleksan te je moguć velik broj genskih varijacija koje bi u većoj ili manjoj mjeri mogle utjecati na neurotransmisiju. Zbog velikog broja genetskih varijacija ali i utjecaja okolišnih čimbenika na razvoj mozga. Nedostatak jasne etiologije uz dokaze o visokom stupnju nasljeđivanja ovog poremećaja, potaknuli su istraživanja genoma (engl. *Genome wide association studies* (GWAS)) u kojima je otkriveno oko 108 gena povezanih sa shizofrenijom (118). Neki od tih gena uključeni su u druge, ne-dopaminske sustave koji su povezani sa patogeneom shizofrenije. Premda obećavajuća, ova vrsta istraživanja ima svoja ograničenja. Shizofrenija je primjer kompleksnog poremećaja za koje je karakteristično da se molekularni mehanizmi preklapaju, dok geni otkriveni u GWAS istraživanjima ne moraju nužno biti povezani zbog čega je teško otkriti mehanizam nastanka kompleksnih poligenih bolesti (119). Glavni problem u analizi rezultata GWAS istraživanja je ispitivanje povezanosti detektiranih polimorfizama sa obilježjima bolesti koje se ispituju. Moguće je da geni čiji je učinak nešto slabiji neće zadovoljiti statističku značajnost GWAS istraživanja. U tu svrhu primjenjuju se različite statističke metode kojima se nastoji utvrditi povezanost polimorfizama sa obilježjem pri čemu je bitno prethodno poznavati biokemijske mehanizme (120). Upravo je nedostatak poznatih bioloških mehanizama shizofrenije nedostatak koji treba uzeti u obzir jer ne postoje niti biokemijski markeri prema kojima bi se postavljala dijagnoza. Dijagnostika shizofrenije temelji se na kliničkoj slici i prisutnim simptomima prema kategorijama DSM priručnika (kako je ranije opisano). Poznavanje konkretnih biljega, endofenotipova, bio bi puno bolji pokazatelj genskog utjecaja tim više što su poznati nedostaci kategorizacije simptoma zbog čega se pristupa sustavu dimenzija (GWAS konzorcij). Nedvojbeno je da je s ovakvim tipom istraživanja dobiven uvid u gene uključene u mehanizam shizofrenije, a time je dobiven iskorak u smjeru otkrivanja patogeneze.

U nedostatku bioloških biljega, a imajući na umu heterogenost poremećaja, u skupini ispitanika sa shizofrenijom ispitano je postoji li statistički značajna razlika u intenzitetu simptoma izdvojenih u dimenzije kada se ispitanici podijele prema genotipovima i prema skupinama s obzirom na kombinaciju genotipova (Tablica 42). Nije uočena statistički značajna razlika prema dimenzijama simptoma niti u slučaju kada smo ispitivali povezanost intenziteta depresivnih simptoma ocijenjenih Calgary ljestvicom sa polimorfizmima COMT, DAT-VNTR, MAOA-uVNTR i 5-HTTLPR. Odnosno kombinacijama genotipova. S alel 5-HTTLPR polimorfizma povezivan je sa depresijom kao zasebnim poremećajem (42, 46, 52) ali povezanost ovog

polimorfizma sa depresivnim simptomima nije uočena je kod ispitanika sa shizofrenijom (121). Nedostatak povezanosti simptoma sa polimorfizmima odnosno kombinacijom genotipova možemo objasniti postojanjem vanjskih utjecaja koji su mogli doprinijeti razvoju simptoma, a u ovom istraživanju nisu ispitani. Nadalje, kao što je ranije spomenuto, zbog nedostatka molekularnog biljega u mogućnosti smo povezivati samo simptom sa genotipom. Sam simptom čija je procjena rađena pomoću validiranih instrumenata (PANSS i Calgary ljestvice) može biti posljedica djelovanja više čimbenika.

Statistički značajna razlika nije utvrđena formiranjem kombinacija genotipa prema literaturnim podacima. Međutim, na temelju vlastitih rezultata pokušali smo utvrditi javljaju li se neke kombinacije češće kod zdravih odnosno ispitanika sa shizofrenijom. Zbog velikog broja kombinacija, koja dovodi do malog broja ispitanika po kombinaciji, ova procjena načinjena je vizualno na temelju grafičkog prikaza iz kojeg se može uočiti da neke kombinacije dolaze do izražaja u skupini ispitanika sa shizofrenijom. Premda prema vizualnoj procjeni, neke kombinacije dolaze do izražaja, nismo uočili statistički značajnu razliku između zdravih i bolesnih ispitanika. Za ovakvu vrstu analize, odgovarajuće snage, bio bi potreban veći broj ispitanika.

Logističkom regresijom utvrđen je model prema kojem je moguće predvidjeti ishod ishoda - dijagnoza shizofrenije. U model su uključene varijable koje su bile statistički značajne u prethodnoj analizi. Spol, bračni status, stručna sprema i zaposlenje. U univarijatnom modelu uz navedene varijable ispitani su polimorfizmi COMT Val158Met, 5-HTTLPR, MAOA-uVNTR i DAT-VNTR. S obzirom na to da se radi o genotipovima koji su komponente dopaminskog i serotoninog sustava, očekivano je da bi dva ili više genotipa u multivarijatnom modelu mogli zajedno biti statistički značajni. Iz tog razloga kriterij statističke značajnosti univarijatnog modela postavljen je na P vrijednost manju od 0,1. Dobili smo model prema kojem je moguće predvidjeti shizofreniju poznavajući varijable kao što su bračni status, stručna sprema, zaposlenje i MAOA. Ovim modelom uspješno je klasificirano 80,45% ispitanika. Navedene varijable u ovom modelu, su prema omjeru izgleda, statistički značajni čimbenici rizika u nastanku shizofrenije. Odnosno, ispitanici koji nisu u braku te ispitanici koji imaju nisku ili srednju stručnu spremu te nezaposleni ispitanici u kombinaciji sa MAOA alelom niske aktivnosti imali su veći rizik za razvoj shizofrenije. Stručna sprema, bračni status, i zaposlenje u ovom slučaju treba promatrati kao biljege narušene mentalne i socijalne funkcije ispitanika sa shizofrenijom. Naime, niska stručna sprema može biti posljedica poremećaja kognitivnih sposobnosti koja se uočava već u ranijoj životnoj dobi prije pojave prvih simptoma, a odsustvo

bračnog partnera kao umanjena sposobnost socijalne interakcije. Zaposlenje također ukazuje na otežano funkcioniranje u okolini

Ovaj model podržava dosadašnja opažanja da je shizofrenija povezana sa socijalnom komponentom, a dodatnu vrijednost u predikciji daje *Low* alel MAOA polimorfizma

Nedostatak čvršće povezanosti shizofrenije sa ispitivanim polimorfizmima i kombinacijama genotipova u skladu je sa već nekoliko puta spomenutom činjenicom da se radi o kompleksnom poremećaju uvjetovanom genetskim i okolišnim čimbenicima. Općeniti pristup istraživanju utjecaja gena je taj da se nastoji uočiti povezanost između gena i nekog obilježja, u ovom slučaju shizofrenije. Čak i kada je otkrivena povezanost gena sa shizofrenijom ili nekom drugom psihijatrijskom bolešću, ti rezultati nisu potvrđeni u drugim istraživanjima. To znači da umjesto izravne povezanost gena i kliničke prezentacije u ovom slučaju shizofrenije, u budućim istraživanjima treba uključiti okolišne čimbenike u najširem smislu. Primjerice, ne reagira svaka osoba jednako na vanjske utjecaje kao što su psihološke traume nastale kao posljedica npr. zlostavljanja ili drugih traumatičnih događaja. U kontekstu ponašanja i određenih tipova ličnosti, divlji tip genotipa ne mora nužno biti povoljan. Moguće je da će mutirani tip biti povoljan ukoliko se promijeni vanjski utjecaj iz negativnog (neki oblik zlostavljanja ili traume) u pozitivan (briga oko pojedinca, odgojne mjere i slično) (122).

Shizofrenija je bolest koja se javlja u 1% populacije, istraživanja provedena na blizancima ukazuju na visok stupanj nasljeđivanja (123), a poremećaj u dopaminskom sustavu ima bitnu ulogu u njezinom nastajanju. Ovo istraživanje jednim dijelom dalo je rezultate koji idu u prilog dopaminskoj hipotezi, jer ispitivani polimorfizmi uključeni su u metabolizam i regulaciju dopamina. Očekivali smo da će frekvencija genotipa dopaminskog transportera koji je odgovoran za nižu aktivnost biti veća kod ispitanika sa shizofrenijom. Međutim, ovo istraživanje pokazalo je suprotno. Ovakav rezultat ukazuje kako u istraživanjima kompleksnih poremećaja kao što je shizofrenija treba pristupiti na način da se ispitivani gen promatra kroz interakciju sa okolišnim čimbenicima, a ne kao samostalni entitet koji u nekom obliku upućuje na povećani rizik od nastanka shizofrenije. Moguće da je našim rezultatima doprinos dao neki vanjski i/ili genski čimbenik koji nije ispitivan u ovom radu. Zanimljivi su rezultati COMT Val158Met polimorfizma gdje smo uočili statistički značajnu razliku u distribuciji genotipa u ženskoj ali ne i muškoj populaciji. Poznate su moguće razlike između žena i muškaraca oboljelih od shizofrenije s obzirom na utjecaj estrogena. Nadalje, moguće je da prema našim rezultatima Val/Met genotip pogoduje zdravoj populaciji žena za razliku od skupine ispitanica sa shizofrenijom. Razlika u distribuciji genotipa MAOA polimorfizma kod muškaraca također

upućuje na to da je određena genska podloga rizična za neke pojedince (u ovom slučaju muškarce) u odnosu na druge (žene).

U skupini ispitanika sa shizofrenijom nismo uočili statistički značajnu razliku u distribuciji genotipa ili kombinaciji ispitivanih genotipova s obzirom na dimenzije simptoma. Ovi rezultati idu u prilog činjenici da je glavni nedostatak ne samo shizofrenije, nego i većine psihijatrijskih poremećaja, upravo nedostatak biljega (endofenotipova) koji bi se mogli povezati sa nekim od ispitivanih genotipova. Premda su DSM IV te PANSS i Calgary validirani instrumenti u postavljanju dijagnoze i procjene stanja sa odgovarajućim dijagnostičkim karakteristikama, nisu dovoljno dobra zamjena za biokemijski biljeg. Neki simptom može biti posljedica djelovanja velikog broja čimbenika i biokemijskih puteva, stoga ne čudi nedostatak povezanosti pojedinog polimorfizma i intenziteta ili prisutnosti simptoma.

Shizofrenija je bez dvojbe složen poremećaj čiji mehanizam do sada nije poznat. Potrebna su dodatna istraživanja u kojima bi se fokus stavio na mogućnost da neka varijanta gena može biti povoljna ili nepovoljna ovisno o kombinaciji drugih čimbenika.

6 ZAKLJUČCI

6.1 Usporedba zdravih i bolesnih ispitanika

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji alela MAOA-uVNTR polimorfizma između zdravih i bolesnih ispitanika u muškoj populaciji.

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa COMT Val158Met polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom u skupini žena, ali ne i ukupnoj ispitivanoj populaciji.

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa dopaminskog transportera DAT-VNTR polimorfizma između zdravih i ispitanika sa shizofrenijom.

Utvrđena je statistički značajna razlika između ispitanika sa shizofrenijom i kontrolne skupine s obzirom na spol, stručnu spremu, zaposlenost i bračni status.

Nije utvrđena povezanost kombinacija genotipova i shizofrenije.

6.2 Usporedba skupina ispitanika sa shizofrenijom

Nije utvrđena povezanost genotipa sa brojem epizoda i trajanjem bolesti.

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa COMT Val158Met polimorfizma u skupini ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih na one sa prisutnim obiteljskim hereditetom i bez obiteljskog herediteta.

Za ostale polimorfizme nije utvrđena statistički značajna razlika.

Nije utvrđena povezanost pojedinog genotipa i dimenzija simptoma prema PANSS skali.

Nije utvrđena povezanost kombinacija genotipa i dimenzija simptoma prema PANSS skali.

Nije utvrđena povezanost genotipa i depresije ocijenjene Calgary skalom.

6.3 Postavljanje regresijskog modela za predviđanje shizofrenije

Logističkom regresijom utvrđen je model prema kojem se uz poznat genotip MAOA-uVNTR, bračni status, stručnu spremu i zaposlenje ispitanika može ispravno klasificirati 80,45% ispitanika sa shizofrenijom.

7 LITERATURA

- 1 Kaplan HI, Cadock BJ, Greb JA. Seventh Kaplan and Sadock's Synopsis of psychiatry: seventh edition. Baltimore, Maryland 21202, USA: Williams & Wilkins 1994.
- 2 Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000;250:274-85.
- 3 Cardno AG, Gottesman II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics *Am J Med Genet* 2000;97:12-7.
- 4 Tienari P. Interaction between genetic vulnerability and family environment: the Finnish adoptive family study of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 1991;84:460-5.
- 5 Oxford medical dictionary. Oxford university press 2002.
- 6 Xavier RM, Vorderstrasse A. Genetic Basis of Positive and Negative Symptom Domains in Schizophrenia. *Biol Res Nurs* 2017;19:559-575.
- 7 Niznikiewicz MA, Kubicki M, Shenton ME. Recent structural and functional imaging findings in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry* 2003;16:123-147.
- 8 Shepherd AM, Laurens KR, Matheson SL, Carr VJ, Green MJ. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 2012;36:1342-56
- 9 Rousseaux MWC, Shulman JM, Jankovic J. Progress toward an integrated understanding of Parkinson's disease. *F1000Res* 2017; 12;6:1121.
- 10 Timmer MHM, van Beek MHCT, Bloem BR, Esselink RAJ. What a neurologist should know about depression in Parkinson's disease. *Pract Neurol* 2017;17:359-368.
- 11 Morgante F, Barbui C, Tinazzi M, Italian DIP study group. Parkinsonian axial signs in schizophrenia. *Parkinsonism Relat Disord* 2017;36:89-92.
- 12 Goridis C, Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:531-41.
- 13 Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Bielau H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun K, Jankowski Z, Kumaratilake J, Henneberg M, Gos T. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front Psychiatry* 2014;19;5:47.
- 14 Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1996;8:223-6.
- 15 Goldman-Rakic PS, Selemon LD. Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia. *Schizophr Bull* 1997;23:437-58.

-
- 16 Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway, *Schizophr Bull.* 2009;35(3):549-62.
 - 17 Stephen M.Stahl. *Essential Psychopharmacology.* Cambridge, UK. Cambridge university press 2000.
 - 18 Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996;153:466-76.
 - 19 Robert M. Julien *A primer of drug action* New York 2001 Worth Publishers.
 - 20 Uhl GR. Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. *Mov Disord.* 2003;18 (suppl 7):S71–S80.
 - 21 Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature.* 1996;379:606-12.
 - 22 Prata DP, Mechelli A, Picchioni MM, Fu CH, Touloupoulou T, Bramon E, Walshe M, Murray RM, Collier DA, McGuire P. Altered effect of dopamine transporter 3'UTRVNTR genotype on prefrontal and striatal function in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:1162-72.
 - 23 Kang AM, Palmatier MA, Kidd KK. Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry* 1999;46:151-60.
 - 24 Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J* 2001;1:152-6.
 - 25 Bilic P, Jukic V, Vilibic M, Savic A, Bozina N. Treatment-resistant schizophrenia and DAT and SERT polymorphisms. *Gene* 2014;543:125-32.
 - 26 Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B:541-50.
 - 27 Lee CS, Samii A, Sossi V, Ruth TJ, Schulzer M, Holden JE, et al. In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000;47:493–503.
 - 28 Godar SC, Bortolato M. Gene-sex interactions in schizophrenia: focus on dopamine neurotransmission. *Front Behav Neurosci* 2014;6:8:71.
 - 29 Sagud M, Mück-Seler D, Mihaljević-Peles A, Vuksan-Cusa B, Zivković M, Jakovljević M, Pivac N. Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. *Psychiatr Danub* 2010;22:270-4.
 - 30 Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004;75:807-21.
 - 31 Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull* 2007;33:635-41.

-
- 32 Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR., Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;5;98:6917-22.
 - 33 Shprintzen RJ, Goldberg R, Golding-Kushner KJ, Marion RW., Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1992 1;42:141-2.
 - 34 Jones G, Zammit S, Norton N, Hamshere ML, Jones SJ, Milham C, Sanders RD, McCarthy GM, Jones LA, Cardno AG, Gray M, Murphy KC, Owen MJ. Aggressive behaviour in patients with schizophrenia is associated with catechol-O-methyltransferase genotype. *Br J Psychiatry* 2001;179:351-5.
 - 35 Strous RD, Bark N, Parsia SS, Volavka J, Lachman HM. Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior. *Psychiatry Res.* 1997;24;69:71-7.
 - 36 Fidalgo S, Ivanov DK, Wood SH. Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology.* 2013;14:21-45.
 - 37 Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES, Levitt P. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 2011; 21;472:347-50.
 - 38 Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, Kandel ER. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* 2012;149:693-707.
 - 39 Goldberg JI, Mills LR, Kater SB. Novel effects of serotonin on neurite outgrowth in neurons cultured from embryos of *Helisoma trivolvis*. *J Neurobiol* 1991;22:182-94.
 - 40 Wirth A, Holst K, Ponimaskin E. How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Prog Neurobiol* 2017;151:35-56.
 - 41 Andrews, PW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, and Thomson JA. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci. Biobehav* 2015;51:164–188.
 - 42 Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996;274:1527-31.
 - 43 Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv.*2004;4:109-23.
 - 44 Kobiella A, Reimold M, Ulshöfer DE, Ikonomidou VN, Vollmert C, Vollstädt-Klein S, Rietschel M, Reischl G, Heinz A, Smolka MN. How the serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism influences amygdala function: the roles of in vivo serotonin transporter expression and amygdala structure. *Transl Psychiatry* 2011;30;1:e37.
 - 45 <http://www.genenames.org/> pristupljeno 17.07.2017.
 - 46 Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996;66:2621-4.
 - 47 Lotrich FE, Pollock BG, Ferrell RE, Serotonin transporter promoter polymorphism in African Americans: allele frequencies and implications for treatment. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3:145-7.

-
- 48 Murakami F, Shimomura T, Kotani K, Ikawa S, Nanba E, Adachi K Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese. *J Hum Genet* 1999;44:15-7.
 - 49 Domínguez-López S, Howell R, Gobbi G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. *Rev Neurosci* 2012;23:429–443.
 - 50 Bozina N, Mihaljević-Peles A, Sagud M, Jakovljević M, Sertić J. Serotonin transporter polymorphism in Croatian patients with major depressive disorder. *Psychiatr Danub* 2006;18:83-9.
 - 51 Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, Egan MF, Weinberger DR Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science* 2002 19;297:400-3.
 - 52 Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;301:386-9.
 - 53 Serretti A, Kato M, De Ronchi D, Kinoshita T. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients. *Mol Psychiatry* 2007;12:247-57.
 - 54 Lewis G, Mulligan J, Wiles N, Cowen P, Craddock N, Ikeda M, Grozeva D, Mason V, Nutt D, Sharp D, Tallon D, Thomas L, O'Donovan MC, Peters TJ. Polymorphism of the 5-HT transporter and response to antidepressants: randomised controlled trial. *Br J Psychiatry* 2011;198:464-71.
 - 55 Dolzan V, Serretti A, Mandelli L, Koprivsek J, Kastelic M, Plesnicar BK. Acute antipsychotic efficacy and side effects in schizophrenia: association with serotonin transporter promoter genotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32:1562-6.
 - 56 Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D, Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 2006;78:815-26.
 - 57 Kaiser R, Tremblay PB, Schmider J, Henneken M, Dettling M, Müller-Oerlinghausen B, Uebelhack R, Roots I, Brockmüller J. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:179-85.
 - 58 Kenna GA, Roder-Hanna N, Leggio L, Zywiak WH, Clifford J, Edwards S, Kenna JA, Shoaff J, Swift RM. Association of the 5-HTT gene-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with psychiatric disorders: review of psychopathology and pharmacotherapy. *Pharmgenomics Pers Med* 2012;5:19-35.
 - 59 Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 1998;103:273-9.
 - 60 Zhu QS, Grimsby J, Chen K, Shih JC. Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci* 1992;12:4437-46.
 - 61 Judaši M, Kostović I. *Temelji neuroznanosti*. Zagreb 1997.
 - 62 Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 1993;262:578-80.

-
- 63 Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Müller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC, et al Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 1995;268:1763-6.
 - 64 Schulze TG, Müller DJ, Krauss H, Scherk H, Ohlraun S, Syagailo YV, Windemuth C, Neidt H, Grässle M, Papassotiropoulos A, Heun R, Nöthen MM, Maier W, Lesch KP, Rietschel M. Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder. *Am J Med Genet* 2000;96:801-3.
 - 65 Zhang J, Chen Y, Zhang K, Yang H, Sun Y, Fang Y, Shen Y, Xu Q. A cis-phase interaction study of genetic variants within the MAOA gene in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 2010;68:795-800.
 - 66 Camarena B, Fresán A, Aguilar A, Escamilla R, Saracco R, Palacios J, Tovilla A, Nicolini H. Monoamine oxidase a and B gene polymorphisms and negative and positive symptoms in schizophrenia. *ISRN Psychiatry* 2012;2012:852949.
 - 67 David SP, Murthy NV, Rabiner EA, Munafó MR, Johnstone EC, Jacob R, Walton RT, Grasby PM. A functional genetic variation of the serotonin (5HT) transporter affects 5-HT1A receptor binding in humans. *J Neurosci* 2005;25:2586-90.
 - 68 Adam D. Mental health: On the spectrum. *Nature*. 2013;496(7446):416.
 - 69 Lobo DM, Agius M The mental illness spectrum *PsyshiatríaDanubina* 2012, 24:suppl 1, pp 157-160.
 - 70 Rietkerk T, Boks MP, Sommer IE, Liddle PF, Ophoff RA, Kahn RS. The genetics of symptom dimensions of schizophrenia: review and meta-analysis. *Schizophr Res* 2008;102:197-205.
 - 71 Kay SR, Lewis A, Fiszben A, Positive and negative syndrome scale PANSS manual, New York USA, 1992 Multi-Health Systems, Inc.
 - 72 Kay SR, Opler LA, Lindenmayer JP. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS): rationale and standardisation. *Br J Psychiatry Suppl*. 1989;(7):59-67.
 - 73 Cronbach LJ, Meehl PE. "Construct Validity in Psychological Tests". *Psychological Bulletin* 1995;52:281-302.
 - 74 Peralta V, Cuesta MJ. Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia. *Psychiatry Res* 1994;53:31-40.
 - 75 Rietkerk T, Boks MP, Sommer IE, Liddle PF, Ophoff RA, Kahn RS The genetics of symptom dimensions of schizophrenia: review and meta-analysis. *Schizophr Res* 2008;102:197-205.
 - 76 Remington G, Addington D, Honer W, Ismail Z, Raedler T, Teehan M. Guidelines for the Pharmacotherapy of Schizophrenia in Adults. *Can J Psychiatry* 2017;62:604-616.
 - 77 <http://linkage.rockefeller.edu/pawe3d/pristupljeno> 06.12.2011.
 - 78 <http://www.ucalgary.ca/cdss/node/9> pristupljeno 07.09.2017.
 - 79 Awad AG, Voruganti LN. The burden of schizophrenia on caregivers: a review. *Pharmacoeconomics* 2008;26:149-62.

-
- 80 Karpov B, Joffe G, Aaltonen K, Suvisaari J, Baryshnikov I, Näätänen P, Koivisto M, Melartin T, Oksanen J, Suominen K, Heikkinen M, Isometsä E. Level of functioning, perceived work ability, and work status among psychiatric patients with major mental disorders. *Eur Psychiatry* 2017;44:83-89.
 - 81 Frese FJ 3rd, Knight EL, Saks E. Recovery from schizophrenia: with views of psychiatrists, psychologists, and others diagnosed with this disorder. *Schizophr Bull* 2009;35:370-80.
 - 82 Ran MS, Wong YI, Yang SY, Ho PS, Mao WJ, Li J, Chan CL. Marriage and outcomes of people with schizophrenia in rural China: 14-year follow-up study. *Schizophr Res* 2017;182:49-54.
 - 83 Godar SC1, Bortolato M2, Gene-sex interactions in schizophrenia: focus on dopamine neurotransmission *Front Behav Neurosci* 2014;8:71.
 - 84 Markham JA. Sex steroids and schizophrenia *Rev. Endocr Metab Disord* 2012;13:187-207.
 - 85 Schlüter T, Winz O, Henkel K, Eggermann T, Mohammadkhani-Shali S, Dietrich C, Heinzl A, Decker M, Cumming P, Zerres K, Piel M, Mottaghy FM, Vernaleken I. MAOA-VNTR polymorphism modulates context-dependent dopamine release and aggressive behavior in males. *Neuroimage* 2016;125:378-85.
 - 86 Jönsson EG, Norton N, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Owen MJ, Sedvall GC. Association between a promoter variant in the monoamine oxidase A gene and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003;61:31-7.
 - 87 Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Müller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 1995;268:1763-6.
 - 88 Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 1993;262:578-80.
 - 89 Frazzetto G, Di Lorenzo G, Carola V, Proietti L, Sokolowska E, Siracusano A et al. Early trauma and increased risk for physical aggression during adulthood: the moderating role of MAOA genotype. *PLoS ONE* 2007;2:e486.
 - 90 Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*. 2002;297:851-4.
 - 91 Jönsson EG, Norton N, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Owen MJ, Sedvall GC. 2003. Association between a promoter variant in the monoamine oxidase A gene and schizophrenia. *Schizophr Res* 61:31–37.
 - 92 Fresan A1, Camarena B, Apiquian R, Aguilar A, Urraca N, Nicolini H. Association study of MAOA and DRD4 genes in schizophrenic patients with aggressive behavior *Neuropsychobiology*. 2007;55(3-4):171-5.
 - 93 Strous RD, Bark N, Parsia SS, Volavka J, Lachman HM. Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior. *Psychiatry Res* 1997;69:71-7.
 - 94 Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 2002;114:975-9.

-
- 95 Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnoila M, Weinberger DR. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology* 2000;22:133-9.
 - 96 Jacobsen LK, Staley JK, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Innis RB, Gelernter J. Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: a preliminary report. *Am J Psychiatry* 2000;157:1700-3.
 - 97 van Dyck CH, Malison RT, Jacobsen LK, Seibyl JP, Staley JK, Laruelle M, Baldwin RM, Innis RB, Gelernter J. Increased dopamine transporter availability associated with the 9-repeat allele of the SLC6A3 gene. *J Nucl Med* 2005;46:745-51.
 - 98 Wonodi I, Hong LE, Stine OC, Mitchell BD, Elliott A, Roberts RC, Conley RR, McMahon RP, Thaker GK. Dopamine transporter polymorphism modulates oculomotor function and DAT1 mRNA expression in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009;150B(2):282-9.
 - 99 Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull* 2007;33:635-41.
 - 100 Matheson SL, Shepherd AM, Pinchbeck RM, Laurens KR, Carr VJ. Childhood adversity in schizophrenia: a systematic meta-analysis. *Psychol Med* 2013;43:225-38.
 - 101 Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biol Psychiatry* 2006;60:141-51.
 - 102 Lindenmayer JP, Khan A, Lachman H, McGurk SR, Goldring A, Thanju A, Kaushik S. COMT genotype and response to cognitive remediation in schizophrenia. *Schizophr Res* 2015;168:279-84.
 - 103 Prata DP, Mechelli A, Fu CH, Picchioni M, Touloupoulou T, Bramon E, Walshe M, Murray RM, Collier DA, McGuire P. Epistasis between the DAT 3' UTR VNTR and the COMT Val158Met SNP on cortical function in healthy subjects and patients with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13600-5.
 - 104 Goldman-Rakic PS, Muly EC 3rd, Williams GV. D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;31:295-301.
 - 105 Winterer G, Weinberger DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci* 2004;27:683-90.
 - 106 Bhakta SG, Zhang JP, Malhotra AK. The COMT Met158 allele and violence in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 2012;140:192-7.
 - 107 Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol Genet Metab* 2000;71:19-31.
 - 108 Nedergaard S, Bolam JP, Greenfield SA. Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature* 1988;333:174-7.
 - 109 Williams J, Davies JA. The involvement of 5-hydroxytryptamine in the release of dendritic dopamine from slices of rat substantia nigra. *J Pharm Pharmacol* 1983;35:734-7.
 - 110 Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry* 2006;11:224-226.

-
- 111 Haleem DJ. 5-HT_{1A} receptor- dependent control of nigrostriatal dopamine neurotransmission in the pharmacotherapy of Parkinson's disease and schizophrenia. *Behav Pharmacol* 2015;26:45-58.
- 112 Bozina N, Medved V, Kuzman MR, Sain I, Sertic J. Association study of olanzapine-induced weight gain and therapeutic response with SERT gene polymorphisms in female schizophrenic patients. *J Psychopharmacol* 2007;21:728-34.
- 113 Chastain LG, Qu H, Bourke CH, Iuvone PM, Dobner PR, Nemeroff CB, Kinkead B. Striatal dopamine receptor plasticity in neurotensin deficient mice. *Behav Brain Res* 2015 1;280:160-71.
- 114 Jonsson EG, Sillen A, Vares M, Ekholm B, Terenius L, Sedvall GC. Dopamine D₂ receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Am J Med Genet* 2003;119B:28-34.
- 115 Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, et al. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7612-7616.
- 116 Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002;71:1296-1302.
- 117 Drgon T, Lin Z, Wang GJ, et al. Common human dopamine transporter (SLC6A3) haplotypes yield varying expression levels in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26:875-89.
- 118 Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Schizophrenia Nature* 2014;511:421-7.
- 119 Zhao Y, He A, Zhu F, Ding M, Hao J, Fan Q, Li P, Liu L, Du Y, Liang X, Guo X, Zhang F, Ma X. Integrating genome-wide association study and expression quantitative trait locus study identifies multiple genes and gene sets associated with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017;81:50-54.
- 120 Wang K, Li M, Hakonarson H. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2010;11:843-54.
- 121 Golimbet VE, Alfimova MV, Shchebatykh TV, Abramova LI, Kaleda VG, Rogaev EI. Serotonin transporter polymorphism and depressive-related symptoms in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;126B(1):1-7.
- 122 Belsky J, Jonassaint C, Pluess M, Stanton M, Brummett B, Williams R. Vulnerability genes or plasticity genes? *Mol Psychiatry* 2009;14(8):746-54.
- 123 Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of General Psychiatry* 2003;60:1187-92.

8 POPIS KRATICA

3-MT: 3-metoksitiramin

5-HT:5-hidroksitriptamin.

5-HTT: 5-hidroksitriptaminski transporter (serotoninski transporter)

5-HTTLPR: (engl. *Serotonin-Transporter-Linked Polymorphic Region*)

ADH: aldehid dehidrogenaza

ADHD: (engl. *attention deficit hyperactiviti disorder*) Poremećaj pažnje s hiperaktivnošću

AMPAR: amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionski receptor

cAMP: ciklički adenozin monofosfat

CCR terapija : (engl. *Computerized Cognitive remediation*)

COMT: katekol-o-metil-transferaza

DAT: dopaminski transporter

VNTR: (engl. *Variable Number Tandem Repeats*) promjenjivi broj uzastopnih ponavljajućih slijedova

DHPA: 3,4-dihidroksifenilacetaldehid

DOPAC: 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina

DSM: (engl. *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*) dijagnostičko statistički priručnik mentalnih poremećaja

GPR: G-protein receptor

GWAS: (engl. *Genome Wide Association Studies*)

HVA: homovanilinska kiselina

K3EDTA: (engl. *Ethylene-Diamine-TetraaceticAcid*)

L-DOPA: L-3,4 dihidroksifenilalanin

MAO: monoamino-oksidaza

MAP kinaza: mitogenima aktivirane proteinske kinaze

MHPA: 3-metoksi-4-hidroksifenilacetaldehid

MINI: (engl. *Mini International Neuropsychiatric Interview*)

MTHFR: metilentetrahidrofolat reduktaza

NARI: (engl. *Noradrenaline Reuptake Ihibitor*) inhibitori ponovne pohrane noradrenalina

NMDR: receptor za N-metil-D-aspartat

PANSS: (engl. *Pozitive and Negative Syndrome Scale*)

PCR: (engl. *Polimerase Chain Reaction*) lančana reakcija polimerazom

RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata

PFC: prefrontalnom korteksu

SLC 6A3: (engl. *Solute Carrier Family 6A3*)

SLC6A4: (engl. *Solute Carrier Family 6A4*)

SNARE: (engl. *SNAP - Soluble NSF Attachment Protein, Receptor*)

SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) polimorfizam jednog nukleotida

SSRI: (engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

VCFS: velokardiofacijalni sindrom

9 ŽIVOTOPIS

Jelena Culej rođena je 24. svibnja 1983. u Zagrebu. Studij medicinske biokemije pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2001. godine. 07. svibnja 2007. godine brani diplomski rad pod naslovom: Genotipovi ABO sustava krvnih grupa kao čimbenici rizika u nastanku nasljednih tromboza, pod mentorstvom dr.sc. Jasne Bingulac-Popović, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu i prof. dr. sc Lade Rumore, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Obranom diplomskog rada stječe titulu diplomiranog inženjera medicinske biokemije odnosno magistre medicinske biokemije. Pripravnički staž započinje u lipnju 2007. u Klinici za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević, gdje ostaje do siječnja 2010. Od siječnja 2010. započinje s radom u Službi za transfuziju i hemostazu onkoloških bolesnika Klinike za tumore. Iste godine započinje specijalizaciju iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine te upisuje poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko - biokemijskom fakultetu. S izradom doktorskog rada započinje pod mentorstvom prof. dr. sc Dalibora Karlovića specijalist psihijatarije i doc dr. sc. Maria Štefanovića specijalist. medicinske biokemije. U kolovozu 2014. godine polaže specijalistički ispit čime stječe titulu specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Od travnja 2017. zaposlena je u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice.

Jelena Culej je autor ili koautor 8 znanstvenih ili stručnih radova od čega su 3 citirana u Current Content bazi podataka te 14 posterskih sažetaka. Dobitnica je nekoliko međunarodnih stipendija za sudjelovanje na kongresima. Kao član Organizacijskog odbora sudjelovala je u organizaciji 2. simpozija Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (22. Simpozij HDMBLM „Novi biljezi bolesti probavnog sustava“ 11.06.2011., Zagreb te 4. Simpozij LOKUS 08.-09.04.2016. Tuheljske Toplice) Član je povjerenstva za edukaciju u Hrvatskom društvu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Također, kao aktivni član sudjeluje u radu Povjerenstva za staleška pitanja u Hrvatskoj komori medicinskih biokemičara.

9.1 Popis radova

9.1.1 Radovi indeksirani u Current content časopisima

- 1) Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Babić I, Culej J, Tomičić M, Vuk T, Šarlija D, Balijsa M. ABO blood groups and genetic risk factors of thrombosis in Croatian population. *Croat Med J* 2009;50:550-8.
- 2) Culej J, Štefanović M, Čelap I, Nikolac N, Karlović D. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in Croatian population. *Mol Biol Rep* 2015;42(2):553-8.
- 3) Kopicinovic LM, Vogrinc Z, Kocijan I, Culej J, Aralica M, Jokic A, Antoncic D, Bozovic M. Laboratory testing of extravascular body fluids in Croatia: a survey of the Working group for extravascular body fluids of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26(3):395-407.

9.1.2 Radovi u ostalim časopisima:

- 1) Culej J, Skoko M, Mihić-Lasan I, Vučemilo T, Šturm D. D-dimer levels in patients with metastatic liver cancer before and after surgery. *Libri. Oncol.* 2011.; 1-10.
- 2) Mihić-Lasan I, Skoko M, Culej J, Vučemilo T, Šturm D. Relationship between ABO blood groups and colorectal cancer. *Libri. Oncol.* 2011.; 11-14.
- 3) Skoko M, Mihić-Lasan I, Culej J, Vučemilo T, Šturm D. Association between ABO blood group, Rh factor and breast cancer in patients treated at the University Hospital for Tumors, Zagreb, Croatia. *Libri. Oncol.* 2011.; 15-19.
- 4) Skoko M, Mihić Lasan, I, Culej J; Krajačić Karas G; Vučemilo T; Šturm D; Serum ferritin concentration in solid tumor patients; *Libri oncologici : Croatian journal of oncology* (0300-8142) Vol 40 (2012); 1-5.
- 5) Skoko M, Mihić Lasan, I, Culej J; Vučemilo T; Šturm D; Upper extremity deep venous thrombosis in oncological patients – case report; *Libri oncologici Croatian journal of oncology* (0300-8142) Vol 40 (2012); 35-38.
- 6) Kopicinovic LM, Culej J; Pleural, peritoneal and pericardial effusions - a biochemical approach; *Biochem Med (Zagreb)*. 2014 Feb 15;24(1):123-37.

9.1.3 Posterski sažeci

- 1) Bingulac-Popović J; Dražić V; Culej J; Babić I, Hundrić-Hašpl Ž, Maglov Č, Balija M; Jukić I. ABO blood group genotyping in Croatian blood donors 29. international Society of blood transfusion (ISBT) congress ; u: Vox Sang 91 (2006) (S3) 1-174. (poster, sažetak, stručni).
- 2) Bingulac-Popović J; Dražić V; Babić I; Culej J; Tomičić M; Balija M; Jukić I. ABO blood groups and risk of thrombosis Vox Sang (2006), 91 (suppl.3), P-174. 29. international ISBT(international society of blood transfusion) congress ; Cape Town, South Africa, 02-07.09.2006.)
- 3) Culej J; Knezović I; Marević S; Laškaj R, Sokolić B; Petres B. N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT- proBNP), predicting survival in infant septic patients: a case report Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Issue S1 (Jun 2009) Supplement: EUROMEDLAB Innsbruck 2009, pp. S5 – S409. Innsbruck, 2009. S250-S250.
- 4) Marevic S; Culej J; Sokolić B; Laškaj R; Petres B. Validation of two commercially available reagents for alkaline-phosphatase // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Issue S1 (Jun 2009) Supplement: EUROMEDLAB Innsbruck 2009. innsbruck, 2009.
- 5) Marević S Culej J; Čeljuska-Tosev E; Laškaj R; Petres B. Corelation of CRP and PCT in patients with infectious diseases and comparison of two commercially available assays for PCT 2010.
- 6) Culej J, Krajacic-Karas G, Sturm D. Plastic versus glass test tubes for coagulation assays. IFCCWorldLab-EuroMedLab Berlin 2011 15-19 May 2011, S496 Clin Chem Lab Med 2011 49 Special Suppl, ppS1-S874. DOI 10.1515/CCLM2011.515.
- 7) Culej J, Nikolac N, Krajačić-Karas G, Šturm D. Artificial urine - possibility or a good try. 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS, Biochemia Medica 2012; 22(3):A54-A204.
- 8) Culej Jelena; Štefanović Mario; Karlović Dalibor. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in Croatian population // Biochemia Medica / Ana-Maria Šimundić (ur.). 2012. A164-A164).
- 9) Culej J, Štefanović M, Karlović D. Catechol-o-methyl transferase-COMTVal158Met polymorphism in Croatian population. EuroMedLab posters, Biochimica clinica, 2013, vol 37, SS.

- 10) Culej J, Štefanović M, Karlović D, DAT1 and COMT polymorphisms are not associated with positive and negative syndrome scale in schizophrenia. EuroMedLab posters, Biochimica clinica, 2013, vol 37, SS.
- 11) Culej J; Vučemilo T; Mayer LJ; Šturm D. Zadovoljstvo djelatnika novim laboratorijem – može li bolje? Simpozij LOKUS, 2013. 30-30.
- 12) Culej J; Štefanović M; Karlović D. Simulacija financijske isplativosti – genotipizacija polimorfizma serotoninskog transportera Simpozij LOKUS 2014. 46-46.
- 13) Culej J, Skoko M Vučemilo T. Comparison of two commercially available reagents for activated partial thromboplastin time. Poster Abstracts-EuroMedLab Paris 2015, , Clin Chem Lab Med; 53, Special Suppl, ppS1-S1450, june 2015. DOI10.1515/cclm-2015-5028.
- 14) Culej J; Mihić Lasan I; Unić A. Analytical quality of prothrombin time and activated partial thromboplastin time using six sigma, Clinical chemistry and laboratory medicine Plebani, Mario (ur.). Berlin : Walter de Gruyter GmbH, 2017. S701-S701.

**POLIMORFIZMI GENA DOPAMINSKOGA (COMT I DAT1) I SEROTONINSKOGA
(MAOA I 5-HTT) SUSTAVA TE DIMENZIJE SIMPTOMA U BOLESNIKA SA
SHIZOFRENIJOM**

Jelena Culej

Klinički bolnički centar "Sestre milosrdnice"

Klinički zavod za kemiju

Vinogradska 29

10 000 Zagreb

Sažetak: Shizofrenija je teška psihička bolest koja zahvaća 1% opće populacije. Dijagnoza se postavlja prema kliničkoj slici i prisutnim simptomima. Premda sama biološka osnova nije razjašnjena, danas je najprihvaćenija dopaminska hipoteza prema kojoj dopamin ima centralnu ulogu u nastanku shizofrenije. Dopaminske puteve u mozgu velikim dijelom prati serotoninski put za koji je utvrđeno da ima inhibitorni učinak na dopaminski sustav. Djelovanje dopamina regulira dopaminski transporter i katekol-o-metil transferaza, a djelovanje serotonina regulira serotoninski transporter i monoamino-oksidaza A, koja osim što sudjeluje u metabolizmu serotonina, sudjeluje i u metabolizmu dopamina.

Hipoteza ovog istraživanja je da bi funkcionalni polimorfizmi dopaminskog transportera (DAT-VNTR), katekol-o-metil transferaze (COMT Val158Met), serotoninskog transportera (5-HTTLPR) i monoamino-oksidaze A (MAOA-uVNTR) mogli biti povezani sa pojavom simptoma shizofrenije.

Ciljevi ovog istraživanja su: Ispitati povezanost pojedinih polimorfizama i kombinacija genotipova sa shizofrenijom. U skupini ispitanika sa shizofrenijom ispitati povezanost polimorfizama sa simptomima bolesti. Uspostaviti regresijski model za predviđanje shizofrenije.

U istraživanje je uključeno 314 zdravih ispitanika i 306 ispitanika sa dijagnozom shizofrenije. Za ispravnu klasifikaciju zdravih ispitanika korišten je MINI upitnik i fizikalni pregled. Dijagnoza shizofrenije postavljena je prema DSM IV standardu, a simptomi shizofrenije ocijenjeni su PANSS i Calgary skalom. Genotipizacija ispitivanih polimorfizama rađena je PCR reakcijom uz elektroforetsko razdvajanje dobivenih fragmenata odnosno PCR-RFLP metodom za genotipizaciju COMT Val158Met polimorfizma.

Usporedbom zdravih i ispitanika sa shizofrenijom utvrđeno je sljedeće: na ukupnom uzorku utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji DAT-VNTR polimorfizma. U podskupini žena utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji COMT Val158Met polimorfizma a u podskupini muškaraca utvrđena je povezanost MAOA-uVNTR polimorfizma sa shizofrenijom. U skupini ispitanika sa shizofrenijom utvrđena je povezanost COMT Val158Met polimorfizma sa obiteljskim hereditetom. Utvrđen je logistički model za predviđanje shizofrenije.

88 stranica, 19 slika, 43 tablice, 123 literaturna navoda, jezik izvornika – Hrvatski

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu

Ključne riječi: shizofrenija, dopaminski transporter, serotoninski transporter, katekol-o-metil transferaza, monoaminooksidaza A DAT-VNTR, 5-HTTLPR, COMT Val158Met i MAOA-uVNTR

Mentor: Prof. dr. sc Dalibor Karlović, Doc. dr.sc. Mario Štefanović

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Karmela Barišić; dr. sc. Nora Nikolac Gabaj, znanstvena suradnica; doc. dr. sc. Miroslav Herceg

Rad prihvaćen: 11.07.2018.

**GENE POLYMORPHISMS IN DOPAMINE (COMT AND DAT1) AND SEROTONIN
(MAOA AND 5-HTT) SYSTEMS AND DIMENSIONS OF SYMPTOMS IN PATIENTS
WITH SCHIZOPHRENIA**

Jelena Culej

“Sestre milosrdnice” University Hospital centre

Department of clinical biochemistry

Vinogradska 29

10 000 Zagreb

Abstract:

Schizophrenia is severe psychiatric disorder which affects 1% of general population. Diagnosis of schizophrenia is based on presence of clinical symptoms but its exact pathophysiology is still unknown. However, according to extensive research the most accepted is dopamine hypothesis by which dopamine plays central role in development of schizophrenia. Dopamine pathways in brain are followed by serotonin pathway which has inhibitory effect on dopamine. Dopamine action is regulated by dopamine transporter and catechol-o-methyltransferase, while serotonin action is regulated by serotonin transporter and monoamine-oxidase A which is also included in dopamine metabolism.

Hypothesis of this research is that polymorphisms of dopamine transporter (DAT-VNTR), catechol-o-methyltransferase (COMT Val158Met), serotonin transporter (5-HTTLPR) and monoamine oxidase A (MAOA-uVNTR) might be associated with symptoms of schizophrenia.

The aims of this research were: To test association of polymorphisms and genotype combinations with schizophrenia. In group of patients with schizophrenia, test association of polymorphisms with schizophrenia symptoms. To establish regression model for prediction of schizophrenia.

314 healthy volunteers and 306 patients with schizophrenia were included in this research. Healthy volunteers were included based on MINI psychiatric questioner and physical exam. Schizophrenia was diagnosed based on DSM IV standard and symptoms of schizophrenia were assessed by PANSS and Calgary scale. For detection of polymorphisms we used PCR followed by electrophoresis with exception of COMT Val158Met polymorphism for which we used PCR-RFLP method.

Comparing healthy volunteers and patients with schizophrenia, the following was established: In overall sample there was statistically significant difference in distribution of DAT-VNTR polymorphisms. In female population we found statistically significant difference in distribution of COMT Val158Met polymorphism. In male population we found statistically significant distribution of MAOA-uVNTR polymorphism. In group of patients with schizophrenia we found association of COMT Val158Met polymorphism with family heritage of schizophrenia. Logistic regression model was established for predicting schizophrenia.

88 pages, 19 figures, 43 tables, 123 references, original in – Croatian

Thesis deposited at National and University Library in Zagreb

Keywords: schizophrenia, dopamine transporter, serotonin transporter, catechol-o-methyltransferase, monoamine oxidase A DAT-VNTR, 5-HTTLPR, COMT Val158Met i MAOA-uVNTR

Supervisor: Prof. dr. sc Dalibor Karlović, Doc. dr.sc. Mario Štefanović

Reviewers: prof. dr. sc. Karmela Barišić; dr. sc Nora Nikolac Gabaj, znanstvena suradnica; doc. dr. sc. Miroslav Herceg

Thesis accepted: 11.07.2018.