

Povezanost polimorfizma gena za katehol-O-metil transferazu s odgovorom na terapiju antipsihoticima u pacijenata sa shizofrenijom

Barić, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:778665>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište
u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anja Barić

Povezanost polimorfizma gena za katehol-O-metil transferazu s odgovorom na terapiju antipsihoticima u pacijenata sa shizofrenijom

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom red. prof. dr. sc. Nele Pivac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Želim zahvaliti mentorici red. prof. dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, i svim članovima Laboratorija molekularne neuropsihijatrije Instituta Ruđera Boškovića na svemu što su me naučili tijekom izrade ovoga diplomskog rada i na iskustvima koja će me sigurno pratiti tijekom daljnjeg akademskog obrazovanja. Također zahvaljujem suvoditeljici, višoj predavačici, dr. sc. Juliji Erhardt.

Posebna hvala dr. sc. Matei Nikolac Perković na svim stručnim savjetima, ali prije svega na iznimnom strpljenju, pristupačnosti i dobronamjernosti zbog kojih će mi vrijeme koje smo provele zajedno trajno ostati u lijepom sjećanju.

Mnogo hvala mojoj obitelji na njihovoj nepokolebljivoj podršci tijekom cijelog studija i hvala im što su vjerovali u mene čak i onda kada sama nisam.

Na kraju, puno hvala najboljim prijateljicama Lauri, Anji, Andrei i Martini koje su slavile sa mnom sve moje uspjehe i bile mi oslonci u najtežim trenucima. One jesu, i zauvijek će biti, veliko veselje u mojem životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZU S ODGOVOROM NA TERAPIJU ANTIPSIHOTICIMA U PACIJENATA SA SHIZOFRENIJOM

Anja Barić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Enzim katehol-o-metil transferaza (COMT) odgovoran je za degradaciju dopamina i smatra se ključnim regulatorom dopaminergičke neurotransmisije u prefrontalnom korteksu (PFC). Predmetom je istraživanja u mnogim asocijacijskim studijama koje ciljaju rasvijetliti njegov doprinos riziku razvoja shizofrenije te farmakogenetičkih istraživanja koja proučavaju mogući utjecaj COMT-a na terapijski odgovor na antipsihotike. Zbog nedostatka pouzdanih podataka u literaturi, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti povezanost dva polimorfizama (rs4680 i rs4818) gena *COMT* s odgovorom na terapiju olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima u pacijenata sa shizofrenijom. Pacijenti su podijeljeni na one s boljim i lošijim odgovorom nakon 8 tjedana terapije s obzirom na 50 % pad bodova na ocjenskoj Pozitivnoj i negativnoj sindromskoj ljestvici (PANSS) i njezinim podljestvicama. Utjecaj polimorfizama *COMT* dodatno je provjeren usporedbom postotaka pada bodova na ljestvici PANSS i podljestvicama. Rezultati pokazuju da polimorfizam rs4680 gena *COMT* utječe na odgovor na terapiju nakon 8 tjedana olanzapina te da bi prisutnost alela povezanog sa smanjenom aktivnosti enzima (alel A) mogao biti prediktivni marker boljeg odgovora na terapiju nakon 8 tjedana primanja olanzapina u relativno velikom uzorku pacijenata sa shizofrenijom.

(60 stranica, 8 slika, 13 tablica, 99 literarnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: antipsihotici, COMT, polimorfizam, shizofrenija, odgovor na terapiju

Voditelj: Dr. sc. Nela Pivac, red. prof., znan. savjetnik

Suvoditelj: Dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

Ocjenitelji: Dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.; Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.; Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 1. 2. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

THE ASSOCIATION OF CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE GENE POLYMORPHISMS WITH THERAPEUTIC RESPONSE TO ANTIPSYCHOTICS IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS

Anja Barić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Enzyme catechol-O-methyltransferase (COMT) is responsible for degradation of dopamine and is considered as the main regulator of dopaminergic neurotransmission in the prefrontal cortex (PFC). It is the subject of various association studies which aim to elucidate its possible role in the risk for schizophrenia and pharmacogenetic studies which are set out to investigate its role in response to antipsychotic therapies. Due to the lack of reliable data in literature, the aim of this thesis was to evaluate the association between two *COMT* gene polymorphisms (rs4680 and rs4818) and treatment response to olanzapine, risperidone, clozapine and other antipsychotics in patients with schizophrenia. Patients were subdivided into responders and non-responders according to a 50 % reduction in the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) total and subscale scores after 8 weeks of treatment. The influence of *COMT* polymorphisms was further investigated by comparing the percentage of the PANSS total and subscale score reductions. Results show that rs4680 *COMT* gene polymorphism affects therapeutic response after 8 weeks of olanzapine treatment and that the allele associated with lower enzyme activity (the allele A) could be considered as a predictive marker for good response to olanzapine treatment after 8 weeks in relatively large sample of patients with schizophrenia.

(60 pages, 8 figures, 13 tables, 99 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: antipsychotics, COMT, polymorphism, schizophrenia, treatment response

Supervisor: Dr. Nela Pivac, Prof., Senior scientist

Cosupervisor: Dr. Julija Erhardt, Senior lecturer

Reviewers: Dr. Julija Erhardt, Senior lecturer; Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.; Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 1. 2. 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Dopaminergički sustav	1
1.2. Enzim katehol-O-metil transferaza (COMT)	2
1.2.1. Gen <i>COMT</i> i izoforme enzima COMT	3
1.2.2. Polimorfizmi gena COMT i promjena aktivnosti enzima COMT	3
1.3. Shizofrenija	5
1.3.1. Uloga dopamina u shizofreniji	7
1.3.2. Uloga enzima COMT u shizofreniji	7
1.3.3. Terapija antipsihoticima	9
1.3.4. Farmakogenetika i COMT	10
2. CILJ RADA.....	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Ispitanici	14
3.1.1. Terapije.....	14
3.2. Izolacija genomske DNA krvi	15
3.2.1. Izolacija genomske DNA metodom isoljavanja.....	16
3.2.2. Izolacija genomske DNA koristeći komercijalni komplet PureLink Genomic DNA Mini Kit	16
3.3. Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizme gena <i>COMT</i>	17
3.4. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI	20
4.1. Demografski podaci	20
4.2. Polimorfizam rs4680	23
4.3. Polimorfizam rs4818	31
4.4. Haplotipska analiza	34
5. RASPRAVA.....	41
5.1. Polimorfizam rs4680 gena <i>COMT</i> i odgovor na terapiju antipsihoticima	41
5.2. Polimorfizam rs4818 gena COMT i odgovor na terapiju antipsihoticima.....	44
5.3. Haplotipska analiza	46

6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA.....	50
8. ŽIVOTOPIS	60

KRATICE

COMT – katehol-O-metil transferaza

DA – dopamin

DAT – dopaminergički transporter

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

LD – neravnoteža udruživanja

L-DOPA – L-3,4-dihidroksifenilalanin

MAO – monoaminooksidaza

MB-COMT – protein COMT vezan za membranu

NR – ispitanici koji nisu imali dobar odgovor na terapiju

PANSS – ljestvica pozitivnih i negativnih sindroma u shizofreniji

PET – pozitronska emisijska tomografija

PFC – prefrontalni korteks

R – ispitanici koji su pokazali dobar odgovor na terapiju

RCLB – pufer za liziranje eritrocita

RT-PCR – metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

S-COMT – toplivi citosolni oblik proteina COMT

SDS – natrij dodecil-sulfat

SE – pufer za liziranje leukocita

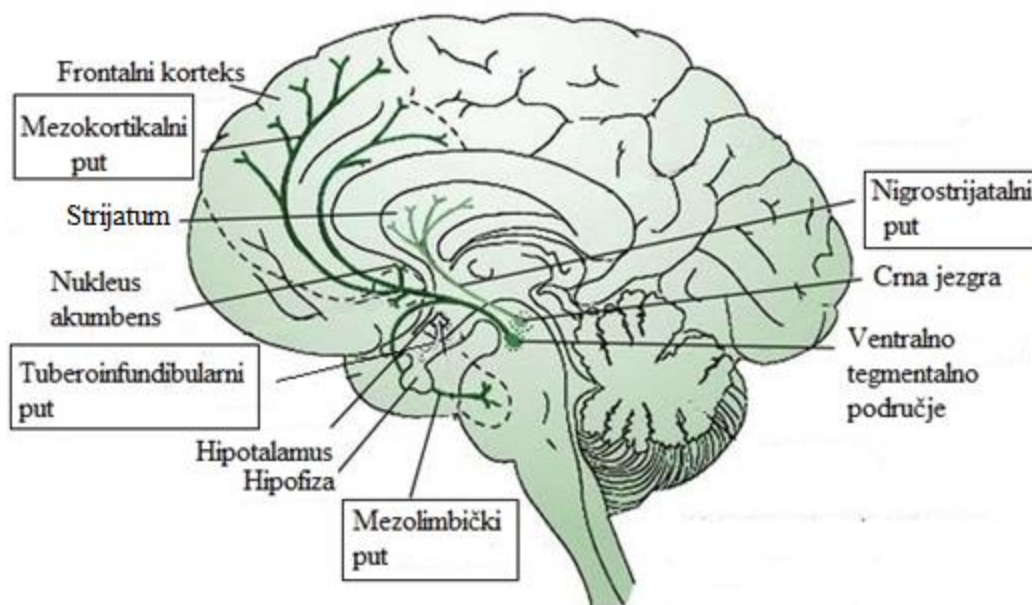
SNP – polimorfizam jednog nukleotida

TE – pufer za čuvanje DNA

1. UVOD

1.1. Dopaminergički sustav

Dopamin (DA) je ekscitacijski neurotransmitor iz skupine kateholamina. Dopaminergički neuroni lokalizirani su u srednjem mozgu, međumozgu i olfaktornom bulbusu i zastupaju manje od 1 % ukupnog broja neurona u mozgu (Chinta i Andersen 2005). Razlikuju se četiri glavna puta dopaminergičke neurotransmisije; nigrostrijatalni put koji sudjeluje u kontroli pokreta i unosa hrane, mezokortikalni put uključen u kogniciju i procesuiranje emocija, mezolimbčki put uključen u sustav nagrade i užitka te tuberoinfundibularni put koji kontrolira sekreciju prolaktina iz hipofize (Marsden 2006). Prostorna distribucija tih puteva prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Prostorna distribucija dopaminergičkih puteva u mozgu.

Neuroni nigrostrijatalnog puta pružaju se od crne jezgre (*Substantia nigra*) do strijatuma. Mezokortikalni i mezolimbčki put započinju u ventralnom tegmentalnom području, a završavaju u frontalnom korteksu i strijatumu. Tuberoinfundibularni put pruža se od hipotalamusa do hipofize. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.neupsykey.com/functional-neuroanatomy-of-the-basal-ganglia/>.

S obzirom na to da dopamin sudjeluje u regulaciji mnogih važnih funkcija u mozgu, važno je održavanje pravilne razine neurotransmisije i proizvodnje dopamina u neuronima. Istraživanja o fiziološkoj ulozi dopamina započela su otkrićem da gubitak dopaminergičkih neurona u bazalnim ganglijima dovodi do gubitka kontrole nad pokretima u Parkinsonovoj bolesti

(Carlsson 1971). Danas se zna da je dopamin umiješan u niz zdravstvenih poremećaja, kao što su depresija, bipolarni poremećaj, diskinezija, shizofrenija, ovisnost itd. (Ashok i sur. 2017, Berthet i Bezard 2009, Brown i Gershon 1993, Carlsson 1977, Diana 2011).

Prvi korak u sintezi dopamina je ujedno i limitirajući korak, a odnosi se na hidroksilaciju tirozina u L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) pomoću enzima tirozin hidroksilaze u citoplazmi. U drugom koraku dekarboksilacijom L-DOPA-e, pomoću enzima dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina, nastaje dopamin. Novosintetizirani dopamin pakira se u sinaptičke vezikule do približne koncentracije od 10 M (Elsworth i Roth 1997). Pojavom akcijskog potencijala dolazi do otpuštanja dopamina u sinapsu egzocitozom. Ondje se veže na dopaminske receptore postsinaptičkih neurona koji dalje prenose signal. Dopaminski receptori su receptori koji vežu G-protein (Missale i sur. 1998). Mogu se podijeliti u dvije skupine prema razlici u njihovoj genskoj strukturi i prema tome djeluju li ekscitirajuće (dopaminski receptori D₁ i D₅) ili inhibicijski (dopaminski receptori D₂, D₃ i D₄) na enzim adenilil ciklazu i proizvodnju cikličkog adenozin monofosfata u postsinaptičkom neuronu (Missale i sur. 1998). Za prekid signala dopamin se iz sinapse uklanja dopaminergičkim transporterima (DAT) koji ga prenose natrag u presinaptički neuron gdje se ponovno pakira u sinaptičke vezikule ili degradira. Degradacija dopamina u presinaptičkom neuronu odvija se pomoću enzima monoamino oksidaze (MAO), a u postsinaptičkom pomoću enzima katehol-O-metil transferaze (eng. *catechol-o-methyltransferase*, COMT). Dio dopamina metabolizira se i u susjednim glija stanicama gdje su prisutna oba enzima (Meiser i sur. 2013).

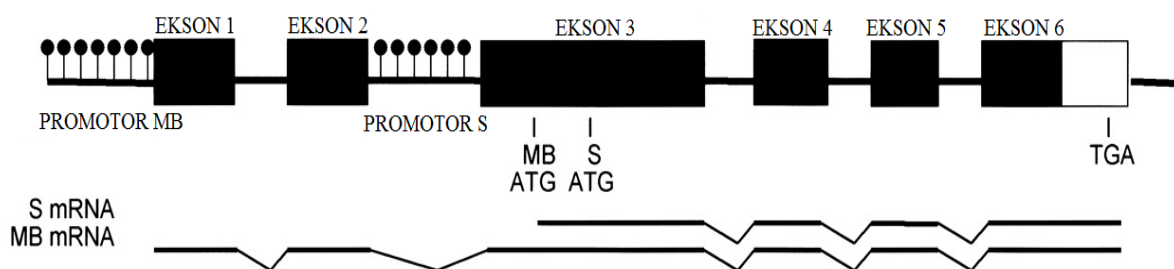
1.2. Enzim katehol-O-metil transferaza (COMT)

Enzim COMT važan je za postsinaptičku inaktivaciju kateholaminergičkih neurotransmitera, kao što su dopamin, adrenalin i noradrenalin, i smatra se ključnim regulatorom dopaminergičke neurotransmisije u prefrontalnom korteksu (eng. *prefrontal cortex*, PFC). Uloga enzima COMT izrazito je važna u PFC-u zbog slabije zastupljenosti DAT-a u toj regiji mozga (Sesack i sur. 1998). Može se pronaći u neuronima i astrocitima, ali prevladava u mikroglija stanicama. Enzim COMT djeluje tako da u prisutnosti Mg²⁺ katalizira prijenos metilne skupine sa S-adenozil-metionina na 3'-hidroksilnu skupinu kateholaminske jezgre, u procesu koji se još naziva i O-metilacija. U slučaju razgradnje dopamina, kao produkt nastaje 3-metoksitiramin koji se dalje pomoću enzima MAO pretvara u homovaniličnu kiselinu koja se izlučuje u urei (Meiser i sur. 2013). Najveće koncentracije enzima nalaze se u jetri i

bubrežima gdje sudjeluje u inaktivaciji kateholestrogena i kateholnih lijekova kojima se tretiraju astma, hipertenzija i Parkinsonova bolest (Axelrod i Tomchick 1958).

1.2.1. Gen *COMT* i izoforme enzima *COMT*

Enzim *COMT* isključivo je unutarstanični protein koji se pojavljuje u dva oblika: protein vezan za membranu (eng. *Membrane-Bound COMT*, MB-*COMT*) i topivi citosolni oblik (eng. *Soluble COMT*, S-*COMT*) (Jeffery i Roth 1984). Upute za sintezu obiju izoformi enzima sadržane su u jedinstvenom genu *COMT*, veličine oko 28 kb koji se nalazi na 22. kromosomu u regiji q11.2. Sastoji se od šest eksona od kojih su prva dva na 5' kraju nekodirajuća. Njegovu ekspresiju kontroliraju dvije zasebne promotorske regije. Distalni promotor P2 regulira sintezu 1.5 kb duge mRNA koja kodira MB-*COMT*, a proksimalni P1 promotor 1.3 kb duge mRNA koja kodira S-*COMT*. Start kodoni obaju transkripta nalaze se u trećem eksonu dok se zajednički stop kodon nalazi u šestom eksonu (Tenhunen i sur. 1994). Struktura gena *COMT* prikazana je na Slici 2. S obzirom na to da se okviri čitanja preklapaju, polipeptidne sekvence dviju izoformi su gotovo identične. Enzim MB-*COMT* ima hidrofobni produžetak na N kraju koji mu omogućuje da se usidri u membranu hrapavog endoplazmatskog retikuluma (Tenhunen i sur. 1994). MB-*COMT* ima veći afinitet za supstrat, ali nižu katalitičku aktivnost nego S-*COMT* (Lotta i sur. 1995). Stanice istodobno eksprimiraju oba oblika enzima, ali u različitim količinama ovisno o tipu stanica i tkiva. MB-*COMT* prevladava u mozgu, a S-*COMT* u većini ostalih tkiva (Tenhunen i sur. 1994).



Slika 2. Struktura gena *COMT*. Preuzeto i prilagođeno prema Sasaki i sur. (2003).

1.2.2. Polimorfizmi gena *COMT* i promjena aktivnosti enzima *COMT*

Polimorfizam jednog nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) najčešći je oblik genetičke varijacije u ljudi. Identificiran je niz SNP-ova vezanih uz gen *COMT*, ali

samo za nekolicinu je poznata funkcija. Smatra se da je varijabilnost gena *COMT* jedan od razloga različite podložnosti neuropsihijatrijskim poremećajima u čijoj je podlozi neuravnoteženo djelovanje kateholaminskih signala i puteva u mozgu (Gatt i sur. 2015). U ovom radu istraženi su polimorfizmi rs4680 i rs4818 gena *COMT*. Naziv rs4680 pripada najpoznatijem i najbolje istraženom funkcionalnom SNP-u gena *COMT*, Val^{108/158}Met. Zamjena baze gvanin za adenin (G→A) u četvrtom eksonu rezultira zamjenom hidrofobne aminokiseline valin (Val) s aminokiselinom metionin (Met) u kodonu 158 ili kodonu 108, ovisno o tome radi li se o izoformi MB-COMT ili S-COMT. Val varijanta enzima COMT stabilnija je pri fiziološkoj temperaturi i 3 do 4 puta aktivnija u odnosu na Met varijantu (Lotta i sur. 1995). Aminokiselina na poziciji 158/108 ne nalazi se u aktivnom mjestu već na samoj površini enzima u blizini veznog mjesta za S-adenozil-metionin. Metionin na toj poziciji dovodi do destabilizacije veznog mjesta i veće tendencije za agregaciju proteina (Rutherford i sur. 2008). Također, na uzorcima biopsije jetre te staničnim linijama COS-1 i HEK293 uočena je manja koncentracija enzima u homozigota za alel A (Met), što također može biti razlog smanjene aktivnosti. Pretpostavlja se da je manja količina enzima rezultat povećane razgradnje proteina ili promjena u transkripciji (Shield i sur. 2004). Prevalencija alela A (Met) seže od oko 62 % u europskim i jugozapadnim azijskim populacijama do 1 % u južnoameričkim populacijama (Palmatier i sur. 1999). Aleli su kodominantni, a G/A ili Val/Met heterozigoti imaju intermedijarni fenotip. Istraživanja na enzimu COMT vrlo brzo su pokazala da jedan polimorfizam ne može objasniti svu varijabilnost u aktivnosti enzima, već da ona vjerojatno ovisi o interakciji više polimorfizama, to jest o haplotipovima. Nackley i suradnici (2006) htjeli su otkriti poveznicu između varijacija u genu *COMT* i osjetljivosti na bol i tendenciji razvoja temporomandibularnog poremećaja zglobova. Pokazali su da izraženost ovih svojstava ovisi o tri različita haplotipa gena *COMT*, koji svaki na svoj način mijenjaju sekundarnu strukturu mRNA transkripta i tako utječe na stopu degradacije molekule mRNA, translaciju proteina i konačno enzimsku aktivnost (Nackley i sur. 2006). Haplotipove su definirali kao različite kombinacije četiri učestala polimorfizma rs4680, rs6269, rs4633 i rs4818. Polimorfizam rs4818 spada u sinonimne SNP-ove što znači da, iako mijenja slijed baza u genu, ne utječe na strukturu proteinske sekvence. Riječ je o zamjeni baze citozin za gvanin (C→G) u četvrtom eksonu, 64 bp nizvodno od polimorfizma rs4680 (Li i sur. 2012). Međusobni položaj polimorfizama prikazan je na Slici 3. Alel koji sadrži gvanin uzrokuje povećanu ekspresiju gena *COMT* i pojavljuje se u više od 40 % europske populacije (Roussos i sur. 2008). Zanimljivo je što haplotip povezan s najslabijom i onaj s najvećom aktivnosti, u istraživanju Nackleyja i sur. (2006), sadrži isti alel s obzirom na polimorfizam rs4680, ali se

oni razlikuju u alelima s obzirom na polimorfizam rs4818. Iz toga bi se dalo zaključiti da polimorfizam rs4818 ima veći utjecaj na enzimsku aktivnost od polimorfizma rs4680, ali detaljna istraživanja te hipoteze još nisu provedena.



Slika 3. Pozicije nekih od najznačajnijih polimorfizama gena *COMT*.

Polimorfizmi rs4680 i rs4818 istaknuti su crvenim okvirom. Preuzeto i prilagođeno prema Li i sur. (2011).

1.3. Shizofrenija

Shizofrenija je neurorazvojni poremećaj koji ozbiljno narušava živote oboljelih i njihovih najbližih, a pogađa oko 1 % svjetske populacije (Jablensky i sur. 1992). Predstavlja izrazito kompliciranu dijagnostičku kategoriju zbog značajnih razlika u kliničkoj prezentaciji bolesti, simptomima, odgovoru na lijekove i tijeku bolesti. Poremećaj je popraćen suptilnim strukturnim i funkcionalnim promjenama u specifičnim populacijama živčanih stanica, imunološkom sustavu, neurokemijskoj ravnoteži te naročito promjenama u serotonergičkoj, dopaminergičkoj, glutamatergičkoj i neurotransmisiji posredovanoj gama-amino-maslačnom kiselinom ili GABA-om (Howes i sur. 2015, Schmidt i Mirnics 2015). Dijagnoza se uspostavlja kliničkim psihijatrijskim pregledom i strukturiranim kliničkim intervjuom temeljenim na prisutnosti i trajanju pozitivnih, negativnih, kognitivnih i afektivnih simptoma prema smjernicama Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje (DSM). Ponekad je zbog sličnosti simptoma teško razlučiti radi li se o shizofreniji ili nekom drugom psihotičkom ili mentalnom poremećaju (Patel i sur. 2014).

Precizna etiologija bolesti još je uvijek nepoznata. Smatra se da ne postoji jedinstven uzrok shizofrenije već da se radi o složenoj interakciji gena i okolišnih čimbenika. Istraživanja na jednojajčanim i dvojajčanim blizancima potvrđuju genetički aspekt bolesti i predviđaju nasljednost u 80 % slučajeva (Sullivan i sur. 2003). Psihijatrijski genomski konzorcij (eng. *Psychiatric Genomics Consortium*, PGC) proveo je u periodu od 2014. do sada najopsežniju

asocijacijsku studiju koja obuhvaća čitav genom (eng. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) kojom je identificirano 108 lokusa za koje se smatra da pridonose riziku za razvoj bolesti (*Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium* 2014). Za većinu njih nepoznat je patološki mehanizam djelovanja, a čak 83 od 108 lokusa po prvi put su spomenuti u razvoju shizofrenije (*Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium* 2014). Metodologija proučavanja utjecaja okoliša na razvoj bolesti puno je kompliciranija utoliko što takvi čimbenici po svojoj prirodi nisu egzaktni kao geni i teško ih je mjeriti. Ipak, do sada je otkriven niz čimbenika za koje se smatra da su izrazito važni u razvoju shizofrenije, kao što su virusne infekcije i pothranjenost u fetalnoj dobi, problemi prilikom poroda, traume u ranoj dječjoj dobi, stresovi u odrasloj dobi, itd. (Brown 2011).

Simptomi shizofrenije mogu se podijeliti na pozitivne, negativne, kognitivne i afektivne. Vizualne i auditorne halucinacije, sumanutosti, ekscesivno ponašanje, agresija, i psihotične epizode rezultat su pretjeranih ili promijenjenih funkcija i svrstavaju se u pozitivne simptome. Suprotno tome, negativni ili deficitarni simptomi kao što su socijalna otuđenost, smanjena ekspresija emocija, nedostatak motivacije te poteškoće u govoru i formiranju misli odnose se na smanjenje ili gubitak normalnih funkcija (Xavier i Vorderstrasse 2017). Smanjenoj kvaliteti života oboljelih od shizofrenije najviše pridonose poremećaji u kogniciji u koje se ubrajaju poremećaji pažnje, radnog pamćenja, apstraktnog razmišljanja, rješavanja zadataka i razumijevanja društvenih međudjelovanja (Bowie i Harvey 2006). Afektivni simptomi uključuju depresivne i anksiozne simptome, koji povećavaju rizik suicidalnom ponašanju i smanjuju kvalitetu života. Terapija antipsihoticima pokazala se uspješnom u liječenju pozitivnih simptoma, ali ima umjeren ili slab utjecaj na negativne simptome i poremećaje u kogniciji. Smatra se da neki lijekovi s antikolinergičnim djelovanjem koji se apliciraju s ciljem suzbijanja nuspojava određenih antipsihotika mogu dovesti do pogoršanja kognicije (Ogino i sur. 2014). No očekuje se da će noviji antipsihotici (antipsihotici druge generacije ili atipični antipsihotici) i oni koji ciljaju dopaminske receptore tipa 4, psihostimulanse, inhibitore COMT-a, i molekularni ciljevi koji uključuju glutamat, inhibitore kolinesteraza, nikotinske i muskarinske agoniste, i parcijalne agoniste serotonina, pokazati umjerene ili čak povoljne učinke na kogniciju i negativne simptome (Penedis i sur. 2016).

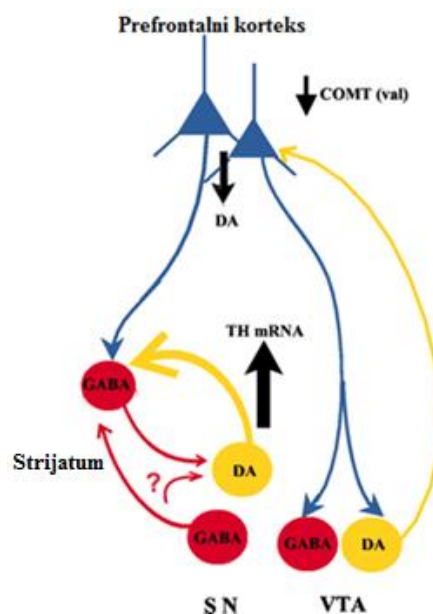
1.3.1 Uloga dopamina u shizofreniji

Jedna od vodećih hipoteza o uzroku pojave shizofrenije jesu promjene u dopaminergičkom sustavu neurotransmisije, odnosno stanje povećane količine dopamina u subkortikalnim regijama (hiperdopaminergija) i smanjene količine dopamina u kortikalnim regijama (hipodopaminergija). Kvantifikacijom radioaktivno označene L-DOPA-e, koja je prekursor u sintezi dopamina, metodom pozitronske emisijske tomografije (PET) (Lyon i sur. 2011) i enzima tirozin hidrosilaze, koji sudjeluje u sintezi L-DOPA-e iz tirozina, metodom imunohistokemije (Howes i sur. 2013), pokazana je povećana stopa sinteze i dostupnost dopamina u presinaptičkim neuronima strijatalnog puta subkortikalne regije. Smatra se da povećana količina dopamina dovodi do njegovog otpuštanja i prijenosa signala čak i u odsutnosti vanjskog podražaja što može rezultirati halucinacijama i sumanutostima (Winton-Brown i sur. 2014). Inhibicija dopaminskog receptora D₂, specifičnog za tu regiju, pokazala se kao uspješna metoda suzbijanja pozitivnih simptoma i vodeći je mehanizam djelovanja antipsihotika (Jafari i sur. 2012). Područje PFC-a u mozgu zaduženo za radnu memoriju, više kognitivne funkcije i svjesne motoričke radnje. Smatra se da smanjena transmisija dopamina preko dopaminskih receptora D₁ u toj regiji može rezultirati pojavom negativnih i kognitivnih simptoma shizofrenije (Abi-Dargham 2003). Neki od mogućih razloga su smanjeno otpuštanje dopamina, što je potvrđeno uporabom metode PET kao i kod hiperdopaminergije u subkorteksu (Slifstein i sur. 2015), ali i smanjena ekspresija samog dopaminskog receptora D₁ što pokazuje kvantifikacija mRNA transkripata metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *Real-time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) (Kaalund i sur. 2014). Dva navedena puta dopaminergičke neurotransmisije nisu međusobno neovisna. Dopaminergički neuroni u PFC-u tvore sinapse s piramidalnim neuronima koji preko inhibirajućih GABA neurona reguliraju dopaminergičke neurone koji se iz crne jezgre pružaju u strijatum. Na taj način kortikalna dopaminergička aktivnost regulira subkortikalnu dopaminergičku aktivnost. Prema tome, u slučaju shizofrenije, smanjena transmisija dopamina u PFC-u direktno rezultira njenim povećanjem u subkortikalnim regijama (Howes i Kapur 2009).

1.2.2. Uloga enzima COMT u shizofreniji

Jedno od svakih 3000 – 4000 djece rađa se s delecijom regije 22q11.2, a otprilike četvrtina njih kasnije u životu razvije shizofreniju. Delecijski sindrom 22q11.2 do danas je najznačajniji poznati genetički faktor rizika za razvoj shizofrenije (Van i sur. 2017). Unatoč

tako velikoj povezanosti, delecijski sindrom 22q11.2 objašnjava tek oko 1 % poznatih slučajeva shizofrenije. Smatra se da bi preostala većina mogla biti posljedica raznih varijacija gena unutar te regije. Jedan od obećavajućih gena kandidata je i gen *COMT* zbog svojih brojnih polimorfizama i uloge enzima COMT u regulaciji dopaminergičke neurotransmisije. Toničko-fazna hipoteza postulira da postoje dvije vrste transmisije dopamina. Fazični dopamin je dopamin kojeg u velikim količinama otpuštaju dopaminergički neuroni u sinapsu nakon stimulacije akcijskim potencijalom (Miller i sur. 1981). Takav visoko koncentrirani dopamin preferencijalno se veže za dopaminske receptore D₂ (Trantham-Davidson i sur. 2004). Tonički dopamin je dopamin koji se u maloj količini nalazi u ekstrasinaptičkoj tekućini (Grace 1994) i veže se za dopaminske receptore D₁ (Trantham-Davidson i sur. 2004). Ispuštanje toničkog dopamina regulira ispuštanje fazičnog dopamina kroz stimulaciju autoreceptora D₂ u sinapsi (Bilder i sur. 2004). Enzim COMT odgovoran je za razgradnju toničkog dopamina. Smanjena aktivnost COMT-a dovodi do povećane razine toničkog dopamina i smanjene razine fazičnog dopamina u sinapsi između dopaminergičkih i piramidalnih neurona u PFC-u, što smanjuje inhibiciju i povećava ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u subkortikalnim dopaminergičkim neuronima (Akil i sur. 2003, Bilder i sur. 2004). Na taj način aktivnost enzima COMT utječe na razinu dopamina u kortikalnim, ali indirektno i subkortikalnim regijama. Shematski prikaz ove interakcije nalazi se na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz utjecaja genotipa gena *COMT* na razinu dopamina u PFC-u i subkortikalnim regijama.

Upitnik označava da neke projekcije GABA neurona još uvijek nisu potvrđene. Preuzeto i prilagođeno prema Akil i sur. (2003).

Polimorfizmi gena *COMT* kao što su rs4860, koji rezultira povećanom enzimatskom aktivnošću, i rs4818, koji rezultira povećanom ekspresijom, izravno utječu na stopu transmisije preko dopaminskog receptora D₁ koji modulira kognitivne funkcije PFC-a. Socijalna kognicija, odnosno tumačenje socijalnih informacija, njihova primjena na vlastito ponašanje te empatija, jedna je od takvih funkcija. Disfunkcija socijalne kognicije jedno je od obilježja shizofrenije i čini se da je posebno izražena u homozigota GG (Val/Val) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* (Tylec i sur. 2017). Homozigoti GG (Val/Val) također imaju smanjenu radnu memoriju (Matsuzaka i sur. 2017) te probleme u izvršnim funkcijama, koje usmjeravaju i organiziraju ponašanje (Jooper i sur. 2002). Polimorfizam rs4818 nešto je slabije istražen, ali uočena je poveznica između alela G i manje uspješnosti u planiranju i rješavanju problema, ali zato boljoj integraciji emocija kod donošenja odluka (Roussos i sur. 2008). Osim na kogniciju, povećana aktivnost enzima COMT utječe i na jaču izraženost negativnih simptoma (Mao i sur. 2016). S druge strane, mnoga istraživanja poput istraživanja na kineskoj, hrvatskoj, slovenskoj i meksičkoj populaciji nisu pronašla razliku u frekvencijama genotipova gena *COMT* između zdrave populacije i oboljelih od shizofrenije (Li i sur. 2012, Nikolac i sur. 2013, Terzić i sur. 2016, Tovilla-Zárate i sur. 2013). Smatra se da ovakvi oprečni rezultati proizlaze iz nedostatka standardizirane definicije fenotipa bolesti, slabog statističkog značenja i razlika u etničkim skupinama kod pojedinih istraživanja ili premalog broja uključenih ispitanika u studiju. Također, većina istraživanja nije uzela u obzir moguće interakcije gena *COMT* s drugim genima ili pak okolišnim čimbenicima.

1.3.3. Terapija antipsihoticima

Kako se simptomi shizofrenije mogu znatno razlikovati od bolesnika do bolesnika, u smislu izraženosti simptoma te u njihovim kombinacijama, ne postoji jedinstven lijek koji je učinkovit u svih bolesnika. Odgovor na terapiju antipsihoticima izrazito varira između pojedinih pacijenata, a stopa odgovora na terapiju u prosjeku iznosi do 50 % (Lieberman i sur. 2005). Antipsihotici prve generacije ili konvencionalni antipsihotici (neuroleptici) bili su djelotvorni i blokirali su pozitivne simptome, ali nisu bili djelotvorni u liječenju negativnih i kognitivnih simptoma. Regulirali su dopaminergičku neurotransmisiju vezanjem i blokadom dopaminskih receptora D₂ (Seeman i sur. 1976). Njihov afinitet za receptore D₂ bio je toliko visok da su često izazivali teške ekstrapiramidalne nuspojave i tardivnu diskineziju (Conley i Kelly 2005). Razvoj antipsihotika druge generacije ili atipičnih antipsihotika započeo je

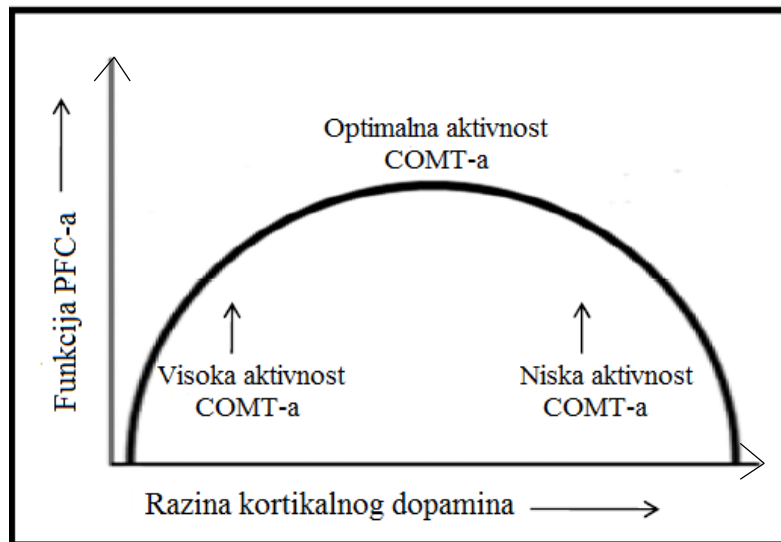
otkrićem klozapina. Klozapin je prvi antipsihotik koji je, osim na dopaminske receptore, djelovao i na serotoninske 5-HT₁, muskarinske, histaminske i α -adrenergičke receptore (Iqbal i sur. 2003). Njegova efektivnost znatno je veća naspram konvencionalnih antipsihotika, međutim on je djelotvoran i kod onih bolesnika otpornih na terapiju atipičnim antipsihoticima (Kane i sur. 1988, Raguraman i sur. 2005). U ovo sadašnje istraživanje uključeni su bolesnici koji su primali monoterapiju olanzapinom, klopazinom, risperidonom i u manjem broju haloperidolom, flufenazinom i kvetiapiinom. Po kemijskoj strukturi olanzapin spada u tienobenzodiazepine, klopazin u dibenzodiazepin, a risperidon u benzisoksazole (Jafari i sur. 2012). Olanzapin i risperidon su dizajnirani na principu klopazina. Iako im se omjeri afiniteta vezanja (5-HT_{2A}/D₂) razlikuju, sva tri antipsihotika imaju veći afinitet prema serotoninskim 5-HT_{2A} nego dopaminskim D₂ receptorima (Jafari i sur. 2012). Na štakorima je pokazano da blokada receptora 5-HT_{2A} dovodi do povećanja razine ekstracelularnog dopamina i transmisije preko D₁ receptora u PFC-u (Kuroki i sur. 1999). Stoga se smatra da bi omjer 5-HT_{2A}/D₂ mogao biti jedan od faktora djelotvornosti antipsihotika u liječenju negativnih simptoma (Meltzer i sur. 1989). Atipični antipsihotici imaju i svoje nedostatke: oni mogu prouzročiti razne metaboličke nuspojave koje uključuju netoleranciju na glukozu, značajan dobitak na težini i dislipidemiju (Jeon i Kim 2017).

1.2.4. Farmakogenetika i COMT

Farmakogenetika je područje istraživanja koje pokušava temeljem genetičkih varijacija predvidjeti u kojih će bolesnika doći do poboljšanja kliničkog stanja i simptoma nakon primjene određenih lijekova, a sve s ciljem individualiziranog pristupa terapiji kako bi se maksimalno smanjili simptomi kod bolesnika, a da se pri tome izbjegnu i određene nuspojave. S obzirom na to da većina antipsihotika djeluje na način da modulira centralnu dopaminergičku funkciju, u farmakogenetičkim istraživanjima zanimljivi su geni koji kodiraju za pojedine sastavnice dopaminergičkog sustava, kao što su dopaminski receptori D₂ i D₃ te enzim COMT, ali i geni za enzime uključene u metabolizam lijekova na primjer CYP2D6 enzim u jetri (Eum i sur. 2016).

Djelatnost enzima COMT utječe na količinu dopamina u kortikalnim i subkortikalnim regijama u mozgu. Smanjena aktivnost enzima COMT ne mora nužno imati povoljan učinak na djelovanje antipsihotika. Illi i sur. (2007) pokazali su da su nosioci genotipa Met/Met (AA), koji je povezan sa najnižom aktivnosti enzima COMT, morali primati veće dnevne

doze konvencionalnih antipsihotika od nosioca genotipova Met/Val (AG) i Val/Val (GG). Taj se rezultat može objasniti hipotezom toničko-faznog dopaminskog signaliziranja. Nosioci genotipa Met/Met (AA) u istraživanju Illi i sur. (2007) imali su povećanu razinu toničkog i smanjenu razinu fazičnog dopamina zbog smanjene aktivnosti COMT-a. Rjeđa stopa vezanja fazičnog dopamina na receptore D₂, zajedno s inhibicijskim djelovanjem konvencionalnih antipsihotika na D₂ receptore, razlog je zašto su nosioci genotipa Met/Met (AA) imali lošiji odgovor na terapiju od nosioca ostalih genotipova (Bilder i sur. 2004). Atipični antipsihotici slabije se vežu na D₂ receptore od konvencionalnih antipsihotika te potiču transmisiju preko D₁ receptora zbog čega nosioci genotipa Met/Met (AA) općenito imaju bolji odgovor na terapiju od nosioca ostalih genotipova (Huang i sur. 2006). Postoji mnogo oprečnih rezultata u literaturi glede utjecaja polimorfizama gena *COMT* na odgovor na terapiju antipsihoticima: neka su istraživanja pokazala da polimorfizam rs4680 gena *COMT* može pozitivno utjecati na odgovor na terapiju atipičnim antipsihoticima (Bertolino i sur. 2004, Gao i sur. 2012, Han i sur. 2017, Woodward i sur. 2006), a drugi da nema povezanosti između *COMT* polimorfizma i odgovora na terapiju (Illi i sur. 2007, Pelayo-Teran i sur. 2011, Yamanouchi i sur. 2003). Jedno od predloženih objašnjenja jest da aktivost COMT-a ovisi o interakciji svih polimorfizama prisutnih u genu *COMT*. Različite osobe imaju različiti odgovor na terapiju antipsihoticima jer nemaju isti set polimorfizama u genu *COMT* (Tunbridge i sur. 2006). Za takve osobe kaže se da zauzimaju različita mjesta na invertnoj U-krivulji, prikazanoj na Slici 5, koja opisuje ovisnost kortikalne razine dopamina i funkcije PFC-a (Gupta i sur. 2011). Problem je u tome je što se za većinu polimorfizama ne zna njihov učinak, ako on uopće postoji, na aktivnost enzima COMT. Polimorfizmi gena *COMT* obično se određuju metodom RT-PCR (Reuter i sur. 2005).



Slika 5. Invertna U-krivulja koja prikazuje ovisnost funkcije PFC-a o razini kortikalnog dopamina.

Preuzeto i prilagođeno prema Gupta i sur. (2011).

2. CILJ RADA

Zbog nedostatka pouzdanih i usklađenih podataka u literaturi, povezanost terapijskog odgovora na antipsihotike s genetičkom podlogom, i to gena *COMT*, u shizofreniji nije dovoljno razjašnjena. Cilj ovog istraživanja je pokazati postoji li povezanost između dva polimorfizma (rs4680 i rs4818) gena *COMT* i odgovora na terapiju antipsihoticima u pacijenata sa shizofrenijom. Oba navedena polimorfizma smještena su unutar istog eksona gena *COMT*, a odabrani su pretraživanjem literature te baze podataka „SZgene“ (<http://www.szgene.org>) i baze SNP-ova (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) u sklopu baze podataka „NCBI“.

Hipoteza ove studije jest da će kombinacija navedenih polimorfizama, tj. kombinacija određenih alela oba polimorfizma dodatno pridonijeti modulaciji aktivnosti enzima *COMT* u PFC-u (Nackley i sur. 2006), a time i odgovoru na antipsihotike u pacijenata sa shizofrenijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U istraživanje su uključeni pacijenti oba spola s dijagnosticiranom shizofrenijom (N = 521) prema kriterijima navedenima u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 4. izdanje (DSM-IV) (First i sur. 1995). Uključeni su punoljetni ispitanici u dobi od 19 – 82 godine. Dijagnozu su postavili psihijatri pomoću dijagnostičkog kliničkog intervjua. Svim ispitanicima u detalje je objašnjena svrha i postupak istraživanja te su svi ispitanici dobrovoljno potpisali informirani pristanak. Svi pacijenti liječeni su u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče ili u Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb gdje su primili terapije atipičnim antipsihoticima u trajanju od osam tjedana. Sva istraživanja su provedena uz odobrenje Etičkog povjerenstva Psihijatrijske bolnice Vrapče i KBC-a Zagreb te uz potpunu suradnju i primjereno razumijevanje sudionika. Istraživanja su bila potpuno usklađena s etičkim standardima postavljenim Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine. Klinička procjena težine simptoma napravljena je prije i nakon 8 tjedana terapije na temelju ukupnih bodova na ocjenskoj ljestvici za pozitivne i negativne sindrome (eng. *Positive And Negative Syndrome Scale for Schizophrenia*, PANSS). Ljestvicom PANSS procjenjuje se ukupno 30 stavki od kojih se 7 odnosi na pozitivne simptome, 7 na negativne i 16 na opće psihopatološke simptome. Svaki simptom boduje se po svojoj izraženosti od 1 do 7 (1=simptom nije prisutan, 7=ekstremna izraženost), ali u ovoj je studiji prema prijedlogu Leucht i sur. (2007), pomaknuta skala i bodovanje na raspon od 0 do 6 (0=simptom nije prisutan, 6=ekstremna izraženost) (Leucht i sur. 2007). Odgovor na terapiju definiran je kao 50 % pad u broju ukupnih bodova na ljestvici PANSS nakon osam tjedana primanja terapije u odnosu na početni broj bodova na ljestvici PANSS. Odabran je 50 % pad kao prijelomna vrijednost, jer on reflektira značajno bolji odgovor na terapiju i kao takav ima veću važnost s kliničkog aspekta od, na primjer, 25 % pada koji reflektira minimalno poboljšanje (Leucht i sur. 2007). Svi sudionici prije ovog istraživanja nisu primali kroz nekoliko tjedana do mjeseci nikakve druge oblike terapije. U sklopu kliničnog intervjua prikupljeni su i podaci o pušenju na temelju kojih su pacijenti podijeljeni na pušće i nepušće.

3.1.1. Terapije

Svi ispitanici primili su monoterapiju s atipičnim antipsihoticima u trajanju od 8 tjedana: ukupno je 190 ispitanika (36,5 %) primalo olanzapin (10 – 20 mg dnevno), 99 ispitanika (19,0 %) risperidon (3 – 6 mg dnevno) i 102 ispitanika (19,6 %) klozapin (100 – 500 mg dnevno). Ispitanici koji su primali neke od drugih antipsihotika, kao što su haloperidol (3 – 115 mg

dnevno), flufenazin (4 – 25 mg dnevno) ili kvetiapin (50 – 800 mg dnevno), grupirani su u zajedničku skupinu pod nazivom “ostali antipsihotici“ (130 ispitanika, 25 %).

3.2 Izolacija genomske DNA iz krvi

Uzorci krvi svih ispitanika prikupljeni su od osoba koje su bile natašte, pri prvom pregledu u prijepodnevnim satima tijekom uobičajenih laboratorijskih testova, koristeći staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer®) s 2 ml antikoagulansa ACD koji sadrži limunsku kiselinu, natrij citrat i dekstrozu (eng. *Acid Citrat Dextrose*). Iz svakog uzorka pune krvi napravljena je izolacija genomske DNA metodom isoljavanja ili koristeći komercijalni komplet PureLink® Genomic DNA Mini (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Izolacija DNA iz krvi isoljavanjem bazira se na metodi koju je uspostavio Miller sa suradnicima (Miller i sur. 1988). Prednost ove metode, pri obradi velikog broja uzoraka, je u njenoj jednostavnosti, ekonomičnosti i lako dostupnim kemikalijama te izbjegavanju korištenja štetnih organskih otapala poput fenola i izokloroforma. Također, metodom isoljavanja moguće je iz istog volumena pune krvi (200 – 300 µl) dobiti značajnije veću koncentraciju genomske DNA u odnosu na koncentraciju genomske DNA koja se dobiva izolacijom iz pune krvi korištenjem komercijalnih kompleta. Ključni korak u svakoj izolaciji DNA jest uklanjanje proteina iz uzorka. U ovoj metodi to se postiže razgradnjom proteina proteinazom K nakon čega slijedi isoljavanje tj. povećavanje koncentracije soli u vodenoj otopini čime se smanjuju interakcije između proteina i molekula otapala, a povećavaju protein-protein interakcije koje dovode do agregacije proteina i njihova taloženja. Nakon toga DNA se precipitira pomoću izopropanola. Kod komercijalnog kompleta PureLink® primjenjuje se tehnika spin kolona. Pri određenim vrijednostima pH i koncentracije soli DNA ostaje vezana za silikonsku gel membranu spin kolone i tako se uspješno odvaja od ostatka staničnog lizata koji kroz nju prolazi. Ova metoda puno je brža od metode isoljavanja, ali daje nižu koncentraciju DNA. Kvantiteta i kvaliteta izolirane genomske DNA provjerena je uporabom Nanodrop aparata (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) slijedeći upute proizvođača. Prinos metode isoljavanja je $40,8 \pm 4,3$ µg DNA / mL krvi, a komercijalnog kompleta PureLink® $3 - 10$ µg DNA / 200 µL krvi.

3.2.1. Izolacija genomske DNA metodom isoljavanja

Epruvete s odmrznutim uzorcima krvi stavljene su na valjkastu miješalicu 15 min dok se krv nije u potpunosti homogenizirala. Otpipetirano je 300 μ l krvi u označene Eppendorf epruvete od 1,5 ml i dodano je 900 μ l hladnog pufera za liziranje eritrocita (RCLB, eng. *Red Cell Lysis Buffer*)(10 mM Tris, Trizma® base, Sigma Aldrich; 5 mM MgCl₂, Kemika; 10 mM NaCl, Kemika; pH = 7,6). Uzorci su izmiješani na vorteks miješalici 20 s, a potom ostavljeni na ledu 10 min i centrifugirani (13000 \times g, 2 min, 4 °C). Nakon što se uklonio supernatant s liziranim eritrocitima od taloga s netaknutim leukocitima, postupak ispiranja ponovljen je još tri puta. Nakon ispiranja, na talog je dodano 300 μ l pufera za liziranje leukocita (SE pufer, eng. *Sodium EDTA buffer*)(75 mM NaCl, Kemika; 25 mM EDTA, pH = 7,6, Sigma Aldrich; pH = 8,0), uzorci su kratko izmiješani na vorteks miješalici te je dodano 30 μ l 10-postotnog natrijevog dodecil-sulfata (SDS, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*) (Sigma Aldrich) i 1,5 μ l proteinaze K (TaKaRa, 20 mgml⁻¹). Uzorci su lagano promiješani okretanjem Eppendorf epruvete te stavljene na inkubaciju 2 sata u termobloku na 56 °C uz konstantno miješanje (500 rpm), pri čemu je došlo do liziranja leukocita. Na uzorke ohlađene na sobnu temperaturu dodana je 1/3 volumena (200 μ l) 5 M otopine NaCl-a (Kemika) nakon čega je uslijedilo miješanje na vorteks miješalici 10 s i centrifugiranje (13000 \times g, 5 min, sobna temperatura). Supernatant s otopljenom genomskom DNA prebačen je u nove označene Eppendorf epruvete i na njega su dodana 2 volumena (800 μ l) hladnog izopropanola (Gram–Mol, min. 99,5 %, p.a.). Eppendorf epruvete okrenute su nekoliko puta gore-dolje dok nije nastao pelet istaložene DNA. Centrifugiranjem (12000 \times g, 2 min, sobna temperatura) uklonjen je supernatant, a na talog je dodano 400 μ l 75-postotnog etanola (Gram–Mol, min. 99,5 %, p.a.). Uzorci su ponovno centrifugirani (12000 \times g, 2 min, sobna temperatura), uklonjen je supernatant i otvorene epruvete stavljene u termoblok na 37 °C dok se nije posušio talog. Osušenom talogu dodano je 100 μ l pufera za čuvanje DNA (eng. *Tris-EDTA buffer, TE*)(10 mM Tris, Trizma® base, Sigma Aldrich; 1 mM EDTA, pH = 7,6, Sigma Aldrich; pH = 8,0) te su uzorci ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se DNA u potpunosti otopila. Nakon toga uzorci su pohranjeni na +4 °C.

3.2.2. Izolacija genomske DNA koristeći komercijalni komplet PureLink® Genomic DNA Mini Kit

Sve korištene kemikalije, osim etanola, pribavljene su od proizvođača komercijalnog kompleta (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Prvi korak bio je priprema lizata iz uzoraka krvi. U sterilnu Eppendorf epruvetu dodano je 200 µl odmrznute krvi, 20 µl proteinaze K i 20 µl RNaze A nakon čega su uzorci promiješani na vorteks miješalici i ostavljeni 2 min na sobnoj temperaturi. U uzorke je potom dodano 200 µl PureLink® Genomic pufera za lizu i dobro promiješano na vorteks miješalici. Eppendorf epruvete stavljene su u termoblok 10 min. na 55°C kako bi se potaknula digestija proteina. Nakon inkubacije dodano je 200 µl 96-postotnog etanola (Gram-Mol, min. 99,5 %, p.a.) i sve je još jednom promiješano na vorteks miješalici. Idući korak je izolacija DNA. Ukupni lizat prebačen je u sterilne spin kolone i na njega je dodano 500 µl pufera za ispiranje 1 nakon čega je uslijedilo centrifugiranje (10000 × g, 1 min, sobna temperatura). Spin kolone prebačene su u nove koleksijske mikrotubice, a stare su bačene. Dodano je 500 µl pufera za ispiranje 2 i ponovljeno centrifugiranje (maksimalna brzina, 3 min, sobna temperatura). Ovime je završeno ispiranje DNA. Spin kolone prebačene su u sterilne Eppendorf epruvete od 1,5 ml, dodano je 75 µl pufera za eluciju PureLink® Genomic i uzorci su ostavljeni 1 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifuge (maksimalna brzina, 1 min, sobna temperatura) bačene su spin kolone, a izolirana genomska DNA ostala je otopljena u puferu za eluciju u Eppendorf epruvetama koje su pohranjene na +4° C.

3.3. Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizme gena *COMT*

Određivanje genotipa ispitanika s obzirom na polimorfizme zamjene jedne baze rs4680 i rs4818 gena *COMT* provedeno je metodom RT-PCR. Pritom su korišteni komercijalno dostupni kompleti za određivanje polimorfizama jedne baze (ID: C_25746809_50 za rs4680 i ID: C_2538750_10 za rs4818) tvrtke Applied Biosystems (SAD). Genotipiziranje je napravljeno na uređaju „ABI Prism 7300 Real time PCR System“ istog proizvođača. Za razliku od tradicionalne PCR reakcije, detekcija amplifikacije odvija se u stvarnom vremenu pomoću interkalirajućih boja (npr. SYBR Green), fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (eng. *Fluorescent Resonant Energy Transfer*) ili kao u ovom slučaju, TaqMan® proba. U svrhu genotipizacije probe su dizajnirane tako da se vežu na kalup između početnica, na poziciji koja sadrži polimorfizam od interesa. Na 5' kraju oligonukleotidne sekvence probe

vezana je fluorescentna boja, a na 3' kraju utišivač koji blokira fluorescenciju dok je proba čitava. Ukoliko je došlo do vezanja, proba se prilikom sinteze novog lanca razgrađuje 5'→3' egzonukleaznom aktivnošću DNA polimeraze što efektivno razdvaja utišivač i boju te omogućuje detekciju fluorescencije. Fluorescenciju uređaj bilježi kao signal, a jačina i vrsta signala omogućuju određivanje genotipa za pojedini uzorak. U reakcijsku smjesu dodaju se dvije probe označene različitim bojama (VIC ili FAM) koje se vežu na istu lokaciju ovisno o slijedu nukleotida. Uzorak u kojem se bilježi signal samo jedne boje je homozigot za odgovarajući alel. Ako su prisutna oba signala, uzorak je heterozigot.

Sadržaj reakcijskih smjesa prikazan je u Tablici 1, a protokol odvijanja reakcije u Tablici 2.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

SASTOJAK	VOLUMEN
TaqMan univerzalna matična mješavina (2*)	12,5 µl
TaqMan mješavina proba i početnica (20*)	1,25 µl
genomska DNA (1-20 ng)	11,25 µl
ukupni volumen: 25 µl	

Tablica 2. Protokol za genotipizaciju metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

KORACI	TEMPERATURA	VRIJEME
početni korak	95 °C	10 min.
	1 ciklus	
denaturacija	92 °C	15 s
vezanje i produljenje početnica	60 °C	90 s
	50 ciklusa	

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je u programu Sigma Stat 3.5 (Jandell Scientific Corp. San Raphael, California, USA). Kolmogorov-Smirnov test korišten je za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih parametara. S obzirom na to da uspoređivani podaci (dob, PANSS bodovi) nisu imali normalnu razdiobu, korišteni su odgovarajući neparametrijski

testovi Mann-Whitney (pri usporedbi dvije skupine) i Kruskal-Wallisova ANOVA rangova (pri usporedbi tri ili više skupina). Klinički i demografski parametri (bodovi na ljestvici PANSS, dob bolesnika) prikazani su kao medijan, raspon i interkvartilni raspon između 25. i 75. percentile. U slučaju kada je Kruskal-Wallisova ANOVA rangova pokazala da postoji značajna razlika u određenom promatranom parametru između pojedinih skupina, napravljena je odgovarajuća post-hoc analiza kako bi se međusobno usporedile zasebne skupine (Conover, 1999). Za analize u kojima je bilo potrebno provjeriti utjecaj većeg broja neovisnih varijabli na jednu ovisnu varijablu korištena je metoda višestruke linearne regresije ili metoda logističke regresije. Za određivanje distribucije kategoričkih podataka te za provjeru postoji li odstupanje distribucije genotipova s obzirom na polimorfizme rs4680 i rs4818 gena *COMT*, korišten je Pearsonov χ^2 -test. S obzirom na to da su oba istraživana polimorfizma smještena unutar četvrtog eksona gena *COMT*, pomoću programa Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, USA) određena je neravnoteža udruživanja (LD, eng. *Linkage Disequilibrium*) koja je prikazana standardiziranim koeficijentom D' . Vrijednosti D' iznad 0,80 označava da su dva istraživana polimorfizma u LD-u. Procjena parova haplotipova za svakog pojedinog ispitanika napravljena je pomoću programa PHASE, verzija 2.1.1 (University of Washington, USA). Razina značajnosti α za sve analize postavljena je na 0,05, a svi korišteni testovi bili su dvosmjerni.

4. REZULTATI

4.1. Demografski podaci

Od 521 pacijenata sa shizofrenijom koji su bili uključeni u istraživanje, 352 (67,6 %) su bili muškog, a 169 (32,4 %) ženskog spola. Dob pacijenata kolebala je od 19 do 82 godine ($40,3 \pm 12,0$). Zbog mogućeg utjecaja na odgovor na terapiju, pacijenti su dodatno podijeljeni prema pušenju cigareta na pušače (322 ispitanika, 61,8 %) i nepušače (199 ispitanika, 38,2 %).

Medijan ukupnog broja bodova na ljestvici PANSS₀₋₆ prije terapije iznosio je 86,0 (raspon od 43 – 144, interkvartilni raspon od 72 – 100), a nakon 8 tjedana terapije pao je na 39,0 (raspon od 4 – 116, interkvartilni raspon od 24 – 55). Broj bodova i dob ispitanika, podijeljenih prema skupini antipsihotika koje su primali tijekom 8 tjedana, prikazani su u Tablici 3. Pacijenti tretirani olanzapinom bili su značajno mlađi od ostalih skupina ispitanika ($H = 12,81$; $p = 0,005$; Tablica 3). U većini podljestvica PANSS-a postojala je značajna razlika između broja bodova kod ispitanika tretiranih drugim antipsihoticima u usporedbi sa skupinom ispitanika koja je primala monoterapiju klopazinom (Tablica 3). Iznimka su broj bodova koji se odnose na PANSS₀₋₆ pozitivne i opće psihopatološke simptome prije terapije olanzapinom i risperidonom te ukupni PANSS₀₋₆ bodovi prije terapije ostalim antipsihoticima. U Tablici 4 prikazana je podjela ispitanika na temelju odgovora na terapiju određenim antipsihotikom. Odgovor na terapiju definiran je kao pad u bodovima PANSS₀₋₆ ljestvice i pojedinih podljestvica za 50 % ili više prema početnom broju bodova na istoj ljestvici koje su bolesnici ostvarili prije početka terapije. Može se uočiti značajna razlika u udjelu ispitanika koji su imali dobar odgovor na terapiju, u odnosu na one koji nisu dobro reagirali na terapiju određenim antipsihotikom, kada se uspoređuje pad bodova PANSS₀₋₆ negativnih simptoma ($\chi^2 = 29,95$; $p < 0,001$; $df = 3$). Najmanji postotak pacijenata s odgovorom na terapiju u pogledu poboljšanja negativnih simptoma (14,7 %) bio je u skupini koji su primali klopazin.

Tablica 3. Dob i broj bodova na ljestvici za pozitivne i negativne sindrome u shizofreniji (PANSS₀₋₆) u shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima, prije terapije i nakon 8 tjedana terapije.

Karakteristike uzorka	Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130			Kruskal–Wallis test (df = 3)	
	Medijan	Raspon Min Max		Medijan	Raspon Min Max		Medijan	Raspon Min Max		Medijan	Raspon Min Max		H	p
Dob (godine)	37,0	19	74	40,0**	20	69	42,0**	19	71	41,5**	19	82	12,81	0,005
Ukupni PANSS ₀₋₆ bodovi (tjedan 0)	85,5*	50	142	83,0*. [#]	43	144	94,0 [#]	47	141	80,5	47	141	14,43	0,002
Ukupni PANSS ₀₋₆ bodovi (tjedan 8)	39,0*	4	116	36,0*	5	89	47,0	15	93	32,0*	4	92	14,56	0,002
PANSS ₀₋₆ pozitivni simptomi (tjedan 0)	23,5 [#]	11	39	22,0	6	39	25,0	9	38	21,0*	6	35	10,66	0,014
PANSS ₀₋₆ pozitivni simptomi (tjedan 8)	9,0*	0	25	8,0*	0	25	11,5	0	25	6,5*	0	23	12,32	0,006
PANSS ₀₋₆ negativni simptomi (tjedan 0)	20,0*	3	35	20,0*	7	35	23,0	11	36	18,5*	5	36	21,57	< 0,001
PANSS ₀₋₆ negativni simptomi (tjedan 8)	12,0*. [#]	2	31	11,0*	2	28	14,0	3	29	9,0*	1	29	17,86	< 0,001
PANSS ₀₋₆ opći psihopatološki simptomi (tjedan 0)	41,0	20	73	40,0	17	73	44,0	16	8	38,5*	15	72	8,05	0,045
PANSS ₀₋₆ opći psihopatološki simptomi (tjedan 8)	18,0*	2	60	17,0*	2	44	21,0	8	46	15,5*	0	48	10,85	0,013

n, broj ispitanika; min, minimum; max, maksimum

*p < 0,05 vs. klozapin; [#]p < 0,05 vs. ostali antipsihotici; **p < 0,05 vs. olanzapin (post-hoc test prema Conoveru (1999)).

W. J. Conover. "Practical Nonparametric Statistics." Third Edition, John Wiley & Sons, New York, 1999

Tablica 4. Broj i udio shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima podijeljenih na ispitanike koji su pokazali dobar odgovor na terapiju (R) i one koji nisu imali dobar odgovor na terapiju (NR) određenim antipsihotikom. Odgovor na terapiju definiran je kao 50 % pad broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici prema početnom broju bodova na istoj ljestvici.

		Olanzapin n = 190	Risperidon n = 99	Klozapin n = 102	Ostali antipsihotici n = 130	χ^2 -test (df = 3)	
						χ^2	p
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije	NR	76 (40,0)	38 (38,4)	54 (52,9)	48 (36,9)	7,20	0,066
	R	114 (60,0)	61 (61,6)	48 (47,1)	82 (63,1)		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	52 (27,4)	28 (28,3)	36 (35,3)	39 (30,0)	2,12	0,548
	R	138 (72,6)	71 (71,7)	66 (64,7)	91 (70,0)		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	123 (64,7)	55 (55,6)	87 (85,3)	69 (53,1)	29,95	< 0,001
	R	67 (35,3)	44 (44,4)	15 (14,7)	61 (46,9)		
Pad bodova PANSS ₀₋₆ općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	83 (43,7)	42 (42,4)	57 (55,9)	59 (45,4)	4,93	0,177
	R	107 (56,3)	57 (57,6)	45 (44,1)	71 (54,6)		

n, broj ispitanika. Frekvencije su prikazane u zagradama (%).

4.2. Polimorfizam rs4680

Raspodjela genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u promatranom uzorku nalazila se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($\chi^2 = 0,05$; $p = 0,830$; $df = 1$). χ^2 -testom utvrđeno je da nema značajne razlike u frekvenciji pojedinih genotipova između muškaraca i žena ($\chi^2 = 1,65$; $p = 0,437$; $df = 2$). Rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u udjelu pojedinih genotipova Met/Met (AA) Met/Val (AG) i Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* između skupina ispitanika koji su bili na terapiji različitim antipsihoticima ($\chi^2 = 1,43$; $p = 0,964$; $df = 6$).

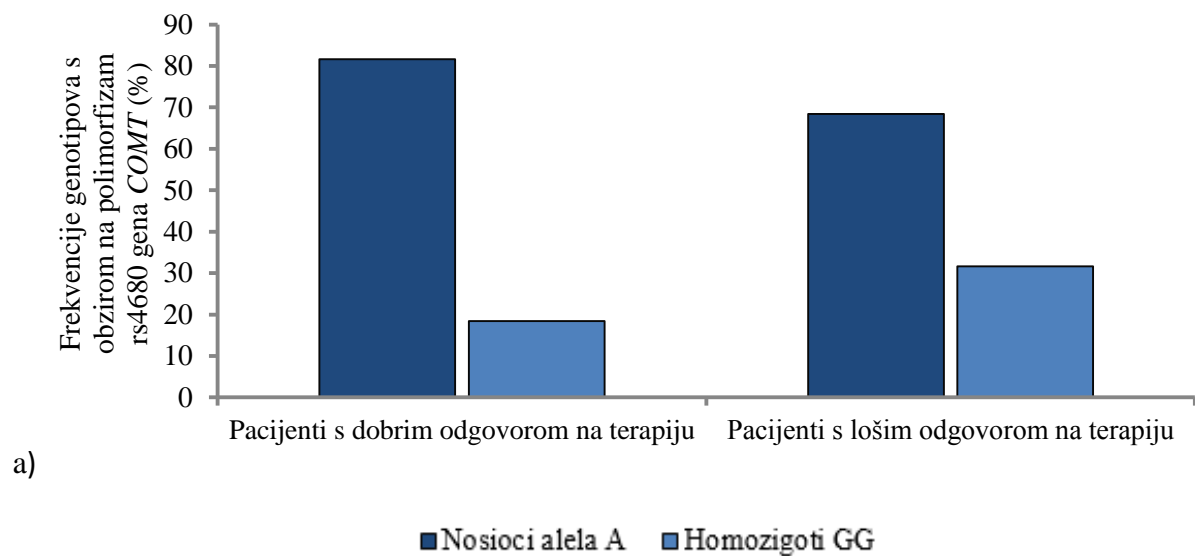
Nisu pronađene značajne razlike u raspodjeli genotipova Met/Met (AA) Met/Val (AG) i Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u pacijenata podijeljenih na one koji su imali dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom i onih kod kojih nije došlo do odgovarajućeg poboljšanja simptoma nakon 8 tjedana primanja terapije risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima (Tablica 5). U pacijenata tretiranih olanzapinom, također, nisu utvrđene značajne razlike u raspodjeli genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*. Međutim, uočen je trend koji upućuje na razliku udjela pojedinih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* nakon podjele ispitanika na one kod kojih je došlo da značajnijeg poboljšanja negativnih ($\chi^2 = 4,97$; $p = 0,083$), pozitivnih ($\chi^2 = 5,72$; $p = 0,057$) te općih psihopatoloških ($\chi^2 = 5,06$; $p = 0,080$) simptoma nakon 8 tjedana terapije, u odnosu na one koji nisu pokazali dobar odgovor na terapiju, odnosno one koji nisu pokazali 50 % poboljšanje spomenutih simptoma bolesti (Tablica 5).

Tablica 5. Broj i udio genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima podijeljenih na one koji su pokazali dobar odgovor na terapiju (R) i one koji nisu imali dobar odgovor na terapiju (NR) određenim antipsihotikom. Odgovor na terapiju definiran je kao 50 % pad broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici.

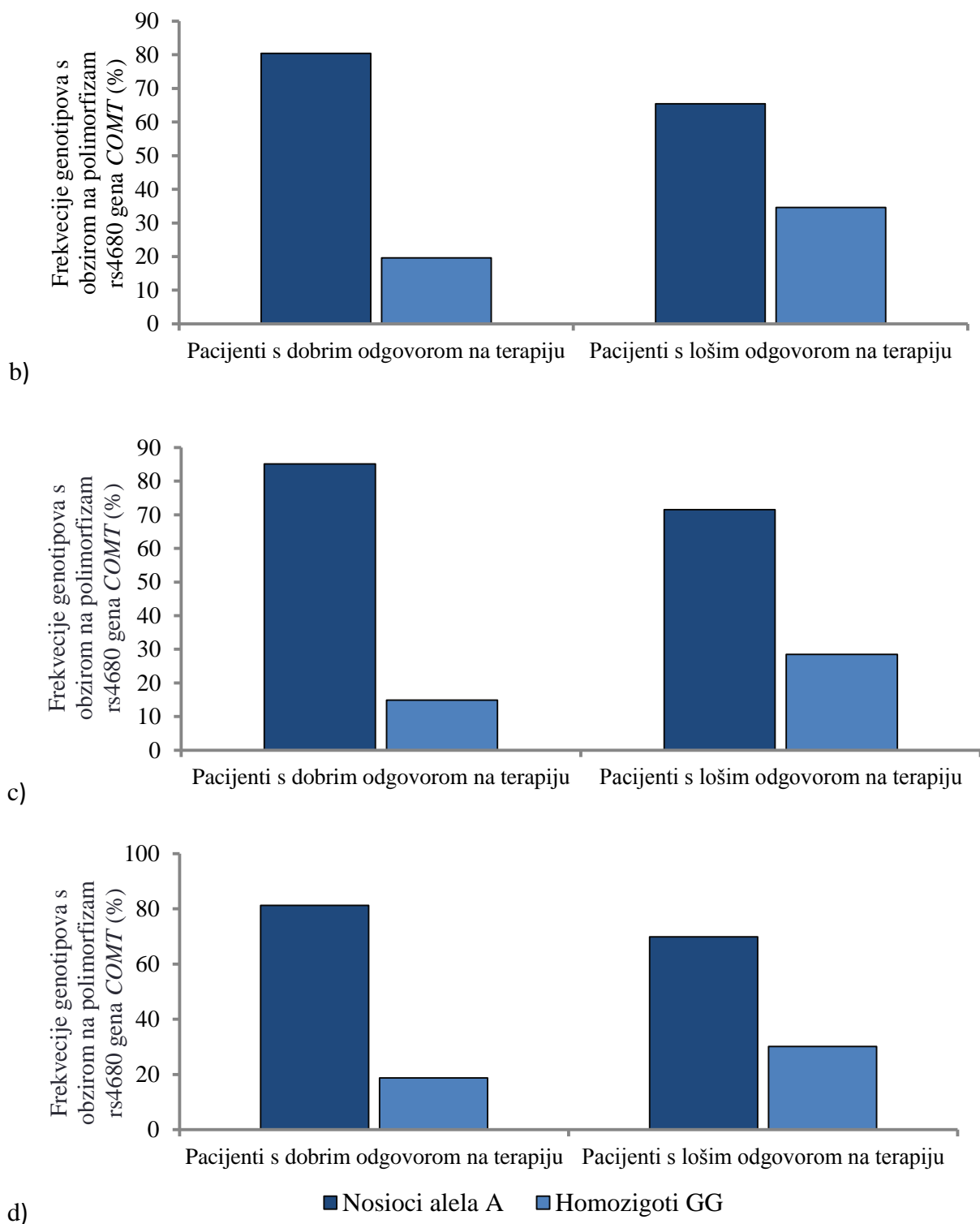
		Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije	N	17	35	24	13	15	10	13	26	15	13	21	14
	R	(22,4)	(46,1)	(31,6)	(34,2)	(39,5)	(26,3)	(24,1)	(48,1)	(27,8)	(27,1)	(43,8)	(29,2)
	R	29	64	21	13	31	17	13	22	13	17	44	21
		(25,4)	(56,1)	(18,4)	(21,3)	(50,8)	(27,9)	(27,1)	(45,8)	(27,5)	(20,7)	(53,7)	(25,6)
		$\chi^2 = 4,40; p = 0,111$			$\chi^2 = 2,15; p = 0,341$			$\chi^2 = 0,12; p = 0,940$			$\chi^2 = 1,27; p = 0,753$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	12	22	18	9	12	7	8	16	12	10	17	12
	R	(23,1)	(42,3)	(34,6)	(32,1)	(42,9)	(25,0)	(22,2)	(44,4)	(33,3)	(25,6)	(43,6)	(30,8)
	R	34	77	27	17	34	20	18	32	16	20	48	23
		(34,6)	(55,8)	(19,6)	(23,9)	(47,9)	(28,2)	(27,3)	(48,5)	(24,2)	(22,0)	(52,7)	(25,3)
		$\chi^2 = 4,97; p = 0,083$			$\chi^2 = 0,70; p = 0,706$			$\chi^2 = 1,02; p = 0,602$			$\chi^2 = 0,92; p = 0,630$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	31	57	35	17	23	15	22	41	24	16	33	20
	R	(25,2)	(46,3)	(28,5)	(30,9)	(41,8)	(27,3)	(25,3)	(47,1)	(27,6)	(23,2)	(47,8)	(29,0)
	R	15	42	10	9	23	12	4	7	4	14	32	15
		(22,4)	(62,7)	(14,9)	(20,5)	(52,3)	(27,3)	(26,7)	(46,7)	(26,7)	(23,0)	(52,5)	(24,6)
		$\chi^2 = 5,72; p = 0,057$			$\chi^2 = 1,59; p = 0,451$			$\chi^2 = 0,01; p = 0,993$			$\chi^2 = 0,37; p = 0,830$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	22	36	25	13	17	12	11	29	17	17	25	17
	R	(26,5)	(43,4)	(30,1)	(31,0)	(40,5)	(28,6)	(19,3)	(50,9)	(29,8)	(28,8)	(42,4)	(28,8)
	R	24	63	20	13	29	15	15	19	11	13	40	18
		(22,4)	(58,9)	(18,7)	(22,8)	(50,9)	(26,3)	(33,3)	(42,2)	(24,4)	(18,3)	(56,3)	(25,4)
		$\chi^2 = 5,06; p = 0,080$			$\chi^2 = 1,22; p = 0,544$			$\chi^2 = 2,61; p = 0,271$			$\chi^2 = 2,94; p = 0,230$		

Frekvencije (%) su prikazane u zagradama.

S obzirom na to da je među ispitanicima koji su pokazali slabiji odgovor na terapiju olanzapinom uočen veći udio homozigota Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u odnosu na druga dva genotipa, pacijenti su dodatno podijeljeni na nosioce alela Met ili A (homozigoti Met/Met (AA) i heterozigoti Met/Val (AG)) i homozigote Val/Val (GG). Frekvencija nosioca alela Met (A) bila je značajno veća u pacijenata koji su imali dobar odgovor na terapiju olanzapinom naspram onih koji nisu pokazali odgovarajuće poboljšanje simptoma s obzirom na ukupne PANSS₀₋₆ bodove ($\chi^2 = 4,37$; $p = 0,037$; $df = 1$) te PANSS₀₋₆ pozitivne ($\chi^2 = 4,73$; $p = 0,030$; $df = 1$) i negativne ($\chi^2 = 4,39$; $p = 0,036$; $df = 1$) simptome (Slika 6). Kod PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na opće psihopatološke simptome nije bilo značajne razlike u poboljšanju simptoma između ispitanika koji su bili nosioci alela Met (A) i homozigota Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* ($\chi^2 = 3,38$; $p = 0,066$; $df = 1$).



Slika 6. Frekvencija nosioca alela Met (A) i homozigota Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* između pacijenata koji su pokazali dobar odgovor i onih koji nisu dobro reagirali na terapiju olanzapinom. (Nastavlja se na idućoj strani.)



Slika 6. (Nastavak.) Frekvencija nosioca alela Met (A) i homozigota Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* između pacijenata koji su pokazali dobar odgovor i onih koji nisu dobro reagirali na terapiju olanzapinom. a) ukupni PANSS₀₋₆ bodovi ($\chi^2 = 4,37$; $p = 0,037$; $df = 1$); b) PANSS₀₋₆ pozitivni simptomi ($\chi^2 = 4,73$; $p = 0,030$; $df = 1$); c) PANSS₀₋₆ negativni simptomi ($\chi^2 = 4,39$; $p = 0,036$; $df = 1$); d) PANSS₀₋₆ opći psihopataloški simptomi ($\chi^2 = 3,38$; $p = 0,066$; $df = 1$).

Kako bi se isključio potencijalni utjecaj spola, dobi ili pušenja na dobivene rezultate, napravljena je dodatna analiza povezanosti odgovora na terapiju olanzapinom s polimorfizmom rs4680 gena *COMT*, nakon podjele ispitanika na nosioce alela Met (A) i homozigote Val/Val (GG), koristeći metodu logističke regresije. Za analizu su svi ispitanici podijeljeni s obzirom na odgovor na terapiju olanzapinom na one koji su pokazali dobar odgovor na terapiju i one kod kojih nije došlo do odgovarajućeg poboljšanja simptoma bolesti, a model je korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja. Rezultati logističke regresije pokazuju da jedino genotip s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* ima značajan utjecaj na odgovor na terapiju olanzapinom kada se uspoređuje pad ukupnih bodova na ljestvici PANSS₀₋₆ (koeficijent = -0,721; SE = 0,347; $p = 0,038$), ali sam model ($\chi^2 = 5,45$; $p = 0,245$; $df = 4$) nije značajan nakon korekcije za utjecaj spola, dobi i pušenja. Slična je situacija utvrđena i u slučaju kada se promatra utjecaj spomenutog polimorfizma na pad bodova podljestvice PANSS₀₋₆ koja se odnosi na pozitivne ($\chi^2 = 5,49$; $p = 0,240$; $df = 4$; koeficijent = -0,794; SE = 0,364; $p = 0,029$), negativne ($\chi^2 = 8,92$; $p = 0,063$; $df = 4$; koeficijent = -0,846; SE = 0,402; $p = 0,035$) te opće psihopatološke ($\chi^2 = 9,85$; $p = 0,043$; $df = 4$; koeficijent = -0,668; SE = 0,351; $p = 0,057$) simptome, nakon što je model korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja.

Kruskal-Wallis ANOVA-om su dodatno uspoređeni padovi PANSS₀₋₆ bodova između ispitanika koji su podijeljeni s obzirom na terapiju koju su primali, te s obzirom na genotip gena *COMT*, a rezultati su prikazani u Tablici 6. Značajna razlika pada bodova između nosioca različitih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* pronađena je jedino kod ukupnih PANSS₀₋₆ bodova ($H = 7,93$; $p = 0,019$) i PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne simptome ($H = 7,26$; $p = 0,027$) kod pacijenata koji su primali olanzapin (Tablica 6). Razlika proizlazi iz značajnijeg pada broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici i pojedinim podljestvicama kod ispitanika koji su nosioci Met/Val (AG) genotipa u odnosu na homozigote Val/Val (GG). Imajući na umu prethodne rezultate, pacijenti na terapiji olanzapinom dodatno su podijeljeni na nosioce alela Met (A) i homozigote Val/Val (GG). Ponovna usporedba pada PANSS₀₋₆ bodova, putem Mann-Whitney testa jer su uspoređene dvije skupine, pokazala je značajnu razliku kod ukupnih PANSS₀₋₆ bodova ($p = 0,006$), PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na PANSS₀₋₆ pozitivne ($p = 0,007$) i PANSS₀₋₆ opće psihopatološke ($p = 0,043$) simptome između ispitanika nosioca alela Met (A) u odnosu na homozigote Val/Val (GG). Značajna razlika nije pronađena u slučaju PANSS₀₋₆ negativnih ($p = 0,064$) simptoma bolesti (Slika 7). Ovi rezultati potvrđuju već uočen bolji odgovor na

terapiju olanzapinom kod osoba koje su nosioci alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u odnosu na nosioce genotipa Val/Val (GG).

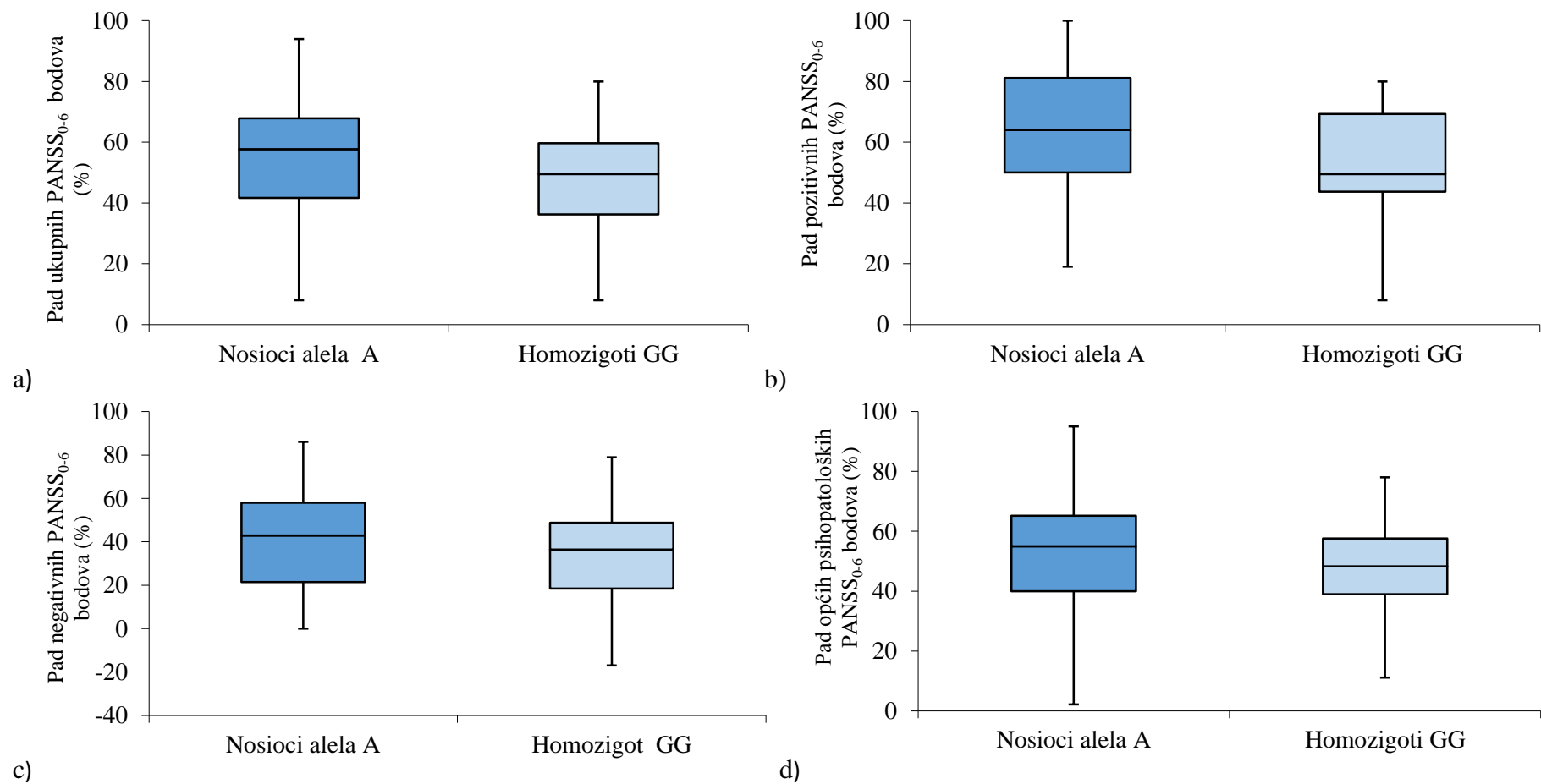
Kako bi se provjerio utjecaj polimorfizma rs4680 na izraženost simptoma procijenjenih pomoću ljestvice PANSS₀₋₆ i njezinih podljestvica, korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za navedenu analizu svi ispitanici su podijeljeni prema genotipu s obzirom na istraživani polimorfizam (nezavisna varijabla) na nosioce alela Met (A) te homozigote Val/Val (GG), a model je korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je broj bodova na ljestvici PANSS₀₋₆ i pojedinim podljestvicama.

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju polimorfizma rs4680 gena *COMT* pokazali su da postoji značajna razlika (koeficijent = -0,195; $t = -2,72$; $p = 0,007$) u ukupnom broju bodova ljestvice PANSS₀₋₆ između pacijenata podijeljenih na homozigote Val/Val (GG) te nosioce alela Met (A). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 3,3 % (korigirani $R^2 = 0,033$; $F = 7,40$; $p = 0,007$) varijacije koja je vidljiva u broju bodova na ljestvici PANSS₀₋₆. U slučaju pozitivnih simptoma, rezultati višestruke linearne regresije pokazali su da postoji značajna razlika (koeficijent = -0,204; $t = -2,86$; $p = 0,005$) u broju bodova podljestvice PANSS₀₋₆ koja se odnosi na pozitivne simptome bolesti između pacijenata podijeljenih na homozigote Val/Val (GG) te nosioce alela Met (A). Rezultat upućuje na to da je zadani model, korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja, odgovoran za 3,7 % (korigirani $R^2 = 0,037$; $F = 8,19$; $p = 0,005$) varijacije koja je vidljiva u broju bodova na pozitivnoj podljestvici PANSS₀₋₆. U slučaju negativnih simptoma, rezultati višestruke linearne regresije pokazali su da ne postoji značajna razlika (koeficijent = -0,142; $t = -1,96$; $p = 0,051$) u broju bodova podljestvice PANSS₀₋₆ koja se odnosi na negativne simptome bolesti između pacijenata podijeljenih na homozigote Val/Val (GG) te nosioce alela Met (A). Rezultat upućuje na to da zadani model, korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja, nije značajan (korigirani $R^2 = 0,008$; $F = 1,39$; $p = 0,240$). U slučaju općih psihopatoloških simptoma, rezultati višestruke linearne regresije pokazali su da ne postoji značajna razlika (koeficijent = -0,137; $t = -1,90$; $p = 0,059$) u broju bodova podljestvice PANSS₀₋₆ koja se odnosi na opće psihopatološke simptome bolesti između pacijenata podijeljenih na homozigote Val/Val (GG) te nosioce alela Met (A). Rezultat upućuje na to da zadani model, korigiran za utjecaj spola, dobi i pušenja, nije značajan (korigirani $R^2 = 0,018$; $F = 1,87$; $p = 0,118$).

Tablica 6. Pad početnih PANSS₀₋₆ bodova (ukupnih i na podljestvicama) izražen u postocima nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima u shizofrenih pacijenata podijeljenih prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*.

	Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
AA	56,0	83	33	52,4	83	32	50,1	55	23	54,3	83	40
AG	58,2	81	24	58,0	70	28	49,2	66	22	60,0	84	28
GG	49,5	71	23	63,2	76	37	45,5	53	27	54,2	79	33
Kruskal-Wallis test	$H = 7,93; p = 0,019$			$H = 0,37; p = 0,832$			$H = 0,04; p = 0,981$			$H = 1,37; p = 0,505$		
Pad pozitivnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
AA	64,5	81	34	62,2	82	30	52,9	75	21	67,6	88	47
AG	63,6	79	31	61,4	86	31	57,7	89	27	64,3	83	30
GG	52,9	84	26	68,8	84	27	53,3	74	28	60,9	90	40
Kruskal-Wallis test	$H = 7,26; p = 0,027$			$H = 0,18; p = 0,912$			$H = 0,33; p = 0,850$			$H = 0,54; p = 0,763$		
Pad negativnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
AA	37,7	80	33	37,2	89	47	28,9	73	13	37,9	88	55
AG	43,5	86	37	48,1	189	41	28,9	67	23	47,6	86	55
GG	36,4	96	29	44,0	92	42	28,2	72	22	44,4	80	47
Kruskal-Wallis test	$H = 3,88; p = 0,144$			$H = 1,85; p = 0,398$			$H = 0,15; p = 0,930$			$H = 0,12; p = 0,944$		
Pad općih psihopatoloških PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
AA	51,2	95	34	48,4	86	26	51,9	58	24	44,4	83	30
AG	55,9	93	25	56,8	86	30	45,4	74	23	56,3	87	28
GG	48,3	75	17	53,6	78	39	43,9	46	25	50,0	106	34
Kruskal-Wallis test	$H = 5,22; p = 0,074$			$H = 0,22; p = 0,897$			$H = 1,60; p = 0,449$			$H = 3,61; p = 0,164$		

Vrijednosti su prikazane kao medijan, raspon i interkvartilni raspon (IR).



Slika 7. Pad PANSS₀₋₆ bodova u shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom podijeljenih na nosioce alela A i homozigote GG s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*. a) ukupni PANSS₀₋₆ bodovi ($p = 0,006$); b) PANSS₀₋₆ bodovi koji se odnose na pozitivne simptome ($p = 0,007$); c) PANSS₀₋₆ bodovi koji se odnose na negativne simptome ($p = 0,064$); d) PANSS₀₋₆ bodovi koji se odnose na opće psihopatološke simptome ($p = 0,043$).

4.3. Polimorfizam rs4818

Raspodjela genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* u promatranom uzorku nalazila se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($\chi^2 = 0,52$; $p = 0,470$; $df = 1$). χ^2 -testom utvrđeno je da nema značajne razlike u frekvenciji pojedinih genotipova između muškaraca i žena ($\chi^2 = 0,08$; $p = 0,963$; $df = 2$). Rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u udjelu pojedinih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* između skupina ispitanika koji su bili na terapiji različitim antipsihoticima ($\chi^2 = 5,55$; $p = 0,476$; $df = 6$).

U Tablici 7 uspoređene su frekvencije genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* (CC/CG/GG) između pacijenata podijeljenih na one koji su imali dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom i one kod kojih nije došlo do odgovarajućeg poboljšanja simptoma nakon 8 tjedana primanja terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima. Rezultati su pokazali da niti u jednoj istraživanoj skupini nije bilo značajne razlike u distribuciji nosioca pojedinih genotipova s obzirom na spomenuti rs4818 polimorfizam između skupina pacijenata koje su pokazale dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom u odnosu na pacijente koji nisu pokazali željeno poboljšanje simptoma bolesti kada su se promatrali ukupni bodovi na ljestvici PANSS₀₋₆ te bodovi na podljestvicama PANSS₀₋₆ koji se odnose na pozitivne, negativne i opće psihopatološke simptome (Tablica 7). S obzirom na dobivene neznačajne rezultate, nije bilo potrebe ispitanike dalje dijeliti na nosioce specifičnih alela te pojedine homozigote.

Kruskal-Wallis ANOVA-om uspoređen je pad bodova na ljestvici PANSS₀₋₆ i pojedinim podljestvicama između nosioca određenih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* za svaku skupinu ispitanika, no ni tu nije uočena značajna razlika. Rezultati su prikazani u Tablici 8.

Tablica 7. Broj i udio genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* kod shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima podijeljenih na one koji su pokazali dobar odgovor na terapiju (R) i one koji nisu imali dobar odgovor na terapiju (NR) određenim antipsihotikom. Odgovor na terapiju definiran je kao 50 % pad broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici.

		Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
		CC	GC	GG	CC	GC	GG	CC	GC	GG	CC	GC	GG
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije	N	29	29	18	18	14	6	16	29	9	22	17	9
	R	(38,2)	(38,2)	(23,7)	(47,4)	(36,8)	(15,8)	(29,6)	(53,7)	(16,7)	(45,8)	(35,4)	(18,8)
	R	36	62	16	22	30	9	15	25	8	34	36	12
		$\chi^2 = 5,46; p = 0,065$			$\chi^2 = 1,56; p = 0,459$			$\chi^2 = 0,04; p = 0,983$			$\chi^2 = 0,97; p = 0,611$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	19	21	12	12	11	5	8	20	8	18	16	5
	R	(36,5)	(40,4)	(23,1)	(42,9)	(39,3)	(17,9)	(22,2)	(55,6)	(22,2)	(46,2)	(41,0)	(12,8)
	R	46	70	22	28	33	10	23	34	9	38	37	16
		$\chi^2 = 2,03; p = 0,362$			$\chi^2 = 0,48; p = 0,786$			$\chi^2 = 2,32; p = 0,313$			$\chi^2 = 0,51; p = 0,776$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	43	54	26	24	23	8	27	46	14	33	26	10
	R	(35,0)	(43,9)	(21,1)	(43,6)	(41,8)	(14,5)	(31,0)	(52,9)	(16,1)	(47,8)	(37,7)	(14,5)
	R	22	37	8	16	21	7	4	8	3	23	27	11
		$\chi^2 = 3,27; p = 0,195$			$\chi^2 = 0,54; p = 0,763$			$\chi^2 = 0,20; p = 0,906$			$\chi^2 = 1,37; p = 0,505$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	32	32	19	19	15	8	13	34	10	27	21	11
	R	(38,6)	(38,6)	(22,9)	(45,2)	(35,7)	(19,0)	(22,8)	(59,6)	(17,5)	(45,8)	(35,6)	(18,6)
	R	33	59	15	21	29	7	18	20	7	29	32	10
		$\chi^2 = 5,55; p = 0,062$			$\chi^2 = 2,40; p = 0,301$			$\chi^2 = 3,60; p = 0,165$			$\chi^2 = 1,31; p = 0,521$		

Frekvencije (%) su prikazane u zagradama.

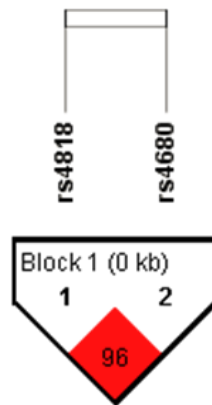
Tablica 8. Pad početnih PANSS₀₋₆ bodova (ukupnih i na podljesticama) izražen u postocima nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima kod shizofrenih pacijenata podijeljenih prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT*.

	Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
CC	53,9	83	32	56,5	79	32	49,5	59	27	55,5	84	32
CG	59,0	81	23	58,1	72	22	48,3	61	23	58,4	78	30
GG	49,5	60	16	62,3	76	47	45-1	53	26	63,9	71	37
Kruskal-Wallis test	$H = 5,32; p = 0,070$			$H = 0,07; p = 0,965$			$H = 0,01; p = 0,994$			$H = 1,94; p = 0,378$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
CC	62,1	82	33	61,9	84	30	52,2	75	25	64,6	90	35
CG	66,7	88	32	65,4	81	25	59,7	79	28	63,0	86	33
GG	53,4	79	25	68,8	84	40	51,6	74	27	77,8	85	41
Kruskal-Wallis test	$H = 4,44; p = 0,108$			$H = 0,03; p = 0,984$			$H = 1,27; p = 0,531$			$H = 2,25; p = 0,325$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
CC	38,9	86	34	39,4	89	43	28,6	73	12	42,1	88	49
CG	42,3	104	37	45,5	189	49	28,6	67	24	50,0	85	47
GG	36,1	79	28	47,1	92	48	34,8	72	24	50,0	72	52
Kruskal-Wallis test	$H = 1,93; p = 0,381$			$H = 0,62; p = 0,734$			$H = 1,56; p = 0,460$			$H = 1,37; p = 0,504$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT genotip												
CC	51,2	91	30	51,0	84	29	52,3	68	23	50,0	83	31
CG	55,9	93	26	57,7	86	26	43,7	66	25	53,7	87	28
GG	48,7	70	11	48,7	78	46	44,7	46	25	47,6	106	41
Kruskal-Wallis test	$H = 4,53; p = 0,104$			$H = 0,09; p = 0,957$			$H = 3,20; p = 0,202$			$H = 2,08; p = 0,354$		

Vrijednosti su prikazane kao medijan, raspon i interkvartilni raspon (IR).

4.4. Haplotipska analiza

Polimorfizmi gena *COMT*, rs4680 i rs4818, nalaze se u četvrtom eksonu i međusobno su udaljeni samo 64 bp. Iz toga se može pretpostaviti da se polimorfizmi u većini slučajeva nasljeđuju zajedno. Da između polimorfizama postoji neravnoteža udruživanja (LD, engl. *Linkage disequilibrium*) potvrđeno je programom Haploview v.4.2 ($D' = 0,96$; $LOD > 2$), a rezultati su prikazani na Slici 8. Istim programom izračunate su i frekvencije četiri moguća haplotipa (Tablica 9).



Slika 8. Prikaz analize neravnoteže udruživanja između polimorfizama gena *COMT*, rs4680 i rs4818, u shizofrenih pacijenata. Blokovi neravnoteže udruživanja (LD) označeni su trokutom. Vrijednosti u kvadratima predstavljaju vrijednosti LD-a između parova polimorfizama, a pojedini kvadrati su obojani prema standardnoj Haploview shemi: crvena boja, $LOD > 2$ i $D' = 1$ (LOD se odnosi na logaritamsku vrijednost omjera izgleda). Vrijednost LD ($D' \times 100$) izračunata je pomoću pravila o 4 gamete. Vrijednost D' koeficijenta (0,96) upućuje na visoku povezanost dvaju polimorfizama.

Tablica 9. Frekvencije haplotipova gena *COMT* u shizofrenih pacijenata, identificiranih programom Haploview.

Haplotip (rs4818-rs4680)	Frekvencija
C-A	0,499
G-G	0,369
C-G	0,124
G-A	0,008

Kako bi potvrdili značajnu povezanost između alela Met (A) polimorfizma rs4680 gena *COMT* i boljeg odgovora na terapiju u pacijenata koji su primali olanzapin, uspoređena je frekvencija nosioca C-A haplotipa naspram nosioca ostalih haplotipova u pacijenata podijeljenih na one koji su imali dobar odgovor na terapiju pojedinim antipsihotikom u odnosu na ispitanike kod kojih nije utvrđen željeni učinak terapije. Haplotip G-A se može zanemariti jer mu je učestalost manja od 1 % (0,8 %). Iz Tablice 10 može se iščitati da zaista postoji značajna razlika u odgovoru na terapiju olanzapinom kod pacijenata koji su bili nosioci haplotipa C-A naspram nosioca ostalih haplotipova kada se promatra 50 % pad na ukupnom broju bodova ljestvice PANSS₀₋₆ kao dobar odgovor na terapiju ($\chi^2 = 4,53$; $p = 0,033$) te kada se zasebno gleda poboljšanje na pojedinim podljestvicama PANSS₀₋₆ koje se odnose na pozitivne ($\chi^2 = 5,36$; $p = 0,021$) i negativne ($\chi^2 = 3,85$; $p = 0,050$) simptome bolesti. Razlike nisu utvrđene obzirom na poboljšanje općih psihopatoloških simptoma ($\chi^2 = 3,44$; $p = 0,064$). Međutim, značajne razlike ponovo su utvrđene samo kod skupine ispitanika koja je primala terapiju olanzapinom, ali ne i kod skupina koje su primale monoterapiju risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima (Tablica 10).

Uspoređujući frekvencije ispitanika nakon podjele na ispitanike koji su nosioci isključivo haplotipova C-A (C-A/C-A), ispitanike koji su nosioci haplotipa C-A u kombinaciji s nekim drugim haplotipom (C-A/*) te ispitanike koji nisu nosioci C-A haplotipa (**), značajna razlika pronađena je kod ispitanika podijeljenih na one kod kojih je došlo do značajnog poboljšanja PANSS₀₋₆ pozitivnih ($\chi^2 = 6,07$; $p = 0,048$) i općih psihopatoloških ($\chi^2 = 6,28$; $p = 0,043$) simptoma nakon terapije olanzapinom te PANSS₀₋₆ pozitivnih ($\chi^2 = 7,01$; $p = 0,030$) i općih psihopatoloških ($\chi^2 = 9,75$; $p = 0,008$) simptoma nakon terapije klozapinom (Tablica 11).

Tablica 10. Broj i udio haplotipova (nosioci C-A haplotipa napsram nosioca ostalih haplotipova) s obzirom na polimorfizme rs4680 i rs4818 gena *COMT* kod shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima podijeljenih na one koji su pokazali dobar odgovor na terapiju (R) i one koji nisu imali dobar odgovor na terapiju (NR) određenim antipsihotikom. Odgovor na terapiju definiran je kao 50 % pad broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici.

		Olanzapin <i>n</i> = 190		Risperidon <i>n</i> = 99		Klozapin <i>n</i> = 102		Ostali antipsihotici <i>n</i> = 130	
		Nosioci C-A	Ostali	Nosioci C-A	Ostali	Nosioci C-A	Ostali	Nosioci C-A	Ostali
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije	N	51	25	28	10	39	15	32	16
	R	(61,7)	(32,9)	(73,7)	(26,3)	(72,2)	(27,8)	(66,7)	(33,3)
	R	92	22	44	17	35	13	60	22
		(80,7)	(19,3)	(72,1)	(27,9)	(72,9)	(27,1)	(73,2)	(26,8)
		$\chi^2 = 4,53; p = 0,033$		$\chi^2 = 0,03; p = 0,866$		$\chi^2 = 0,01; p = 0,937$		$\chi^2 = 0,62; p = 0,431$	
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	33	19	21	7 (25,0)	24	12	26	13
	R	(63,5)	(36,5)	(75,0)		(66,7)	(33,3)	(66,7)	(33,3)
	R	110	28	51	20	50	16	66	25
		(79,7)	(20,3)	(71,8)	(28,2)	(75,8)	(24,2)	(72,5)	(27,5)
		$\chi^2 = 5,36; p = 0,021$		$\chi^2 = 0,11; p = 0,750$		$\chi^2 = 0,97; p = 0,326$		$\chi^2 = 0,45; p = 0,501$	
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	87	36	40	15	63	24	47	22
	R	(70,7)	(29,3)	(72,7)	(27,3)	(72,4)	(27,6)	(68,1)	(31,9)
	R	56	11	32	12	11	4	45	16
		(83,6)	(16,4)	(72,7)	(27,3)	(73,3)	(26,7)	(73,8)	(26,2)
		$\chi^2 = 3,85; p = 0,050$		$\chi^2 = 0,00; p = 1,000$		$\chi^2 = 0,01; p = 0,941$		$\chi^2 = 0,50; p = 0,479$	
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije	N	57	26	30	12	40	17	40	19
	R	(68,7)	(31,3)	(71,4)	(28,6)	(70,2)	(29,8)	(67,8)	(32,2)
	R	86	21	42	15	34	11	52	19
		(80,4)	(19,6)	(73,7)	(26,3)	(75,6)	(24,4)	(73,2)	(26,8)
		$\chi^2 = 3,44; p = 0,064$		$\chi^2 = 0,06; p = 0,803$		$\chi^2 = 0,37; p = 0,545$		$\chi^2 = 0,46; p = 0,497$	

Frekvencije su prikazane u zagradama (%).

Tablica 11. Broj i frekvencija genotipova *COMT* (rs4818-rs4680) kod shizofrenih pacijenata na terapiji olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima podijeljenih na one koji odgovaraju i ne odgovaraju na terapiju. Odgovor na terapiju definiran je 50 % padom bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici.

		Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
		C-A/C-A	C-A/*	*/*	C-A/C-A	CA/*	*/*	C-A/C-A	C-A/*	*/*	C-A/C-A	C-A/*	*/*
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije	NR	15 (19,7)	36 (47,4)	25 (32,9)	12 (31,6)	16 (42,1)	10 (26,3)	7 (13,0)	32 (59,3)	15 (27,8)	10 (20,8)	22 (45,8)	16 (33,3)
	R	24 (21,1)	68 (59,6)	22 (19,3)	13 (21,3)	31 (50,8)	17 (27,9)	13 (27,1)	22 (45,8)	13 (27,1)	17 (20,7)	43 (52,4)	22 (26,8)
		$\chi^2 = 4,70; p = 0,095$			$\chi^2 = 1,37; p = 0,503$			$\chi^2 = 3,45; p = 0,178$			$\chi^2 = 0,70; p = 0,704$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	11 (21,2)	22 (42,3)	19 (36,5)	8 (28,6)	13 (46,4)	7 (25,0)	2 (5,6)	22 (61,1)	12 (33,3)	7 (17,9)	19 (48,7)	13 (33,3)
	R	28 (20,3)	82 (59,4)	28 (20,3)	17 (23,9)	34 (47,9)	20 (28,2)	18 (27,3)	32 (48,5)	16 (24,2)	20 (22,0)	46 (50,5)	25 (27,5)
		$\chi^2 = 6,07; p = 0,048$			$\chi^2 = 0,25; p = 0,881$			$\chi^2 = 7,01; p = 0,030$			$\chi^2 = 0,55; p = 0,759$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	25 (20,3)	62 (50,4)	36 (29,3)	16 (29,1)	24 (43,6)	15 (27,3)	16 (18,4)	47 (54,0)	24 (27,6)	13 (18,8)	34 (49,3)	22 (31,9)
	R	14 (20,9)	42 (62,7)	11 (16,4)	9 (20,5)	23 (52,3)	12 (27,3)	4 (26,7)	7 (46,7)	4 (26,7)	14 (23,0)	31 (50,8)	16 (26,2)
		$\chi^2 = 4,10; p = 0,129$			$\chi^2 = 1,11; p = 0,575$			$\chi^2 = 0,53; p = 0,748$			$\chi^2 = 0,63; p = 0,729$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije	NR	20 (24,1)	37 (44,6)	26 (31,3)	12 (28,6)	18 (42,9)	12 (28,6)	5 (8,8)	35 (61,4)	17 (29,8)	14 (23,7)	26 (44,1)	19 (32,2)
	R	19 (17,8)	67 (62,6)	21 (19,6)	13 (22,8)	29 (50,9)	15 (26,3)	15 (33,3)	19 (42,2)	11 (24,4)	13 (18,3)	39 (54,9)	19 (26,8)
		$\chi^2 = 6,28; p = 0,043$			$\chi^2 = 0,69; p = 0,708$			$\chi^2 = 9,75; p = 0,008$			$\chi^2 = 1,54; p = 0,462$		

Frekvencije su prikazane u zagradama (%).

Nosioci C-A haplotipa također su imali veći pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova ($U = 2463,5$; $p = 0,006$) te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne ($U = 2474,0$; $p = 0,007$) i opće psihopatološke ($U = 2679,0$; $p = 0,037$) simptome naspram nosioca ostalih haplotipova kod pacijenata koji su primali terapiju olanzapinom. Rezultati su također pokazali da nema značajne razlike u padu broja bodova na ljestvici PANSS₀₋₆ i njezinim podljestvicama kod skupina pacijenata koji su bili na terapiji drugim antipsihoticima (Tablica 12). Kada su nosioci C-A haplotipa kombinirani kao nosioci genotipova C-A/C-A i C-A/* i uspoređeni s preostalim kombinacijama haplotipova (*/*), utvrđena je značajna povezanost genotipa C-A/* s boljim odgovorom na terapiju olanzapinom s obzirom na pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova ($H = 7,81$; $p = 0,020$) te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne ($H = 7,47$; $p = 0,024$) i opće psihopatološke ($H = 5,70$; $p = 0,058$) simptome (Tablica 13). S druge strane, kod ispitanika na terapiji klozapinom može se uočiti da bolesnici s genotipom C-A/C-A imaju značajno najveći pad PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na opće psihopatološke simptome ($H = 8,13$; $p = 0,017$). U preostalim skupinama nisu potvrđene značajne razlike u padu bodova s obzirom na genotip, odnosno kombinacije haplotipova (Tablica 13).

Tablica 12. Pad početnih PANSS₀₋₆ bodova (ukupnih i na podljestvicama) izražen u postocima nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima kod shizofrenih pacijenata podijeljenih na nosioce C-A haplotipa naspram nosioca ostalih haplotipova.

	Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
Nosioci C-A	57,7	86	26	57,3	83	30	49,5	66	23	57,9	85	32
Ostali	49,5	71	23	63,2	76	37	45,5	53	27	53,6	79	34
Mann-Whitney U test	$U = 2463,5; p = 0,006$			$U = 927,5; p = 0,727$			$U = 1016,5; p = 0,884$			$U = 1701,0; p = 0,810$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
Nosioci C-A	64,0	81	31	61,4	86	30	54,6	90	27	65,9	86	33
Ostali	52,9	84	26	68,8	84	27	53,3	74	28	58,3	90	40
Mann-Whitney U test	$U = 2474,0; p = 0,007$			$U = 943,0; p = 0,820$			$U = 984,5; p = 0,699$			$U = 1736,5; p = 0,953$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
Nosioci C-A	42,9	86	37	43,35	198	48	28,9	73	19	47,4	88	56
Ostali	36,4	96	31	44,0	92	42	28,2	72	22	44,2	80	46
Mann-Whitney U test	$U = 2747,0; p = 0,061$			$U = 900,0; p = 0,571$			$U = 988,0; p = 0,719$			$U = 1714,0; p = 0,862$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
Nosioci C-A	55,0	95	25	54,2	95	28	47,3	74	21	53,8	92	27
Ostali	48,3	75	19	53,6	78	39	43,9	46	25	49,5	106	35
Mann-Whitney U test	$U = 2679,0; p = 0,037$			$U = 950,0; p = 0,863$			$U = 1014,5; p = 0,872$			$U = 1621,0; p = 0,516$		

Vrijednosti su prikazane kao medijan, raspon i interkvartilni raspon (IR).

Tablica 13. Pad početnih PANSS₀₋₆ bodova (ukupnih i na podljestvicama) izražen u postocima nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima kod shizofrenih pacijenata podijeljenih na one koji su nosioci samo haplotipa C-A (C-A/C-A), ispitanike koji su nosioci haplotipa C-A u kombinaciji s nekim drugim haplotipom (C-A/*) te ispitanike koji nisu nosioci haplotipa C-A (*/*).

	Olanzapin n = 190			Risperidon n = 99			Klozapin n = 102			Ostali antipsihotici n = 130		
	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR	Medijan	Raspon	IR
Pad ukupnih PANSS ₀₋₆ bodova nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
C-A/C-A	55,4	83	33	56,1	79	31	52,5	55	17	55,6	83	32
C-A/*	58,2	81	23	58,0	72	29	46,7	66	24	58,2	84	33
/	49,5	71	23	63,2	76	37	45,5	53	27	53,6	79	34
Kruskal-Wallis test	$H = 7,81; p = 0,020$			$H = 0,13; p = 0,937$			$H = 3,08; p = 0,214$			$H = 0,23; p = 0,891$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova pozitivnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
C-A/C-A	64,0	81	36	63,2	80	30	56,4	75	24	68,8	79	45
C-A/*	65,4	79	31	61,3	86	31	52,0	89	28	63,2	86	31
/	52,9	84	26	68,8	84	27	53,3	74	28	58,3	90	40
Kruskal-Wallis test	$H = 7,47; p = 0,024$			$H = 0,05; p = 0,974$			$H = 1,02; p = 0,600$			$H = 0,14; p = 0,932$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova negativnih simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
C-A/C-A	43,5	80	34	38,7	89	45	28,9	73	14	50,0	88	56
C-A/*	42,6	86	37	46,2	189	41	28,9	67	22	47,1	86	55
/	36,4	96	31	44,0	92	42	28,2	72	22	44,2	80	46
Kruskal-Wallis test	$H = 3,55; p = 0,169$			$H = 1,09; p = 0,581$			$H = 0,35; p = 0,840$			$H = 0,08; p = 0,960$		
Pad PANSS ₀₋₆ bodova općih psihopatoloških simptoma nakon 8 tjedana terapije												
COMT haplotip												
C-A/C-A	48,7	91	37	50,0	84	26	55,8	58	17	48,1	83	31
C-A/*	55,6	93	25	56,0	86	31	43,7	74	24	55,6	87	28
/	48,3	75	19	53,6	78	39	43,9	46	25	49,5	106	35
Kruskal-Wallis test	$H = 5,70; p = 0,058$			$H = 0,03; p = 0,984$			$H = 8,13; p = 0,017$			$H = 1,85; p = 0,396$		

Vrijednosti su prikazane kao medijan, raspon i interkvartilni raspon (IR).

5. RASPRAVA

Ispitanici koji su primali terapiju klozapinom imali su pretežno veći broj bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici i podljestvicama od ispitanika koji su primali terapiju olanzapinom, risperidonom i ostalim antipsihoticima. Razlog tomu mogao bi biti u tome što se klozapin, zbog svoje učinkovitosti, obično prepisuje pacijentima s težim oblicima shizofrenije koji su otporni na terapiju drugim antipsihoticima (Warnez i Alessi-Severini 2014). Također, ispitanici koji su primali klozapin imali su značajno slabije poboljšanje negativnih simptoma, što začuđuje s obzirom da je procijenjena efikasnost klozapina protiv negativnih simptoma jednaka drugim atipičnim antipsihoticima (Asenjo Lobos i sur. 2010), te se klozapin vrlo često propisuje rezistentnim bolesnicima.

5.1. Polimorfizam rs4680 gena *COMT* i odgovor na terapiju antipsihoticima

Polimorfizam rs4680 gena *COMT* podrazumijeva zamjenu baze gvanin za adenin odnosno aminokiseline valin za metionin u kodonu 158 ili kodonu 108, ovisno o tome radi li se o izoformi MB-COMT ili S-COMT. Ova zamjena, uslijed smanjene termostabilnosti, rezultira 3-4 puta slabijom aktivnosti enzima COMT zbog čega se polimorfizam opisuje kao visoko funkcionalan (Lotta i sur. 1995). U našem uzorku, od 521 pacijenta s dijagnosticiranom shizofrenijom, genotipovi s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* (AA/CG/GG) bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži te nije utvrđena razlika u raspodjeli s obzirom na spol i skupine ispitanika koje su primale terapiju različitim antipsihoticima. Taj je nalaz omogućio da se bolesnici oba spola mogu uspoređivati kao jedna skupina bez podjele na muške i ženske ispitanike sa shizofrenijom.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na značajnu povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* i odgovora na terapiju olanzapinom, ali ne i na terapiju risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima (haloperidol, flufenazin i kvetiapin) nakon primjene u trajanju od 8 tjedana. Nosioci alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* bolje su reagirali na terapiju olanzapinom. Taj je nalaz potvrđen jer je pronađen veći udio nosioca alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u skupini koja je imala bolji terapijski odgovor, a nosioci alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* imali su značajno veći postotak pada bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici naspram homozigota Val/Val (GG). Iste analize korištene su i za procjenu poboljšanja simptoma nakon 8 tjedana terapije. Nosioci alela Met (A) pokazali su značajno poboljšanje pozitivnih i negativnih simptoma nakon 8 tjedana tijekom kojih su primili terapiju olanzapinom s obzirom na podjelu ispitanika prema

odgovoru na terapiju, te značajno poboljšanje pozitivnih simptoma s obzirom na postotak pada bodova odgovarajuće PANSS₀₋₆ podljestvice, naspram homozigota Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*. Logističkom regresijom i višestrukom linearnom regresijom potvrđeno je da spol, dob i pušenje nisu utjecali na dobivene rezultate. Kod općih psihopatoloških simptoma bio je vidljiv trend koji upućuje na bolji odgovor kod nosioca alela Met (A) nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, no rezultat nije bio značajan. S druge strane, nosioci alela Met (A) imali su značajno veći pad PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose opće psihopatološke simptome od homozigota Val/Val (GG) nakon 8 tjedana tijekom kojih su primali olanzapin, no značajnost se izgubila nakon korekcije za dob, spol i pušenje. Unatoč nedostatku značajnosti, smatramo da je polimorfizam rs4680 ipak povezan s poboljšanjem općih psihopatoloških simptoma, a učinak bi možda bio uočljiviji da smo koristili specijaliziraniji test za procjenu promjena kognitivnih sposobnosti. Uspoređen je i pad broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici između ispitanika podijeljenih prema terapiji i prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* bez grupacije različitih genotipova. Pronađena je značajna razlika u padu ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne simptome između nosioca pojedinih genotipova, a ona proizlazi iz značajnijeg pada broja bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici i pojedinim podljestvicama kod ispitanika koji su nosioci genotipa Met/Val (AG) u odnosu na homozigote Val/Val (GG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u pacijenata koji su primali olanzapin. To bi značilo da intermedijarna aktivnost enzima COMT i stopa razgradnje dopamina pogoduju boljem odgovoru na terapiju olanzapinom s obzirom da je efekt alela na fenotip aditivan. Takvi rezultati donekle se razlikuju od prijašnjih istraživanja koja pokazuju da genotip Met/Met (AA) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* ima značajno veće poboljšanje simptoma naspram ostalih genotipova (Bertolino i sur. 2004, Huang i sur. 2016), ali sve upućuje na to da je alel Met (A) povezan s boljim odgovorom na terapiju. Važno je istaknuti da primarna analiza nije pokazala značajnu razliku u raspodjeli genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u ispitanika podijeljenih na one koji su imali dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom i onih kod kojih nije došlo do odgovarajućeg poboljšanja simptoma nakon 8 tjedana primanja terapije olanzapinom, risperidonom, klopazinom ili ostalim antipsihoticima. Jedino kod skupine koja je primala terapiju olanzapinom bio je uočljiv trend koji je upućivao na to da ipak postoji razlika u udjelima genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* nakon podjele ispitanika prema odgovoru na terapiju. S obzirom na veći udio genotipova Met/Met (AA) i Met/Val (AG) u skupini ispitanika s boljim odgovorom na terapiju, u odnosu na homozigote Val/Val (GG),

odlučili smo podijeliti ispitanike na nosioce alela Met (A) i homozigote Val/Val (GG) s obzirom na spomenuti polimorfizam.

U sličnom istraživanju, Bertolino i sur. (2004) ispitali su učinak polimorfizma rs4680 na odgovor na terapiju olanzapinom kod 30 pacijenata s dijagnosticiranom shizofrenijom. Slično našim rezultatima, uočili su da nosioci alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* imaju značajno poboljšanje negativnih i općih psihopatoloških simptoma naspram homozigota GG. Dodatnim testovima ustanovili su da je poboljšanje općih psihopatoloških simptoma rezultat poboljšanja procesa radne memorije (Bertolino i sur. 2004). Unatoč razlikama u značajnosti rezultata pojedinih analiza, smatramo da ukupni rezultati našeg istraživanja i onog provedenog od strane Bertolina i sur. (2004) upućuju na to da bi polimorfizam rs4680 gena *COMT* mogao biti prediktivni marker boljeg odgovora pacijenata s dijagnosticiranom shizofrenijom u slučaju terapije olanzapinom. S druge strane, Pelayo-Teran i sur. (2011) nisu pronašli značajnu povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* i odgovora na terapiju olanzapinom. Glavne razlike između našeg i njihovog istraživanja su u veličini uzorka (55 ispitanika kod Pelayo-Teran i sur. naspram 190 ispitanika u našem istraživanju), trajanju terapije (6 tjedana kod Pelayo-Teran i sur. naspram 8 tjedana u našem istraživanju) i bodovnim ljestvicama za pozitivne ili negativne simptome korištenim za procjenu simptoma (SANS i SAPS ljestvice kod Pelayo-Teran i sur. naspram PANSS ljestvice u našem istraživanju). Smatramo da su to vjerojatni razlozi nepodudarnosti rezultata.

Negativni i opći psihopatološki simptomi vezani su uz slabiju dopaminergičku aktivnost u PFC-u (Slifstein i sur. 2015). Neka istraživanja su pokazala da gen *COMT* može utjecati na izraženost spomenutih simptoma (Molero i sur. 2007, Wright i sur. 2012) dok drugi nisu uspjeli ponoviti takve rezultate (Barnett i sur. 2008, Mata i sur. 2008, Tovilla-Zarate i sur. 2013). U slučaju polimorfizma rs4680 gena *COMT*, smatra se da nosioci alela Val (G), naročito homozigoti Val/Val (GG), mogu imati izraženije negativne simptome (Mao i sur. 2016, Wang i sur. 2010) i veći pad u kognitivnim funkcijama (Egan i sur. 2001, Mata i sur. 2006). U skladu s tim nalazima, pretpostavljeni farmakogenetički utjecaj gena *COMT* mogao bi biti rezultat kombiniranog utjecaja enzima COMT i antipsihotika na dopaminergičku aktivnost. Smanjena stopa degradacije dopamina kod nosioca alela Met (A) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* u PFC-u, zajedno sa antagonističkim djelovanjem antipsihotika prema dopaminskim receptorima, vraćaju dopamin bliže optimalnoj razini potrebnoj za normalno obavljanje funkcija PFC-a i tako dovode do ublažavanja ili potpunog povlačenja simptoma (Gupta i sur. 2011). Smanjena aktivnost enzima COMT u PFC-u

indirektno utječe i na smanjenje razine dopamina u subkortikalnim regijama (Howes i Kapur 2009) što bi moglo objasniti zašto je došlo i do značajnog poboljšanja pozitivnih simptoma kod nosioca alela Met (A) s obzirom na polimorfizma rs4680 gena *COMT* kod pacijenata nakon 8 tjedana primanja terapije olanzapinom.

Sukladno istraživanjima koja nisu pronašla značajnu povezanost polimorfizama gena *COMT* i odgovora na terapiju klozapinom (Illi i sur. 2007), risperidonom (Yamanouchi i sur. 2003, Pelayo-Teran i sur. 2011) i haloperidolom (Pelayo-Teran i sur. 2011), niti naše istraživanje nije ustanovilo značajnu povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* i odgovora na terapiju risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima. Nije u potpunosti jasno zašto je u ovom istraživanju primijećen farmakogenetički utjecaj polimorfizma rs4680 u kombinaciji s olanzapinom, ali ne i kod drugih antipsihotika, s obzirom na to da postoje istraživanja koja povezuju polimorfizam rs4680 gena *COMT* s boljim odgovorom na terapiju risperidonom, klozapinom i kvetiapiinom (Gao i sur. 2012, Han i sur. 2017, Woodward i sur. 2006). Nagađa se da bi se te razlike mogle objasniti s mlađom dobi ispitanika koji su primali terapiju olanzapinom, od ispitanika drugih skupina, te razlikama u brojnosti ispitanika između skupina koje su primale različite tipove antipsihotika. Velika količina oprečnih rezultata u istraživanjima o farmakogenetičkom djelovanju gena *COMT* mogla bi biti posljedica slabe statističke značajnosti pojedinih istraživanja zbog uključenih malih uzoraka, razlika u metodološkom dizajnu, ali i velikih etničkih razlika između ispitivanih skupina (Huang i sur. 2016).

5.2. Polimorfizam rs4818 gena *COMT* i odgovor na terapiju antipsihoticima

Sinonimni polimorfizam rs4818 gena *COMT* podrazumijeva zamjenu baze citozin za gvanin u kodonu 136 (MB-COMT). Iako ne dolazi do promjene u slijedu aminokiselina, smatra se da polimorfizam rs4818 mijenja sekundarnu strukturu molekule mRNA te posljedično ekspresiju gena i aktivnost enzima COMT (Nackely i sur. 2006). U našem su uzorku udijeli genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* (CC/CG/GG) bili u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, te nije bilo razlike u raspodjeli s obzirom na spol i skupine ispitanika koji su bili na terapiji različitim antipsihoticima. Rezultati ovog rada upućuju na to da polimorfizam rs4818 gena *COMT* nije povezan s odgovorom na terapiju olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima u trajanju od 8 tjedana. Niti u jednoj ispitivanoj skupini nije utvrđena značajna razlika u distribuciji nosioca pojedinih genotipova s obzirom na spomenuti polimorfizam između skupina pacijenata koje su pokazale dobar odgovor na terapiju

određenim antipsihotikom u odnosu na pacijente koji nisu pokazali željeno poboljšanje simptoma bolesti, kada su se promatrali ukupni bodovi na ljestvici PANSS₀₋₆ te bodovi na podljestvicama PANSS₀₋₆ koji se odnose na pozitivne, negativne i opće psihopatološke simptome. Tome u prilog ide i činjenica da između nosioca određenih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* za svaku skupinu ispitanika, nije bilo značajne razlike u padu ukupnih bodova PANSS₀₋₆ ljestvice te padu bodova na pojedinim podljestvicama. Prema našim saznanjima, ovo je prvo ovakvo istraživanje koje uključuje polimorfizam rs4818 na ispitanicima europskog podrijetla. Do danas je povezanost polimorfizma rs4818 gena *COMT* i odgovora na terapiju antipsihoticima kod pacijenata s dijagnosticiranom shizofrenijom još uvijek slabo istražena. Pretraživanjem literature pronađena su dva usporediva istraživanja koja su provedena na kineskoj Han populaciji. Xu i suradnici (2016) su, između ostalog, proveli istraživanje o povezanosti polimorfizma rs4818 i odgovora na terapiju risperidonom, klopazinom, kvetiapiinom i klorpromazinom. Slično našim rezultatima, nije primijećena povezanost spomenutog polimorfizma i odgovora na terapiju risperidonom i klopazinom. Kod kineskih ispitanika koji su primali kvetiapin uočen je značajno veći udio homozigota CC i heterozigota CG s obzirom na polimorfizam rs4818 u skupini koja je imala dobar odgovor na terapiju (Xu i sur. 2016). Broj ispitanika u našem istraživanju koji su primali kvetiapin bio je premalen da bi činio zasebnu skupinu s toga je nemoguće procijeniti da li je postojala povezanost polimorfizma rs4818 gena *COMT* i odgovora na terapiju nakon 8 tjedana. Naše istraživanje i ono provedeno od strane Xu i suradnika (2016) razlikovalo se u veličini uzorka i dozama propisanih antipsihotika, ali većina ostalih parametara bila je ista; dobar odgovor na terapiju definiran padom bodova PANSS₀₋₆ ljestvice za 50 % ili više, trajanje terapije od 8 tjedana te kriteriji za uključivanje pacijenata u istraživanje. Godinu dana kasnije, ista skupina provela je istraživanje o genetičkim markerima dobrog odgovora na terapiju risperidonom na većem uzorku te su uočili da postoji značajno veći udio nosioca alela C s obzirom na polimorfizam rs4818 gena *COMT* u skupini pacijenata koji su pokazali dobar odgovor na terapiju (Shi i sur. 2017). Autori smatraju da je nepodudarnost u rezultatima barem dijelom uzrokovana razlikom u veličini uzorka, smanjenjem terapije sa 8 na 4 tjedana te različitim kriterijima na temelju kojih se vršio odabir terapije (Shi i sur. 2017). S obzirom na mali broj provedenih istraživanja i oprečne rezultate nemoguće je sa sigurnošću procijeniti povezanost polimorfizma rs4818 gena *COMT* i odgovora na terapiju antipsihoticima kod pacijenata s dijagnosticiranom shizofrenijom. Radi toga te rezultate treba potvrditi ili opovrgnuti s budućim istraživanjima koje će uključiti veći broj ispitanika.

5.3. Haplotipska analiza

Programom Haploview potvrđeno je da se polimorfizmi rs4680 i rs4818 gena *COMT* nalaze u LD-u, sukladno rezultatima istraživanja Hoenicka i suradnika (2009) te Gupte i suradnika (2009). Od dva moguća haplotipa koji sadrže alel od interesa (alel Met ili A s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*), samo je haplotip C-A zastupljen u više od 1 % našeg uzorka. Pokazano je da postoji značajno veći udio nosioca haplotipa C-A u skupini koja je imala dobar odgovor na terapiju olanzapinom u trajanju od 8 tjedana, naspram nosioca ostalih haplotipova, s obzirom na ukupan broj PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne i negativne simptome. Daljnjom podjelom prema kombinaciji haplotipova prisutnih kod ispitanika pokazalo se da su nosioci haplotipa C-A u kombinaciji s nekim drugim haplotipom (C-A/*) ti koji imaju najveću učestalost boljeg odgovora na terapiju olanzapinom, ali i klopazinom s obzirom na PANSS₀₋₆ bodove koji se odnose na pozitivne i opće psihopatološke simptome. Ovakvi rezultati u skladu su s prethodnim rezultatima našeg istraživanja koji pokazuju da nosioci genotipa Met/Val (AG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* imaju bolji odgovor na terapiju olanzapinom naspram nosioca ostalih genotipova. Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje se bavilo utjecajem haplotipova s obzirom na polimorfizme rs4818 i rs4680 gena *COMT* na odgovor na terapiju olanzapinom kod pacijenata s dijagnosticiranom shizofrenijom. Gupta i suradnici (2009) su na skupini tretiranoj risperidonom isto pokazali da haplotipovi s obzirom na polimorfizme rs4818 i rs4680 gena *COMT* mogu utjecati na odgovor na terapiju antipsihoticima. Slično našim rezultatima s olanzapinom, identificirali su nosioce haplotipa C-A kao skupinu koja ima najveću učestalost dobrog odgovora na terapiju risperidonom (Gupta i sur. 2009). Međutim, u našem istraživanju nije bilo značajne razlike u odgovoru nosioca haplotipa C-A nakon 8 tjedana primanja terapije risperidonom, kao ni terapije klopazinom i ostalim antipsihoticima, naspram nosioca ostalih haplotipova, kod ispitanika podijeljenih na one koji su imali dobar odgovor na terapiju pojedinim antipsihotikom u odnosu na ispitanike kod kojih nije utvrđen željeni učinak terapije. Prednost nosioca haplotipa C-A, naspram nosioca drugih haplotipova u skupini koja je primala terapiju olanzapinom, vidljiva je i s obzirom na značajno veći pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne i opće psihopatološke simptome. Također, potvrđena je značajna povezanost genotipa C-A/* s boljim odgovorom na terapiju olanzapinom s obzirom na pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne i opće psihopatološke simptome. U većini preostalih skupina nije bilo značajne razlike u padu bodova s obzirom na genotip, odnosno

kombinacije haplotipova, osim kod klozapina gdje je uočeno da bolesnici s genotipom C-A/C-A imaju značajno najveći pad PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na opće psihopatološke simptome. Rezultati koji su dobiveni u skupini koja je primala terapiju klozapinom mogli bi upućivati na to da interakcija polimorfizama rs4818 i rs4680 gena *COMT* može imati utjecaj na odgovor na terapiju klozapinom, iako zasebne analize navedenih polimorfizama nisu ponudile značajne rezultate. Za donošenje ovakvog zaključka trebala bi se provesti dodatna istraživanja s većim uzorkom pacijenata koji bi primali samo klozapin.

Rezultati dobiveni analizom haplotipova potvrđuju da postoji povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* i odgovora na terapiju olanzapinom te da nosioci alela Met (A) imaju značajno bolji odgovor naspram homozigota Val/Val (GG).

6. ZAKLJUČAK

- Nema značajne razlike u raspodjeli genotipova s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* između ispitanika koji su imali dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom i onih kod kojih nije bilo odgovarajućeg poboljšanja simptoma nakon terapije olanzapinom, risperidonom, klozapinom ili ostalim antipsihoticima. Nakon podjele ispitanika na nosioce alela Met (A) i homozigote Val/Val (GG), uočeno je da nosioci alela Met (A) čine veći udio u skupini pacijenata koja je pokazala dobar odgovor na terapiju olanzapinom kada se promatraju ukupni PANSS₀₋₆ bodovi te pozitivni i negativni simptomi.
- Nosioci genotipa Met/Val (AG) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* imaju veći pad bodova na ukupnoj PANSS₀₋₆ ljestvici te podljestvici PANSS₀₋₆ koja se odnosi na pozitivne simptome, naspram nosioca ostalih genotipova, nakon 8 tjedana terapije olanzapinom. Nosioci alela Met (A) imaju veći pad bodova na ukupnoj PANSS₀₋₆ ljestvici te PANSS₀₋₆ podljestvicama koje se odnose na pozitivne i opće psihopatološke simptome nakon 8 tjedana terapije olanzapinom, naspram homozigota Val/Val (GG).
- Utvrđeno je da polimorfizam rs4818 gena *COMT* nije povezan s odgovorom na terapiju olanzapinom, risperidonom, klozapinom i ostalim antipsihoticima s obzirom da nema značajne razlike u raspodjeli genotipova kod ispitanika podijeljenih na one koji imaju dobar odgovor na terapiju određenim antipsihotikom i onih kod kojih nema odgovarajućeg poboljšanja simptoma. Također, nije potvrđena niti značajna razlika u padu bodova na PANSS₀₋₆ ljestvici i podljestvicama kod ispitanika podijeljenih prema rs4818 genotipu.
- Nosioci haplotipa C-A čine veći udio u skupini koja ima bolji odgovor na terapiju olanzapinom, a rezultat je značajan kada se gleda 50 % pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te bodova koji se odnose na pozitivne i negativne simptome. U skupinama koje imaju bolji odgovor na terapiju olanzapinom i klozapinom pronađen je značajno veći udio nosioca genotipa C-A/* naspram nosioca ostalih genotipova, kada se gleda utjecaj terapije na pozitivne i negativne simptome bolesti.
- Nosioci C-A haplotipa imaju veći pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne i negativne simptome bolesti u odnosu na nosioce ostalih haplotipova. Nosioci genotipa C-A/* imaju značajno veći pad ukupnih PANSS₀₋₆ bodova te PANSS₀₋₆ bodova koji se odnose na pozitivne i opće psihopatološke simptome terapije olanzapinom, dok nosioci genotipa C-A/C-A imaju značajno veći pad PANSS₀₋₆ bodova

koji se odnose na opće psihopatološke simptome nakon terapije klozapinom, u usporedbi s nosiocima ostalih genotipova.

7. LITERATURA

- Abi-Dargham A. (2003): Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us? *World Psychiatry* **2**(3): 166-171.
- Akil M., Kolachana B. S., Rothmond D. A., Hyde T. M., Weinberger D. R., Kleinman J. E. (2003): Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *J Neurosci* **23**(6): 2008-2013.
- Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht, S. (2010): Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* (11): CD006633.
- Ashok A. H., Marques T. R., Jauhar S., Nour M. M., Goodwin G. M., Young A. H., Howes O. (2017): The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. *Mol Psychiatry* **22**(5): 666-679.
- Axelrod J., Tomchick R. (1958): Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J Biol Chem* **233**: 702-705.
- Barnett J. H., Scoriels L., Munafò M. R. (2008): Meta-analysis of the cognitive effects of the catechol-O-methyltransferase gene Val158/108Met polymorphism. *Biol Psychiatry* **64**(2): 137-44.
- Berthet A., Bezard E. (2009): Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism Relat Disord* **15**(4): 8-12.
- Bertolino A., Caforio G., Blasi G., De Candia M., Weinberger D.R., Nardini M. (2004): Interaction of COMT (Val(108/158)Met) genotype and olanzapine treatment on prefrontal cortical function in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* **161**(10): 1798-1805.
- Bilder R. M., Volavka J., Lachman H. M., Grace A. A. (2004): The catechol-O-methyltransferase polymorphism: relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacology* **29**(11): 1943-1961.
- Bowie C. R., Harvey P. D. (2006): Cognitive deficits and functional outcome in schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat* **2**(4): 531-536.
- Brown A. S. (2011): The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol* **93**(1): 23-58.
- Brown A. S., Gershon S. (1993): Dopamine and depression. *J Neural Transm Gen Sect* **91**(2-3): 75-109.

- Carlsson A. (1971): Basic concepts underlying recent developments in the field of Parkinson's disease. *Contemp Neurol Series* **8**: 1-31.
- Carlsson A. (1977): Does dopamine play a role in schizophrenia? *Psychol Med* **7**: 583-597.
- Chinta S. J., Andersen J. K. (2005): Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 942-946.
- Conley R. R., Kelly D. L. (2005): Second generation antipsychotics for schizophrenia: a review of clinical pharmacology and medication-associated side effects. *J Psychiatr Relat Sci* **42**: 51-60.
- Diana M. (2011): The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry* **2**: 64.
- Egan M. F., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Callicott J. H., Mazzanti C. M., Straub R. E., Goldman D., Weinberger D. R. (2001): Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6917-6922.
- Elsworth J. D., Roth R. H. (1997): Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **144**(1): 4-9.
- Eum S., Lee A. M., Bishop J. R. (2016): Pharmacogenetic tests for antipsychotic medications: clinical implications and considerations. *Dialogues Clin Neurosci* **18**(3): 323-337.
- First M. B., Spitzer R. L., Williams J. B. W., Gibbons M. (1995): Structured clinical interview for DSM-IV-patient edition (SCID-P). American Psychiatric, Washington DC
- Frydecka D., Beszlej J.A., Gościmski P., Kiejna A., Misiak B. (2016): Profiling cognitive impairment in treatment-resistant schizophrenia patients. *Psychiatry Res* **235**: 133-138.
- Gao S., Hu Z., Cheng J., Zhou W., Xu Y., Xie S., Liu S., Li Z., Guo J., Dong J., Huang M. (2012): Impact of catechol-o-methyltransferase polymorphisms on risperidone treatment for schizophrenia and its potential clinical significance. *Clin Biochem* **45**(10-11): 787-792.
- Gatt J. M., Burton K. L., Williams L. M., Schofield P. R. (2015): Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J Psychiatr Res* **60**: 1-13.

- Grace A. A. (2000): The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* **95**(2): 119-128.
- Gupta M., Bhatnagar P., Grover S., Kaur H., Baghel R., Bhasin Y., Chauhan C., Verma B.,... Kukreti R. (2009): Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics* **10**: 385-397.
- Gupta M., Kaur H., Jajodia A., Jain S., Satyamoorthy K., Mukerji M., Thirthalli J; Indian Genome Variation Consortium, Kukreti R. (2011): Diverse facets of COMT: from a plausible predictive marker to a potential drug target for schizophrenia. *Curr Mol Med* **11**(9): 732-43.
- Han J., Li Y., Wang X. (2017): Potential link between genetic polymorphisms of catechol-O-methyltransferase and dopamine receptors and treatment efficacy of risperidone on schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat* **13**: 2935-2943.
- Hoenicka J., Garrido E., Ponce G., Rodríguez-Jiménez R., Martínez I., Rubio G., Jiménez-Arriero M. A., Palomo T. (2010): Sexually dimorphic interaction between the DRD1 and COMT genes in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(4): 948-54.
- Howes O. D., Kapur S. (2009): The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull* **35**(3): 549-562.
- Howes O., McCutcheon R., Stone J. (2015): Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol* **29**(2): 97-115.
- Howes O., Williams M., Ibrahim K., Leung G., Egerton A., McGuire P. K., Turkheimer F. (2013): Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: a post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain* **136**(11): 3242-3251.
- Huang E., Zai C. C., Lisoway A., Maciukiewicz M., Felsky D., Tiwari A.K., Bishop J.R., Pelayo-Terán J.M., Kaur H., Kukreti R., Meltzer H.Y., Lieberman J.A., Potkin S.G., Müller D. J., Kennedy J. L. (2016): Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical response to antipsychotic treatment in schizophrenia and schizo-affective disorder patients: a meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol* **19**(5): pyv132.

- Illi A., Kampman O., Hänninen K., Anttila S., Mattila K. M., Katila H., Rontu R., Hurme M., Lehtimäki T., Leinonen E. (2007): Catechol-O-methyltransferase val108/158met genotype and response to antipsychotic medication in schizophrenia. *Hum Psychopharmacol* **22**(4): 211-215.
- Iqbal M. M., Rahman A., Husain Z., Mahmud S. Z., Ryan W. G., Feldman J. M. (2003): Clozapine: a clinical review of adverse effects and management. *Ann Clin Psychiatry* **15**(1): 33-48.
- Jablensky A., Sartorius N., Ernberg G., Anker M., Korten A., Cooper J. E., Day R., Bertelsen A. (1992): Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study. *Psychol Med Monogr Suppl* **20**: 1-97.
- Jafari S., Fernandez-Enright F., Huang X. F. (2012): Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects. *J Neurochem* **120**(3): 371-384.
- Jeffery D. R., Roth J.A. (1984): Characterization of membrane-bound and soluble catechol-O-methyltransferase from human frontal cortex. *J Neurochem* **42**: 826-832.
- Jeon S. W., Kim Y.-K. (2017): Unresolved issues for utilization of atypical antipsychotics in schizophrenia: antipsychotic polypharmacy and metabolic syndrome. *Int J Mol Sci* **18**(10): 2174.
- Joober R., Gauthier J., Lal S., Bloom D., Lalonde P., Rouleau G., Benkelfat C., Labelle A. (2002): Catechol-O-methyltransferase Val-108/158-Met gene variants associated with performance on the Wisconsin Card Sorting Test. *Arch Gen Psychiatry* **59**(7): 662-663.
- Kaalund S. S., Newburn E. N., Ye T., Tao R., Li C., Deep-Soboslay A., Herman M. M., Hyde T. M., Weinberger D. R., Lipska B. K., Kleinman J. E. (2014): Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. *Mol Psychiatry* **19**(12): 1258-66.
- Kane J., Honigfeld G., Singer J., Meltzer H. (1988): Clozapine for the treatment resistant schizophrenics: A double blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* **45**: 789-796.

- Kuroki T., Meltzer H. Y., Ichikawa J. (1999): Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* **288**(2): 774-781.
- Leucht S., Davis J. M., Engel R. R., Kane J. M., Wagenpfeil S. (2007): Defining 'response' in antipsychotic drug trials: recommendations for the use of scale-derived cutoffs. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1903-1910.
- Li T., Yu S., Du J., Chen H., Jiang H., Xu K., Fu Y., Wang D., Zhao M. (2011): Role of novelty seeking personality traits as mediator of the association between COMT and onset age of drug use in Chinese heroin dependent patients. *PloS One* **6**: e22923.
- Li W. J., Kou C. G., Yu Y., Sun S., Zhang X., Kosten T. R., Zhang X. Y. (2012): Association of catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms with schizophrenia and negative symptoms in a Chinese population. *Am J of Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **0**(4): 370-375.
- Lieberman J. A., Stroup T. S., McEvoy J. P., Swartz M. S., Rosenheck R. A., Perkins D. O., Keefe R. S., Davis S. M., Davis C. E., Lebowitz B. D. (2005): Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* **353**: 1209-1223.
- Lotta T., Vidgren J., Tilgmann C., Ulmanen I., Melen K., Julkunen I., Taskinen J. (1995): Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* **34**: 4202-4210.
- Lyon G. J., Abi-Dargham A., Moore H., Lieberman J. A., Javitch J. A., Sulzer D. (2011): Presynaptic regulation of dopamine transmission in schizophrenia. *Schizophr Bull* **37**(1): 108-117.
- Mao Q., Tan Y. L., Luo X. G., Tian L., Wang Z. R., Tan S. P., Chen S., Yang G. G., An H. M., Yang F. D., Zhang X. Y. (2016): Association of catechol-O-methyltransferase Val(108/158) Met genetic polymorphism with schizophrenia, P50 sensory gating, and negative symptoms in a Chinese population. *Psychiatry Res* **242**: 271-276.
- Marsden C. A. (2006): Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol* **147**(1): 136-144.
- Mata I., Arranz M. J., Staddon S., Lopez-Illundain J. M., Tabares-Seisdedos R., Murray R. M. (2006): The high-activity Val allele of the catechol-O-methyltransferase

gene predicts greater cognitive deterioration in patients with psychosis. *Psychiatr Genet* **16**: 213-216.

- Mata I., Perez-Iglesias R., Pelayo-Teran J.M., Rodríguez Sanchez J. M., Gonzalez Blanch C., Carrasco-Marin E., Vazquez-Barquero J. L., Crespo-Facorro B. (2008): Lack of influence of COMT Val158Met genotype on cognition in first-episode non-affective psychosis. *Schizophr Res* **102**: 206-209.
- Matsuzaka C. T., Christofolini D., Ota V. K., Gadelha A., Berberian A. A., Noto C., Mazzotti D. R., Spindola L. M., Moretti P. N., Smith M. A. C., Melaragno M. I., Belangero S. I., Bressan R. A. (2017): Catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms modulate working memory in individuals with schizophrenia and healthy controls. *Rev Bras Psiquiatr* **39**(4): 302-308
- Meiser J., Weindl D., Hiller K. (2013): Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* **11**: 34.
- Meltzer H. Y., Matsubara S., Lee J. C. (1989): Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* **251**(1): 238-246.
- Miller J. D., Sanghera M. K., German D. C. (1981): Mesencephalic dopaminergic unit activity in the behaviorally conditioned rat. *Life Sci* **29**: 1255-1263.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky, H. F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**(3): 1215.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G. (1998): Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**(1): 189-225.
- Molero P., Ortuño F., Zalacain M., Patiño-García A. (2007): Clinical involvement of catechol-O-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders: influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment. *Pharmacogenomics J* **7**(6): 418-26.
- Nackley A. G., Shabalina S. A., Tchivileva I. E., Satterfield K., Korchynskyi O., Makarov S. S., Maixner W., Diatchenko L. (2006): Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* **314**: 1930-1933.
- Nikolac M., Sagud M., Nedic G., Nenadic Svirgin K., Mihaljevic Peles A., Uzun S., Vuskan Cusa B., Kozumplik O., Zivkovic M., Mustapic M., Jakovljevic M., Pavlovic M., Muck-Seler D., Borovecki F., Pivac N. (2013): The lack of association between

catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and smoking in schizophrenia and alcohol dependence. Letter to the Editor. *Psychiatry Res* **205**: 179-180.

- Ogino S., Miyamoto S., Miyake N., Yamaguchi N. (2014): Benefits and limits of anticholinergic use in schizophrenia: Focusing on its effect on cognitive function. *Psychiatry Clin Neurosci* **68**: 37-49.
- Palmatier M. A., Kang A. M., Kidd K. K. (1999): Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry* **46**(4): 557-567.
- Patel K. R., Cherian J., Gohil K., Atkinson D. (2014): Schizophrenia: overview and treatment Options. *Pharmacol Ther* **39**(9): 638-645.
- Pelayo-Terán J. M., Pérez-Iglesias R., Vázquez-Bourgon J., Mata I., Carrasco-Marín E., Vázquez-Barquero J. L., Crespo-Facorro B. (2011): Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and negative symptoms after acute antipsychotic treatment in first-episode non-affective psychosis. *Psychiatry Res* **185**(1-2): 286-9.
- Penadés R., Pérez-García H., González-Rodríguez A., Catalán R., Bernardo M. (2016): Treating cognition in schizophrenia: searching for the best evidence-based practices. *Evid based Psychiatric Care* pp 80-84.
- Reuter M., Küpper Y., Schmitz A., Breuer J.P., Wend U., Hennig J. (2005): Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. *J Genet* **84**(3): 341-5.
- Roussos P., Giakoumaki S. G., Pavlakis S, Bitsios P. (2008): Planning, decision-making and the COMT rs4818 polymorphism in healthy males. *Neuropsychologia* **46**: 757-763.
- Rutherford K.J., Alphantery E., McMillan A., Dagget V., Parson W.W. (2008): The V108M mutation decreases the structural stability of catechol-O-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1784**(7-8): 1098-1105.
- Sasaki M., Kaneuchi M., Sakuragi N., Dahiya R. (2003): Multiple promoters of catechol-O-methyltransferase gene are selectively inactivated by CpG hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res* **63**(12): 3101-3106.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C. (2014): Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**: 421-7.

- Schmidt M. J., Mirnics K. (2015): Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **40**(1): 190-206.
- Seeman P., Lee T., Chau-Wong M., Wong K. (1976): Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* **261**: 717-719.
- Sesack S. R., Hawrylak V. A., Matus C., Guido M. A., Levey A. I. (1998): Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* **18**: 2697–2708.
- Shi Y., Li M., Song C., Xu Q., Huo R., Shen L., ... Qin S. (2017): Combined study of genetic and epigenetic biomarker risperidone treatment efficacy in Chinese Han schizophrenia patients. *Transl Psychiatry* **7**(7): e1170.
- Shield A. J., Thomae B. A., Eckloff B. W., Wieben E. D., Weinshilboum R. M. (2004): Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol Psychiatry* **9**: 151-160.
- Slifstein M., Van de Giessen E., Van Snellenberg J., Thompson J. L., Narendran R., Gil R., ... Abi-Dargham A. (2015): Deficits in prefrontal cortical and extra-striatal dopamine release in schizophrenia: a PET fMRI study. *JAMA Psychiatry* **72**(4): 316-324.
- Sullivan P. F., Kendler K. S., Neale M. C. (2003): Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* **60**(12): 1187-92.
- Tenhunen J., Salminen M., Lundström K., Kiviluoto T., Savolainen R., Ulmanen I. (1994): Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* **223**(3): 1049-59.
- Terzić T., Kastelic M., Dolžan V., Plesničar B. K. (2016): Genetic polymorphisms in dopaminergic system and treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatr Danub* **28**(2): 127-31.
- Tovilla-Zárate C., Medellín B. C., Fresán A., López-Narváez L., Castro T. B. G., Juárez Rojop I., ... Nicolini H. (2013): No association between catechol-o-methyltransferase Val108/158Met polymorphism and schizophrenia or its clinical symptomatology in a Mexican population. *Mol Biol Rep* **40**(2): 2053-2058.

- Trantham-Davidson H., Neely L. C., Lavin A., Seamans J. K. (2004): Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* **24**(47): 10652-10659.
- Tunbridge E. M., Harrison P.J., Weinberger D.R. (2006): Catechol-O-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biol Psychiatry* **60**(2): 141-151.
- Tylec A., Jeleniewicz W., Mortimer A., Bednarska-Makaruk M., Kucharska K. (2017): Interaction between Val158Met catechol-O-methyltransferase polymorphism and social cognitive functioning in schizophrenia: pilot study. *Ann Hum Genet* **81**(6): 267-275.
- Van L., Boot E., Bassett A. S. (2017): Update on the 22q11.2 deletion syndrome and its relevance to schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* **30**(3): 191-196.
- Wang Y., Fang Y., Shen Y., Xu Q. (2010): Analysis of association between the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and negative symptoms in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res* **179**(2): 147-50.
- Warnez S., Alessi-Severini S. (2014): Clozapine: a review of clinical practice guidelines and prescribing trends. *BMC Psychiatry* **14**: 102.
- Winton-Brown T., Fusar-Poli P., Ungless M., Howes O. (2014): Dopaminergic basis of salience dysregulation in psychosis. *Trends Neurosci* **37**: 85-94.
- Woodward N. D., Jayathilake K., Meltzer H.Y. (2007): COMT val108/158met genotype, cognitive function, and cognitive improvement with clozapine in schizophrenia. *Schizophr Res* **90**(1-3): 86-96.
- Wright G. E., Niehaus D. J., van der Merwe L., Koen L., Korkie L. J., Kinnear C. J., Drögemöller B. I., Warnich L. (2012): Association of MB-COMT polymorphisms with schizophrenia-susceptibility and symptom severity in an African cohort. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **39**(1): 163-9.
- Xavier R. M., Vorderstrasse A. (2017): Genetic basis of positive and negative symptom domains in schizophrenia. *Biol Res Nurs* **19**(5): 559-575.
- Xu Q., Wu X., Li M., Huang H., Minica C., Yi Z., Wang G., Shen L., Xing Q., Shi Y., He L., Qin S. (2016): Association studies of genomic variants with treatment response to risperidone, clozapine, quetiapine and chlorpromazine in the Chinese Han population. *Pharmacogenomics J* **16**(4): 357-365.

- Yamanouchi Y., Iwata N., Suzuki T., Kitajima T., Ikeda M., Ozaki N. (2003): Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone. *Pharmacogenomics J* **3**(6): 356-61.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- <https://www.neupsykey.com/functional-neuroanatomy-of-the-basal-ganglia/>
- <https://www.szgene.org/>

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Anja Barić

Datum i mjesto rođenja: 24. rujna 1993., Zagreb

Državljanstvo: Hrvatsko

e-mail: anja2499@gmail.com

OBRAZOVANJE

2015 – 2018 Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu

2013 SCK•CEN ljetna škola radiobiologije, Belgijski nuklearni istraživački centar,
Mol

2012 – 2015 Preddiplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno–matematički
fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2008 – 2012 XV. Gimnazija, Zagreb

KONFERENCIJE

2017 Mini-simpozij „Europski certificirani farmakolog – EuCP program“

2016 4. Kongres Hrvatskog društva za istraživanje raka s međunarodnim sudjelovanjem

2015 1. Hrvatski simpozij biologa u zdravstvu

VOLONTIRANJA

2017 Dan otvorenih vrata Instituta Ruđer Bošković

2016 Smotra Sveučilišta u Zagrebu

NAGRADE

2017 2. nagrada za poster-izlaganje pod nazivom "*The association of catechol-O-methyltransferase polymorphisms with therapeutic response to antipsychotics in schizophrenia patients*"