# Povezanost monoaminoksidaze tipa B i trauma u djetinjstvu s posttraumatskim stresnim poremećajem

**Marin, Nika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:713114

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Nika Marin

# Povezanost monoaminoksidaze tipa B i traume u djetinjstvu s posttraumatskim stresnim poremećajem

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom doc. dr. sc. Dubravke Švob Štrac, više znanstvene suradnice Instituta Ruđer Bošković. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Hvala mojim mentoricama i svim zaposlenicima Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju na nesebičnoj pomoći pri izradi diplomskog rada.*

*Mojim roditeljima.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

POVEZANOST MONOAMINOOKSIDAZE TIPA B I TRAUME U DJETINJSTVU S POSTTRAUMATSKIM STRESNIM POREMEĆAJEM

Nika Marin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Monoaminooksidaza (MAO) razgrađuje biogene amine, uključujući neurotransmitore dopamin, histamin, serotonin i noradrenalin. Uloga ovog enzima u regulaciji raspoloženja, emocija i ponašanja upućuje na uključenost u patofiziologiju raznih neuropsihijatrijskih poremećaja. Kako trombociti i neuroni dijele brojne biokemijske procese, aktivnost trombocitne MAO-B može poslužiti kao periferni pokazatelj određenih promjena ponašanja i osobnosti. Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) je kompleksan psihijatrijski poremećaj koji nastaje nakon izlaganja traumatskom iskustvu, sa nepotpuno jasnom neurobiološkom podlogom. Istraživanja upućuju da su u razvoj i težinu simptoma PTSP-a uključene promjene neurotransmitorskih sustava, za koje su djelomično odgovorne i varijacije određenih gena, ali i okolišni čimbenici poput traume u djetinjstvu. Stoga je cilj istraživanja bio istražiti povezanost polimorfizama gena *MAOB*, aktivnosti trombocitne MAO-B, te traume u djetinjstvu, s razvojem i težinom simptoma PTSP-a u hrvatskih ispitanika. Značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B pronađene su između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om, te između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om. Također je utvrđena povezanost gena *MAOB* s razvojem PTSP-a, kao i traumatskih događaja u djetinjstvu s težinom simptoma PTSP-a, te značajna interakcija polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu. Međutim, u svrhu razjašnjavanja uloge genetskih i okolišnih čimbenika, te njihovih kompleksnih interakcija u PTSP-u, potrebna su daljnja istraživanja.

(66 stranica, 22 slika, 15 tablica, 131 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: aktivnost trombocitne MAO-B, polimorfizmi gena *MAOB*, PTSP, trauma u djetinjstvu

Voditelj: Doc. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znan. suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Su-voditelj: V. pred. dr. sc. Julija Erhardt, znan. suradnica, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Rad je prihvaćen: x. x. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation Thesis

# ASSOCIATION OF MONOAMINO OXIDASE B AND CHILDHOOD TRAUMA WITH POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

Nika Marin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Monoamine oxidase (MAO) degrades biogenic amines, including neurotransmitters dopamine, histamine, serotonin and noradrenaline. The role of this enzyme in the regulation of mood, emotions and behavior suggest its involvement in the pathophysiology of various neuropsychiatric disorders. As platelets and neurons share numerous biochemical processes, platelet MAO-B activity might serve as peripheral marker of certain behavioral and personality changes. Post-traumatic stress disorder (PTSD) is complex psychiatric disorder developing after traumatic experience, with unclear neurobiological background. Research suggests that development and severity of PTSD symptoms include changes in neurotransmitter systems, partly due to certain gene variations, but also environmental factors such as childhood trauma. The study investigated associations of *MAOB* gene polymorphisms, platelet MAO-B activity, and childhood trauma, with development and severity of PTSD symptoms in Croatian subjects. Differences in platelet MAO-B activity were found between subjects with and without PTSD, and between patients with moderate and severe PTSD. Results demonstrated association between *MAOB* gene and development of PTSD, between childhood trauma and severity of PTSD symptoms; as well as significant interaction of rs1799836 *MAOB* gene polymorphism and physical neglect in childhood. However, further research is necessary to clarify the role of genetic and environmental factors and their complex interactions in PTSD.

(66 pages, 22 figures, 15 tables, 131 references, original in: Croatian)

Thesis deposites in the Central Biological Library

Keywords: platelet MAO-B activity, *MAOB* gene polymorphisms, PTSD, childhood trauma

Supervisor: Ass. Prof. Dubravka Švob Štrac, PhD, Senior Research Associate, Rudjer Boskovic Institute, Zagreb

Co-supervisor: Sen. Lect. Julija Erhardt, PhD, Research Associate, Faculty of Science, Univeristy of Zagreb

Reviewers: Assoc. Prof. Ivana Ivančić Baće, PhD, Assoc. Prof. Damjan Franjević, PhD

Thesis accepted: x x 2019.

SADRŽAJ:

1. UVOD ..... 1
1.1. Monoaminooksidaza ..... 1
1.1.1 Izoenzimi monoaminooksidaze ..... 1
1.1.2 Geni za monoaminooksidazu tipa A i B ..... 3
1.1.2.1 Mutacije i polimorfizmi u genima *MAOA* i *MAOB* ..... 3
1.1.3 Aktivnost monoaminooksidaze ..... 5
1.2 Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) ..... 6
1.2.1 Neurobiološke i neurokemijske značajke PTSP-a ..... 8
1.2.2 Genetski i okolišni čimbenici razvoja PTSP-a ..... 8
1.2.3 Monoaminoksidaza u PTSP-u ..... 10
1.3 Cilj istraživanja ..... 11
2. MATERIJAL I METODE ..... 12
2.1 Ispitanici ..... 12
2.2 Uzorkovanje ..... 13
2.3 Određivanje aktivnosti trombocitne MAO-B ..... 13
2.4 Određivanje koncentracije proteina u trombocitima ..... 14
2.5 Izolacija DNA iz krvi ..... 15
*2.6* Genotipizacija polimorfizama gena *MAOB* ..... 16
2.7 Statistička analiza podataka ..... 17
3. REZULTATI ..... 18
4. RASPRAVA ..... 45
5. ZAKLJUČAK ..... 51
6. LITERATURA ..... 54
7. ŽIVOTOPIS ..... 66

# POPIS KRATICA

5-HIAA: 5-hidroksiindoloctena kiseline

*5-HTTLPR*: Polimorfizam gena za serotoninski prijenosnik; engl. *Serotonin Transporter-Linked Promoter Region*

*5-HTTVNTR:* Polimorfizam gena za serotoninski prijenosnik; engl. *Serotonin Transporter-Variable Number TandemRrepeat*

ACD: Antikoagulans; engl. *Acid Citrate Dextrose*

ADHD: Poremećaj s nedostatkom pažnje i hiperaktivnošću; engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*

ADP: Adenozin difosfat

*ADRB2*: Gen za adrenoceptor beta 2

BDNF: Moždani neurotrofni čimbenik; engl. *Brain neurotophic factor*

BSA: Albumin iz goveđeg seruma; engl. *Bovine Serum Albumin*

CAPS: Klinička skala za posttraumatski stresni poremećaj; engl. *Clinician-Administered PTSD Scale*

CRH: Kortikotropin-oslođađajući hormon

CTQ: Upitnik za traumu u djetinjstvu; engl. *Childhood Trauma Questionnaire*

$dH_2O$ –Destilirana voda

DNA: Deoksiribonukleinska kiselina

DSM-V: Dijagnostički i statistički priručnik američkog psihijatrijskog udruženja, 5. izdanje; *engl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*

FAD: Flavin-adenin-dinukleotid

*FKBP5*: Gen za FK506-vezujući protein (košaperon hsp90 koji regulira osjetljivost glukokotikoidnog receptora)

GABA: Gama-aminomaslačna kiselina

GWAS: Širokogenomska studija povezanosti; engl. *Genome-Wide Association Study*

HHN os: Os hipotalamus- hipofiza – nadbubrežna žlijezda

HVA: Homovanilinska kiselina

kb:Kilobaza

kDa: Kilodalton

LD: Neravnoteža udruživanja; engl. *Linkage Disequilibrium*

MAO: Monoaminooksidaza

*MAOA* i *MAOB*: Geni za monoaminoksidazu A i B

MAO-A: Monoaminoksidaza tipa A

MAO-B: Monoaminooksidaza tipa B

MHPG: 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol

mRNA: Glasnička RNA*;* engl. *Massenger RNA*

p: Statistička vjerojatnost

pb: Parovi baza

PMF: Prirodoslovno-matematički fakultet

PRP: Plazma bogata trombocitima; engl. *Platelet Rich Plasma*

PTSP: Posttraumatski stresni poremećaj

RCLB: Pufer za lizu eritrocita; engl. *Red Cells Lysis Buffer*

RNA: Ribonukleinska kiselina

RT-PCR: Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu; engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

SCID: Strukturirani klinički intervju

SD: Standardna devijacija

SDS: Natrij dodecil sulfat; engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*

SE pufer: Natrij-EDTA pufer engl. *Sodium-EDTA buffer*

SLC6A39: Alel 9 polimorfizma gena za dopaminski prijenosnik

SNP: Polimorfizam jednog nukleotida; *engl. Single Nucleotide Polymorphism*

T3: Trijodtironin

T4: Tiroksin

TAE pufer: Tris-acetat-EDTA pufer

TE pufer: Tris-EDTA pufer

VNTR: Varijabilni broj ponavljajućih sljedova, engl. *Variable Number of Tandem Repeats*

$\chi^2$-test: Hi-kvadrat test

# 1. UVOD

## 1.1. Monoaminooksidaza

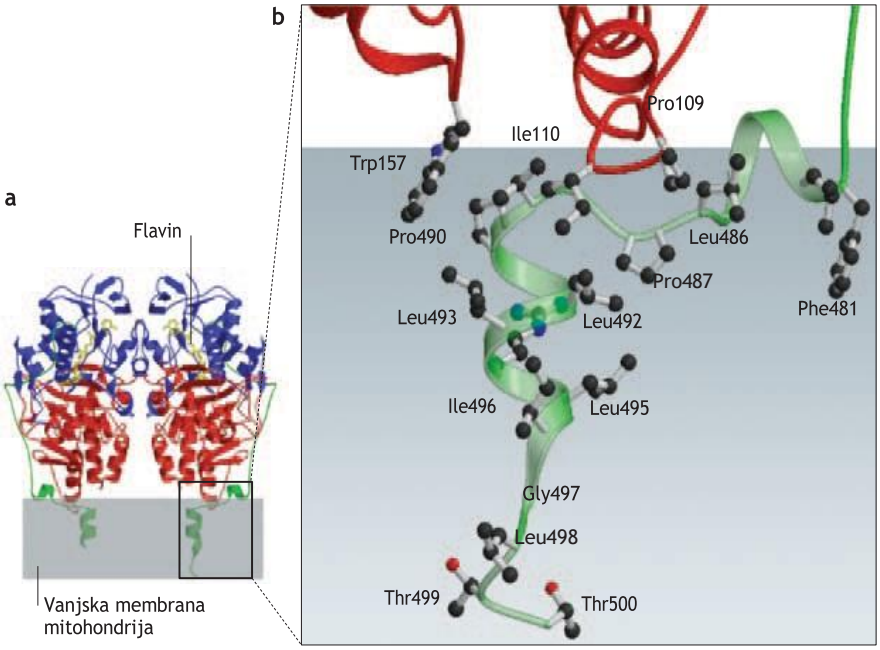
Monoaminooksidaza (MAO) je enzim koji katalizira oksidativnu deaminaciju monoaminskih neurotransmitora kao i ksenobiotskih amina. Integralni je protein vanjske membrane mitohondrija te sadrži flavin-adenin-dinukleotid (FAD). MAO je enzim široko rasprostranjen u tijelu i pronađen je u svim tipovima stanica osim u eritrocitima. Endogeni supstrati MAO uključuju ključne neurotransmitore, kao što su serotonin, dopamin, noradrenalin i adrenalin (Berry i sur., 1994).

### 1.1.1 Izoenzimi monoaminooksidaze

Postoje dva izoenzima MAO, MAO-A i MAO-B, koji dijele 70%-tnu homologiju gena i nalaze se na X kromosomu. Usprkos tome, njihova preferencija za supstrat, raspodjela i fiziološka uloga značajno se razlikuju (Bortolato i Shih, 2011). MAO-A primarno katalizira oksidativnu deaminaciju serotonina i noradrenalina, a glavni supstrati MAO-B su dopamin i egzogeni amini poput benzilamina i feniletilamina. (Berry i sur., 1994). Oba izoenzima degradiraju dopamin, triptamin i tiramin. Ipak, razlika u afinitetu za supstrat nije potpuna, u nedostatku jednoga od izoenzima, drugi može preuzeti njegovu ulogu (Chen i sur., 2004). Oba enzima nalaze se u većini tkiva, ali ipak se samo MAO-A uobičajeno nalazi u fibroblastima i posteljici, a MAO-B u trombocitima i limfocitima (Bond i Cundall, 1977; Donnelly i Murphy, 1977). Ekspresija dvaju izoenzima razlikuje se i u stanicama središnjeg živčanog sustava; enzim MAO-A u mozgu se nalazi unutar kateholaminskim neurona, a rjeđe u glija stanicama, dok se MAO-B pretežito nalazi u glija stanicama i serotoninskim neuronima (Grimsby i sur., 1990). Ekspresija enzima MAO se kod čovjeka mijenja tijekom života. U mozgu fetusa zastupljenija je MAO-A, dok u mozgu odraslih osoba prevladava MAO-B, zbog pretežne ekspresije MAO-B u glija stanicama koje proliferiraju tijekom čitavog života (Riederer i sur., 1987). Osim što regulira koncentraciju neurotransmitora u mozgu, MAO na periferiji sudjeluje u obrani od različitih potencijalno toksičnih aminskih spojeva unesenih hranom ili nastalih metabolizmom (Oreland, 2004).

Izoenzimi MAO-A i MAO-B su dimeri sastavljeni su od dvije jednake podjedinice od 59 kDa, odnosno 58 kDa. Svaka podjedinica sadrži 4 visoko konzervirane domene koje su važne za funkcioniranje enzima. U prvoj N-terminalnoj domeni nalazi se karakteristični β-α-β motiv za koji se veže ADP, a u drugoj domeni nalazi se vezno mjesto supstrata. U trećoj domeni je

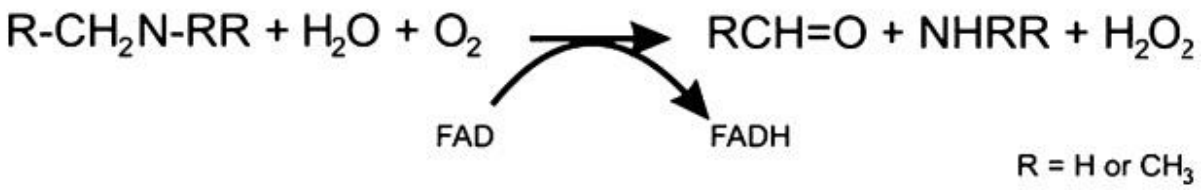
vezno mjesto za koenzim FAD, dok je četvrta domena C-terminalna domena u kojoj se nalazi transmembranski α–heliks iznimno je važan za funkcioniranje enzima (Chen i sur., 2004), i putem kojeg je izoenzim usidren u vanjsku membranu mitohondrija (Slika 1.) (Binda i sur, 2002; Edmondson i sur., 2009).




**Slika 1. Kristalna struktura ljudskog MAO-B. a) Sekundarna struktura dimera b) C-terminalna domena unutar membrane mitohondrija**

Područje vanjske membrane mitohondrija (sivo), domena koja veže supstrat (crveno), domena koja veže flavin (plavo), membranska domena (zeleno), flavin (žuto) (preuzeto i prilagođeno prema Youdim i sur., 2006).

MAO katalizira reakciju oksidativne deaminacije endogenih i egzogenih amina u organizmu koja se odvija u tri stupnja. Prvo dolazi do oksidacije supstrata popraćene redukcijom FAD-a. Potom se FAD ponovno oksidira kisikom uz nastanak vodikovog peroksida i naposljetku nastaje imin početnog supstrata koji spontano hidrolizira do aldehida (Slika 2.) (Berry i sur., 1994).



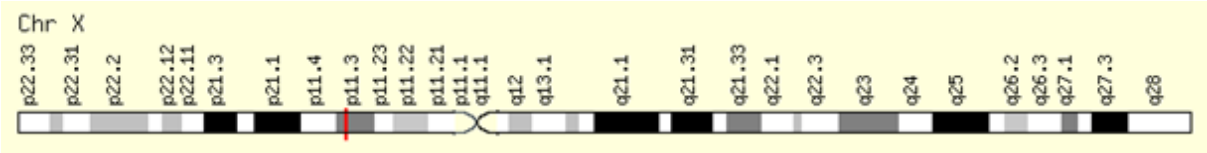

**Slika 2. Oksidativna deaminacija koju katalizira MAO**

(preuzeto iz Berry i sur., 1994)

### 1.1.2 Geni za monoaminooksidazu tipa A i B

Geni koji kodiraju za MAO-A i MAO-B enzime nalaze se na X kromosomu, lokusu Xp11.23 (Slika 3.) i odvojeni su približno 50 kb (Ozelius i sur., 1988; Lan i sur., 1989; Levy i sur, 1989; Chen i sur., 1992). Uz to što dijele 70% homologiju sekvenci, imaju i identičnu organizaciju introna i egzona. Naime, svaki gen ima 15 egzona i 14 introna što upućuje na zajedničko porijeklo ovih gena. Smatra se da su geni za MAO-A i MAO-B nastali duplikacijom zajedničkog gena pretka (Grimsby i sur., 1991). Brojne filogenetske studije pokazale su da samo jedan *MAO* gen postoji kod ranih eukariota (Schilling i Lerch, 1995), beskralješnjaka (Boutet i sur., 2004) i riba koštunjača (Chen i sur., 1994; Setini i sur., 2005; Anichtchik i sur., 2006). Prisutnost dvaju *MAO* gena prvi puta se javlja kod vodozemaca roda *Anura* (žabe) (Chen i sur., 1994). Kod žaba *MAOA* dominira u stadiju punoglavca, dok ekspresija *MAOB* raste tijekom metamorfoze (Nicotra i Senatori, 1988), što ukazuje na mogućnost da je duplikacija gena selekcionirana kao povoljna osobina za odražavanje redoks homeostaze kao odgovor na hiperoksičnu promjenu kao posljedicu razvoja plućne respiracije. U tom je kontekstu važan podatak da MAO-A ima puno veći afinitet za $O_2$ od MAO-B (Edmondson i sur., 2004).

Međutim, *MAOA* i *MAOB* geni unatoč identičnoj organizaciji introna i egzona imaju različitu regulaciju. Oba promotora su bogata GC bazama i regulirana transkripcijskim čimbenikom Sp1, no Sp1 vezna mjesta su drugačije organizirana. Upravo zbog različite organizacije veznih mjesta za transkripcijski čimbenik smatra se da dolazi do razlike u specifičnoj ekspresiji izoenzima u stanicama različitih tkiva (Chen, 2004.)




**Slika 3. Položaj *MAO* gena na X kromosomu označen je crvenom bojom**

(preuzeto sa www.genecards.org)

#### 1.1.2.1 Mutacije i polimorfizmi u genima *MAOA* i *MAOB*

Rezultati raznih istraživanja pokazali su da mutacije i polimorfizmi u genima *MAOA* i *MAOB* mogu različito utjecati na brzinu procesiranja (engl. turnover rate) dopamina i serotonina. Utvrđena je povezanost viših razina monoamina, koje razgrađuje MAO (noradrenalin, adrenalin, serotonin), i njihovih metabolita u plazmi i urinu, s CT genotipom polimorfizma rs1137070 gena *MAOA* (Dorszewska i sur., 2013). Visoka aktivnost uVNTR

varijante gena *MAOA* se također povezuje s višim razinama metabolita monoamina, homovanilinske kiseline (HVA) i 5- hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA) u cerebrospinalnoj tekućini (Jonsson i sur., 2000; Williams i sur., 2003; Zalsman i sur., 2005). Kod pacijenata s Brunnerovim sindromom, koji je rezultat mutacije gena *MAOA*, pronađene su niske koncentracije HVA, 5-HIAA i vanilmandelične kiseline, što potvrđuje smanjenu degradaciju monoamina zbog smanjene aktivnosti MAO-A (Brunner i sur., 1993).

U genu *MAOB* najčešće je proučavan polimorfizam u intronu 13. To je polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism-SNP), odnosno promjena adenina (A) u guanin (G), koja se nalazi 36 pb uzvodno od granice introna 13 i egzona 14 (Ho i sur., 1995). Zbog svog položaja, pretpostavlja se da A/G polimorfizam u intronu 13 (rs1799836) gena *MAOB* utječe na translaciju i/ili stabilnost glasničke RNA (mRNA) (Balciuniene i sur., 2002). U istraživanju Garpenstanda i sur. (2000) pronađena je povezanost rs1799836 polimorfizma gena *MAOB* i aktivnosti trombocitne MAO-B. S druge strane, mnoga istraživanja nisu uputila na povezanost ovog polimorfizma i aktivnosti trombocitne MAO-B u zdravih ljudi (Pivac i sur., 2006), veterana oboljelih od PTSP-a (Pivac i sur., 2007) kao ni ovisnika o alkoholu (Nedić Erjavec i sur., 2014). Istraživanje Girmena i sur. (1992) također nije utvrdilo povezanost alela *MAOB* gena i aktivnosti trombocitne MAO-B. Istraživanje Balciunienea i sur. (2002) pokazalo je smanjenu aktivnost MAO-B u mozgu u nosioca G alela, pri čemu su razine *MAOB* mRNA bile jednake, bez obzira na genotip. Stoga se pretpostavlja da postoji cis-regulatorni element povezan sa rs1799836 polimorfizmom gena *MAOB* koji mijenja aktivnost MAO-B u ljudskom mozgu (Balciuniene i sur., 2002). Ovaj polimorfizam može mijenjati procesiranje introna 13 gena *MAOB*, u slučaju alela A s većom efikasnošću, što može utjecati na povećanu ekspresiju proteina i veću enzimatsku aktivnost MAO-B (Jakubauskiene i sur., 2012).

U istraživanjima je pokazana značajna povezanost negativne emocionalnosti s dva visoko povezana polimorfizma gena *MAOB,* rs10521432 i rs6651806 ($p<0.002$) (Dlugos i sur., 2009). Haplotipskom analizom utvrđeno je da je haplotip GACG (kojeg tvore četiri SNP-a: rs1799836, rs10521432, rs6651806 i rs590551) značajno povezan s niskim rezultatom negativne emocionalnosti kod zdravih ispitanika ($p<0.002$) (Dlugos i sur., 2009). Utvrđeno je da su polimorfizmi rs5905512 i rs1799836 gena *MAO*B povezani s koncentracijom 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG) glavnog metabolita noradrenalina, u psihotičnih muškaraca, (Andreuo i sur., 2014). Međutim, rs5905512 polimorfizam gena *MAOB* nije bio povezan s koncentracijom MHPG kod psihotičnih žena, zdravih žena i zdravih muškaraca (Andreuo i sur., 2014). Polimorfizam rs1799836 gena *MAOB* povezuje se i sa shizofrenijom u žena (Gasso i

sur., 2008). Nadalje, u jednom od prethodnih istraživanja i polimorfizam rs5905512 gena *MAOB* također je povezan sa shizofrenijom, ali u muških ispitanika (Carrera i sur., 2009). S druge strane, Mas i sur. (2009) nisu utvrdili povezanost ovog polimorfizma sa shizofrenijom ni kod jednog spola.

### 1.1.3 Aktivnost monoaminooksidaze

Ekspresija, odnosno aktivnost enzima MAO stabilna je nekoliko desetljeća života, uz mali porast nakon 40. godine života (Robinson i sur., 1972; Murphy i sur., 1976; Bridge i sur., 1985; Bagdy i Rihmer, 1986). Nekoliko istraživanja pokazalo je da se aktivnost MAO nasljeđuje, uz čimbenik 0.75 u žena i muškaraca (Oxenstiern i sur., 1986; Pedersen i sur., 1993). Postojanje MAO u trombocitima prvi puta je zabilježeno 1964. godine (Paasonen i sur., 1964), te je utvrđeno da se u ljudi u trombocitima nalazi isključivo MAO-B, koja ima isti aminokiselinski slijed kao i MAO-B u mozgu (Chen i sur., 1993). Trombocitna MAO-B ima slična biokemijska i farmakološka svojstva kao i MAO-B u mozgu (Oreland, 2004) i obje su kodirane istim genom *MAOB* (Chen i sur., 1992). Međutim, u istraživanju koje su proveli Gustavson i sur. (2010), aktivnost trombocitne MAO-B nije bila povezana s koncentracijama raznih metabolita monoamina (HVA, 5-HIAA i MHPG) u cerebrospinalnoj tekućini, iako je u drugim istraživanjima pozitivno korelirala s koncentracijama HVA i 5-HIAA u cerebrospinalnoj tekućini (Oreland i sur., 1981; von Knorring i sur., 1986).

Zbog svoje važne uloge u regulaciji raspoloženja, emocija i ponašanja (Edmondson i sur., 2009), pretpostavlja se da je MAO uključena u patofiziologiju raznih mentalnih i neurodegenerativnih poremećaja (Oreland, 1993). Jedan od poremećaja koji ovdje moramo navesti je perniciozna anemija kod koje je zabilježena povećana aktivnost MAO (Regland i sur., 1991). Povećanje aktivnosti MAO, prisutno je i kod raznih neurodegenerativnih bolesti s različitom patogenezom, kao što su Parkinsonova bolest (Jarman i sur., 1993; Bongioanni i sur., 1996) i Huntingtonova bolest (Mann and Chiu, 1978; Norman i sur., 1987a). Točkasta mutacija u genu *MAOA* koja rezultira u smanjenoj koncentraciji MAO-A (Brunner i sur., 1993) povezuje se s impulzivnom agresijom, razdražljivošću, napadajima, uništavanjem imovine ili drugim antisocijalnim ponašanjem. Osim toga, promjene u aktivnosti i ekspresiji MAO-B povezane su s depresijom, alkoholizmom, psihotičnim poremećajima, impulzivnošću i neurodegenerativnim bolestima (Adolfsson i sur., 1980; Sandler i sur., 1993).

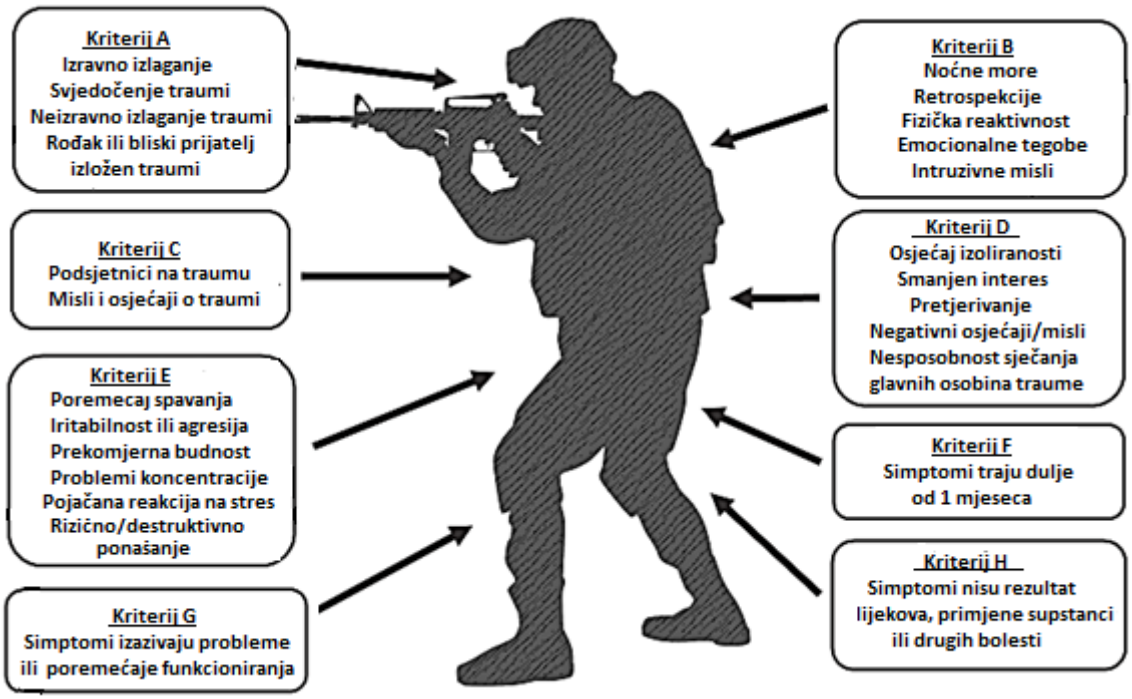
Trombocitna aktivnost MAO-B predložena je kao periferni biomarker različitih osobina ličnosti i psihijatrijske ranjivosti, uključujući traženje uzbuđenja, novina, ekstraverzije,

impulsivnosti i predispozicije za različita rizična ponašanja (Oreland i Hallman, 1995; Harro i sur., 2004; Oreland, 2004). Također, aktivnost MAO-B u trombocitima povezuje se sa psihopatijom i crtama osobnosti povezanima s agresivnošću (Stalenheim, 2004). Brojna istraživanja pokazala su smanjenu aktivnost trombocitne MAO-B kod ispitanika koji pokazuju disinhibiciju u ponašanju (Oreland, 2004). Ruchkin i sur. (2005) predložili su da niska aktivnost MAO-B predstavlja nespecifični biljeg predispozicije za razvitak psihopatologije, odnosno povezana je sa specifičnim svojstvima osobnosti koji predstavljaju čimbenik ranjivosti za razvoj psihotpatologije. Smanjena aktivnost trombocitne MAO zabilježena je i kod pušača, 1987. godine dvije su grupe istraživača pokazale da pušenje inhibira trombocitnu aktivnost MAO (Yu i Boulton, 1987; Norman i sur., 1987b). Međutim, i smanjena i povećana aktivnost trombocitne MAO-B mogu predstavljati biološku ranjivost i podložnost različitim ponašanjima i osobinama (Paaver i sur., 2006) i ne postoji linerana povezanost (Schalling i sur., 1987; Paaver i sur., 2006).

## 1.2 Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP)

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) je psihijatrijski poremećaj koji se može razviti kod ljudi koji su iskusili ili svjedočili traumatičnom događaju, kao što je prirodna katastrofa, nesreća, teroristički napad, rat, silovanje ili neki drugi događaj opasan po život (Kessler i sur., 2017, Liu i sur., 2017). Klasični simptomi PTSP-a variraju u ozbiljnosti i mogu se podijeliti na: intruzivne misli; izbjegavanje podsjetnika na traumu; negativne misli i osjećaje, te uzbuđivanje i reaktivne simptome (APA, 2013). Intruzivne misli uključuju ponovljene, nenamjerne uspomene, noćne more i ponovno proživljavanje traume. Ponovna proživljavanja traume (engl. flashbacks) mogu biti tako živopisna da ljudi imaju osjećaj da ponovno proživljavaju traumatsko iskustvo i gube se na način da ne mogu razaznati prošle od sadašnjih događaja i imaju osjećaj da se traumatičan događaj događa sada, ispred njihovih očiju (Ehlers i Steil, 1995, Butler i sur., 1996). Izbjegavanje podsjetnika na traumatični događaj može uključivati izbjegavanje ljudi, mjesta, aktivnosti, objekata i situacija koje dovode do uznemirujućih uspomena. Izbjegavaju sjećanje ili razmišljanje o traumi, mogu se odupirati razgovoru o tome što se dogodilo ili kako se osjećaju u vezi s tim. Oboljeli mogu imati negativne misli i osjećaje o sebi i drugima, koji mogu uključivati neprekidna i iskrivljena uvjerenja o sebi ili drugima (APA, 2013). Također, mogu osjećati trajni strah, užas, bijes, krivnju ili sram. Javlja se mnogo manje zanimanje za aktivnosti u kojima su prethodno uživali i često se osjećaju odvojeno ili otuđeno od drugih. Uzbuđenje i reaktivni simptomi mogu uključivati razdražljivost i izljeve ljutnje, nesmotreno ili autodestruktivno ponašanje. Također osobe se lako uznemire ili imaju

problem s koncentracijom ili spavanjem (Mellman i sur., 1995). Simptome nalik ovima ima mnogo ljudi nakon izloženosti nekakvoj traumi, međutim za postavljanje dijagnoze posttraumatskog stresnog poremećaja nužno je da simptomi traju najmanje mjesec dana, a kod nekih pacijenata mogu trajati i godinama (APA, 2013).




**Slika 4. Karakteristični simptomi PTSP-a prema DSM-V**

(slika napravljena prema DSM-V; APA, 2013)

Mnogi razvijaju simptome unutar tri mjeseca od traumatičnog događaja, međutim simptomi se mogu pojaviti i kasnije. Trajanje simptoma PTSP-a može varirati od potpunog oporavka 3 mjeseca nakon pojavljivanja (kod otprilike polovine odraslih), do zadržavanja simptoma više od 12 mjeseci, a ponekad čak i više od 50 godina. Povećanje intenziteta ili povratak simptoma može se javiti kao odgovor na životne stresove, događaje koji podsjećaju na originalnu traumu ili nove traumatske događaje. PTSP je češći kod žena nego kod muškaraca, te žene u općoj populaciji doživljavaju PTSP dužeg trajanja nego muškarci. Barem dio povećanog rizika za PTSP u žena javlja se zbog češće izloženosti traumatičnim događajima kao što je silovanje i nasilje. PTSP se često udružuje s drugim poremećajima pa je tako kod pojedinaca s PTSP-om, 80% veća učestalost javljanja simptoma koji ispunjavaju dijagnostički kriterij za bar još jedan mentalni poremećaj (na primjer depresivni, bipolarni i anksiozni poremećaj) (APA, 2013).

### 1.2.1 Neurobiološke i neurokemijske značajke PTSP-a

Neurobiološka podloga PTSP-a nije potpuno jasna. Brojni čimbenici se moraju uzeti u obzir kada se promatra odnos između vanjskih podražaja, odgovora na stres i patologije. Biološke promjene u PTSP-u su sustavne (Michopoulos i sur., 2015) i uključuju promijenjenu funkciju osi hipotalamus- hipofiza – nadbubrežna žlijezda (HHN), imunološku, neurotransmitersku i neurotrofnu funkciju, povećanu aktivnost štitnjače, visoku osjetljivost živčanog sustava, smanjenje prefrontalnih regija mozga, niži volumen hipokampusa, povećanu aktivnost amigdala, rizik od kardiovaskularnih, metaboličkih i autoimunih bolesti, ali i ubrzanih procesa povezanih sa starenjem (Schuff i sur., 2001; Pace i sur., 2011, Pitman i sur., 2012).

Os HHN je središnji koordinator sustava neuroendokrinog stresnog odgovora te se u tom kontekstu najviše proučava. HHN os sastoji se od endokrinog hipotalamusa uključujući i prednji režanj hipofize kao i nadbubrežne žlijezde (Sherin i Nemeroff, 2011). Kod osoba s PTSP-om nađene su snižene razine kortizola u krvi i urinu, premda izlaganje stresu uzrokuje aktivaciju HHN osi. Istraživanja su pokazala da je uzrok smanjene razine kortizola povećana osjetljivost negativne povratne sprege HHN osi, što ukazuje na to da stresori dovode do disregulacije HHN osi (Yehuda, 2006). Uz HHN os, kod osoba s PTSP-om uočene su promjene i u osi hipotalamus –hipofiza – štitna žlijezda i promjene u omjeru hormona štitnjače trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) (T3 je povišen u odnosu na T4) što doprinosi povećanoj anksioznosti (Wang i Mason, 1999).

Neurokemijske značajke PTSP-a uključuju abnormalnu regulaciju serotonina i drugih kateholamina, aminokiselina, peptida i opioidnih neurotransmitora. Ti neurotransmitori su nađeni u moždanim krugovima koji reguliraju odgovore vezane za stres i strah (Sherin i Nemeroff, 2011). Karakteristične promjene u strukturi i funkciji mozga također su zabilježene kod osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem. Regije mozga koje su promijenjene u PTSP-e uključuju hipokampus, amigdalu i kortikalne regije (anteriorni cingulat, insula, orbitofrontalna regija). Ova područja međusobno formiraju neuralni krug koji posreduje, između ostalog, prilagodbu stresu. Pretpostavlja se da promjene u tom neuralnom krugu imaju izravnu vezu s razvojem PTSP-a (Rauch i sur., 2006; Bremner i sur., 2008).

### 1.2.2 Genetski i okolišni čimbenici razvoja PTSP-a

Većina ljudi koja se suoči s traumatskim događajem ne razvije PTSP i zato je važno razumjeti čimbenike ranjivosti i otpornosti. Genetička istraživanja PTSP-a otežana su

mnoštvom čimbenika, kao što je genetska heterogenost (slični fenotipovi produkt su različitih genotipa) i nepotpuna fenotipska pojavnost (osoba s genetskim rizikom za PTSP, koja nije izložena traumi neće razviti PTSP). Unatoč ovim otežavajućim okolnostima istraživanja, sve je više dokaza da je rizik za PTSP pod značajnim utjecajem genetskih čimbenika (Sherin i Nemeroff, 2011). Naime, osim izmijenjene biološke funkcije, genetički podaci iz obiteljskih studija povezanosti, studija blizanaca, te širokogenomskih analiza povezanosti (engl. genome-wide association study-GWAS) pokazuju da nasljednost PTSP-a varira od 30-40% (Almli i sur., 2014; Duncan i sur., 2018). Dokazi iz istraživanja provedenih u obiteljima i na blizancima ukazuju na doprinos nasljednih komponenti u razvoju PTSP-a, kao što su smanjeni hipokampalni volumen (Gilbertson i sur., 2002) ili veća aktivnost amigdale (Hariri i sur., 2002). Sve se više istražuju genetske varijacije u neurobiološkim sustavima koji utječu na odgovor na traumu i posljedično na rizik odnosno otpornost za razvoj PTSP-a (Brokeman i sur., 2007).

Kao i u drugim složenim mentalnim poremećajima, relativno velik broj gena s malim učinkom pridonosi kumulativnom riziku za nastanak PTSP-a. Postoje različiti rezultati koji se odnose na povezanost (ili nedostatak povezanosti) gena kandidata, koji kodiraju za proteine uključene u različite biološke sustave, s rizikom razvoja PTSP-a (Digangi i sur., 2013; Almli i sur., 2014; Solovieff i sur., 2014; Ryan i sur., 2016). Međutim, većina podataka upućuje na varijacije rizičnih gena uključenih u serotoninski, dopaminski i GABA sustav, imunološki sustav, HHN os, kao i varijacije gena za neuropeptid Y, BDNF, apolipoprotein E i drugih gena koji se odnose na odgovor na stres, strah, kogniciju i anksioznost (Ryan i sur., 2016; Nedic Erjavec i sur., 2018). Na primjer, pronađena je veza između polimorfizma gena za dopaminski prijenosnik i rizika za razvoj PTSP-a. Naime, Segman i sur. (2002) u svom su istraživanju pokazali da oboljeli od PTSP-a imaju više ponavljanja *SLC6A39* alela, što pokazuje da genetski uvjetovane značajke prijenosa dopamina mogu utjecati na razvoj PTSP-a kod osoba izloženih traumi. Također je dokazano da genetska varijacija ko-šaperona glukokortikoidnog receptora utječe na rizik razvitka PTSP-a, zajedno sa zlostavljanjem u djetinjstvu. Tako su Binder i sur. (2008), istraživali interakcije između zlostavljanja u djetinjstvu, traume u odrasloj dobi i polimorfizma gena *FKBP5* i zaključili da postoji značajna interakcija između polimorfizama gena *FKBP5* i zlostavljanja u djetinjstvu s kasnijim razvojem PTSP-a.

Poznato je da nedaće u djetinjstvu predviđaju povećani rizik razvoja PTSP-a nakon traumatičnih iskustava (Duncan i sur., 1996; Zaidi i Foy, 1994; McLaughlin i sur., 2017). Istraživanje na ratnim veteranima iz Vijetnama pokazalo je da nedaće u djetinjstvu povećavaju rizik za kasniji razvoj PTSP-a (Bremner i sur., 2003). Sve više istraživanja pokazuje da rana

loša iskustva, uključujući i prenatalni stres i stres u djetinjstvu, imaju značajan i dugotrajan učinak na razvoj neurobioloških sustava, tako da „programiraju“ buduće reakcije na stres i ranjivost za razvoj PTSP-a (Nemeroff, 2004; Meaney i Szyf, 2005; Seckl i Meaney, 2006). Djeca s poviješću zlostavljanja imaju veći rizik od razvoja PTSP-a u budućnosti (Wolitzky-Taylor i sur., 2008). Istraživanje na djeci koja su preživjela uragan Katrina također je pokazalo da imaju značajno povećan rizik od PTSP-a (McLaughlin i sur., 2010). Istraživanja su provedena i na primatima izloženim različitim uvjetima potrage za hranom, što je uzrokovalo nepredvidljivu skrb majke za mladunče i posljedično dovelo do adultnog fenotipa sa senzibilizacijom na znakove straha, hiperaktivnosti kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) i sniženim razinama kortizola, što su klasične značajke osoba s PTSP-om (Coplan i sur., 1996).

### 1.2.3 Monoaminoksidaza u PTSP-u

Davidson i sur. utvrdili su značajno nižu aktivnost trombocitne MAO-B u ispitanika s PTSP-om u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (Davidson i sur., 1985), Međutim, rezultati drugih istraživanja pokazali su da se trombocitna MAO-B aktivnost nije razlikovala značajno između ratnih veterana s PTSP-om ili bez njega, i ratnih zarobljenika s PTSP-om (Pivac i sur., 2002). S druge strane, veća aktivnost trombocitne MAO-B, pokazana je u veterana s PTSP-om, osobito onima sa psihotičnim u usporedbi s nepsihotičnim osobinama (Pivac et al., 2007). U veterana s PTSP-om pronađena je nešto veća aktivnost trombocitne MAO-B kod bolesnika s težim simptomima PTSP-a i bolesnika s agitacijom, te značajno veća aktivnost trombocitne MAO-B kod veterana s izraženijim psihotičnim simptomima, u odnosu na bolesnike s manje izraženim simptomima, što upućuje da su teži simptomi PTSP-a povezani s većom aktivnošću trombocitne MAO-B (Švob Štrac i sur., 2016).

Povezanost polimofizma rs1799836 gena *MAOB* sa aktivnošću trombocitne MAO-B nije pronađena u veterana s PTSP-om (Pivac i sur., 2007). Značajne razlike u učestalosti alela polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* nisu utvrđene između ratnih veterana sa psihotičnim i nepsihotičnim PTSP-om (Pivac i sur., 2007). Međutim, u istraživanju na veteranima oboljelim od PTSP-a, učestalost alela A i G rs1799836 polimorfizma gena *MAOB* značajno se razlikovala vezano uz težinu simptoma PTSP-a (simptomi PTSP-a su podijeljeni prema CAPS ljestvici na blage, umjerene i teške). Kada su bolesnici s PTSP-om podijeljeni prema agitaciji i psihotičnim simptomima, pronađena je slična raspodjela A i G alela rs1799836 polimorfizma gena *MAOB* (Švob Štrac i sur., 2016).

## 1.3 Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti moguću povezanost polimorfizama gena *MAOB* (rs6651806, rs1799836, rs5905512), aktivnosti trombocitne MAO-B, te traume u djetinjstvu, s razvojem i težinom simptoma PTSP-a u 369 hrvatskih ispitanika. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge genetskih čimbenika, kao što su varijante gena *MAOB,* i okolišnih čimbenika, poput traume u djetinjstvu, te njihovih kompleksnih interakcija u neurobiološkoj podlozi PTSP-a.

# 2. MATERIJAL I METODE

## 2.1 Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 369 ispitanika i to 282 muška ratna veterana s dijagnozom PTSP-a koji se liječe u Klinici za psihijatriju Vrapče u Zagrebu i 87 kontrolna zdrava muška ispitanika. Dijagnoza PTSP-a je postavljena primjenom Strukturiranog kliničkog intervjua (eng. Structured Clinical Interview - SCID), osnovanom na DSM-V (engl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) kriterijima (APA, 2013).

Težina simptoma PTSP-a utvrđena primjenom Kliničke ljestvice za PTSP (engl. Clinician-Administered PTSD Scale – CAPS) (Blake i sur., 1990). CAPS ljestvica mjeri učestalost i intenzitet izraženosti simptoma PTSP-a koji su grupirani s obzirom na tri kriterija procjene: B kriterij – ponovno proživljavanje traumatskih iskustava u mislima i snovima; C kriterij – izbjegavanje podsjetnika na traumu i emocionalna otuđenost, te D kriterij – povećana pobudljivost živčanog sustava. Ukupni broj bodova CAPS ljestvice dobije se zbrajanjem bodova sva tri pojedinačna kriterija. Prema bodovima na CAPS ljestvici bolesnici s PTSP-om mogu se podijeliti sljedeće kategorije: bolesnike s elementima PTSP-a (do 45 bodova), lakim PTSP-om (45-65 bodova), srednjim PTSP-om (66-95 bodova) i teškim PTSP-om (iznad 95 bodova). Povijest zlostavljanja i zanemarivanja u djetinjstvu utvrđena je primjenom Upitnika za traumu u djetinjstvu (engl. Childhood Trauma Questionnaire-CTQ) (Bernstein and Fink, 1998). CTQ uputnik procjenjuje izlaganje fizičkom, seksualnom i emocionalnom zlostavljanju, te fizičkom i emocionalnom zanemarivanju u djetinjstvu i adolescenciji. Upitnik se sastoji od 28 tvrdnji koje ispitanik mora bodovati s bodovima od 1-5, odnosno od potpuno netočno do potpuno točno. Prema bodovima možemo procijeniti stupanj fizičkog zlostavljanja (nema 5-7, nisko 8-9, umjereno 10-12, teško ≥ 13), emocionalnog zlostavljanja (nema 5-8, nisko 9- 12, umjereno 13-15, teško ≥ 16) i seksualnog zlostavljanja (nema 5, nisko 6-7, umjereno 8-12, teško ≥ 13), kao i fizičkog zanemarivanja (nema 5-7, nisko 8-9, umjereno 10-12, teško ≥ 13) i emocionalnog zanemarivanja (nema 5-9, nisko 10-14, umjereno 15-17, teško ≥ 18) ispitanika.

Kriteriji za isključivanje iz studije su: trenutno prisutna terapija lijekovima, zloporaba droga, ovisnost o alkoholu ili patofiziološke promjene na jetri, shizofrenija, adultni poremećaj s nedostatkom pažnje i hiperaktivnošću (engl. Attention Deficit Hyperactivity Disorder – ADHD) i Alzheimerova bolest. Odgovarajuću kontrolnu skupinu čine 82 zdrava muškaraca koji nisu u rodu i ne primaju terapiju lijekovima, te čiji su podaci i uzorci prikupljeni također u Klinici za psihijatriju Vrapče u Zagrebu za vrijeme redovnih pregleda. Kod kontrolnih

ispitanika će se također provjeriti jesu li, prema DSM-V kriterijima, prisutni: PTSP, ovisnost o alkoholu, shizofrenija, adultni ADHD, Alzheimerova bolest ili patofiziološke promjene na jetri. Svih ispitanici su etnički homogena skupina bijelaca hrvatskog porijekla. Svim ispitanicima su prije uključivanja u studiju opisani svi detalji istraživanja, te je od njih dobiven potpisan informirani pristanak.

Studija je provedena uz odobrenje Etičkog povjerenstava Klinike za psihijatriju Vrapče (Zagreb, Hrvatska), te je potpuno u skladu s etičkim standardima postavljenim Helsinškom deklaracijom 1964. godine. Diplomski rad je djelomično financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt Genomski i glikanski biomarkeri PTSP-a -GlikoGenPTSP (IP-2014-09-4289, voditelj: N.Pivac).

## 2.2 Uzorkovanje

Uzorci krvi (8 ml) sakupljeni su u plastične epruvete s 2 ml antikoagulansa ACD (engl. Acid Citrate Dextrose - ACD) u 8 sati ujutro nakon noćnog posta. Unutar 24 sata iz uzoraka pune krvi izdvojeni su plazma i DNA te pohranjeni u odgovarajuće zamrzivače pri temperaturi od -80°C. Krv je centrifugirana na 1831 x g, 3 min na sobnoj temperaturi kako bi se dobila plazma bogata trombocitima (engl. Platelet rich plasma – PRP). Daljnjim centrifugiranjem plazme bogate trombocitima u ohlađenoj (4°C) centrifugi na 5087 x g, tijekom 15 min istaloženi su trombociti. Talog je ispran fiziološkom otopinom i ponovno centrifugiran. Istaloženi trombociti pohranjeni su u zamrzivaču na 20°C. Prije analize aktivnosti MAO-B, talog trombocita odmrznut je na sobnoj temperaturi.

## 2.3 Određivanje aktivnosti trombocitne MAO-B

Kod određivanja aktivnosti trombocitne MAO-B modificiranom metodom prema Krajlu (Krajl, 1965), potrebni su prazna proba i standardi koji se priređuju u duplikatu. Kao standardi korišteni su 5 nM, 2.5 nM, 1.25 nM, 0.562 nM i 0.313 nM vodena otopina 4-hidroksikinolina. Za praznu probu korišten je sonicirani talog trombocita. Za određivanje aktivnosti trombocitne MAO-B korišen je prethodno obrađen i zamrznut talog trombocita. Prije analize aktivnosti MAO-B, talog trombocita odmrznut je na sobnoj temperaturi i potom razoren soniciranjem (20 kHz, amplitude 8 x 10-3 mm kroz 60 sekundi). U staklene epruvete za uzorak i praznu probu stavljeno je 100 µl soniciranog taloga trombocita ili po 100 µl standarda svake koncentracije. Uzorci su zatim deproteinizirani s 1 ml 10% $ZnSO_4$ i 0.5 ml NaOH. U deproteinizirane uzorke za pripremu fluorofora dodano je 0.2 ml L-cisteina (0.1%) i 1.2 ml ortoftalaldehida (0.05%).

Potom je u epruvete s uzorcima i praznim probama dodano 800 µl fosfatnog pufera, a standardima 900 µl fosfatnog pufera i sve su epruvete stavljene na miješanje u vorteks miješalicu. Nakon miješanja, samo u epruvete s uzorcima dodano je 100 µl kinuramina.

Epruvete s praznom probom, standardima i uzorcima sat vremena su inkubirane u vodenoj kupelji na 37°C. Nakon inkubacije, reakcija razgradnje kinuramina zaustavljena je dodatkom 2 ml hladne 1M otopine NaOH. U epruvete s praznim probama naknadno je dodano 100 µl kinuramina. Intenzitet fluorescencije u uzorcima, standardima i praznim probama mjeren je uređajem Varian Cary Eclipse (Agilen ttechnologies, SAD) uz ekscitaciju pri 310 nm i emisiju pri 380 nm. Prema fluorescenciji poznatih koncentracija 4-hidroksikinolina u standardima izračunata je aktivnost trombocitne MAO-B. Rezultat se izražava kao količina 4-hidroksikinolina nastalog razgradnjom kinuramina tijekom jednog sata u odnosu na količinu ukupnih proteina u trombocitima. Zbog toga je potrebno provesti i određivanje koncentracije ukupnih proteina u istom uzorku u kojem se određuje i aktivnost trombocitne MAO-B.

## 2.4 Određivanje koncentracije proteina u trombocitima

Za određivanje koncentracije proteina metodom Lowry-a i sur. (1951) pripremljena je tzv. ABC smjesa i standardi različitih koncentracija. ABC otopina pripremljena je miješanjem 140 ml 2% otopine $Na_2CO_3$, 1.4 ml 2% otopine K-Na tartarata i 1.4 ml 1% otopine $CuSO_4$. Za pripremu standarda korištena je matična otopina goveđeg serumskog albumina (BSA-engl. Bovine serum albumin) koja je dobivena otapanjem 5 mg BSA u 1 ml 0.1M HCl. Potom je matična otopina BSA razrijeđivana pomoću 0.1M HCl. Prvi standard bilo je 200 µl matične otopine BSA i 200 µl 0.1M HCl. Drugi standard je pripremljen razrijeđenjem 200 µl prvog standarda s 200 µl 0.1M HCl, a treći jednakim razrijeđenjem drugog standarda. Na taj način dobivena su tri standarda različitih koncentracija (2.50 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.63 mg/ml). Kao uzorak korišten je odmrznuti talog trombocita razbijen soniciranjem, a kao prazna proba upotrijebljena je 0.1M HCl. Kako bi mjerenje bilo što preciznije, svi uzorci, standardi i prazne probe, priređeni su u triplikatima.

U svaku epruvetu stavljeno je 10 µl uzorka, standarda ili 0.1M HCl i na to je dodano 2 ml ABC smjese. Smjesa je ostavljena da odstoji 10 minuta, a zatim je u smjesu dodano 0.2 ml Folin-Ciocalteau reagensa koji je razrijeđen vodom u omjeru 1:1. Dobivena smjesa odstajala je 30 minuta na sobnoj temperaturi i potom je spektofotometrijski izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 700 nm. Koncentracija proteina izračunata je prema optičkoj gustoći poznatih koncentracija BSA kao standarda.

## 2.5 Izolacija DNA iz krvi

Millerovom metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988) izolirana je genomska DNA iz leukocita. Uzorci krvi su odmrznuti, te su miješani na valjkastoj miješalici 20 minuta. U epruvetu se je izdvojilo 300 µl uzorka krvi na koje se dodalo 900 µl hladnog pufera za lizu eritrocita (RCLB, engl. Red cell lysis buffer), te se nakon miješanja na rotacijskoj miješalici ostavilo stajati na ledu 10 min. Nakon centrifugiranja 2 min na 13400 g, pri 4°C supernatant s liziranim eritrocitima se baca. Leukociti u talogu pročišćavaju se postupkom resuspendiranja u RCLB, te centrifugiranja uz odvajanje supernatanta, koji se ponavlja 3 puta. Na talog se zatim dodaje 300 µl natrij-EDTA pufera, 30 µl 10% SDS-a (za destabilizaciju membrana leukocita) i 1.5 µl proteinaze K (za razgradnju proteina). Sve se inkubira 2 sata na 56°C, uz miješanje na miješalici. Nakon inkubacije uzorci se ohlade na sobnu temperaturu (25°C), te se doda 160 µl 5 mM NaCl, promiješa i potom centrifugira 5 min na 13400 g, pri 20°C. Supernatant sa DNA prebaci se u novu epruvetu, te se doda 800 µl hladnog izopropanola koji uz lagano miješanje uzrokuje precipitaciju DNA. Uzorak se centrifugira 2 min na 12000 g, pri 20°C, supernatant se odlije, a talogu se doda 250 µl 75% etanola. Nakon centrifugiranja 2 min na 12000 g, pri 20°C, supernatant se odlije, a talog se ostavi sušiti na zraku 30 minuta. Talogu se zatim doda 100 µl Tris-EDTA pufera, koji uz trešnju tijekom jednog sata na 37°C otapa izoliranu DNA. Uzorci DNA se pohranjuju u hladnjak na -20°C.

**Tablica 1. Kemikalije za izolaciju DNA metodom isoljavanja**

| Kemikalije | Sastav/koncentracija | Volumen po epruveti |
|---|---|---|
| Pufer za lizu eritrocita (RCLB, engl. Red cell lysis buffer) | 10 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, pH=7.6 | 900 µl |
| Natrij-EDTA pufer (SE-buffer, engl. Sodium EDTA) | 75 mM NaCl, 25 mM $Na_2EDTA$, pH=8.0 | 300 µl |
| Natrij dodecil sulfat (SDS, engl. Sodium dodecil sulphate), | 10%, pH=7.2 | 30 µl |
| Proteinaza K | 20 mg/kg | 1.5 µl |
| NaCl, | 5 mM | 160 µl |
| Izopropanol | | 800 µl |
| Etanol | 75% | 250 µl |
| Tris-EDTA pufer (TE-buffer) | 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8.0 | 100 µl |

## *2.6* Genotipizacija polimorfizama gena *MAOB*

Genotipizacija polimorfizama rs6651806, rs1799836 i rs5905512 u genu *MAOB* napravljena je prema protokolu proizvođača *Applied Biosystems.* Uzorci izolirane DNA su odmrznuti, te su pripremljena razrjeđenja s redestiliranom vodom kako bi svaki uzorak sadržavao 1-20 ng DNA. U svaku od 96 jažica na reakcijskoj pločici stavljeno je 4.5 µl razrijeđenog uzorka DNA i 5.5 µl reakcijske mješavine koja se sastoji od Taqman univerzalne mješavine (sa slobodnim deoksiribonukleotid trifosfatima i AmpliTaq Gold DNA polimerazom) i Taqman mješavine za genotipizaciju SNP-a (kombinacija dviju početnica za umnažanje ciljane sekvence DNA obilježene različitim fluorescentnim bojama VIC i FAM u svrhu razlikovanja dvaju alela). Reakcijske pločice se zatvore folijom, centrifugiraju 2 min na 5000 rpm i stave u uređaj "*ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus"* (ABI, Foster City, SAD). Uređaj u početnom koraku zagrijava pločice 10 min na 95°C, zatim 15 sek na 92°C kako bi došlo do denaturacije DNA, te potom spušta temperaturu na 60°C kroz 1 min, radi vezivanja početnica i elongacije AmpliTaq Gold polimerazom. Ciklusi od denaturacije do umnažanja DNA ponavljeni su 50 puta. Ova metoda alelne diskriminacije zasniva se na primjeni fluorogenih proba koje se vežu uz određeni alel i detektiraju se pri umnažanju DNA u lančanoj reakciji polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR, engl. Real-time polymerase chain reaction). Proba se sastoji od jednolančanog oligonukleotida s vezanom fluorescentnom bojom (engl. reporter) na 5' kraju i prigušivajućom bojom (engl. quencher) na 3' kraju. Ako je proba komplementarna slijedu DNA, dolazi do njihove hibridizacije, te tijekom PCR reakcije Taq DNA polimeraza svojom 5' nukleaznom aktivnošću oslobađa fluorescentnu boju što se detektira kao povećanje intenziteta fluorescencije. Tako se u stvarnom vremenu može pratiti nastajanje PCR produkta.

**Tablica 2. Kemikalije korištene za genotipizaciju polimorfizma**

| Kemikalije | Volumen po jažici |
|---|---|
| Genomska DNA razrijeđena u dH2O (1-20 ng DNA) | 4.5 µl |
| Taqman univerzalna mješavina | 5 µl |
| 40x Taqman mješavina za genotipizaciju SNP-a | 0.5 µl |
| Ukupni volumen | 10 µl |

## 2.7 Statistička analiza podataka

Rezultati su prikazani kao brojevi i postotci, kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (kod normalne raspodjele podataka) ili kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila (kada raspodjela podataka nije bila normalna). Normalnost razdiobe podataka analizirana je primjenom D'Agostino-Pearson testa. Razlike između dvije skupine analizirane su Student t-testom u slučaju normalne raspodjele podataka ili primjenom Mann-Whitney U testa u slučaju kada podaci nisu bili normalno raspoređeni. Više skupina uspoređeno je pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-e i post-hoc Dunnovog testa s obzirom na to da nije postojala normalna raspodjela podataka. Učestalost pojedinih alela i haplotipova polimorfizama gena *MAOB* između različitih skupina uspoređena je pomoću Fisherovog testa odnosno $\chi 2$-testa. Korelacija je utvrđena primjenom Spearmanovog testa korelacije zbog nenormalne raspodjele podataka. Za statističku obradu podataka koristio se računalni program „GraphPad Prism 4.00.“ Multipla regresijska analiza napravljena je primjenom programa „MedCalc Statistical Software 14.8.1.“, kako bi se odredio potencijalni utjecaj genetičkih i okolišnih čimbenika (nezavisne varijable) i njihove interakcije, na broj bodova na CAPS ljestvici kojom se određuje težina simptoma PTSP-a (zavisna varijabla). Za haplotipsku analizu korišteni su programi „Haploview 4.2.“ i „PLINK 1.07.“. Kriterij za značajnost u svim testovima bio je $p < 0.05$.

# 3. REZULTATI

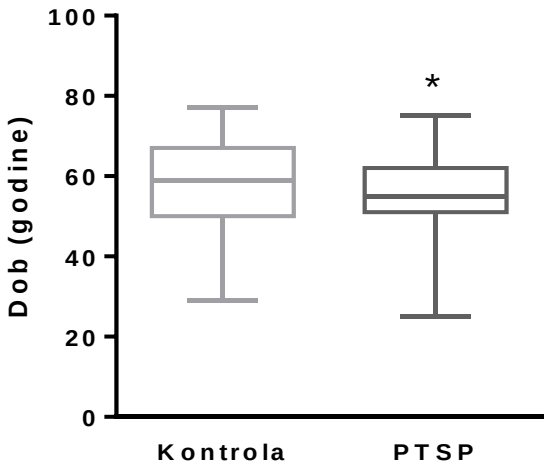
U istraživanje je uključeno ukupno 369 muških ispitanika i to 87 kontrolnih ispitanika i 282 ratnih veterana s dijagnozom PTSP-a. S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da dob ispitanika ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za analizu smo koristili neparametrijski Mann-Whithey test. Kao što je prikazano u Tablici 3. i Slici 5., analiza Mann-Whitney testom utvrdila je da se dob bolesnika s PTSP-om značajno razlikovala od dobi kontrolnih ispitanika (P=0.031; U=10394, Mann-Whitney test), odnosno da su bolesnici s PTSP-om bili statistički značajno mlađi od kontrolnih ispitanika.

**Tablica 3. Dob kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om**

| **Dob (godine)** | **Kontrolni ispitanici (n=87)** | **Bolesnici s PTSP-om (n=282)** |
|---|---|---|
| **Minimum** | 29.00 | 25.00 |
| **25% Percentila** | 50.00 | 51.00 |
| **Medijan** | 59.00 | 55.00 |
| **75% Percentila** | 67.00 | 62.00 |
| **Maksimum** | 77.00 | 75.00 |
| **Mann-Whithey test** | **U=10394, P=0.031*** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.

*P=0.031 u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Mann-Whitney test)




**Slika 5. Dob kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om uključenih u istraživanje**

Dob u godinama prikazana je kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.
*P=0.031 u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Mann-Whitney test)

### 4.1. Povezanost polimorfizama gena *MAOB* s PTSP-om

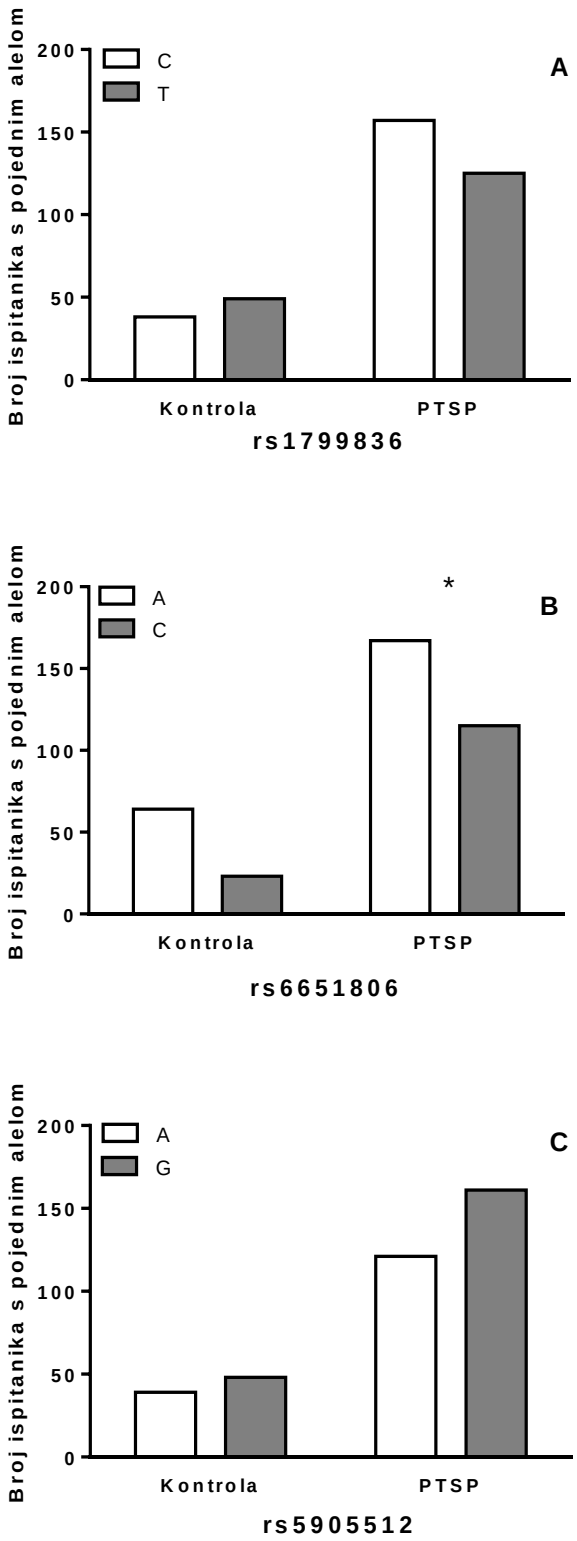
Kako bi utvrdili potencijalnu povezanost polimorfizama gena *MAO-B* s razvojem PTSP-a, u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om napravljena je genotipizacija s obzirom na polimorfizme rs1799836, rs6651806 i rs5905512. S obzirom na to da se gen *MAOB* nalazi na X kromosomu, a u istraživanje su uključeni isključivo muški ispitanici (koji imaju samo jedan X kromosom), bilo je moguće usporediti samo učestalost pojedinih alela, a ne i genotipova istraživanih polimorfizama gena *MAOB*.

Kao što je prikazano u Tablici 4 i Slici 6, kontrolni ispitanici i bolesnici s PTSP-om značajno su se razlikovali (P= 0.016; Fisherov test) u raspodjeli alela polimorfizma rs6651806 gena *MAOB*. Naime, u slučaju polimorfizma rs6651806, učestalost A alela bila je značajno niža, odnosno učestalost C alela bila je značajno viša u bolesnika s PTSP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4, Slika 6). S druge strane, kao što je također vidljivo u tablici 4 i slici 6, učestalost pojavljivanja pojedinih alela polimorfizama rs1799836 i rs5905512 gena *MAOB*, nije se značajno razlikovala između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s dijagnozom PTSP-a.

**Tablica 4. Učestalost pojavljivanja alela polimofizama gena *MAOB* u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om**

| **Polimorfizam** | **rs1799836** | | **rs6651806** | | **rs5905512** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Alel** | **C** | **T** | **A** | **C** | **A** | **G** |
| **Kontrolni ispitanici** | 38 (43.68 %) | 49 (56.32 %) | 64 (73.56 %) | 23 (26.44) | 39 (44.83 %) | 48 (55.17 %) |
| **Bolesnici s PTSP-om** | 157 (55.67 %) | 125 (44.33 %) | 167 (59.22 %) | 115 (40.78 %) | 121 (42.91 %) | 161 (57.09 %) |
| **Fisherov test** | **P=0.065** | | **P=0.016*** | | **P=0.805** | |

Vrijednosti su prikazane kao broj i postotak ispitanika u svakoj skupini.
*P=0.016 između nosioca A i C alela rs6651806 polimorfizma gena *MAOB* (Fisherov test)

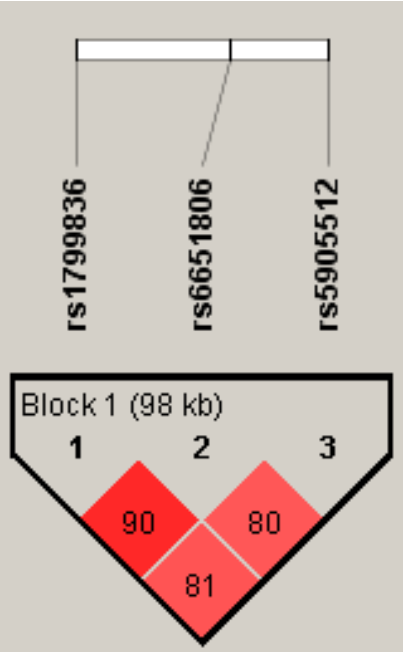



**Slika 6. Učestalost pojavljivanja alela polimofizama A) rs1799836, B) rs6651806, C) rs5905512 gena *MAOB* u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om**

Vrijednosti su prikazane kao broj ispitanika u svakoj skupini.

*P=0.016 između nosioca A i C alela rs6651806 polimorfizma gena MAOB (Fisherov test)

Program „Haploview version 4.2“ korišten je za utvrđivanje haplotipskog bloka polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* u svih ispitanika. Za navedene polimorfizme utvrđen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (engl. linkage disequilibrium, LD) (slika 7), gdje se LD vrijednost kretala između 80-90, što upućuje da se ova tri polimorfizma vrlo vjerojatno nasljeđuju zajedno u bloku.




**Slika 7. Prikaz LD vrijednosti između polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* dobiven pomoću programa Haploview (izvorna slika)**

Program „PLINK version 1.07“ korišten je za usporedbu frekvencija haplotipova u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om. Haplotipskom analizom utvrđeno je sedam najčešćih haplotipova u ispitivanom uzorku, a za 3 haplotipa (CCG, CAG i TAG) su učestalosti bile značajno različite između kontrolne skupine i skupine ratnih veterana s PTSP-om (Tablica 5). Kao što se vidi u Tablici 5, u slučaju haplotipa CCG učestalost pojavljivala bila je statistički značajno veća ($\chi2$=43.49, P=4.26 x $10^{-8}$, $\chi2$-test) u skupini bolesnika s PTSP-om nego u kontrolnoj skupini, dok je u slučaju haplotipova CAG ($\chi2$=29.01, P=7.21 x $10^{-5}$, $\chi2$-test) i TAG ($\chi2$=4.01, P=0.045, $\chi2$-test) učestalost bila značajno veća u skupini kontrolnih ispitanika u usporedbi sa skupinom bolesnika s PTSP-om.

**Tablica 5. Učestalost haplotipova za polimorfizme rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* u skupini kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om**

| Haplotip | Kontrolni ispitanici | Bolesnici s PTSP-om | $\chi 2$; P |
|---|---|---|---|
| **TAA** | 0.425 | 0.379 | **$\chi 2$=0.587; P=0.443** |
| **CCG** | 0.000 | 0.362 | **$\chi 2$=43.49; P=4.26 x $10^{-8}$ ****** |
| **CAG** | 0.414 | 0.145 | **$\chi 2$=29.01; P=7.21 x $10^{-5}$ ****** |
| **TAG** | 0.115 | 0.053 | **$\chi 2$=4.01; P=0.045 *** |
| **CCA** | 0.000 | 0.035 | **$\chi 2$=3.171; P=0.075** |
| **CAA** | 0.023 | 0.014 | **$\chi 2$=0.322; P=0.570** |
| **TCG** | 0.023 | 0.011 | **$\chi 2$=0.759; P=0.384** |

Vrijednosti su prikazane kao učestalost (frekvencija) pojavljivanja.

*P=0.045, ****P=4.26 x $10^{-8}$ ili P=7.21 x $10^{-5}$

## 4.2. Aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika i bolesnika a PTSP-om

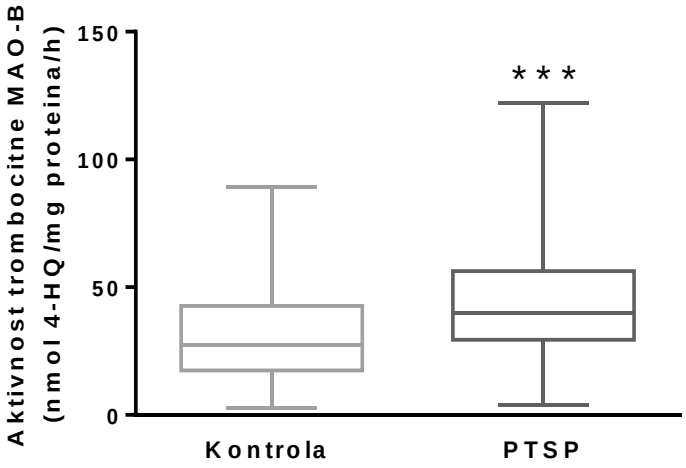
Aktivnost trombocitne MAO-B odredili smo u svih kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om. S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da aktivnost trombocitne MAO-B ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za analizu smo koristili neparametrijski Mann-Whithey test. Kao što je prikazano u Tablici 6 i Slici 8, utvrdili smo statistički značajnu razliku (P<0.0001, U=7452, Mann-Whithey test) u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s dijagnozom PTSP-a, odnosno bolesnici s PTSP-om imali su značajno višu aktivnost trombocitne MAO-B u usporedbi s kontrolnom skupinom.

**Tablica 6. Aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om**

| Aktivnost trombocitne MAO-B (nmol 4-HQ/mg proteina/h) | Kontrolni ispitanici (n=87) | Bolesnici s PTSP-om (n=282) |
|---|---|---|
| **Minimum** | 2.79 | 3.78 |
| **25% Percentila** | 17.40 | 29.48 |
| **Medijan** | 27.46 | 40.11 |
| **75% Percentila** | 42.63 | 56.27 |
| **Maksimum** | 89.02 | 121.90 |
| **Mann-Whithey test** | **U=7452, P<0.0001*** ** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.

*** P<0.0001 u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Mann-Whitney test)




**Slika 8. Aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om**

Aktivnosti su prikazane kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

***P<0.0001 u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney test)

### 4.3. Povezanost polimorfizama gena *MAOB* i aktivnosti trombocitne MAO-B

Kako bismo istražili potencijalnu povezanost polimorfizama gena *MAOB* i aktivnosti MAO-B u trombocitima, kontrolne ispitanike i bolesnike s PTSP-om podijelili smo na nosioce pojedinih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*. Kako je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da aktivnost trombocitne MAO-B ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za analizu smo koristili neparametrijski Kruskal-Wallis test i post-hoc Dunnov test višestruke usporedbe.

Kao što je prikazano u tablici 7 i slici 9, u slučaju sva tri istraživana polimorfizma gena *MAOB*, nismo utvrdili nikakve značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca različitih alela u kontrolnoj skupini, kao ni u skupini ratnih veterana s PTSP-om, ali su postojale značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca istih alela između kontrolnih ispitanika i ispitanika s PTSP-om.

Naime, u slučaju polimorfizma rs1799836 gena *MAOB*, kada smo usporedili četiri skupine (kontrolni ispitanici i ispitanici s PTSP-om podijeljeni na nosioce C i T alela), Kruskal-Wallis test pokazao je da postoje značajne razlike između skupina u aktivnosti trombocitne MAO-B ($P<0.0001$), (Tablica 7). Međutim, kao što je prikazano u tablici 7 i slici 9, Dunnov post-hoc test pokazao je da se aktivnost trombocitne MAO-B značajno ne razlikuje između nosioca C i T alela unutar kontrolne skupine ($P>0.9999$), kao niti unutar skupine bolesnika s PTSP-om ($P>0.9999$), upućujući da polimorfizam rs1799836 gena *MAOB* ne utječe na aktivnost MAO-B u trombocitima. S druge strane, Dunnov test je utvrdio da postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca C u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om ($P=0.0074$), kao i između nosioca T u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om ($P<0.0001$), dodatno potvrđujući primijećenu razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om (Tablica 7, Slika 9).

I u slučaju polimorfizma rs6651806 gena *MAOB*, kada smo usporedili četiri skupine (kontrolni ispitanici i ispitanici s PTSP-om podijeljeni na nosioce A i C alela), Kruskal-Wallis test pokazao je da postoje značajne razlike između skupina u aktivnosti trombocitne MAO-B ($P<0.0001$), (Tablica 7). Međutim, kao što je prikazano u tablici 7 i slici 9, i u ovom slučaju Dunnov post-hoc test pokazao je da se aktivnost trombocitne MAO-B značajno ne razlikuje između nosioca A i C alela unutar kontrolne skupine ($P>0.9999$), kao niti unutar skupine

bolesnika s PTSP-om (P=0.2713), upućujući da ni polimorfizam rs6651806 gena *MAOB* ne utječe na aktivnost MAO-B u trombocitima. S druge strane, Dunnov test je utvrdio da postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca A u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om (P=0.0016), kao i između nosioca C u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om (P=0.0002), dodatno potvrđujući primijećenu razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om (Tablica 7, Slika 9).

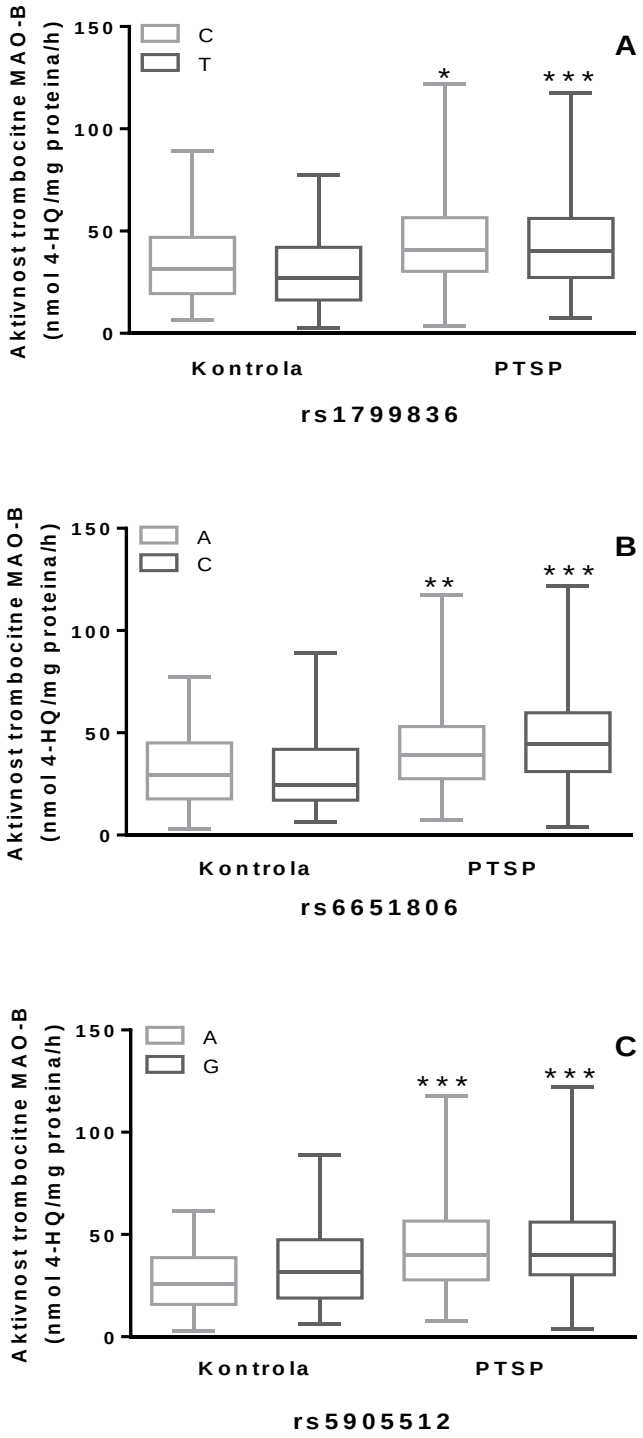
Vezano uz polimorfizam rs5905512 gena MAOB, kada smo usporedili četiri skupine (kontrolni ispitanici i ispitanici s PTSP-om podijeljeni na nosioce A i G alela), Kruskal-Wallis test pokazao je da postoje značajne razlike između skupina u aktivnosti trombocitne MAO-B (P<0.0001), (Tablica 7). Međutim, i u ovom slučaju Dunnov post-hoc test pokazao je da se aktivnost trombocitne MAO-B značajno ne razlikuje između nosioca A i G alela unutar kontrolne skupine (P=0.5930), kao niti unutar skupine bolesnika s PTSP-om (P>0.9999), upućujući da ni polimorfizam rs5905512 gena MAOB ne utječe na aktivnost MAO-B u trombocitima. S druge strane, Dunnov test je utvrdio da postoji značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca A u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om (P<0.0001), kao i između nosioca G u skupini kontrolnih ispitanika i skupini bolesnika s PTSP-om (P<0.0001), dodatno potvrđujući primijećenu razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om (Tablica 7, Slika 9).

**Tablica 7. Aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om podijeljenih prema nosiocima pojedinih alela polimorfizama gena *MAOB***

| **Aktivnost trombocitne MAO-B (nmol 4-HQ/mg proteina/h)** | **Kontrolni ispitanici (n=87)** | | **Bolesnici s PTSP-om (n=282)** | |
|---|---|---|---|---|
| **rs1799836 polimorfizam** | **C alel** | **T alel** | **C alel** | **T alel** |
| **Minimum** | 6.40 | 2.79 | 3.78 | 7.54 |
| **25% Percentila** | 19.39 | 16.32 | 30.28 | 27.26 |
| **Medijan** | 31.43 | 27.15 | 40.51 | 40.02 |
| **75% Percentila** | 46.99 | 42.10 | 56.57 | 56.15 |
| **Maksimum** | 89.02 | 77.32 | 121.90 | 117.60 |
| **F= 32.11, P<0.0001*** Kruskal-Wallis test** | **P>0.999 Dunnov test** | | **P>0.999 Dunnov test** | |
| **rs6651806 polimorfizam** | **A alel** | **C alel** | **A alel** | **C alel** |
| **Minimum** | 2.79 | 6.40 | 7.54 | 3.78 |
| **25% Percentila** | 17.69 | 17.02 | 27.52 | 31.03 |
| **Medijan** | 29.31 | 24.35 | 39.17 | 44.51 |
| **75% Percentila** | 45.05 | 41.98 | 53.01 | 59.79 |
| **Maksimum** | 77.32 | 89.02 | 117.60 | 121.90 |
| **F=35.12, P<0.0001*** Kruskal-Wallis test** | **P>0.999 Dunnov test** | | **P=0.271 Dunnov test** | |
| **rs5905512 polimorfizam** | **A alel** | **G alel** | **A alel** | **G alel** |
| **Minimum** | 2.79 | 6.40 | 7.54 | 3.78 |
| **25% Percentila** | 15.76 | 18.90 | 27.84 | 30.25 |
| **Medijan** | 25.68 | 31.43 | 40.06 | 40.12 |
| **75% Percentila** | 38.67 | 47.42 | 56.58 | 56.02 |
| **Maksimum** | 61.53 | 89.02 | 117.60 | 121.90 |
| **F= 33.44, P<0.0001*** Kruskal-Wallis test** | **P=0.593 Dunnov test** | | **P>0.999 Dunnov test** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.

*** P<0.0001 između sve četiri skupine (Kruskal-Wallis test)




**Slika 9. Aktivnost trombocitne MAO-B u kontrolnih ispitanika i bolesnika s PTSP-om podijeljenih prema nosiocima pojedinih alela polimorfizama A) rs1799836, B) rs6651806, C) rs5905512 gena *MAOB***

Aktivnosti su prikazane kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

* P<0.01, **P<0.002, ***P<0.0002 u odnosu na nosioce istog alela u kontrolnoj skupini (Dunnov test nakon Kruskal-Wallis testa)

## 4.4. Povezanost polimorfizama gena *MAOB* sa težinom simptoma u ratnih veterana s PTSP-om

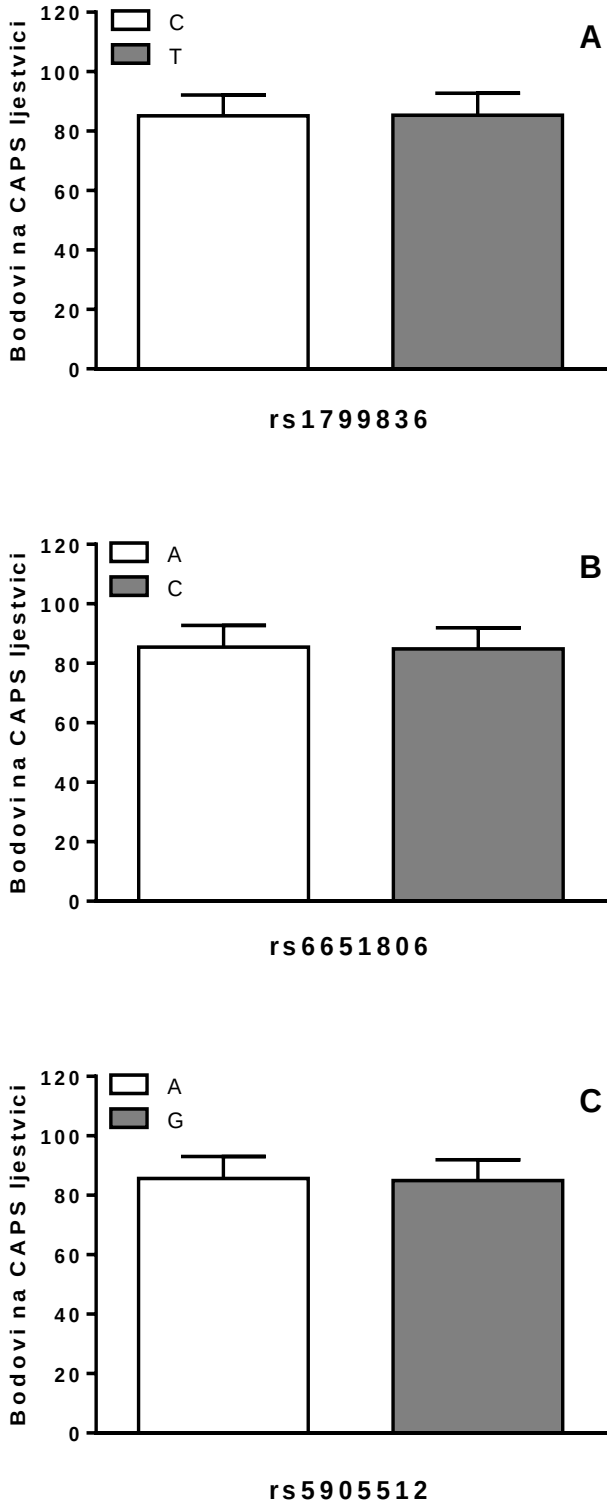
Svim bolesnicima s dijagnozom PTSP-a težina simptoma utvrđena je primjenom Kliničke ljestvice za PTSP (engl. Clinician-Administered PTSD Scale, CAPS). Kako je broj bodova na CAPS ljestvici pratio normalnu raspodjelu podataka, primijenili smo Student t-test za usporedbu bodova na CAPS ljestvici između nosioca različitih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*. Kao što je prikazano u Tablici 8. i Slici 10., broj bodova na CAPS ljestvici nije se statistički značajno razlikovao između nosioca alela C i T polimorfizma rs1799836 (t=0.181, P=0.856, Student t-test), između nosioca alela A i C polimorfizma rs6651806 (t=0.687, P=0.492, Student t-test), kao niti nosioca alela A i G polimorfizma rs5905512 (t=0.902, P=0.368, Student t-test) gena *MAOB*.

**Tablica 8. Broj bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om podijeljenih prema nosiocima pojedinih alela polimorfizama gena *MAOB***

| **Bolesnici s PTSP-om (n=282)** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Polimorfizam** | **rs1799836** | | **rs6651806** | | **rs5905512** | |
| **Broj bodova na CAPS ljestvici** | **C alel** | **T alel** | **A alel** | **C alel** | **A alel** | **G alel** |
| **Srednja vrijednost** | 85.17 | 85.33 | 85.49 | 84.89 | 85.69 | 84.91 |
| **Standardna devijacija** | 6.98 | 7.44 | 7.24 | 7.10 | 7.39 | 7.01 |
| **Standardna pogreška** | 0.557 | 0.665 | 0.560 | 0.662 | 0.672 | 0.552 |
| **Student t-test** | **t=0.181, P=0.856** | | **t=0.687, P=0.492** | | **t=0.902, P=0.368** | |

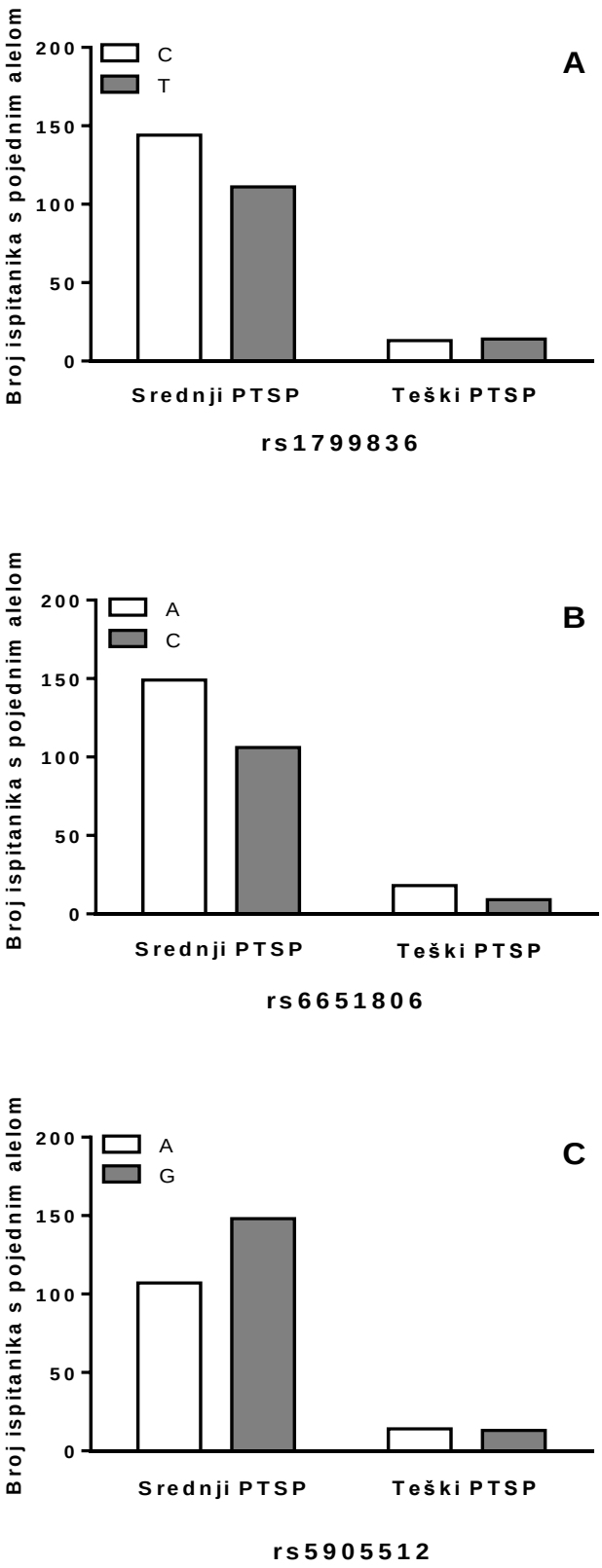
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, standardna devijacija i standardna pogreška.

Prema bodovima na CAPS ljestvici bolesnici s PTSP-om mogu se podijeliti slijedeće kategorije: bolesnike s elementima PTSP-a (do 45 bodova), lakim PTSP-om (45-65 bodova), srednjim PTSP-om (66-95 bodova) i teškim PTSP-om (iznad 95 bodova). Međutim, u našem istraživanju bolesnici s PTSP-om imali su prema broju bodova na CAPS ljestvici srednji i teški PTSP. Kada smo ratne veterane s PTSP-om podijelili prema bodovima na CAPS ljestvici na kategorije bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om primjenom Fisherovog testa nismo uočili statistički značajne razlike u raspodjeli nosioca alela polimofizama rs1799836 (P=0.423), rs6651806 (P=0.537) i rs5905512 (P=0.414) gena *MAOB* (Tablica 9, Slika 11).




**Slika 10. Broj bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om podijeljenih prema nosiocima pojedinih alela polimorfizama A) rs1799836, B) rs6651806, C) rs5905512 gena *MAOB***

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.




**Slika 11. Učestalost pojavljivanja alela polimofizama A) rs1799836, B) rs6651806, C) rs5905512 gena *MAOB* u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

Vrijednosti su prikazane kao broj ispitanika u svakoj skupini.

**Tablica 9. Učestalost pojavljivanja alela polimofizama gena *MAOB* u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| **Polimorfizam** | **rs1799836** | | **rs6651806** | | **rs5905512** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Alel** | **C** | **T** | **A** | **C** | **A** | **G** |
| **Srednji PTSP** | 144 (56.47 %) | 111 (43.53 %) | 149 (58.43 %) | 106 (41.57 %) | 107 (41.96 %) | 148 (58.04 %) |
| **Teški PTSP** | 13 (48.15 %) | 14 (51.85 %) | 18 (66.67 %) | 9 (33.33 %) | 14 (51.85 %) | 13 (48.15 %) |
| **Fisherov test** | **P=0.423** | | **P=0.537** | | **P=0.414** | |

Vrijednosti su prikazane kao broj i postotak ispitanika u svakoj skupini.

Program „PLINK version 1.07“ korišten je za usporedbu frekvencija haplotipova u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om. Haplotipska analiza za sedam najčešćih haplotipova u ispitivanom uzorku, nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti haplotipova između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om (Tablica 10).

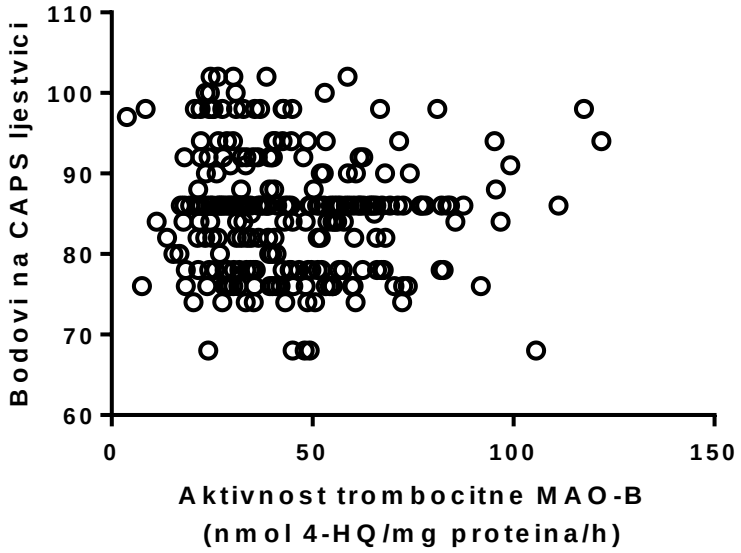
**Tablica 10. Učestalost haplotipova za polimorfizme rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* u skupini bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| **Haplotip** | **Srednji PTSP** | **Teški PTSP** | **$\chi 2$; P** |
|---|---|---|---|
| **CCA** | 0.035 | 0.037 | **$\chi 2$=0.002; P=0.963** |
| **TAA** | 0.372 | 0.444 | **$\chi 2$=0.536; P=0.464** |
| **CAA** | 0.012 | 0.037 | **$\chi 2$=1.115; P=0.291** |
| **TCG** | 0.012 | 0.000 | **$\chi 2$=0.321; P=0.571** |
| **CCG** | 0.369 | 0.296 | **$\chi 2$=0.553; P=0.457** |
| **TAG** | 0.051 | 0.074 | **$\chi 2$=0.258; P=0.611** |
| **CAG** | 0.149 | 0.111 | **$\chi 2$=0.282; P=0.595** |

Vrijednosti su prikazane kao učestalost (frekvencija) pojavljivanja.

### 4.5. Povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B i težine simptoma PTSP-a

U ispitanika s PTSP-om istražili smo korelaciju između aktivnosti trombocitne MAO-B i bodova na CAPS ljestvici. Kako je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da aktivnost trombocitne MAO-B ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za analizu smo koristili neparametrijski Spearmanov test korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju (r=-0.063, P=0.292) između aktivnosti trombocitne MAO-B i bodova na CAPS ljestvici u ratnih veterana s PTSP-om (Slika 12).




**Slika 12. Korelacija između aktivnosti trombocitne MAO-B i bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om**

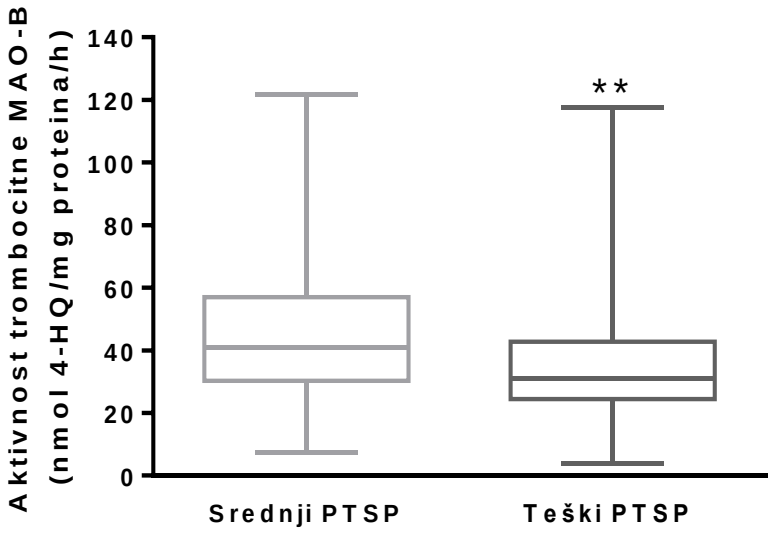
Kako je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da aktivnost trombocitne MAO-B ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu aktivnosti trombocitne MAO-B između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om koristili smo neparametrijski Mann-Whitney test. Kao što se može vidjeti iz Tablice 11 i Slike 13, kada smo podijelili ratne veterane na one sa srednjim i teškim PTSP-om, utvrdili smo statistički značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B (P=0.009, U= 2399, Mann-Whitney test).

**Tablica 11. Aktivnost trombocitne MAO-B u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| Aktivnost trombocitne MAO-B (nmol 4-HQ/mg proteina/h) | Bolesnici sa srednjim PTSP-om | Bolesnici sa teškim PTSP-om |
|---|---|---|
| **Minimum** | 7.54 | 3.78 |
| **25% Percentila** | 30.30 | 24.44 |
| **Medijan** | 40.74 | 30.86 |
| **75% Percentila** | 56.97 | 42.76 |
| **Maksimum** | 121.90 | 117.60 |
| **Mann-Whithey test** | **U= 2399, P=0.009**** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.

** P<0.009 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)



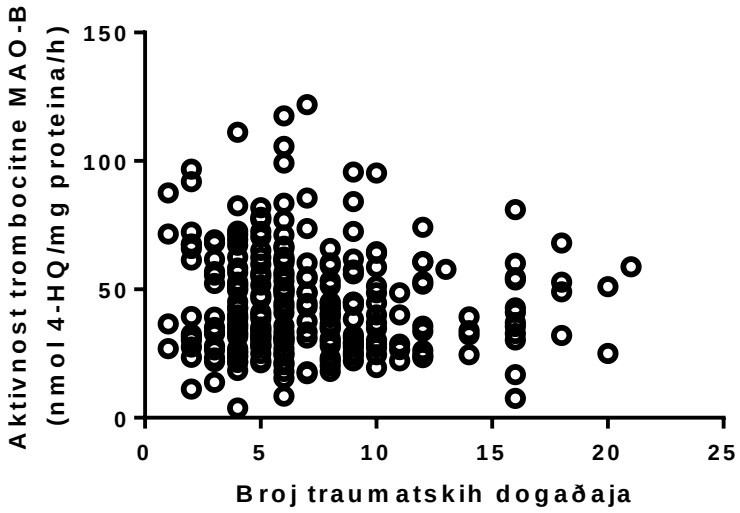

**Slika 13. Aktivnost trombocitne MAO-B u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

Aktivnosti su prikazane kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

**P=0.009 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)

## 4.6. Povezanost broja traumatskih događaja i aktivnosti trombocitne MAO-B u bolesnika s PTSP-om

Većina ratnih veterana s PTSP-om imala je više traumatskih događaja (median=6, minimum=1, maksimum=21), koji su prethodili i za koje se smatra da su doprinijeli razvoju PTSP-a. Stoga smo u ispitanika s PTSP-om istražili korelaciju između broja traumatskih događaja za koje se smatra da su doveli do razvoja PTSP-a i aktivnosti trombocitne MAO-B. S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da broj traumatskih događaja kao i aktivnost trombocitne MAO-B ne prate normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu broja traumatskih događaja i aktivnosti trombocitne MAO-B koristili smo neparametrijski Spearmanov test korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju (r=-0.0176, P=0.769) između broja traumatskih događaja i aktivnosti trombocitne MAO-B u ratnih veterana s PTSP-om (Slika 14.).

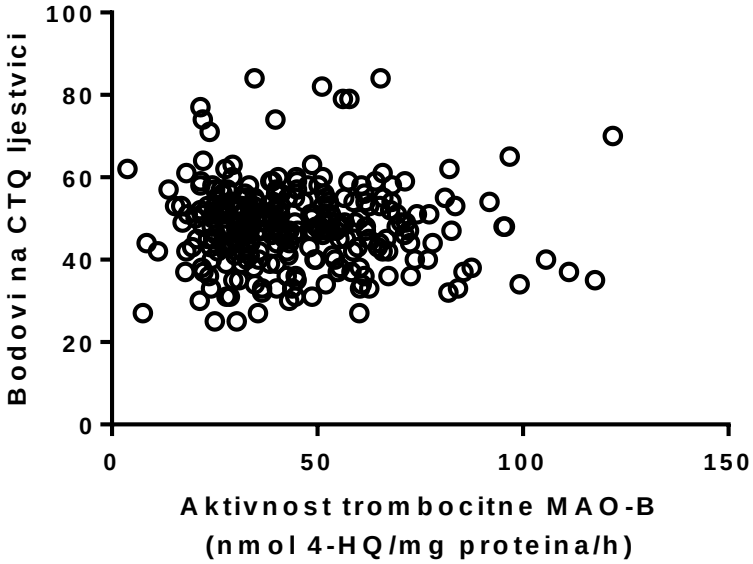



**Slika 14. Korelacija između aktivnosti trombocitne MAO-B i broja traumatskih događaja u bolesnika s PTSP-om**

## 4.7. Povezanost traume u djetinjstvu i aktivnosti trombocitne MAO-B u bolesnika s PTSP-om

S obzirom na to da se smatra da vulnerabilnosti osoba za razvoj PTSP-a može doprinijeti i trauma u djetinjstvu, svim bolesnicima sa dijagnozom PTSP-a trauma u djetinjstvu evaluirana je primjenom upitnika za traumu u djetinjstvu (engl. Childhood Trauma Questionnaire-CTQ). U ispitanika s PTSP-om istražili smo korelaciju između bodova na CTQ ljestvici i aktivnosti trombocitne MAO-B. S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti

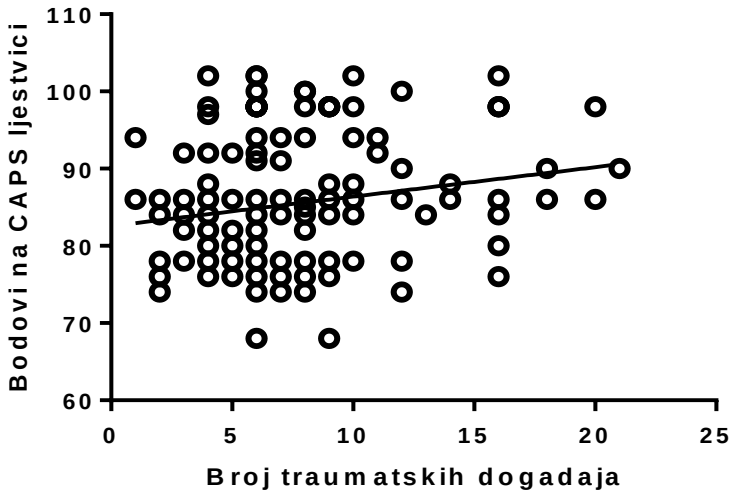
utvrđeno da broj bodova na CTQ ljestvici kao i aktivnost trombocitne MAO-B ne prate normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu bodova na CTQ ljestvici i aktivnosti trombocitne MAO-B koristili smo neparametrijski Spearmanov test korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju (r=-0.049, P=0.415) između bodova na CTQ ljestvici i aktivnosti trombocitne MAO-B u ratnih veterana s PTSP-om (Slika 15.).




**Slika 15. Korelacija između bodova na CTQ ljestvici i aktivnosti trombocitne MAO-B u bolesnika s PTSP-om**

### 4.8. Povezanost broja traumatskih događaja i težine simptoma PTSP-a

U ispitanika s PTSP-om istražili smo korelaciju između broja traumatskih događaja i bodova na CAPS ljestvici. S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da broj traumatskih događaja ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu broja traumatskih događaja i bodova na CAPS ljestvici koristili smo neparametrijski Spearmanov test korelacije. Rezultati su pokazali statistički značajnu korelaciju (r=0.213, P=0.0003) između broja traumatskh događaja i bodova na CAPS ljestvici u ratnih veterana s PTSP-om (Slika 16).




**Slika 16. Korelacija između broja traumatskih događaja i broja bodova na CAPS ljestvici**

***P=0.0003 (Spearmanov test korelacije)

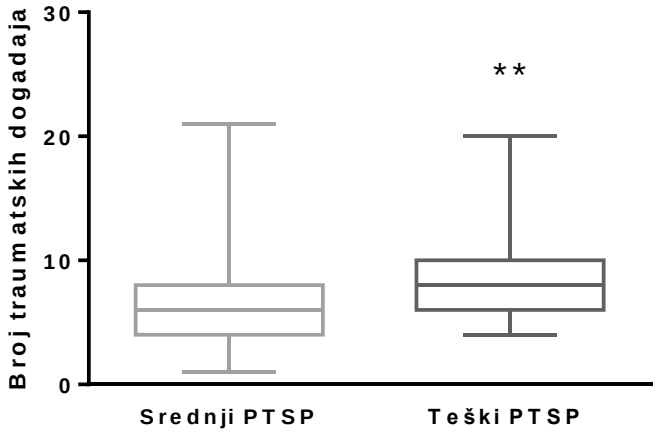
Kako je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da broj traumatskih događaja ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu broja traumatskih događaja između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om koristili smo neparametrijski Mann-hitney test. Kada smo podijelili bolesnike na one sa srednjim i teškim PTSP-om, utvrdili smo statistički značajne razlike u broju traumatskih događaja (Tablica 12., Slika 17.), odnosno bolesnici sa teškim PTSP-om imali su veći broj traumatskih događaja u usporedbi sa bolesnicima s srednjim PTSP-om (U=2319, P=0.0046, Mann-Whitney test).

**Tablica 12. Broj traumatskih događaja u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| **Broj traumatskih događaja** | **Bolesnici sa srednjim PTSP-om** | **Bolesnici sa teškim PTSP-om** |
|---|---|---|
| **Minimum** | 1.00 | 4.00 |
| **25% Percentila** | 4.00 | 6.00 |
| **Medijan** | 6.00 | 8.00 |
| **75% Percentila** | 8.00 | 10.00 |
| **Maksimum** | 21.00 | 20.00 |
| **Mann-Whithey test** | **U=2319, P=0.0046**** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.

** P=0.0046 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)



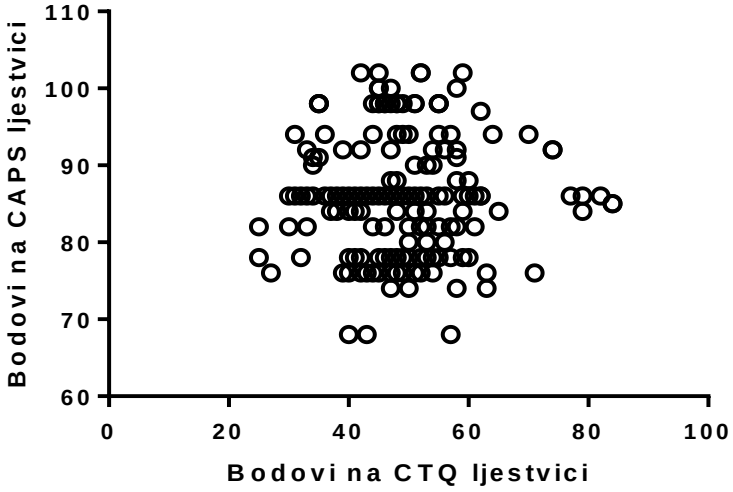

**Slika 17. Broj traumatskih događaja u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om.**

Vrijednosti su prikazane kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

** P=0.0046 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)

### 4.9. Povezanost traume u djetinjstvu i težine simptoma PTSP-a

U ispitanika s PTSP-om istražili smo korelaciju između bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici. S obzirom da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da bodovi na CTQ ljestvici ne prate normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici koristili smo neparametrijski Spearmanov test korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju (r=0.050, P=0.402) između aktivnosti bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici u ratnih veterana s PTSP-om (Slika 18.).



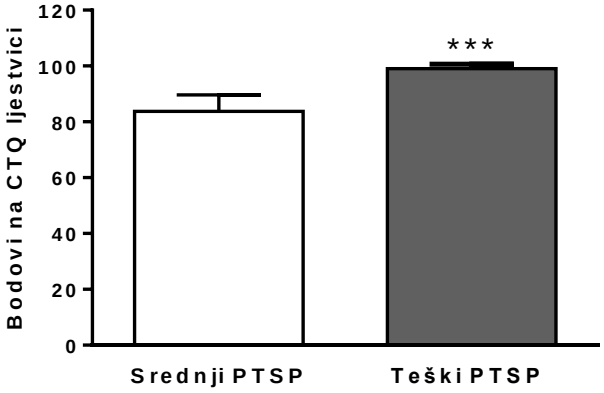

**Slika 18. Korelacija između bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om**

Za usporedbu bodova CTQ ljestvice između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om koristili smo parametrijski Student t-test, jer je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da bodovi na CTQ ljestvici prate normalnu raspodjelu vrijednosti. Kako je prikazano u Tablici 13. i Slici 19., između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om, utvrdili smo statistički značajne razlike u broju bodova na CTQ ljestvici (P<0.0001, Student t-test).

**Tablica 13. Broj bodova na CTQ ljestvici u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| **Broj bodova na CTQ ljestvici** | **Bolesnici sa srednjim PTSP-om** | **Bolesnici sa teškim PTSP-om** |
|---|---|---|
| **Srednja vrijednost** | 83.78 | 99.00 |
| **Standardna devijacija** | 5.87 | 1.64 |
| **Standardna pogreška** | 0.367 | 0.316 |
| **Student t-test** | **P<0.0001*** ** | |

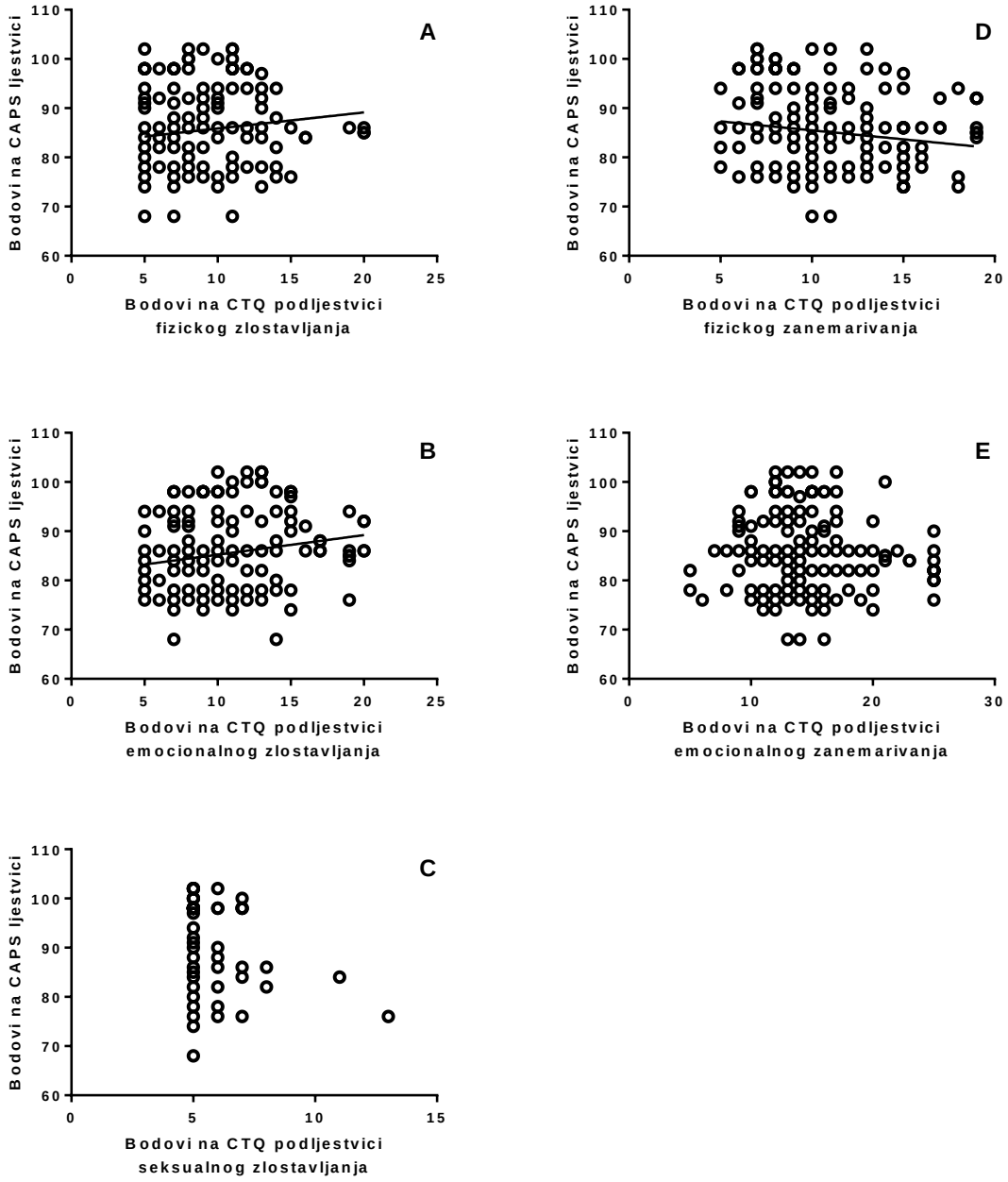
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, standardna devijacija i standardna pogreška.
***P<0.0001 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Student t-test)




**Slika 19. Bodovi na CTQ ljestvici u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
***P<0.0001 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Student t-test)

Kako CTQ ljestvica procijenjuje izlaganje fizičkom, seksualnom i emocionalnom zlostavljanju, te fizičkom i emocionalnom zanemarivanju u djetinjstvu, u ispitanika s PTSP-om istražili smo korelacije između bodova na CTQ podljestvicama i bodova na CAPS ljestvici. S obzirom da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da bodovi na CTQ podljestvicama ne prate normalnu raspodjelu vrijednosti u našem uzorku, za usporedbu bodova na CTQ podljestvicama i bodova na CAPS ljestvici koristili smo neparametrijski Spearmanov

test korelacije. Utvrdili smo značajnu korelaciju bodovima na CAPS ljestvici sa bodovima na CTQ podljestvici fizičkog zlostavljanja (r=0.183, P=0.002), emocionalnog zlostavljanja (r=0.206, P=0.0005) i fizičkog zanemarivanja (r=-0.1803, P=0.0024), ali ne i sa bodovima na CTQ podljestvici seksualnog zlostavljanja (r=0.052, P=0.384) i emocionalnog zanemarivanja (r=-0.0298, P=0.619) (Slika 20).




**Slika 20. Korelacija između bodova na CAPS ljestvici i bodova na CTQ podljestvici A) fizičkog zlostavljanja **P=0.002, B) emocionalnog zlostavljanja ***P=0.0005, C) seksualnog zlostavljanja, D) fizičkog zanemarivanja**P=0.0024, E) emocionalnog zlostavljanja, u bolesnika s PTSP-om**

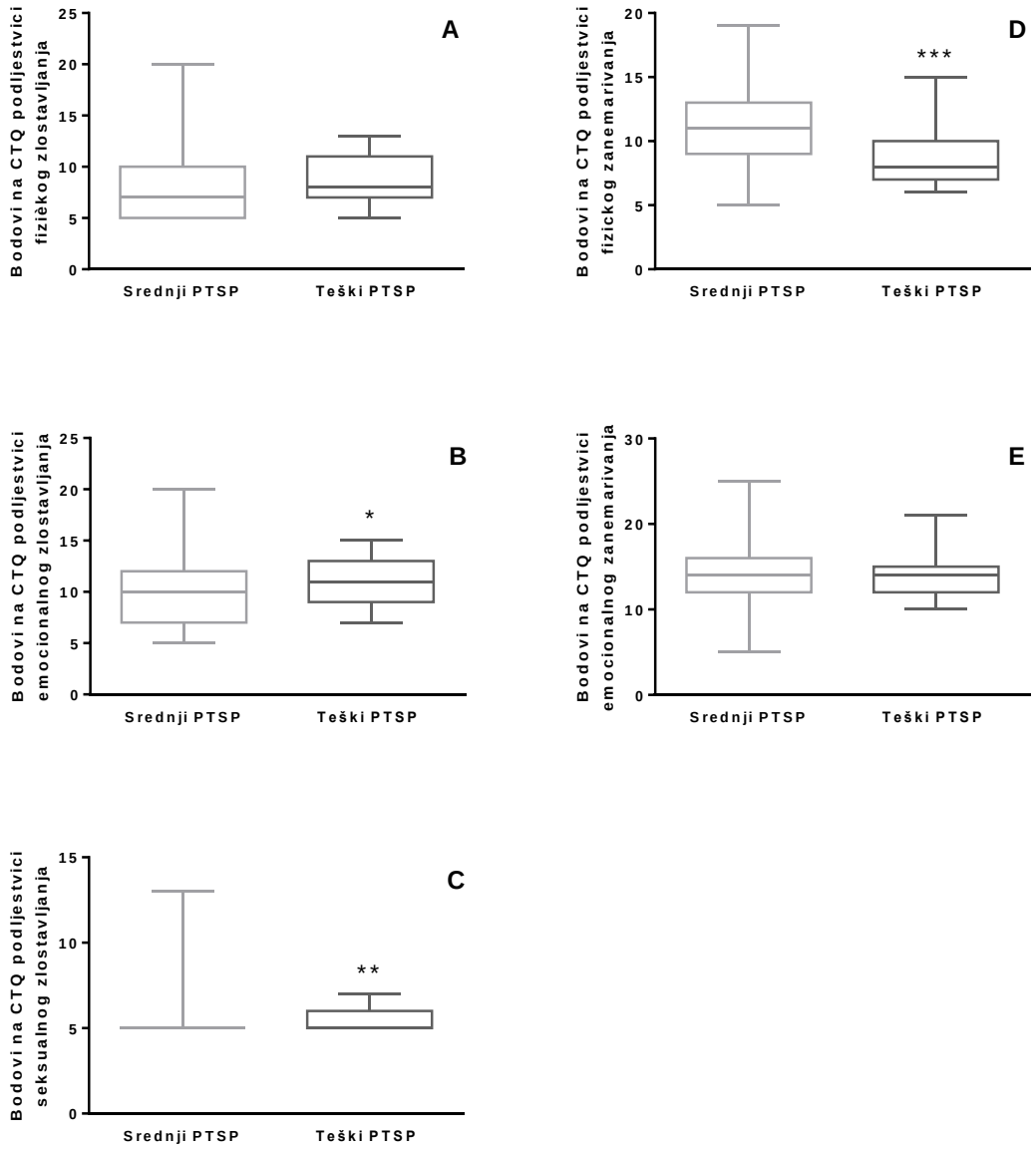
**Tablica 14. Bodovi na CTQ podljestvicama u bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om**

| Broj bodova na CTQ podljestvicama | | Bolesnici sa srednjim PTSP-om | Bolesnici s teškim PTSP-om |
|---|---|---|---|
| **CTQ podljestvica fizičkog zlostavljanja** | **Minimum, maksimun** | 5.00, 20.00 | 5.00, 13.00 |
| | **Medijan** | 7.00 | 8.00 |
| | **25% Percentila, 75% Percentila** | 5.00, 10.00 | 7.00,11.00 |
| | **Mann-Whithey test** | **U=2744, P=0.0745** | |
| **CTQ podljestvica emocionalnog zlostavljanja** | **Minimum, maksimun** | 5.00, 20.00 | 7.00, 15.00 |
| | **Medijan** | 10.00 | 11.00 |
| | **25% Percentila, 75% Percentila** | 7.00, 12.00 | 9.00, 13.00 |
| | **Mann-Whithey test** | **U=2559, P=0.0269*** | |
| **CTQ podljestvica seksualnog zlostavljanja** | **Minimum, maksimun** | 5.00, 13.00 | 5.00, 7.00 |
| | **Medijan** | 5.00 | 5.00 |
| | **25% Percentila, 75% Percentila** | 5.00, 5.00 | 5.00, 6.00 |
| | **Mann-Whithey test** | **U= 2806, P=0.004**** | |
| **CTQ podljestvica fizičkog zanemarivanja** | **Minimum, maksimun** | 5.00, 19.00 | 6.00, 15.00 |
| | **Medijan** | 11.00 | 8.00 |
| | **25% Percentila, 75% Percentila** | 9.00, 13.00 | 7.00, 10.00 |
| | **Mann-Whithey test** | **U=2050, P=0.0004***** | |
| **CTQ podljestvica emocionalnog zanemarivanja** | **Minimum, maksimun** | 5.00, 25.00 | 10.00, 21.00 |
| | **Medijan** | 14.00 | 14.00 |
| | **25% Percentila, 75% Percentila** | 12.00, 16.00 | 12.00, 15.00 |
| | **Mann-Whithey test** | **U=3401, P=0.9175** | |

Vrijednosti su prikazane kao medijan, minimum, maksimum, 25 i 75% percentila.
*P=0.0269, **P=0.004, ***P=0.0004 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)

S obzirom na to da je primjenom D'Agostino & Pearson testa normalnosti utvrđeno da broj bodova na CTQ podljestvicama ne prati normalnu raspodjelu vrijednosti kada ratne veterane podijelimo na bolesnike sa srednjim i teškim PTSP-om, za njihovu usporedbu koristili smo neparametrijski Mann-Whitney test. Statistički značajne razlike između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om utvrđene su u bodovima CTQ podljestvice emocionalnog zlostavljanja

(U=2559, P=0.0269*, Mann-Whitney test), seksualnog zlostavljanja (U= 2806, P=0.004**, Mann-Whitney test) i fizičkog zenemarivanja (U=2050, P=0.0004***, Mann-Whitney test), dok u bodovima CTQ podljestvice fizičkog zlostavljanja (U=2744, P=0.0745, Mann-Whitney test) i emocionalnog zanemarivanja (U=3401, P=0.9175, Mann-Whitney test) nije bilo statistički značajnih razlika između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om (Tablica 14., Slika 21.).




**Slika 21. Bodovi na CTQ podljestvici A) fizičkog zlostavljanja, B) emocionalnog zlostavljanja, C) seksualnog zlostavljanja, D) fizičkog zanemarivanja, E) emocionalnog zlostavljanja, u bolesnika s PTSP-om**

Vrijednosti su prikazane kao medijan sa minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

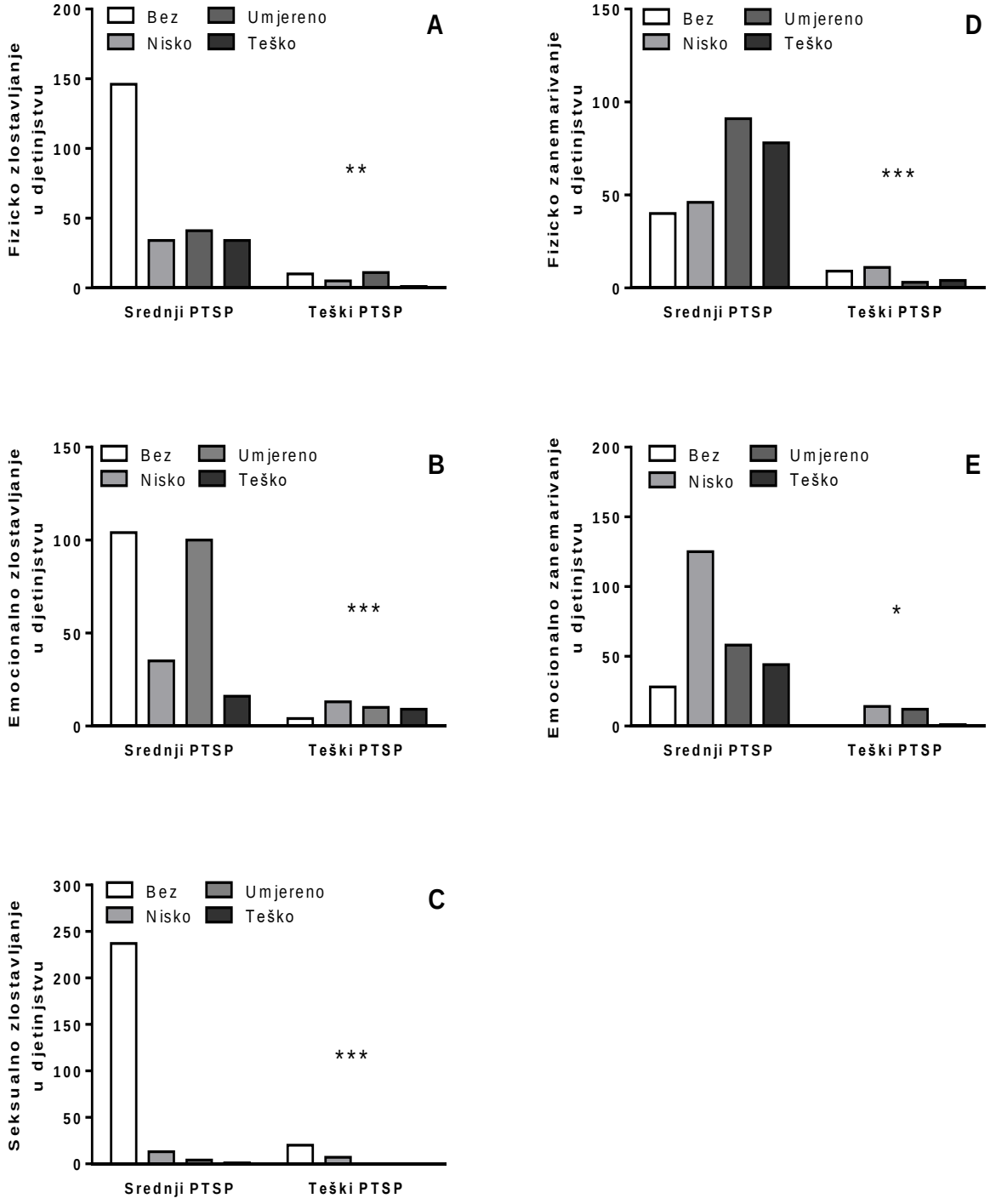
*P=0.0269, **P=0.004,***P=0.0004 u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om (Mann-Whitney test)

**Tablica 15. Bolesnici sa srednjim i teškim PTSP-om podijeljeni prema težini zlostavljanja/zanemarivanja u djetinjstvu**

| **Težina zlostavljanja/zanemarivanja u djetinjstvu (bodovi CTQ podljestvice)** | | **Bolesnici sa srednjim PTSP-om (n=255)** | **Bolesnici s teškim PTSP-om (n=27)** |
|---|---|---|---|
| **Fizičko zlostavljanje u djetinjstvu** | **Nema (5-7)** | 146 (57.25%) | 10 (37.04%) |
| | **Nisko (8-9)** | 34 (13.33%) | 5 (18.52%) |
| | **Umjereno (10-12)** | 41 (16.08%) | 11 (40.74%) |
| | **Teško (≥ 13)** | 34 (13.33%) | 1 (3.70%) |
| | **χ2-test** | **χ2=12.16, P=0.0069**** | |
| **Emocionalno zlostavljanje u djetinjstvu** | **Nema (5-8)** | 104 (40.78%) | 4 (14.81%) |
| | **Nisko (9-12)** | 35 (13.72%) | 13 (48.15%) |
| | **Umjereno (13-15)** | 100 (39.22%) | 10 (37.04%) |
| | **Teško (≥ 16)** | 16 (6.27%) | 0 (0.00%) |
| | **χ2-test** | **χ2=23.02, P< 0.0001***** | |
| **Seksualno zlostavljanje u djetinjstvu** | **Nema (5)** | 237 (92.94%) | 20 (74.07%) |
| | **Nisko (6-7)** | 13 (5.10%) | 7 (25.93%) |
| | **Umjereno (8-12)** | 4 (1.57%) | 0 (0.00%) |
| | **Teško (≥ 13)** | 1 (0.39%) | 0 (0.00%) |
| | **χ2-test** | **χ2=16.42, P=0.0009***** | |
| **Fizičko zanemarivanje u djetinjstvu** | **Nema (5-7)** | 40 (15.69%) | 9 (33.33%) |
| | **Nisko (8-9)** | 46 (18.04%) | 11 (40.74%) |
| | **Umjereno (10-12)** | 91 (35.69%) | 3 (11.11%) |
| | **Teško (≥ 13)** | 78 (30.59%) | 4 (14.81%) |
| | **χ2-test** | **χ2=17.11, P=0.0007***** | |
| **Emocionalno zanemarivanje u djetinjstvu** | **Nema (5-9)** | 28 (10.98%) | 0 (0.00%) |
| | **Nisko (10-14)** | 125 (49.02%) | 14 (51.85%) |
| | **Umjereno (15-17)** | 58 (22.74%) | 12 (44.44%) |
| | **Teško (≥ 18)** | 44 (17.25%) | 1 (3.70%) |
| | **χ2-test** | **χ2=10.45, P=0.0151*** | |

Vrijednosti su prikazane kao broj i postotak ispitanika u svakoj skupini.

*P=0.0151, ** P=0.0069, *** P=0.0007 ili P=0.0009 ili P< 0.0001 između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om (χ2-test)




**Slika 22. Bolesnici sa srednjim i teškim PTSP-om podijeljeni prema težini A) fizičkog zlostavljanja B) emocionalnog zlostavljanja C) seksualnog zlostavljanja D) fizičkog zanemarivanja E) emocionalnog zanemarivanja u djetinjstvu**

Vrijednosti su prikazane kao broj ispitanika u svakoj skupini.

*P=0.0151, ** P=0.0069, *** P=0.0007 ili P=0.0009 ili P< 0.0001 između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om ($\chi2$-test)

Bolesnike sa srednjim i teškim PTSP-om podijelili smo također prema bodovima na CTQ podljestvicama fizičkog, seksualnog i emocionalnog zlostavljanja, kao i fizičkog i emocionalnog zanemarivanja na ispitanike bez, s niskim, umjerenim i teškim zlostavljanjem/zanemarivanjem u djetinjstvu. Primjenom $\chi2$-testa utvrdili smo statistički značajne razlike u raspodjeli bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om podijeljenih prema težini fizičkog ($\chi2$=12.16, P=0.0069**), emocionalnog ($\chi2$=23.02, P< 0.0001***) i seksualnog ($\chi2$=16.42, P=0.0009***) zlostavljanja u djetinjstvu, kao i fizičkog ($\chi2$=17.11, P=0.0007***) i emocionalnog ($\chi2$=10.45, P=0.0151*) zanemarivanja u djetinjstvu. Kao što se može vidjeti u Tablici 15. i na Slici 22., u usporedbi sa bolesnicima sa srednjim PTSP-om, bolesnici s teškim PTSP-om češće su bili žrtve fizičkog (62.96% vs. 42.74%), emocionalnog (85.19% vs. 59.21%) i seksualnog (25.93% vs. 7.06%) zlostavljanja, kao i emocionalnog zanemarivanja (100.00% vs 89.01%) i to posebice umjerenog fizičkog, niskog emocionalnog i seksualnog zlostavljanja, te umjerenog emocionalnog zanemarivanja u djetinjstvu. Neočekivano, bolesnici sa srednjim PTSP-om bili su češće žrtve fizičkog zanemarivanja (84.32% vs. 66.66%) i to posebice umjerenog i teškog zanemarivanja u djetinjstvu u usporedbi sa bolesnicima sa teškim PTSP-om (Tablica 15., Slika 22.).

Da bi provjerili da li genetski (varijante polimorfizama gena *MAOB*) ili okolišni (broj traumatskih događaja i traume u djetinjstvu) čimbenici (nezavisne varijable) ili oboje imaju značajan učinak na težinu simptoma PTSP-a izraženu u bodovima na CAPS ljestvici (zavisna varijabla ) napravili smo i multiplu regresijsku analizu. Rezultati multiple regresije su potvrdili da pojedinačni polimorfizmi rs1799836 (P=0.3839), rs6651806 (P=0.3676) i rs5905512 (P=0.5482) gena *MAOB* nisu značajno povezani s brojem bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om, te su istaknuli broj traumatskih događaja (P=0.0119), kao i fizičko zanemarivanje (P<0.0001) i emocionalno zlostavljanje (P=0.0018) u djetinjstvu, kao glavne varijable koje utječu na težinu simptoma PTSP-a izraženu bodovima na CAPS ljestvici. Nadalje, multipla regresijska analiza utvrdila je da u slučaju broja bodova na CAPS ljestvici postoji statistički značajna interakcija (P=0.032) polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu upućujući da na težinu simptoma PTSP-a utječu i genetski i okolišni čimbenici.

# 4. RASPRAVA

Istraživanjem se najprije pokušala utvrditi povezanost polimorfizama rs6651806, rs1799836 i rs5905512 gena *MAOB*, te aktivnosti trombocitne MAO-B s post-traumatskim stresnim poremećajem odnosno istražiti postoje li razlike u učestalosti alela gena *MAOB* i aktivnosti trombocitne MAO-B između oboljelih od PTSP-a i zdravih kontrolnih ispitanika. U istraživanje je bilo uključeno 282 muška ratna veterana s dijagnozom PTSP-a i 87 kontrolna zdrava muška ispitanika. Iako smo se trudili da prikupimo ispitanike koji međusobno odgovaraju po dobi, dob ratnih veterana i kontrolnih ispitanika značajno se razlikovala, odnosno bolesnici s PTSP-om bili su značajno mlađi od kontrolnih ispitanika.

S obzirom na to da se gen *MAOB* nalazi na X kromosomu, a u istraživanje su uključeni isključivo muški ispitanici (koji imaju samo jedan X kromosom), bilo je moguće usporediti samo učestalost pojedinih alela, a ne i genotipova istraživanih polimorfizama gena *MAOB*. Kontrolni ispitanici i bolesnici s PTSP-om značajno su se razlikovali u raspodjeli alela polimorfizma rs6651806 gena *MAOB*, ali ne i polimorfizama rs1799836 i rs5905512 gena *MAOB*. Naime, učestalost A alela polimorfizma rs6651806 gena *MAOB* bila je značajno niža, odnosno učestalost C alela bila je značajno viša u bolesnika s PTSP-om nego u kontrolnoj skupini. Koliko nam je poznato ovo je prvo istraživanje koje je utvrdilo značajnu povezanost polimorfizma rs6651806 gena *MAOB* s razvojem PTSP-a.

Povezanost sva tri navedena polimorfizma s koncentracijom MHPG, glavnog metabolita noradrenalina, utvrđena je u muškaraca sa psihitičkim poremećajem (Andreou i sur., 2014). Polimorfizam rs5905512 gena *MAOB* bio je povezani i sa shizofrenijom u muškaraca (Carrera i sur., 2009), dok je polimofizam rs6651806 gena *MAOB* bio povezan s negativnom emocionalnošću u zdravih osoba (Dlugos i sur., 2009). Međutim, u literaturi nismo pronašli istraživanja PTSP-a koja su uključila polimorfizme rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*. Samo za najčešće istraživan polimorfizam rs1799836 gena *MAOB* postoje istraživanja na ispitanicima sa PTSP-om. Kao i naše istraživanje, studija Pivac i i sur. (2007) nije utvrdila povezanost polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* sa razvojem PTSP-a, kao niti značajne razlike u učestalosti alela ovog polimorfizma između ratnih veterana sa psihotičnim i nepsihotičnim PTSP-om (Pivac i sur., 2007).

Za polimorfizme rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* utvrđen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (LD=80-90), što upućuje da se nasljeđuju zajedno u bloku. Stoga smo napravili haplotipsku analizu kako bi utvrdili postoje li razlike u učestalosti pojedinih

haplotipova ovih polimorfizama između zdravih ispitanika i ratnih veteran s PTSP-om. Naše istraživanje je pokazalo da je učestalost pojavljivanja haplotipa CCG značajno veća u bolesnika s PTSP-om nego u kontrolnoj skupini, dok je učestalost haplotipova CAG i TAG značajno veća u kontrolnih ispitanika u usporedbi s bolesnicima s PTSP-om. Veća učestalost pojavljivanja haplotipa CCG bolesnika s PTSP-om primijećena u našem istraživanju u skladu je s rezultatima Dlugos i sur. (2009) koji su pokazali da je haplotip CACG (rs1799836, rs10521432, rs6651806 i rs590551 polimorfizama) gena *MAOB* značajno povezan s negativnom emocionalnošću, rezultatima reakcije na stres, otuđenjem i anksioznošću, a koji su učestalo povezani s PTSP-om (APA, 2013).

Istraživanje je također pokazalo da oboljeli od PTSP-a imaju značajno veću aktivnost trombocitne monoaminooksidaze tipa B od zdravih, kontrolnih ispitanika što potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja (Pivac i sur., 2007). Naime, veća aktivnost trombocitne MAO-B, pokazana je u veterana s PTSP-om, osobito onima sa psihotičnim u usporedbi s nepsihotičnim osobinama (Pivac i sur., 2007). Međutim naši rezultati razlikuju se od rezultata Davidsona i sur. koji su utvrdili značajno nižu aktivnost trombocitne MAO-B u ispitanika s PTSP-om u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (Davidson i sur., 1985). U drugoj studiji trombocitna MAO-B aktivnost nije se značajno razlikovala između ratnih veterana s PTSP-om ili bez njega, i ratnih zarobljenika s PTSP-om (Pivac i sur., 2002).

Kako bismo istražili potencijalnu povezanost polimorfizama gena *MAOB* i aktivnosti MAO-B u trombocitima, kontrolne ispitanike i bolesnike s PTSP-om podijelili smo na nosioce pojedinih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*. Nisu pronađene značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca različitih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* unutar kontrolne skupine, kao niti unutar skupine ratnih veterana s PTSP-om., što upućuje da navedeni polimorfizmi gena *MAOB* ne utječu na aktivnost MAO-B u trombocitima.

To je u suprotnosti sa studijama koje pokazuju da polimorfizam rs1799836 gena *MAOB* utječe na translaciju i/ili stabilnost glasničke RNA (mRNA) (Balciuniene i sur., 2002), i da postoji povezanost rs1799836 polimorfizma gena *MAOB* i aktivnosti trombocitne MAO-B (Garpenstand i sur., 2000). Smanjena aktivnost MAO-B povezana je s A alelom na malom broju (N=55) muških ispitanika (Gaprenstrand i sur., 2000) ili s G alelom u posmrtnim uzorcima ljudskog mozga (Balciuniene i sur., 2002). Smatra se da ovaj polimorfizam može mijenjati procesiranje introna 13 gena *MAOB,* u slučaju alela A s većom efikasnošću, što može utjecati na povećanu ekspresiju proteina i veću enzimatsku aktivnost MAO-B (Jakubauskiene i sur.,

2012). S druge strane, ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koja nisu pronašla povezanost polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i aktivnosti trombocitne MAO-B u zdravih ljudi (Pivac i sur., 2006), veterana oboljelih od PTSP-a (Pivac i sur., 2007) kao ni ovisnika o alkoholu (Nedić Erjavec i sur., 2014). I istraživanje Švob Štac i sur. (2016) pokazalo je da nema povezanosti između ovog polimorfizma i aktivnosti trombocitne MAO-B. U skladu s podacima koje smo i mi dobili, pojedinačni polimorfizmi odnosno aleli gena *MAOB* nisu bili značajno povezani s trombocitnom aktivnošću MAO-B u istraživanjima Jansson i sur. (2005) i Girmena i sur. (1992).

U ratnih veterana s PTSP-om, broj bodova na CAPS ljestvici kojom se utvrđuje težina simptoma PTSP-a, nije se značajno razlikovao između nosioca različitih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*. Također, između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om nisu uočene značajne razlike u raspodjeli alela polimofizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512, kao niti haplotipova gena *MAOB*.

Naši rezultati djelomično su u suprotnosti su s prethodnim istraživanjem polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* koje je pokazalo da postoji značajna razlika u učestalosti alela A i G kada su ispitanici podijeljeni po težini simptoma PTSP-a na blage, umjerene i teške prema CAPS skali (Švob Štrac i sur., 2016). S druge strane, isto istraživanje pokazalo je da ne postoji značajna razlika u učestalosti alela polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* kada su ispitanici podijeljeni prema agitaciji i psihotičnim simptomima, međutim takva podjela nije uključena u izradu ovog istraživanja. U istraživanju Pivac i sur. (2007) također nije pronađena značajna razlika u raspodjeli alela rs1799836 polimorfizma gena *MAOB* između veterana sa psihotičnim i nepsihotičnim PTSP-om.

U našem istraživanju nije bilo značajne korelacije između aktivnosti trombocitne MAO-B i bodova na CAPS ljestvici u ratnih veterana s PTSP-om. U ratnih veterana s PTSP-om također nije utvrđena značajna korelacija aktivnosti trombocitne MAO-B s brojem traumatskih događaja i kao niti s bodovima na CTQ ljestvici kojom se procijenjuje trauma u djetinjstvu. Međutim između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om utvrđene su značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B, pri čemu je kod ispitanika s težim simptomima PTSP-a uočena manja aktivnost trombocitne MAO-B.

Ovaj rezultat je u suprotnosti s prethodnim istraživanjima kod kojih je uočena veća aktivnost trombocitne monoaminooksidaze kod pacijenata s težim simptomima (Švob Štrac i sur., 2016). Naime, u veterana s PTSP-om pronađena je nešto veća aktivnost trombocitne MAO-B kod

bolesnika s težim simptomima PTSP-a i bolesnika s agitacijom, te značajno veća aktivnost trombocitne MAO-B kod veterana s izraženijim psihotičnim simptomima, u odnosu na bolesnike s manje izraženim simptomima, što upućuje da su teži simptomi PTSP-a povezani s većom aktivnošću trombocitne MAO-B (Švob Štrac i sur., 2016).

Međutim, pušenje također utječe na aktivnost trombocitne MAO-B tako da smanjuje aktivnost MAO-B (Fowler i sur., 2003; Oreland, 2004), a pušački status nije uključen u ovo istraživanje što ostavlja mogućnost da su ovi rezultati u suprotnosti s prethodnima zbog čimbenika pušenja. Također je moguće da povišena aktivnost trombocitne MAO-B u bolesnika sa srednjim PTSP-om predstavlja neki kompenzacijski mehanizam koji se gubi u bolesnika s teškim PTSP-om.

U ratnih veterana s PTSP-om nadalje je pronađena značajna korelacija između broja traumatskih događaja i bodova na CAPS ljestvici, što upućuje da broj traumatskoh događaja doprinosi težini simptoma PTSP-a. Između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om, utvrđene su značajne razlike u broju traumatskih događaja, odnosno bolesnici sa teškim PTSP-om imali su veći broj traumatskih događaja nego bolesnici sa srednjim PTSP-om. To je u skladu s istraživanjima koja upućuju na broj traumatskih događaja kao jedan od presudnih okolišnih čimbenika koji utječu na težinu PTSP-a (Blosnich i sur., 2004; Jacob i sur., 2017; Kessler i sur., 2017).

Iako u ratnih veterana s PTSP-om nije utvrđena značajna korelacija između bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici, između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om postojale su značajne razlike u broju bodova na CTQ ljestvici.

Naši rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je uočena povezanost zlostavljanja u djetinjstvu s kasnijim razvojem PTSP-a (Bremner i sur., 1993; Widom, 1999; Heim i Nemeroff, 2001; Wolitzky-Taylor i sur., 2008). Iako se u prethodnim istraživanjima radilo o različitim i raznolikim skupinama ispitanika, dok je naša skupina ispitanika uniformna i čine je muškarci, bijelci i ratni veterani, dobiveni rezultati ukazuju na povezanost traume u djetinjstvu i težine simptoma PTSP-a.

Zlostavljanje u djetinjstvu može povećati ranjivost za kasniji razvoj PTSP-a, jer mijenja psihološki (privrženost) i biološki (funkciju HHN osi) razvojni proces u interakciji s genetskim čimbenicima. Premda i drugi traumatski događaji u djetinjstvu koji nisu povezani sa zlostavljanjem (npr. požar, prometna nesreća) također mogu negativno utjecati na razvoj, najviše istraživanja i pažnje posvećeno je zlostavljanju jer predstavlja čimbenik kojim se može

predvidjeti niz psihičkih i fizičkih problema kasnije u životu (Coopeland i sur., 2007). Razlozi još nisu do kraja razjašnjeni, ali nekoliko je mogućih objašnjenja. U usporedbi s drugim traumatskim događajima, zlostavljanje se najčešće događa u obitelji. Bilo koji tip zlostavljanja u djetinjstvu povećava vjerojatnost da će osoba biti izložena nekom drugom tipu zlostavljanja, a u usporedbi s nekim drugim traumama, za zlostavljanje je veća vjerojatnost da neće biti samo jedan, nego više događaja (npr. seksualni zlostavljač koji zlostavlja dijete više puta tijekom dužeg perioda) (Dong i sur., 2004).

Utvrđena je značajna korelacija bodova na CTQ podljestvicama fizičkog i emocionalnog zlostavljanja i fizičkog zanemarivanja s bodovima na CAPS ljestvici, dok između bodova na CAPS ljestvici i bodova na CTQ podljestvicama seksualnog zlostavljanja i emocionalnog zanemarivanja nije bilo značajne korelacije. Poznato je da nedaće u djetinjstvu predviđaju povećani rizik razvoja PTSP-a nakon traumatičnih iskustava (McLaughlin i sur., 2017). Istraživanje na ratnim veteranima iz Vijetnama pokazalo je da nedaće u djetinjstvu povećavaju rizik za kasniji razvoj PTSP-a (Bremner i sur., 2003). Također je pokazano da djeca s poviješću zlostavljanja imaju veći rizik od razvoja PTSP-a u budućnosti (Wolitzky-Taylor i sur., 2008). Prethodna su istraživanja utvrdila da je vjerojatnost da zanemareno ili zlostavljano dijete oboli od PTSP-a 1.75 puta veća od onog koje nije proživjelo takve traume. Povećan rizik od kroničnog PTSP-a uočen je kod dva tipa zlostavljanja (fizičkog zlostavljanja, seksualnog zlostavljanja) i bilo kojeg tipa zanemarivanja u prethodnim istraživanjima (Spatz Widom, 1999).

Naše istraživanje također je pokazalo da su bolesnici s teškim PTSP-om češće bili žrtve fizičkog, emocionalnog i seksualnog zlostavljanja, kao i emocionalnog zanemarivanja u djetinjstvu, dok su bolesnici sa srednjim PTSP-om bili češće žrtve fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu. U skladu s ovim rezultatima, Vijetnamski veterani kod kojih je zabilježeno fizičko zlostavljanje u djetinjstvu imali su teži oblik PTSP-a (Bremner i sur., 1995; Donovan i sur., 1996). Bremner i sur. (1995) predložili su da život u kaotičnom i stresnom okruženju u djetinjstvu povećava rizik pojedinca da razvije PTSP nakon izlaganja traumi kasnije u životu. U usporedbi s drugim razvojnim razdobljima, rano seksualno zlostavljanje i fizičko zlostavljanje u dobi od 13 godina na više, s velikom vjerojatnošću mogu predvidjeti depresiju i simptome PTSP-a (Capretto, 2017). Za razjašnjavanje utjecaja pojedinih tipova zlostavljanja i zanemarivanja u djetinjstvu potrebna su daljnja istraživanja i meta analize koje bi povezale sve dobivene rezultate prethodnih istraživanja.

Rezultati multiple regresije su potvrdili da polimorfizmi gena *MAOB* nisu značajno povezani s brojem bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om, te su istaknuli broj traumatskih događaja, kao i fizičko zanemarivanje i emocionalno zlostavljanje u djetinjstvu, kao glavne varijable koje utječu na težinu simptoma PTSP-a izraženu bodovima na CAPS ljestvici. Međutim, za broj bodova na CAPS ljestvici, multipla regresijska analiza također je utvrdila značajnu interakciju polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu.

Kao i naša, i druge studije ističu važnost istraživanja interakcija gena i okoliša u etiologiji PTSP-a kao ključnih za razumijevanje ranjivosti i otpornosti nakon izlaganja traumatskom događaju (Koenen i sur., 2008). Na primjer, Kilpatrick i sur. (2007) našli su da s/s genotip *5-HTTLPR* polimorfizma nosi povećan rizik razvoja PTSP-a u uvjetima slabe socijalne potpore i visokog izlaganja uraganu. Nadalje, interakcija između *5-HTTLPR* i izlaganja potresu, kao i interakcija između *5-HTTVNTR* i izlaganja potresu pokazale su se značajnim za razvoj PTSP-a (Tian i sur., 2015). U istraživanju Bindera i sur. (2008), četiri polimorfizma u genu *FKBP5* pokazala su značajnu interakciju s težinom zlostavljanja u djetinjstvu u predikciji težine simptoma PTSP-a odraslih osoba. I interakcija polimofizma gena *ADRB2*, povezanim s adrenergičkom funkcijom, s traumom u djetinjstvu pokazala se važnom u predviđanju simptoma PTSP-a u odraslih ljudi (Liberzon i sur., 2014). Vezano uz MAO, studija McDermotta i sur. (2013) pronašla je da osobe s varijantom gena *MAOA* koja ima nisku aktivnost, a koje su bile izložene nasilju u mladosti, imaju veću vjerojatnost ispoljavanja fizičke agresije u odrasloj dobi. Međutim, iako rezultati naše i brojnih drugih studija potvrđuju ulogu i genetskih i okolišnih čimbenika, kao i njihove interakcije u PTSP-u, u svrhu njihovog razjašnjavanja potrebna su daljnja istraživanja.

# 5. ZAKLJUČAK

1. U našem istraživanju, dob ratnih veterana i kontrolnih ispitanika značajno se razlikovala, odnosno bolesnici s PTSP-om bili su značajno mlađi od kontrolnih ispitanika.

2. Kontrolni ispitanici i bolesnici s PTSP-om značajno su se razlikovali u raspodjeli alela polimorfizma rs6651806, ali ne i polimorfizama rs1799836 i rs5905512 gena *MAOB*. U slučaju polimorfizma rs6651806, učestalost A alela bila je značajno niža, odnosno učestalost C alela bila je značajno viša u bolesnika s PTSP-om nego u kontrolnoj skupini.

3. Za polimorfizme rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* utvrđen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (LD=80-90), što upućuje da se nasljeđuju zajedno u bloku.

4. Učestalost pojavljivanja haplotipa CCG značajno je veća u bolesnika s PTSP-om nego u kontrolnoj skupini, dok je učestalost haplotipova CAG i TAG značajno veća u kontrolnih ispitanika u usporedbi s bolesnicima s PTSP-om.

5. Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om, odnosno bolesnici s PTSP-om imali su značajno višu aktivnost trombocitne MAO-B u usporedbi s kontrolnom skupinom.

6. Nisu pronađene značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B između nosioca različitih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB* unutar kontrolne skupine, kao niti unutar skupine ratnih veterana s PTSP-om.

7. U ratnih veterana s PTSP-om, broj bodova na CAPS ljestvici kojom se utvrđuje težina simptoma PTSP-a, nije se značajno razlikovao između nosioca različitih alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512 gena *MAOB*.

8. Između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om nisu uočene značajne razlike u raspodjeli alela polimorfizama rs1799836, rs6651806 i rs5905512, kao niti haplotipova gena *MAOB*.

9. Nije bilo značajne korelacije između aktivnosti trombocitne MAO-B i bodova na CAPS ljestvici u ratnih veterana s PTSP-om, no između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om utvrđene su značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B.

10. U ratnih veterana s PTSP-om nije utvrđena značajna korelacija aktivnosti trombocitne MAO-B s brojem traumatskih događaja i kao niti s bodovima na CTQ ljestvici kojom se procijenjuje trauma u djetinjstvu.

11. Značajna korelacija između broja traumatskih događaja i bodova na CAPS ljestvici pronađena je u ratnih veterana s PTSP-om. Između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om, utvrđene su značajne razlike u broju traumatskih događaja, odnosno bolesnici s teškim PTSP-om imali su veći broj traumatskih događaja nego bolesnici sa srednjim PTSP-om.

12. Iako u ratnih veterana s PTSP-om nije utvrđena značajna korelacija između bodova na CTQ ljestvici i bodova na CAPS ljestvici, između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om postojale su značajne razlike u broju bodova na CTQ ljestvici.

13. Utvrđena je značajna korelacija bodova na CTQ podljestvicama fizičkog i emocionalnog zlostavljanja i fizičkog zanemarivanja sa bodovima na CAPS ljestvici, dok između bodova na CAPS ljestvici i bodova na CTQ podljestvicama seksualnog zlostavljanja i emocionalnog zanemarivanja nije bilo značajne korelacije.

14. Značajne razlike između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om pronađene su u bodovima CTQ podljestvica emocionalnog i seksualnog zlostavljanja, te fizičkog zanemarivanja, ali ne i u bodovima CTQ podljestvica fizičkog zlostavljanja i emocionalnog zanemarivanja.

15. Bolesnici s teškim PTSP-om češće su bili žrtve fizičkog, emocionalnog i seksualnog zlostavljanja, kao i emocionalnog zanemarivanja u djetinjstvu, dok su bolesnici sa srednjim PTSP-om bili češće žrtve fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu.

16. Rezultati multiple regresije su potvrdili da pojedini polimorfizmi gena *MAOB* nisu značajno povezani s brojem bodova na CAPS ljestvici u bolesnika s PTSP-om, te su istaknuli broj traumatskih događaja, kao i fizičko zanemarivanje i emocionalno zlostavljanje u djetinjstvu, kao glavne varijable koje utječu na težinu simptoma PTSP-a izraženu bodovima na CAPS ljestvici. Za broj bodova na CAPS ljestvici, multipla regresijska analiza također je utvrdila značajnu interakciju polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu.

Kontrolni ispitanici i bolesnici s PTSP-om značajno su se razlikovali u raspodjeli alela polimorfizma rs6651806, kao i u raspodjeli haplotipova CCG, CAG i TAG, što upućuje na

povezanost gena *MAOB* s razvojem PTSP-a. Međutim, u ratnih veterana s PTSP-om nije ustanovljena povezanost pojedinih polimorfizama, kao ni haplotipova gena *MAOB* s težinom PTSP-a procijenjenom prema CAPS ljestvici. Značajne razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B pronađene su između kontrolnih ispitanika i ratnih veterana s PTSP-om, kao i između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om, no ove razlike nisu bile povezane s istraživanim polimorfizmima gena *MAOB*, brojem traumatskih događaja i traumom u djetinjstvu procijenjenom CTQ ljestvicom. Između bolesnika sa srednjim i teškim PTSP-om utvrđene su značajne razlike u broju bodova CTQ ljestvice i podljestvica, upućujući da su bolesnici s teškim PTSP-om češće žrtve fizičkog, emocionalnog i seksualnog zlostavljanja, te emocionalnog zanemarivanja u djetinjstvu. Broj traumatskih događaja, kao i fizičko zanemarivanje i emocionalno zlostavljanje u djetinjstvu predstavljaju glavne varijable koje utječu na težinu simptoma PTSP-a izraženu bodovima na CAPS ljestvici, sa značajnom interakcijom polimorfizma rs1799836 gena *MAOB* i fizičkog zanemarivanja u djetinjstvu. Rezultati istraživanja potvrđuju ulogu i genetskih i okolišnih čimbenika, kao i njihove interakcije u PTSP-u, no u svrhu njihovog razjašnjavanja potrebna su daljnja istraživanja.

# 6. LITERATURA


Adolfsson R., Gottfries C. G., Oreland L., Wiberg A., Winblad B. (1980): Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase in dementia of Alzheimer type. Life Sci. **27**:1029-34.

Almli L. M., Fani N., Smith A. K., Ressler K. J. (2014): Genetic approaches to understanding post-traumatic stress disorder. Int J Neuropsychopharmacol. **17**:355-70.

Andreou D., Soderman E., Axelsson T., Sedvall G. C., Terenius L., Agartz I., Jonsson E. G. (2014): Polymorphisms in genes implicated in dopamine, serotonin and noradrenalin metabolism suggest association with cerebrospinal fluid monoamine metabolite concentrations in psychosis. Behaviorial and Brain functions **10**: 26 – 36.

Anichtchik O., Sallinen V., Peitsaro N., Panula P. (2006): Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (Danio rerio). J. Comp. Neurol: **498:** 593–610.

APA (2013): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*. *Am Psychiatr Assoc* doi:10.1176/appi.books.9780890425596.

Bagdy G., Rihmer Z. (1986): Measurement of platelet monoamine oxidase activity in healthy human volunteers. Acta Physiol Hung **68**:19–24.

Balciuniene J., Emilsson L., Oreland L., Pettersson U., Jazin E.E. (2002): Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. Hum Genet. **110**:1-7.

Bernstein, D. P., Fink, L. (1998): Childhood Trauma Questionnaire: A retrospective self-report manual San Antonio, TX: The Psychological Corporation.

Berry M.D., Juorio A.V., Paterson I.A. (1994): The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. Prog. Neurobiol. **42**:375-391.

Binda C., Newton-Vinson P., Hubálek F., Edmondson D.E., Mattevi A. (2002): Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders.Nat Struct Biol. **9**:22-6.

Binder E. B., Bradley R. G., Liu W., Epstein M. P., Deveau T. C., Mercer K. B., Tang Y., Gillespie C. F., Heim C. M., Nemeroff C. B., Schwartz A. C., Cubells J. F., Ressler K. J (2008): Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. JAMA. **299**:1291-1305.

Blosnich J. R., Dichter M. E., Cerulli C., Batten S. V., Bossarte R. M. (2014): Disparities in adverse childhood experiences among individuals with a history of military service. JAMA Psychiatry. **71**:1041–1048.

Bond P. A., Cundall, R. L. (1977): Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma. Clin. Chim. Acta **80**: 317–326.

Bongioanni P., Mondino C., Boccardi B., Borgna M., Castagna M. (1996): Monoamine oxidase molecular activity in platelets of parkinsonian and demented patients. Neurodegeneration **5**:351–357.

Bortolato M., Shih J. C. (2011): Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. Int. Rev. Neurobiol. **100**:13–42.

Boutet I., Tanguy A., Moraga D. (2004): Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biochim. Biophys. Acta **1679**: 29–36.

Bremner J. D., Elzinga B., Schmahl C., Vermetten E. (2008): Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. Prog Brain Res. **167**: 171-186.

Bremner J. D., Southwick S. M., Johnson D. R., Yehuda R., Charney D. S. (1993): Childhood physical abuse and combat-related posttraumatic stress disorder in Vietnam veterans. Am J Psychiatry. **150**:235-239.

Bremner J. D., Vythilingam M., Vermetten E., Southwick S. M., McGlashan T., Staib L. H., Soufer R., Charney D. S. (2003): Neural correlates of declarative memory for emotionally valenced words in women with posttraumatic stress disorder related to early childhood sexual abuse. Biol Psychiatry.**53**: 879-889.

Bremner, J. D., Southwick, S. M., Charney, D. S. (1995): Etiological factors in the development of posttraumatic stress disorder. In: C. M. Mazure (Ed.), Does stress cause psychiatric illness? Progress in psychiatry, **46** (149–185).

Bridge T. P., Soldo B. J., Phelps B. H., Wise C. D., Franacak M. J., Wyatt R. J. (1985): Platelet monoamine oxidase activity: demographic characteristics contribute to enzyme activity variability. J Gerontol **40**: 23–28.

Broekman B. F., Olff M., Boer F. (2007): The genetic background to PTSD. Neurosci Biobehav Rev. **31**: 348-362.

Brunner H. G., Nelen M., Breakefield X. O., Ropers H. H., van Oost B. A. (1993): Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. Science. **262**: 578-580.

Butler R. W., Mueser K. T., Sprock J., Braff D. L. (1996): Positive symptoms of psychosis in posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry **39**:839–44.

Capretto J. J. (2017): Developmental Timing of Childhood Physical and Sexual Maltreatment Predicts Adult Depression and Post-Traumatic Stress Symptoms. Journal of Interpersonal Violence **1**:886260517704963:1–25

Carrera N., Sanjuan J., Molto M. D., Carracedo A., Costas J. (2009): Recent adaptive selection at MAOB and ancestral susceptibility to schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **150B**: 369–374.

Chen K., Wu H. F., Shih J. C. (1993): The deduced amino acid sequences of human platelet and frontal cortex monoamine oxidase B are identical. J Neurochem. **61**:187-90.

Chen K. (2004): Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression. Neurotoxicology **25**: 31-36

Chen K., Holschneider D. P., Wu W., Rebrin I., Shih J. C. (2004): A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxietylike behavior. J. Biol. Chem. **279**: 39645–39652

Chen K., Wu H. F., Grimsby J., Shih J. C. (1994): Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. Molecular Pharmacology. **46**: 1226-1233.

Chen Z. Y., Powell J. F., Hsu Y. P., Breakefield X. O., Craig I. W. (1992): Organization of the human monoamine oxidase genes and long-range physical mapping around them. Genomics **14**:75-82.

Copeland W. E., Keeler G., Angold A., Costello E. J. (2007): Traumatic events and posttraumatic stress in childhood. Arch Gen Psychiatry. **64**:577-584.,

Coplan J. D., Andrews M. W., Rosenblum L. A., Owens M. J., Friedman S., Gorman J. M., Nemeroff C. B. (1996): Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. **93**:1619-1623.

Davidson J., Lipper S., Kilts C. D., Mahorney S., Hammett E. (1985): Platelet MAO activity in posttraumatic stress disorder. Am. J. Psychiatry, **142**:1341–1343.

Digangi J., Guffanti G., McLaughlin K. A., Koenen K. C.. (2013): Considering trauma exposure in the context of genetics studies of posttraumatic stress disorder: a systematic review. Biol Mood Anxiety Disord. **3**:2.

Dlugos A. M., Palmer A. A., de Wit H. (2009): Negative emotionality: monoamine oxidase B gene variants modulate personality traits in healthy humans. J. Neural Transm. **116**: 1323–1334.

Dong M., Anda R. F., Felitti V. J., et al. (2004): The interrelatedness of multiple forms of childhood abuse, neglect and household dysfunction. Child Abuse Negl. **28(7)**:771-784.

Donnelly C. H., Murphy D. L. (1977): Substrate and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamineoxidase. Biochem Pharmacol **26**: 853-858.

Donovan, B. S., Padin-Rivera, E., Dowd, T., Blake, D. D. (1996): Childhood factors and war zone stress in chronic PTSD. Journal of Traumatic Stress, **9:** 361–368.

Dorszewska J., Prendecki M., Oczkowska A., Rozycka A., Lianeri M., Kozubski W. (2013): Polymorphism of the COMT, MAO, DAT, NET and 5-HTT Genes, and Biogenic Amines in Parkinson's Disease. Curr Genomics. **14**: 518-533.

Duncan L. E., Ratanatharathorn A., Aiello A. E., Almli L. M., Amstadter A. B., Ashley-Koch A. E., Baker D. G., Beckham J.C., Bierut L. J., Bisson J., Bradley B., Chen C. Y., Dalvie S., Farrer L.A., Galea S., Garrett M. E., Gelernter J. E., Guffanti G., Hauser M. A., Johnson E. O., Kessler R. C., Kimbrel N. A., King A., Koen N., Kranzler H. R., Logue M. W., Maihofer A. X., Martin A. R., Miller M. W., Morey R. A., Nugent N. R., Rice J. P., Ripke S., Roberts A. L., Saccone N. L., Smoller J. W., Stein D. J., Stein M. B., Sumner J. A., Uddin M., Ursano R. J., Wildman D. E., Yehuda R., Zhao H., Daly M. J., Liberzon I., Ressler K. J., Nievergelt C. M., Koenen K. C. (2018): Largest GWAS of PTSD (N=20 070) yields genetic overlap with schizophrenia and sex differences in heritability. Mol Psychiatry. **23**:666-673.

Duncan R. D., Saunders B. E., Kilpatrick D. G., Hanson R. F., Resnick H. S. (1996): Childhood physical assault as a risk factor for PTSD, depression, and substance abuse: findings from a national survey. Am. J. Orthopsychiatry, **66:** 437–448.

Edmondson D. E., Binda C., Wang J., Upadhyay A. K., Mattevi A. (2009): Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. Biochemistry **48**: 4220–4230.

Edmondson D. E., Mattevi A., Binda C., Li M., Huba´lek F. (2004): Structure and mechanism of monoamine oxidase. Curr. Med. Chem. **11**: 1983–1993.

Ehlers A., Steil R. (1995): Maintenance of intrusive memories in posttraumatic stress disorder: a cognitive approach. Behav Cogn Psychother **23**:217–49.

Fowler J. S., Logan J., Wang G. J., Volkow N. D. (2003): Monoamine oxidase and cigarette smoking. Neurotoxicology. **24**:75-82.

Garpenstrand H., Ekblom J., Forslund K., Rylander G., Oreland L. (2000): Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype, J. Neural Transm. **107**: 523-530.

Gassó P., Bernardo M., Mas S., Crescenti A., Garcia C., Parellada E., Lafuente A. (2008): Association of A/G polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with schizophrenia in a Spanish population. Neuropsychobiology. **58**:65-70.

Gilbertson M. W., Shenton M. E., Ciszewski A., Kasai K., Lasko N. B., Orr S. P., Pitman R. K. (2002): Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. Nat Neurosci. **5**:1242-1247.

Girmen A. S., Baenziger J., Hotamisligil G. S., Konradi C., Shalish C., Sullivan J. L., Breakefield X. O. (1992): Relationship between platelet monoamine oxidase B activity and alleles at the MAOB locus. J Neurochem **59**:2063–6.

Grimsby J., Chen K.,Wang L. J., Lan N. C., Shih J. C. (1991): Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 3637–3641.

Grimsby J., Lan N. C., Neve R., Chen K., Shih J. C. (1990): Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. J Neurochem. **55**: 1166-1169.

Gustavson C., Wass C., Mansson J. E., Blennow K., Forsman A., Anckarsater H., Nilsson T. (2010): Platelet monoamine oxidase B activity did not predict destructive personality traits or violent recidivism: a prospective study in male forensic psychiatric examinees. Neuropsychobiology. **61**:87-96.

Hariri A. R., Mattay V. S., Tessitore A., Kolachana B., Fera F., Goldman D., Egan M. F., Weinberger D. R. (2002): Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. Science. **297**: 400-403.

Harro J., Fischer K., Vansteelandt S., Harro M. (2004): Both low and high activities of platelet monoamine oxidase increase the probability of becoming a smoker. Eur Neuropsychopharmacol. **14**: 65-69.

Heim C., Nemeroff C. B.( 2001): The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biol Psychiatry. **49(12)**:1023-1039.

Ho S. L., Kapadi A. L., Ramsden D. B., Williams A. C. (1995): An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. Ann Neurol. **37**: 403-405.

Jakob J. M., Lamp K., Rauch S. A., Smith E. R., Buchholz K. R. (2017): The Impact of Trauma Type or Number of Traumatic Events on PTSD Diagnosis and Symptom Severity in Treatment Seeking Veterans. J Nerv Ment Dis. **205**:83-86.

Jakubauskiene E., Janaviciute V., Peciuliene I., Soderkvist P., Kanopka A. (2012): G/A polymorphism in intronic sequence affects the processing of MAO-B gene in patients with Parkinson disease, FEBS Lett. **586**: 3698-3704.

Jansson M., McCarthy S., Sullivan P. F., Dickman P., Andersson B., Oreland L., Schalling M., Pedersen N. L. (2005): MAOA haplotypes associated with thrombocyte-MAO activity. BMC Genet. **20**:46.

Jarman J., Glover V., Sandler M., Turjanski N., Stern G. (1993): Platelet monoamine oxidase B activity in Parkinson's disease: a reevaluation. J Neural Trasm Park Dis Dement Sect **5**: 1–4.

Jonsson E. G., Norton N., Gustavsson J. P., Oreland L., Owen M. J., Sedvall G. C. (2000): A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene and its relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. J Psychiatr Res. **34**: 239-244.

Kessler R. C., Aguilar-Gaxiola S., Alonso J., Benjet C., Bromet E. J., Cardoso G., Degenhardt L., de Girolamo G., Dinolova R. V., Ferry F., Florescu S., Gureje O., Haro J. M., Huang Y., Karam E. G., Kawakami N., Lee S., Lepine J. P., Levinson D., Navarro-Mateu F., Pennell B. E., Piazza M., Posada-Villa J., Scott K. M., Stein D. J., Ten Have M., Torres Y., Viana M. C., Petukhova M. V., Sampson N. A., Zaslavsky A. M., Koenen K. C. (2017): Trauma and PTSD in the WHO World Mental Health Surveys. Eur J Psychotraumatol. **8**:1353383.

Kilpatrick D. G., Koenen K. C., Ruggiero K. J., Acierno R., Galea S., Resnick H. S., Roitzsch J., Boyle J., Gelernter J. (2007): Serotonin transporter gene and social support moderate PTSD and depression in hurricane-exposed adults. Am. J. Psychiatry. **164**:1693-9.

Koenen K. C., Nugent N. R., Amstadter A. B. (2008): Gene-environment interaction in posttraumatic stress disorder: review, strategy and new directions for future research. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. **258**:82-96.

Krajl M. (1965): A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. Biochem. Pharmacol. **14**:1684–166

Lan N. C., Chen C. H., Shih J. C. (1989): Expression of functional human monoamine oxidase A and B cDNAs in mammalian cells. J. Neurochem. **52**:1652–1654.

Levy E. R., Powell J. F., Buckle V. J., Hsu Y. P., Breakefield X. O., Craig, I. W. (1989): Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23–11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease. Genomics **5**: 368–370.

Liberzon I., King A. P., Ressler K. J., Almli L. M., Zhang P., Ma S. T., Cohen G. H., Tamburrino M. B., Calabrese J. R., Galea S. (2014): Interaction of the ADRB2 gene polymorphism with childhood trauma in predicting adult symptoms of posttraumatic stress disorder. JAMA Psychiatry. **71**:1174-82.

Liu H., Petukhova M. V., Sampson N. A., Aguilar-Gaxiola S., Alonso J., Andrade L. H., Bromet E. J., de Girolamo G., Haro J. M., Hinkov H., Kawakami N., Koenen K. C., Kovess-Masfety V., Lee S., Medina-Mora M. E., Navarro-Mateu F., O'Neill S., Piazza M., Posada-Villa J., Scott K. M., Shahly V., Stein D. J., Ten Have M., Torres Y., Gureje O., Zaslavsky A. M., Kessler R. C.; World Health Organization World Mental Health Survey Collaborators. (2017): Association of DSM-IV Posttraumatic Stress Disorder With Traumatic Experience Type and History in the World Health Organization World Mental Health Surveys. JAMA Psychiatry. **74**:270-281.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265–275.

Mann J., Chiu E. (1978): Platelet monoamine oxidase activity in Huntington's chorea. J Neurol Neurosurg Psychiatr. **41**:809–812.

Mas S., Bernardo M., Parellada E., Garcia-Rizo C., Gasso P., Alvarez S., Lafuente A. (2009): ARVCF single marker and haplotypic association with schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**:1064–1069.

McDermott, R., Dawe, C., Prom-Wormley, E., Eaves L., Hatemi P.K. (2013): MAOA and Aggression: A Gene–Environment Interaction in Two Populations. Journal of Conflict Resolution **57**:1043-1064.

McLaughlin K., Koenen K. C., Bromet E. J., Karam E. G., Liu H., Petukhova M., Ruscio A. M., Sampson N. A., Stein D. J., Aguilar-Gaxiola S., Alonso, Borges G., Demyttenaere K., Dinolova R. V., Ferry F., Florescu S., de Girolamo G., Gureje O., Kawakami N., Lee S., Navarro-Mateu F., Piazza M., Pennell B. E., Posada-Villa J., Ten Have M., Viana M. C., Kessler R. C. (2017): Childhood adversities and post-traumatic stress disorder: evidence for stress sensitisation in the World Mental Health Surveys. Br J Psychiatry. **211**:280-288.

McLaughlin K. A., Fairbank J. A., Gruber M. J., Jones R. T., Osofsky J. D., Pfefferbaum B., Sampson N. A., Kessler R. C. (2010): Trends in serious emotional disturbance among youths exposed to Hurricane Katrina. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. **49**: 990-1000.

Meaney M. J., Szyf M. (2005): Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. Dialogues Clin Neurosci.**7**: 103-123.

Mellman T. A., Kulick-Bell R., Ashlock L. E., Nolan B. (1995): Sleep events among veterans with combat-related posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry. **152**:110-5.

Michopoulos V., Norrholm S. D., Jovanović T. (2015): Diagnostic biomarkers for posttraumatic stress disorder: promising horizons from translational neuroscience research. Biol. Psychiatry. **78**:344–353.

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**: 1215

Murphy D. L., Wright C., Buchsbaum M., Nichols A., Costa J. L.,Wyatt R. J. (1976): Platelet and plasma amine oxidase activity in 680 normals: sex and age differences and stability over time. Biochem Med **16**:254–256.

Nedić Erjavec G., Konjevod M., Nikolac Perković M., Švob Štrac D., Tudor L., Barbas C., Grune T., Žarković N., Pivac N. (2018): Short overview on metabolomic approach and redox changes in psychiatric disorders. Redox Biol. **14**:178-186.

Nedić Erjavec G., Nenadić Sviglin K., Nikolac Perković M., Muck-Seler D., Jovanović T., Pivac N. (2014): Association of gene polymorphisms encoding dopaminergic system components and platelet MAO-B activity with alcohol dependence and alcohol dependence-related phenotypes. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. **54**: 321-327.

Nemeroff C. B. (2004): Neurobiological consequences of childhood trauma. J Clin Psychiatry. **65**: 18-28.

Nicotra A., Senatori O. (1988): Changes in monoamine oxidase activity by mitochondria isolated from late embryos of *Bufo bufo*. Comp. Biochem. Physiol. C **89**: 5–9.

Norman T. R., Chamberlain K. G., French M. A. (1987b): Platelet monoamine oxidase: low activity in cigarette smokers. Psychiatr Res **20** :199–205.

Norman T. R., Chiu E., French M. A. (1987a): Platelet monoamine oxidase activity in patients with Huntington's disease. Clin Exp Pharmacol Physiol **14**:547–50.

Oreland L., Hallman J. (1995): The correlation between platelet MAO activity and personality: short review of findings and a discussion on possible mechanisms. Prog Brain Res. **106**:77-84.

Oreland L. (1993): Monoamine oxidase in neuropsychiatric disorders. VSP Press, Utrecht, 219–247.

Oreland L. (2004): Platelet monoamine oxidase, personality and alcoholism: the rise, fall and resurrection. Neurotoxicology. **25**: 79-89.

Oreland L., Wiberg A., Asberg M., Traskman L., Sjostrand L., Thoren P., Bertilsson L., Tybring G. (1981): Platelet MAO activity and monoamine metabolites in cerebrospinal fluid in depressed and suicidal patients and in healthy controls. Psychiatry Res. **4**: 21-29.

Oxenstierna G., Edman G., Iselius L., Oreland L., Ross S., Sedvall G. (1986): Concentrations of monoamine metabolites in the CSF of twins and unrelated subjects: a genetic study. J Psychiatr Res **20**: 19–29.

Ozelius L., Hsu Y. P., Bruns G., Powell J. F., Chen S., Weyler W., Utterback M., Zucker D.,Haines J., Trofatter J.A., i sur. (1988): Human monoamine oxidase gene (MAOA): chromosome position (Xp21-p11) and DNA polymorphism. Genomics **3**: 53–58.

Paasonen M. K., Solatunturi E., Kivalo E. (1964): Monoamine oxidase activity of blood platelets and their ability to store 5-hydroxytryptamine in some mental deficiencies. Psychopharmacologia **6**:120–4.

Paaver M., Eensoo D., Pulver A., Harro J. (2006): Adaptive and maladaptive impulsivity, platelet monoamine oxidase (MAO) activity and risk-admitting in different types of risky drivers. Psychopharmacology (Berl). **186**: 32-40.

Pace T.W., Heim C.M. (2011): A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: from risk factors to medical comorbidities. Brain Behav. Immun. **25**:6–13.

Pedersen N. L., Oreland L., Reynolds C., McClearn G. E. (1993): Importance of genetic influence on thrombocyte MAO activity in twins reared together. Psychiatr Res **6**:239–251.

Pitman R. K., Rasmusson A. M., Koenen K. C., Shin L. M., Orr S. P., Gilbertson M. W. (2012): Biological studies of post-traumatic stress disorder. Nat. Rev. Neurosci. **13**:769–787.

Pivac N., Mück-Seler D., Sagud M., Jakovljević M. (2002): Platelet serotonergic markers in posttraumatic stress disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. **26**:1193-8.

Pivac N., Knežević J., Kozarić-Kovačić D., Deželjin M., Mustapić M., Rak D., Matijević T., Pavelić J., Muck-Seler D. (2007): Monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity in combat-related posttraumatic stress disorder. J Affect Disord. **103**: 131-138.

Pivac N., Knežević J., Mustapić M., Deželjin M., Muck-Seler D., Kozarić-Kovačić D., Balija M., Matijević T., Pavelić J. (2006): The lack of association between monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity among men. Life Sci. **79**: 45-49.

Rauch S. L., Shin L. M., Phelps E. A. (2006): Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present,and future. Biol Psychiatry. **60**:376-382.

Regland B., Gottfries C. – G., Oreland L. (1991): Vitamin B-12 induced reductions of platelet MAO activity in patients with dementia and pernicious anemia. Eur Arch Psych Clin Neurosci **240**: 288–291.

Riederer P., Konradi C., Schay V., Kienzl E., Birkmayer G., Danielczyk W., Sofic E., Youdim M. B. (1987): Adv. Neurol. **45**: 111-118.

Robinson D. S., Davis J. M., Nies A., Colburn R. W., Davis J. N., Bourne H. R. et al. (1972): Ageing, monoamines and monoamine oxidase levels. Lancet **1**: 290–291.

Ruchkin V. V., Koposov R. A., af Klinteberg B., Oreland L., Grigorenko E. L. (2005): Platelet MAO-B, personality, and psychopathology. J Abnorm Psychol. **114**:477-82.

Ryan J., Chaudieu I., Ancelin M. L., Saffery R. (2016): Biological underpinnings of trauma and post-traumatic stress disorder: focusing on genetics and epigenetics. Epigenomics. **8**:1553-1569.

Sandler M., Glover V., Clow A., Jarman J. (1993): Monoamine oxidase-B, monoamine oxidase-B inhibitors, and Parkinson's disease. A role for superoxide dismutase? Adv Neurol. **60**:238-41.

Schalling D., Asberg M., Edman G., Oreland L. (1987): Markers for vulnerability to psychopathology: temperament traits associated with platelet MAO activity. Acta Psychiatr Scand. **76**: 172–182.

Schilling B., Lerch K. (1995): Cloning, sequencing and heterologous expression of the monoamine oxidase gene from Aspergillus niger. Mol. Gen. Genet. **247**: 430–438.

Schuff N., Neylan T. C., Lenoci M. A., Du A. T., Weiss D. S., Marmar C. R. (2001): Decreased hippocampal N-acetylaspartate in the absence of atrophy in posttraumatic stress disorder. Biol. Psychiatry. **50**:952–959.

Seckl J. R., Meaney M. J. (2006): Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. Ann N Y Acad Sci. **1071**: 351-378.

Segman R. H., Cooper-Kazaz R., Macciardi F., Goltser T., Halfon Y., Dobroborski T., Shalev A. Y. (2002): Association between the dopamine transporter gene and posttraumatic stress disorder. Mol Psychiatry. **7**:903-7.

Setini A., Pierucci F., Senatori O., Nicotra A. (2005): Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. **140**: 153–161.

Sherin J. E., Nemeroff C. B. (2011): Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. Dialogues Clin Neurosci **13**: 263–278.

Solovieff N., Roberts A. L., Ratanatharathorn A., Haloosim M., De Vivo I., King A. P., Liberzon I., Aiello A., Uddin M., Wildman D. E., Galea S., Smoller J. W., Purcell S. M., Koenen K. C. (2014): Genetic association analysis of 300 genes identifies a risk haplotype in SLC18A2 for post-traumatic stress disorder in two independent samples. Neuropsychopharmacology. **39**:1872-9.

Spatz Widom C. (1999): Posttraumatic Stress Disorder in Abused and Neglected Children Grown Up, Ph.D. Am J Psychiatry **156**:1223–1229)

Stalenheim E. G. (2004): Long-term validity of biological markers of psychopathy and criminal recidivism: follow-up 6–8 years after forensic psychiatric investigation. Psychiatry Res. **121**: 281-291.

Švob Štrac D., Kovačić Petrović Z., Nikolac Perković M., Umolac D., Nedić Erjavec G., Pivac N. (2016): Platelet monoamine oxidase type B, MAOB intron 13 and MAOA-uVNTR polymorphism and symptoms of post-traumatic stress disorder. Stress **19**(4): 362-373.

Tian Y., Liu H., Guse L., Wong T. K., Li J., Bai Y., Jiang X. (2015): Association of Genetic Factors and Gene–Environment Interactions With Risk of Developing Posttraumatic Stress Disorder in a Case–Control Study. Biol Res Nurs. **17**:364-72.

von Knorring L., Oreland L., Haggendal J., Magnusson T., Almay B., Johansson F. (1986): Relationship between platelet MAO activity and concentrations of 5-HIAA and HVA in cerebrospinal fluid in chronic pain patients. J Neural Transm. **66**: 37-46.

Wang S., Mason J. (1999): Elevations of serum T3 levels and their association with symptoms in WWII veterans with combat-related posttraumatic stress disorder: replication of findings in Vietnam combat veterans. Psychosom Med. **61**: 131-138.

Widom C.S. (1999): Posttraumatic stress disorder in abused and neglected children grown up. Am J Psychiatry. **156**:1223-1229.

Williams R. B., Marchuk D. A , Gadde K. M., Barefoot J. C., Grichnik K , Helms M. J., Kuhn C. M., Lewis J. G., Schanberg S. M., Stafford-Smith M., Suarez E. C , Clary G. L., Svenson I. K., Siegler I. C. (2003): Serotonin-related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function. Neuropsychopharmacology. **28**: 533-541.

Wolitzky-Taylor K. B., Ruggiero K. J., Danielson C. K. , Resnick H. S., Hanson R. F., Smith D. W., Saunders B. E., Kilpatrick D. G. (2008): Prevalence and correlates of dating violence in a national sample of adolescents. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. **47**: 755-762.

Yehuda R. (2006): Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications. Ann N Y Acad Sci. **1071**: 137-166.

Youdim M. B., Edmondson D., Tipton K. F. (2006): The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. Nat Rev Neurosci. **7**: 295-309.

Yu P. H., Boulton A. A. ( 1987): Irreversible inhibition ofmonoamine oxidase by some components of cigarette smoke. Life Sci **41**: 675–82.

Zaidi, LY, Foy, DW. (1994): Childhood abuse experiences and combat-related PTSD. J. Trauma Stress; 7: 33–42.

Zalsman G., Huang Y. Y., Harkavy-Friedman J. M., Oquendo M. A., Ellis S. P., Mann J. J. (2005): Relationship of MAOA promoter (u-VNTR) and COMT (V158M) gene polymorphisms to CSF monoamine metabolites levels in a psychiatric sample of Caucasians: A preliminary report. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. **132B**: 100-103.

Web stranice:

https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAOA#genomic_location (pristupljeno: Kolovoz 2018.)

# 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16. travnja 1993. godine u Splitu. Tamo sam završila Osnovnu školu Lučac, a potom upisala i Prirodoslovno tehničku školu, smjer prirodoslovna gimnazija.
Godine 2011. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije i ekologije mora na Sveučilišnom odjelu za studije mora Sveučilišta u Splitu, te sam 2014. godine stekla zvanje Sveučilišna prvostupnica biologije i ekologije mora. Završni rad Agresivno ponašanje kod glavonožaca napravljen je pod mentorstvom doc.dr.sc. Mirele Petrić.
Bila sam aktivna članica Udruge studenata odjela za studije mora "Oceanus" i sudjelovala u realizaciji projekata popularizacije znanosti i poboljšanja kvalitete studentskog života.
Godine 2014. upisala sam diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu.
Od 2016. do 2018. bila sam članica studentske udruge "eSTUDENT" gdje sam sudjelovala u realizaciji različitih projekata namijenjenih studentima.