

# Povezanost polimorfizma gena za serotoniniski receptor 5-HT1B i akutnih estrapiramidnih nuspojava antipsihotika haloperidola u oboljelih od shizofrenije

---

Hrgovčić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:451220>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Hrgovčić

Povezanost polimorfizma gena za serotoninški receptor 5-HT1B i  
akutnih ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika haloperidola u  
oboljelih od shizofrenije

Diplomski rad

Zagreb, 2015. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju, na Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob Štrac, znanstvene suradnice IRB. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

# ZAHVALE

Moj diplomski rad nastao je uglavnom zahvaljujući dobrim ljudima kojima sam okružena. Ja sama, bez vaše podrške i pomoći, nikad ga ne bih uspjela dovršiti. Samo neke ću poimence spomenuti, ostalima zahvaljujem ovako u komadu i od srca.

Prvo, hvala mojoj mentorici, doktorici Dubravki Švob Štrac, na prilici da uopće napišem ovaj rad, strpljivosti i pomoći tijekom izrade i staloženosti i razumijevanju pri dovršavanju i predaji rada. Sigurno sam vas koštala živaca, hvala što ste mi pristupili s razumijevanjem.

Hvala i profesorici Hranilović na savjetima i usmjeravanju tijekom pisanja rada, i na pomoći u zadnjim uzbudljivim trenucima prije predaje.

Hvala svim mojim prijateljima, koji su mi nabijali krivnju i tjeroali me da počnem pisati (Jurana, Katarina i Ivana), koji su me tješili s razumijevanjem (Jelena, Iva i Josip), koji su bili sa mnom u najtežim minutama, prepravljali mi slike i tresli se sa mnom (Dujo i Stipe), i svim drugima koji su učinili studiranje najzabavnijim i najljepšim razdobljem mog života.

Veliko hvala mojoj obitelji, svima onima koji mogu i koji ne mogu primiti moju zahvalu, jer im je uvijek na umu moja dobrobit.

Na kraju, ali ništa manje, zahvaljujem se tetama u referadi, bez kojih ne bih završila fakultet.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost polimorfizma gena za serotoninški receptor 5-HT1B i akutnih ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika haloperidola u oboljelih od shizofrenije

Ana Hrgovčić, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Shizofrenija predstavlja ozbiljan kronični psihijatrijski poremećaj čija je neurobiološka podloga još uvijek nedovoljno poznata. Bolest se liječi tzv. tipičnim i atipičnim antipsihoticima, no kod dijela bolesnika javljaju se negativni popratni učinci koji značajno otežavaju liječenje dovodeći do prekida terapije i učestalog povratka bolesti. Najpoznatiji popratni učinci tipičnih antipsihotika su akutne (distonija, parkinsonizam, akatizija) i kronične (tardivna diskinezija) ekstrapiramidne nuspojave (EPS), dok su najčešće nuspojave atipičnih antipsihotika povećanje tjelesne težine i metabolički sindrom. Atipični antipsihotici razlikuju se od tipičnih po većem afinitetu za serotoninške 5-HT<sub>2</sub> receptore u odnosu na dopaminske D<sub>2</sub> receptore, te po bržoj disocijaciji s D<sub>2</sub> receptora. Saznanja o međudjelovanju dopaminskog i serotoninškog sustava u mozgu potaknula su pitanja o mogućem utjecaju serotoninškog sustava na pojavu EPS. Stoga je cilj istraživanja bio utvrditi moguću povezanost polimorfizma u genu za serotoninški receptor 5-HT<sub>1B</sub> u oboljelih od shizofrenije, s pojavom akutnih ekstrapiramidnih nuspojava nakon liječenja tipičnim antipsihotikom haloperidolom. U istraživanju je utvrđena značajna povezanost polimorfizma rs132120411 u genu za serotoninški 5-HT<sub>1B</sub> receptor s razvojem akatizije u bolesnika sa shizofrenijom nakon terapije haloperidolom. Dobiveni rezultati trebali bi pomoći kliničarima da individualiziraju farmakoterapiju, te da prevencijom neželjenih nuspojava antipsihotika povećaju uspješnost liječenja i kvalitetu života oboljelih od shizofrenije.

(50 stranica, 15 slika, 10 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: serotonin, dopamin, EPS, rs13212041, *HTR1B*

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, znanstvena suradnica IRB

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Izv. prof. dr. sc. Antun Alegro

Doc. dr. sc. Ana Galov

Rad prihvaćen: 15.9.2015.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

The association between 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptor gene polymorphism and acute extrapyramidal side effects in haloperidol-treated patients with schizophrenia

Ana Hrgovčić

Rooseveltova trg 6, Zagreb

Schizophrenia is a serious chronic psychiatric condition with neurobiological basis still largely unknown. Therapy consists of typical and atypical antipsychotic; however some patients develop side effects that severely affect treatment outcomes and lead to discontinuation of therapy and frequent relapse. Well known side effects of typical antipsychotics are acute (dystonia, parkinsonism, akathisia) and chronic (tardive dyskinesia) extrapyramidal side effects (EPS), while metabolic syndrome and weight gain are main side effects of atypical antipsychotics. Atypical antipsychotics differ from typical in higher affinity for serotonin 5-HT receptors and faster dissociation from dopamine D<sub>2</sub> receptors. Findings on various interactions between serotonin and dopamine systems in the brain have raised questions about possible involvement of serotonin in EPS. Therefore, the aim of this research was to determine the possible association between rs13212041 polymorphism in the gene for the serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptor in patients with schizophrenia, with the development of acute EPS after treatment with typical antipsychotic drug haloperidol. The study found significant association of rs132120411 polymorphism in the gene coding for the serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptor with the development of akathisia in schizophrenia patients following haloperidol therapy. The results should help clinicians to individualize the pharmacotherapy and by preventing the unwanted side effects of antipsychotics to increase the treatment efficacy and quality of life of schizophrenia patients.

(50 pages, 15 pictures, 10 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: serotonin, dopamine, EPS, rs13212041, *HTR1B*

Supervisor: Dr.sc. Dubravka Švob Štrac, Research Associate, RBI

Co-supervisor: Dr.sc. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof., Faculty of Science

Reviewers: Dr.sc. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.

Dr.sc. Antun Alegro, Assoc. Prof.

Dr.sc. Ana Galov, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15.9.2015.

## POPIS KRATICA

5-HT – 5-hidroksitriptamin

ACD – dekstroza citratne kiseline (*acid citrate dextrose*)

BARS – Barnes Akathisia Rating Scale

DISC1/2 – *disrupted in schizophrenia 1 / 2*

DOPA – dihidroksifenilalanin

DSM-III(IV) – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd. Edition (4th. Edition)*, priručnik za dijagnozu psihičkih poremećaja

EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina

EPS – ekstrapiramidalne nuspojave

ESRS – *Extrapyramidal Symptom Rating Scale*, ljestvica ekstrapiramidnih simptoma

GABA –  $\gamma$ -amino-maslačna kiselina

IL – interleukin

MGB – ligand manjeg utora DNA (*minor groove binder*)

MKB-10 – 10. revizija međunarodne klasifikacije bolesti

NMDA – N-metil-D-aspartat

PANSS – *Positive and negative syndrome scale*, pozitivna i negativna sindromska ljestvica

PCP – fenciklidin

PCR – lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

RCLB – pufer za lizu eritrocita (*red cell lysis buffer*)

SAS – *Simpson-Angus Scale*, ljestvica ekstrapiramidnih simptoma

SDS – natrij-dodecil sulfat

SERT – transporter serotonina

SNP – *single nucleotide polymorphism*, polimorfizam promjene jedne baze

TNF $\alpha$  – tumorski faktor nekroze  $\alpha$

VMAT – vezikularni transporter monoamina

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Shizofrenija.....	1
1.2. Etiologija bolesti.....	4
1.3. Uloga dopamina i serotonina u razvoju bolesti .....	7
1.4. Liječenje shizofrenije .....	8
1.5. Nuspojave primjene antipsihotika .....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Ispitanici .....	17
3.2. Izolacija DNA iz krvi metodom izoljavanja .....	18
3.3. Određivanje genotipova metodom <i>real-time</i> PCR-a .....	19
3.4. Statistička obrada podataka .....	20
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA .....	39
6. ZAKLJUČAK .....	43
7. LITERATURA .....	45



# 1. UVOD

## 1.1. Shizofrenija

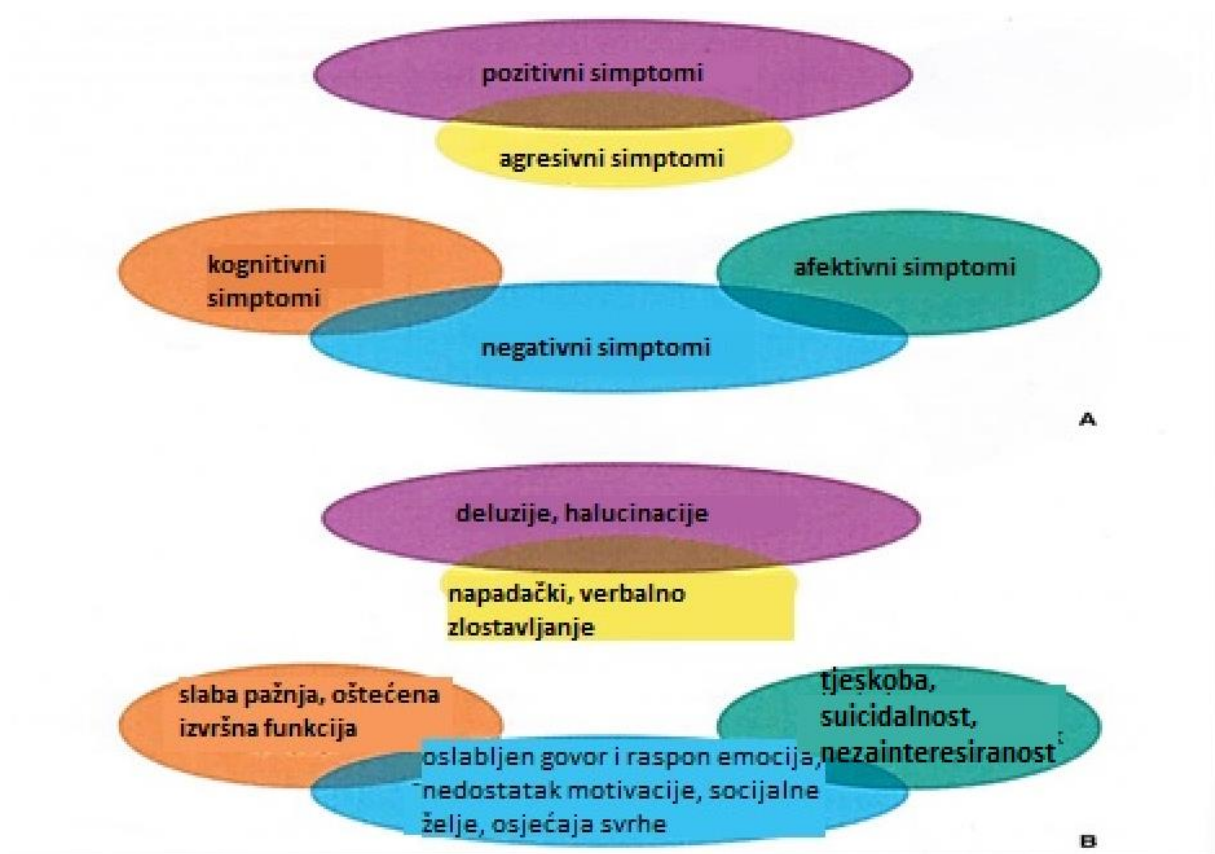
Shizofrenija je kronični psihijatrijski poremećaj kojeg karakterizira neusklađenost misli i osjećaja te njihova nepodudarnost s vanjskim svijetom. Svijet koji oboljela osoba doživljava ne odgovara stvarnom svijetu pa kažemo da bolesnik „ne doživljava stvarnost“, iako je često sposobna funkcionirati u svakodnevnom životu. Simptomi shizofrenije uključuju promjenu gotovo svih psihičkih funkcija, a njihova se pojavnost razlikuje među oboljelima (Begić, 2011).

Slučajevi shizofrenije dokumentirani su kroz povijest i prisutni u najranijim medicinskim zapisima. Moderna povijest bolesti započinje sredinom 19. stoljeća kada je francuski liječnik Bénédict A. Morel opisao simptome kognitivne degeneracije, halucinacija i sumanutih misli kod jednog od svojih bolesnika. Ovaj skup simptoma nazvao je *démence précoce*. Trideset godina kasnije, njemački psihijatar Emil Kraepelin osmislio je podjelu duševnih poremećaja na dvije velike skupine; manično-depresivne psihoze i psihoze koje je nazvao *dementia praecox* (Begić, 2011).

Švicarski liječnik Eugen Bleuler skovao je za ovu skupinu psihoza naziv shizofrenija, od grčkih riječi *schizo* – rascjep i *phren* – razum, ilustrirajući tako svoje opažanje da kod shizofrenije dolazi do rascjepa osjećaja i razuma. Bleuler klasificira simptome u dvije grupe: A-simptome, koji su obavezni za dijagnozu i sekundarne simptome. A-simptomi uključuju poremećaj asocijacija, poremećaj afekta, autizam i ambivalenciju, odnosno dvostrukost emocija, dok su sekundarni sumanute misli i halucinacije. Bleuler i neki od kasnijih liječnika smatrali su da demencija i smanjenje kognitivne sposobnosti nije nužna posljedica bolesti i da se mogu spriječiti pravovremenim liječenjem. Američki psihijatar Harry S. Sullivan zastupao je psihološko objašnjenje i liječenje shizofrenije videći njezin uzrok u socijalnoj izolaciji (Begić, 2011).

Kasniji pokušaji klasifikacije psihopatologije shizofrenije smjeraju uvesti red u postupke dijagnoze i raščlaniti mnogobrojne simptome. Jedan od aktualnijih modela patologije shizofrenije prema Lindenmayeru i sur. (1994) jest peterodimenzionalni model shizofrenih simptoma.

Simptomi su klasificirani u 5 zasebnih skupina: negativne simptome (emocionalna povučenost, smanjenje afekta, socijalna povučenost, pasivnost, apatetičnost), uzbuđenost (loša kontrola impulsa, neprijateljstvo, napetost), kognitivne simptome (konceptualna neorganiziranost, dezorijentiranost, poteškoće održavanja pažnje i apstraktnog mišljenja), pozitivne simptome (halucinacije, deluzije, paranoičnost) i depresivne simptome (depresija, tjeskoba, preokupacija, krivnja).



Slika 1: Petodimenzionalni model simptoma shizofrenije. (A) klasifikacija simptoma (B) primjeri simptoma (preuzeto i modificirano sa [www.schizophrenia.com](http://www.schizophrenia.com))

Prvi simptomi bolesti najčešće se javljaju za vrijeme kasne adolescencije; prema istraživanjima Svjetske zdravstvene organizacije, 51% novo dijagnosticiranih slučajeva su pacijenti između 15 i 25 godina, dok je 82.5% između 15 i 35 godina (Harrop i Trower, 2001). Rizik obolijevanja od shizofrenije u populaciji je 1%, a incidencija je 10-40 ljudi na 100 000 godišnje i ova brojka stabilna je već duži niz godina. Obiteljske studije ukazuju na genetičku komponentu bolesti; rizik od obolijevanja raste do 7% ako su oboljeli brat ili sestra, a ako je obolio i roditelj rizik je i do 17%. Studije na blizancima predviđaju rizik od 40-50% ako je bolest dijagnosticirana jednojajčanom blizancu, a 10-15% ako je riječ o dvojajčanom

blizancu (Begić, 2011). Incidencija bolesti kod muškaraca u odnosu na žene je u omjeru 1.42:1 i manjem ako se primjenjuju širi dijagnostički kriteriji, dok je, paradoksalno, u dosadašnjim analizama utvrđena prevalencija bolesti jednaka kod žena i muškaraca. Razlike između spolova u tijeku i prognozi bolesti uključuju kasniju pojavu simptoma kod žena, češću pojavu pozitivnih simptoma i uzbuđenosti te manje negativnih simptoma nego kod muškaraca (Abel i sur., 2010).

Prodromalni simptomi koji se javljaju za vrijeme adolescencije najčešće su negativni i depresivni (Begić, 2011) i ponekad ih je teško odvojiti od uobičajenih psiholoških i bihevioralnih promjena kroz koje prolaze mladi u razvoju. Harrop i Trower (2001) tako iznose psihološko-razvojnu teoriju da je pojava shizofrenije u kasnoj adolescenciji rezultat zakočenog psihološkog sazrijevanja; obrambeni mehanizmi kojima se osoba štiti od traume odvajanja od roditelja i traženja svog mjesta u društvu vršnjaka postaju pretjerani i ekstremni.

Prijelaz iz prodromalne faze u akutnu može se dogoditi postepeno ili naglo kroz nekoliko dana; u akutnoj fazi javljaju se pozitivni simptomi koji često rezultiraju hospitalizacijom. Nakon akutne može nastupiti kronična faza u kojoj dolazi do poremećaja funkcioniranja, trajnih afektivnih promjena i kognitivnog propadanja.

Ovisno o prognozi bolesti, do kronične faze ne mora uopće doći, tako jedan dio bolesnika nakon akutne faze ulazi u fazu remisije. U fazi remisije, često uz kontinuirano uzimanje lijekova, može doći do potpunog oporavka od svih simptoma, iako nije moguće jamčiti da neće doći do ponovnog pogoršanja bolesti (Begić, 2011).

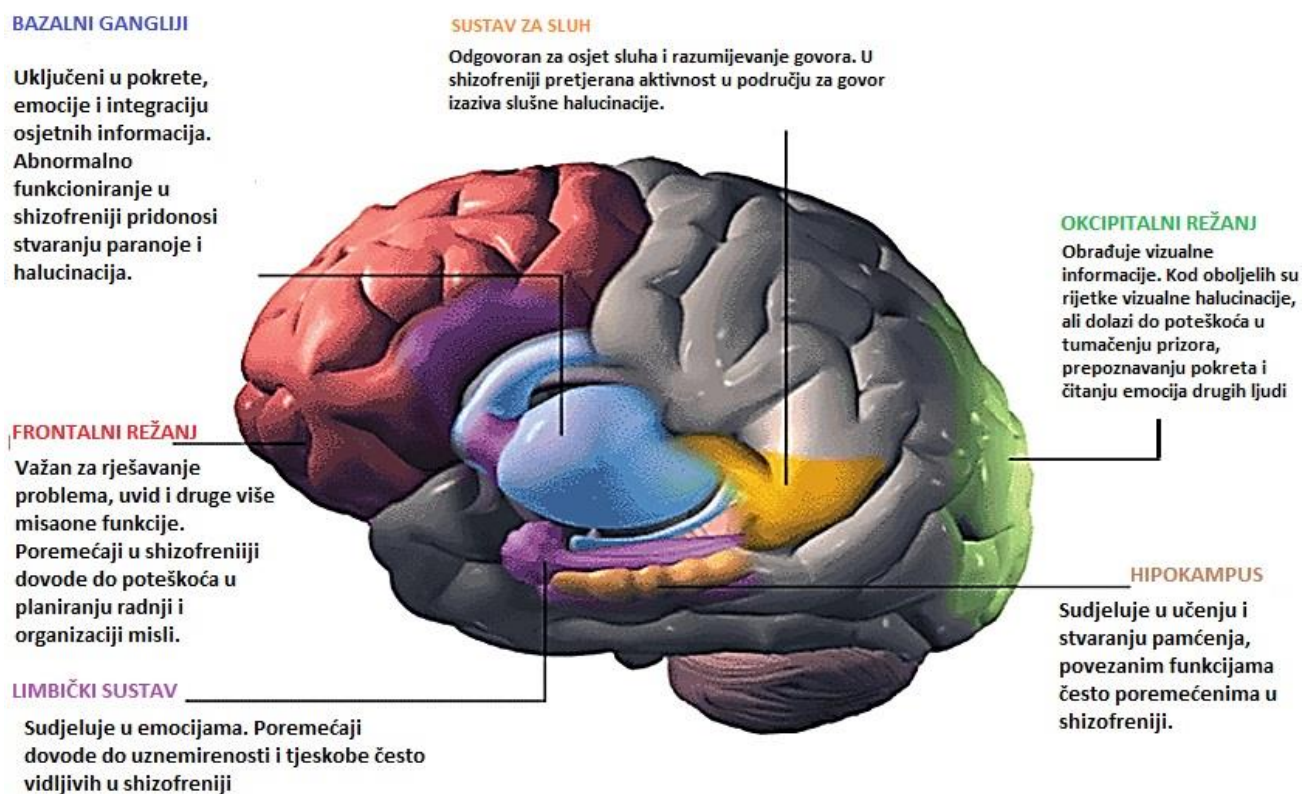
Predominantni simptomi nisu isti među oboljelima, pa se u postupku dijagnostike može razlikovati nekoliko podtipova shizofrenije:

1. **Paranoidna shizofrenija** – Predominantni simptomi su slušne halucinacije i deluzije o proganjanju i uhođenju.
2. **Dezorganizirana shizofrenija** – Dezorganiziranost misaonih procesa je glavno obilježje i značajno utječe na sposobnost izvođenja svakodnevnih zadataka.
3. **Katatonička shizofrenija** – Poremećaji motorike su glavni simptom ovog podtipa. Kod oboljelih osoba dolazi do postupnog smanjenja motoričke aktivnosti do krajnjih granica, tada govorimo o katatoničkom stuporu.
4. **Nediferencirana shizofrenija** – Dijagnosticiran kod osoba koje imaju nespecifične simptome pa ih se ne može smjestiti u neki drugi podtip. Simptomi se mijenjaju kroz tijek bolesti.
5. **Rezidualna shizofrenija** – Ovaj podtip dijagnosticira se kada pacijent više nema izražene simptome, odgovara kroničnoj fazi (Benassir i sur., 2010).

## 1.2. Etiologija bolesti

Uzrok nastanka shizofrenije još uvijek nije utvrđen, što je i razumljivo s obzirom na složenost bolesti i raznolikost simptoma. Hipoteze o nastanku bolesti izvedene su na temelju neuroanatomije i morfologije, genetičkih studija i mehanizma djelovanja antipsihotika.

Neurorazvojna hipoteza nastanka shizofrenije traži uzroke u događajima u prenatalnom razdoblju života, bilo genetičkog ili okolišnog porijekla, koji bi mogli rezultirati oštećenjima mozga čije su posljedice vidljive tek u adolescenciji i ranoj odrasloj dobi. Neuroanatomske i citoarhitektonske abnormalnosti mozga kod oboljelih od shizofrenije potkrijepljuju ovu hipotezu. Primjerice, najčešće uočena promjena u morfologiji mozga jest povećanje cerebroventrikularnog sustava: lateralnih i treće ventrikule, te proširenje kortikalnih fisura i sulkusa kod oboljelih.



Slika 2. Regije mozga promijenjene u shizofreniji. Bolest utječe na sustav za sluh, bazalne ganglije, frontalni i okcipitalni režanj, hipokampus i limbički sustav (preuzeto i modificirano sa [www.schizophrenia.com](http://www.schizophrenia.com))

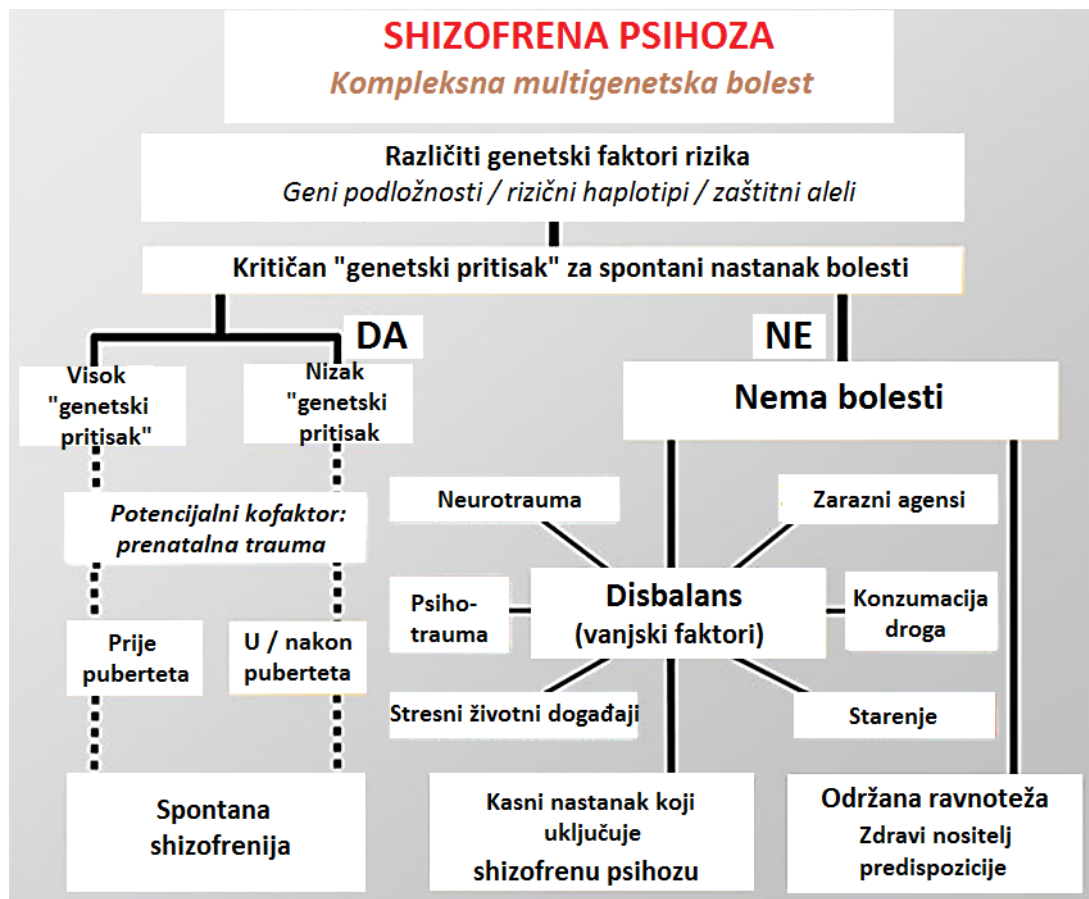
Obdukcijski nalazi pokazuju kortikalnu atrofiju, smanjenje volumena amigdale i talamusa, a citoarhitektonske studije pokazuju abnormalnosti u laminarnoj organizaciji i orijentaciji neurona (Fatemi i Folson, 2009). Piramidalni neuroni u hipokampusu i neokorteksu imaju smanjena stanična tijela te manji broj dendritičkih spina, a kod oboljelih je utvrđeno i klasteriranje neurona u dubljim kortikalnim slojevima te nepotpuno klasteriranje tamo gdje bi trebalo biti prisutno. Ovi nalazi upućuju na klasifikaciju shizofrenije kao bolesti poremećene sinaptičke komunikacije neurona (Powell, 2010).

Uzroci abnormalnog razvoja mozga mogu biti genetički ili okolišni. Jedna od zanimljivih poveznica koja može upućivati na okolišni uzrok jest veći broj rođenja tijekom zime i ranog proljeća među oboljelima od shizofrenije. Smatra se da virusne infekcije majke tijekom drugog tromjesečja trudnoće mogu uzrokovati poremećaje u neuralnom razvoju, bilo direktnim prelaskom infekcije na dijete ili aktivacijom citokina koji su inače uključeni u razvoj mozga – interleukina IL-1 $\beta$ , IL-6, te tumorskog faktora nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Fatemi i Folson, 2009). U studiji provedenoj na Finskim državljanima čije su majke tijekom 1957. godine u drugom tromjesečju trudnoće bile zaražene virusnim sojem gripe A2, Mednick i sur. (1988) utvrdili su da je rizik od obolijevanja od shizofrenije povećan na 50%. Karlsson i sur. (2001) utvrdili su prisutnost retroviralne RNA u cerebrospinalnoj tekućini u 29% ispitanika s akutnom i kroničnom pojavom bolesti.

Porođajne komplikacije, hipoksija, pothranjenost i stres kod majki mogli bi također biti uzrok abnormalnosti u razvoju mozga u prenatalnom i perinatalnom razdoblju (Powell, 2010). Naime, pretpostavlja se da okolišni i/ili genetički faktori uzrokuju stres i poremećaje u nastanku i migraciji neurona neokorteksa te na taj način stvaraju predispoziciju za obolijevanje od shizofrenije u kasnijoj dobi, pripomognutu osobnim karakteristikama i životnim iskustvom pojedinca (Mednick i sur., 1988).

Genetička podloga shizofrenije po svemu sudeći nije monogenska niti slijedi jednostavnu Mendelovu genetiku. Obiteljske studije i studije na blizancima jasno pokazuju da postoji nasljedna komponenta bolesti koja ne dolazi od razvojnih i okolišnih faktora (Berry i sur., 2003). Rezultati studija povezanosti (*linkage studies*) povezuju više genskih lokusa s rizikom od obolijevanja, međutim, za svaki pojedini lokus značajnost je slaba, te se najvjerojatnije radi o međudjelovanju više gena za podložnost nastanku shizofrenije (Kendler i sur., 2000).

Tako su kao rizični lokusi koji se povezuju s razvojem shizofrenije identificirani: 1q21-q22, 1q42 (*DISC1* i *DISC2* geni), 5q, 6p22-p24, 6q, 8p21-p22, 10p, 11q, 13q, 15q13-q15, 22q (Berry i sur., 2003, Kendler i sur., 2000).



Slika3. Shema međudjelovanja genetskih i okolišnih čimbenika na razvoj shizofrenije (preuzeto i modificirano sa [www.neuroprotection-schizophrenia.de](http://www.neuroprotection-schizophrenia.de))

Dopaminska hipoteza nastanka shizofrenije predlaže hiperaktivnost dopaminskog sustava kao uzrok pojavi shizofrenih simptoma. Pozitivni simptomi dovedeni su u povezanost s pretjeranim otpuštanjem subkortikalnog dopamina i povećanom aktivnošću receptora  $D_2$ , dok su negativni simptomi (anhedonija, nedostatak motivacije) rezultat smanjene aktivnosti receptora  $D_1$  u prefrontalnom korteksu.

### 1.3. Uloga dopamina i serotonina u razvoju bolesti

Dopamin i serotonin su neurotransmiteri iz porodice biogenih amina; dopamin spada u kateholamine, a serotonin u primarne amine. Svi kateholamini nastaju iz zajedničkog prekursora, aminokiseline tirozina koji se hidroksilira pomoću enzima tiroksin-hidroksilaze u prekursor dopamina (dihidroksifenilalanin, DOPA). Dopamin nastaje iz DOPA-e djelovanjem dekarboksilaze, te se nakon nastanka u citoplazmi presinaptičkih završetaka sprema u vezikule putem vezikularnog monoaminskog prijenosnika (VMAT). Djelovanje dopamina u sinapsi prekida se odvođenjem u obližnje glija stanice preko  $\text{Na}^+$ -ovisnog dopaminskog prijenosnika, a enzimi uključeni u razgradnju dopamina su monoamin oksidaza i katehol O – metiltransferaza. U sinapsi, dopamin djeluje na receptore vezane uz G-proteine, a podtipovi dopaminskih receptora obično inhibiraju ili aktiviraju adenilil ciklazu i tako pokreću raznolike odgovore u mozgu. Glavno područje u mozgu koje sadrži dopamin je strijatalno područje koje dobiva informacije iz substantie nigre i odgovorno je za koordinaciju tjelesnih pokreta (Purves i sur., 2008).

Serotonin (5-hidroksitriptamin) se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana djelovanjem enzima triptofan-5-hidroksilaze. Spremanje serotonina u sinaptičke vezikule obavlja također VMAT, a prijenos iz sinaptičke pukotine natrag u neuron obavlja specifični serotoninški prijenosnik (SERT). Većina serotoninških receptora su metabotropni i oni su uključeni u procese nastanka emocija, u cirkadijalne ritmove, stanje uzbuđenosti i motoričko ponašanje. Jedina grupa ionotropnih receptora serotonina su receptori  $5\text{-HT}_3$ , i oni upravljaju ekscitacijskim postsinaptičkim odgovorima. Najviše serotonina nalazi se u područjima raphe nuclei, ponsu i gornjoj kralježničkoj moždini s projekcijama u prednji mozak (Purves i sur., 2008).

Studije povezanosti s genima kandidatima bavile su se velikim dijelom genima za receptore dopamina, poglavito receptorom  $\text{D}_2$  koji se pokazao kao mjesto djelovanja tipičnih antipsihotika. Također, prekursor dopamina (L-DOPA) koji se koristi u ublažavanju simptoma Parkinsonove bolesti može izazvati psihotične simptome kod bolesnika, kao i zlouporaba droga koje djeluju kao dopaminergički agonisti, primjerice amfetamini (Begić, 2011).

Značajna povezanost polimorfizama dopaminskih receptora D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>5</sub> i pojave shizofrenije utvrđena je u nekim studijama, ali pokušaji ponavljanja rezultata su često bili neuspješni (Berry i sur., 2003). Nakon otkrića klopazina i drugih atipičnih antipsihotika te njihova djelovanja na serotonininske receptore, serotoniniski sustav postao je zanimljiv za istraživanja povezanosti s pojavom shizofrenije. Uz genske varijacije serotoniniskog receptora 5-HT<sub>2A</sub>, polimorfizmi gena za serotoniniski transporter pokazali su povezanost s nekim psihopatološkim stanjima (Berry i sur., 2003).

U posljednje vrijeme pozornost je usmjerena na studije koje povezuju shizofreniju s poremećajima glutamatnog sustava. Smanjena funkcija glutamatnih receptora za N-metil-D-aspartat (NMDA) smatra se jednim od čimbenika u patofiziologiji shizofrenije, tako antagonisti receptora NMDA, primjerice ketamin i fenciklidin (PCP), izazivaju simptome slične pozitivnim i negativnim simptomima u shizofreniji (Tsai i Coyle, 2002).

#### **1.4. Liječenje shizofrenije**

Cijeloživotno liječenje shizofrenije je neophodno za održavanje društvenog funkcioniranja i sprječavanje relapsa simptoma, pri čemu je posebno važno pravovremeno započeti terapiju kako bi se spriječila nepovratna oštećenja ličnosti. Bolest se liječi lijekovima iz skupine antipsihotika, koji se najčešće dijele na tzv. tipične ili antipsihotike prve generacije (klorpromazin, haloperidol, flufenazin), učinkovite u liječenju pozitivnih simptoma, te novije tzv. atipične ili antipsihotike druge generacije (olanzapin, risperidon, kvetiapin) koji mogu smanjiti i pozitivne i negativne simptome shizofrenije (Zhang i Malhotra, 2011).

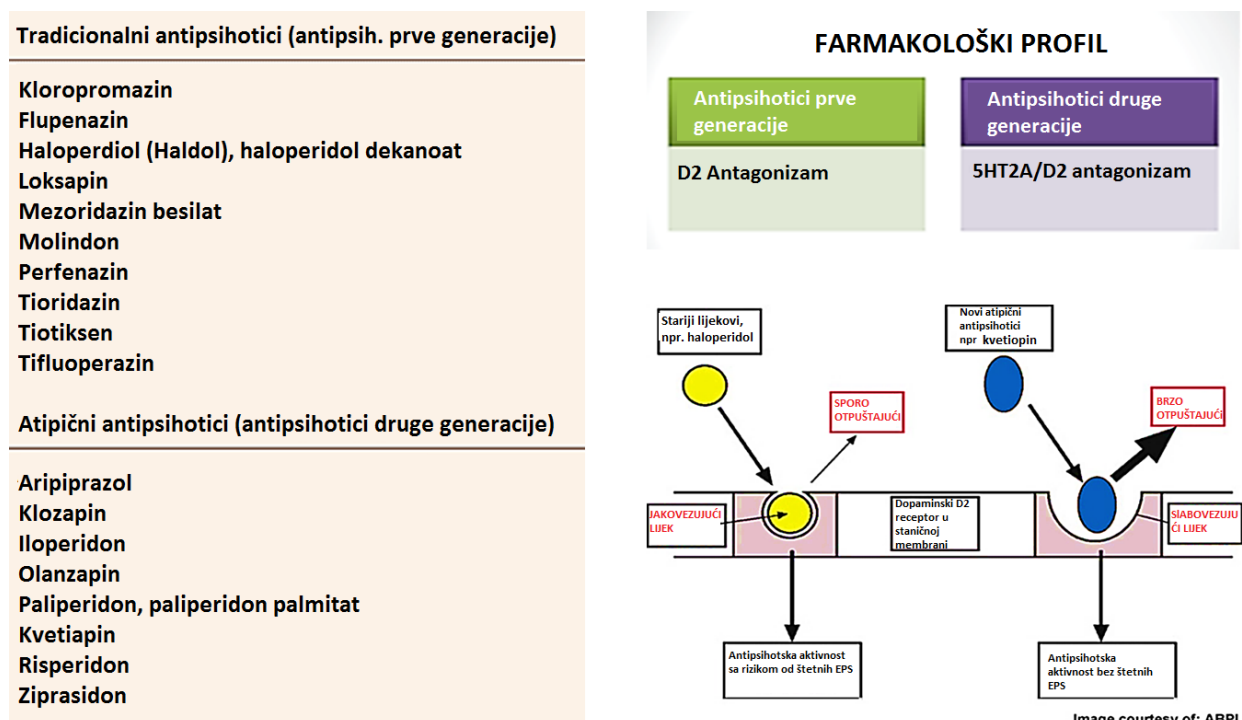
Složena simptomatika shizofrenije, koja uključuje pozitivne i negativne, afektivne i kognitivne simptome, te neurorazvojna oštećenja i degenerativne promjene mozga, nedvojbeno ukazuje na složenost uzroka bolesti. Posljedično, liječenje shizofrenije vjerojatno nikada neće biti moguće svesti na jednostavno djelovanje putem jednog terapijskog cilja.

Farmakološko liječenje glavni je pristup liječenju shizofrenije. Kognitivna bihevioralna terapija, psihoedukacija i pomoć u uključivanju u društvo važni su za omogućavanje povratka normalnom životu oboljelih osoba, no za uklanjanje pozitivnih simptoma bolesti neophodno je liječenje antipsihoticima, poglavito u akutnoj fazi bolesti (Kaut i Cadenhead, 2010). Pri liječenju se, dakle, daje prednost liječenju pozitivnih simptoma



shizofrenije (halucinacija, deluzija, paranoičnih misli), međutim, vlada velika potreba za liječenjem negativnih simptoma i kognitivnih deficita koji predstavljaju najveću prepreku oboljelima pri pokušaju normalizacije života (Kim i Stahl, 2010).

Antipsihotike dijelimo na tipične (antipsihotike prve generacije) i atipične (druge generacije). Mehanizam njihovog djelovanja u osnovi je isti, oni se vežu za dopaminske receptore D<sub>2</sub> kao antagonisti ili inverzni agonisti. Vezanjem za receptore, oni ili inhibiraju bazalnu aktivnost G-proteinskog glasničkog sustava vezanog uz receptor (inverzni agonisti) ili nemaju nikakvo djelovanje na bazalnu aktivnost. Na bilo koji od ova dva načina zapravo blokiraju postsinaptički receptor i sprečavaju vezanje dopamina (Kim i Stahl, 2010). Novi atipični antipsihotici razlikuju se od sporo disocirajućih tipičnih antipsihotika po većem afinitetu za serotonininske receptore 5-HT<sub>2</sub> u odnosu na receptore D<sub>2</sub>, te po bržoj disocijaciji s receptora D<sub>2</sub> (Kapur i sur., 2000).

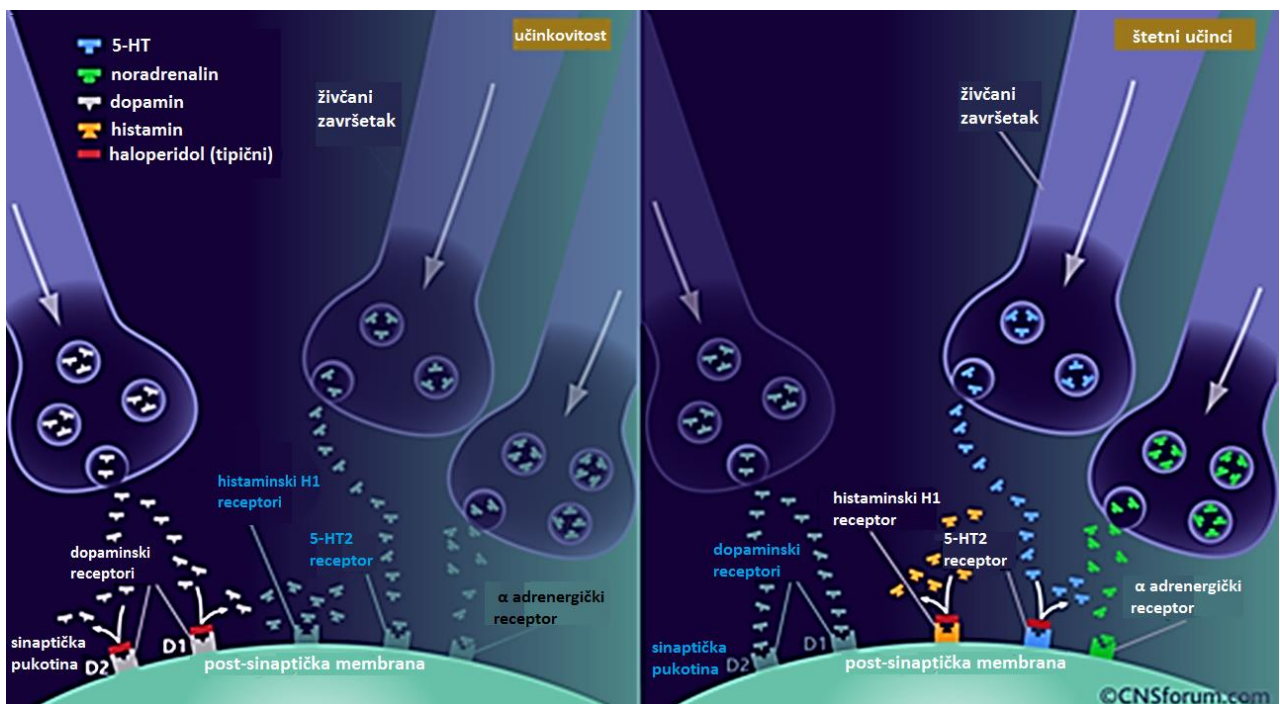


Slika 4. Mehanizam djelovanja tipičnih i atipičnih antipsihotika s primjerima lijekova. Tipični antipsihotici se snažno vežu za receptor i sporo otpuštaju, za razliku od atipičnih antipsihotika (preuzeto i modificirano s [www.abpi.org.uk](http://www.abpi.org.uk))

Antipsihotici prve generacije (klorpromazin, haloperidol) variraju u učinkovitosti, farmakološkim svojstvima i sklonosti izazivanju nuspojava. Otprilike 30% pacijenata s psihotičnim simptomima ne pokazuje nikakav odgovor na lijek, dok gotovo 60% pokazuje samo djelomičan odgovor.

Tipični antipsihotici također pokazuju lošije djelovanje na negativne simptome shizofrenije u odnosu na djelovanje na pozitivne simptome (Miyamoto i sur., 2005). Svi tipični antipsihotici mogu rezultirati pojavom ekstrapiramidnih nuspojava (EPS): parkinsonizma, distonije, akatizije i tardivne diskinezije (Lencz i Malhotra, 2009, Kane, 2001).

Meta-analize usporedbe učinkovitosti antipsihotika druge generacije (klozapin, risperidon, olanzapin) s tipičnim antipsihoticima pokazale su veću podnošljivost i sigurnost ovih lijekova, poglavito u vezi s pojavom EPS. U testovima neurokognitivnih funkcija, atipični antipsihotici također pokazuju bolje rezultate (Bilder i sur., 2002).



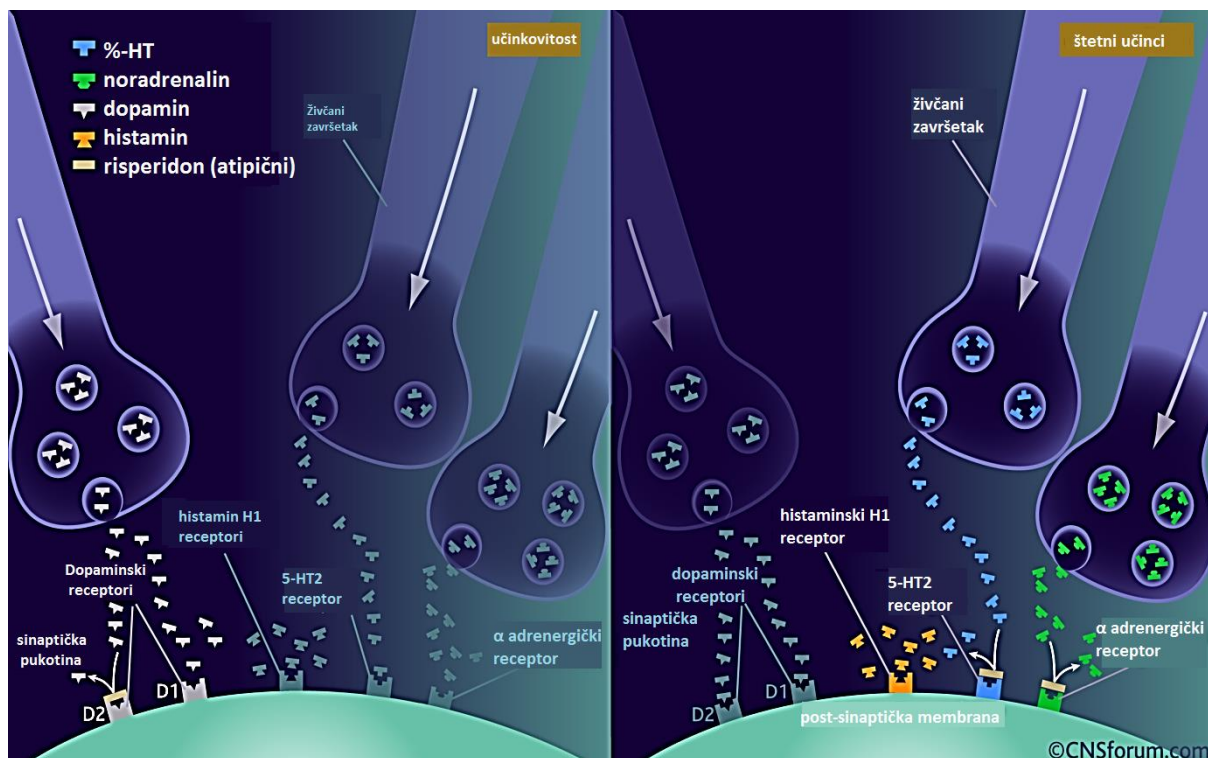
Slika 5. Mehanizam djelovanja tipičnih antipsihotika. Haloperidol utječe na psihotične simptome blokiranjem D2 i D1 receptora. Štetne nuspojave nastaju neselektivnim vezajem na druge tipove receptora, npr. histaminske (preuzeto i modificirano s [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com))

Jedna od teorija terapijskog učinka antipsihotika tvrdi da brzina otpuštanja antagonista s receptora ima utjecaja na terapijsko djelovanje, konkretno, da je veća brzina otpuštanja s receptora kod atipičnih antipsihotika odgovorna za uspješnije rezultate u liječenju i smanjenu pojavu EPS. Nije, ipak, posve jasno utječe li brže otpuštanje i na brži relaps simptoma bolesti (Miyamoto i sur., 2005).

Tipični antipsihotici pokazuju visoku koleraciju između terapijske doze i afiniteta za vezanje na receptore D<sub>2</sub>. Primjerice, jedan od tipičnih antipsihotika, haloperidol, se veže s

velikim afinitetom i sporo disocira s receptora. Njegov učinak je povezan sa zauzetošću veznih mjesta, antipsihotički učinak javlja se kod 65-70% zauzetih receptora, dok se rizik od pojave ekstrapiramidnih nuspojava značajno povećava kod 80%-tne zasićenosti receptora. Haloperidol u dozi od 2-5mg/dnevno postiže zasićenost receptora od 60-80%, međutim, s vremenom je potrebna veća doza da bi se postigao isti učinak zbog povećanja broja receptora kao odgovora na primjenu lijeka (Miyamoto i sur., 2005).

Atipični antipsihotici pokazuju veći afinitet za vezanje na serotonininski receptor 5-HT<sub>2A</sub> u odnosu na dopaminski receptor D<sub>2</sub>, što je u teoriji osnova za veću efikasnost u liječenju pozitivnih simptoma i smanjenu pojavu ekstrapiramidnih nuspojava. Klozapin, risperidon, olanzapin i ziprasidon zauzimaju više od 80% kortikalnih receptora 5-HT<sub>2A</sub> (Miyamoto i sur., 2005). Naime, tipični antipsihotici djeluju neselektivno na dopaminske receptore, kako na one u mezolimbičkom dopaminskom putu (čime se smanjuju psihotični simptomi bolesti), tako i na smanjenje aktivnosti receptora D<sub>2</sub> u nigrostrijatalnom području (pojava EPS) te mezokortikalnom dopaminskom putu (negativni i afektivni simptomi). Serotonergični neuroni djeluju na otpuštanje dopamina u dopaminergičnim neuronima preko dva puta: izravno preko somatodendritičkih i aksodendritičkih serotoninških receptora na tim neuronima ili neizravno preko istih receptora na GABA interneuronima i to djelovanje je najčešće inhibicijsko. Antipsihotici druge generacije svojim antagonističkim djelovanjem na serotoninške receptore blokiraju inhibiciju i omogućuju otpuštanje dopamina u dopaminergičkim neuronima što rezultira smanjenjem pojave nuspojava (Kim i Stahl, 2010).



Slika 6. Mehanizam djelovanja atipičnih antipsihotika. Risperidon blokira serotoninske receptore, selektivniji je od tipičnih antipsihotika, pa se ne veže za histaminske receptore te izostaju štetni učinci lijeka (preuzeto i modificirano sa [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com))

Terapijski odgovor na antipsihotike pokazao je vezu s kliničkim i okolišnim čimbenicima kao što su dob, spol, pušenje i prehrana. Muškarci mlađe dobi tako pokazuju slabiji odgovor na liječenje klopazinom, dok muškarci s manje prethodnih hospitalizacija pokazuju bolji odgovor na risperidon (Arranz i de Leon, 2007). Ipak, ove razlike nisu toliko značajne da bi bile klinički korisne. Bitnijima za terapijski odgovor pokazali su se afiniteti antipsihotika za različite receptore na neuronima.

Primjerice, od 5 različitih tipova dopaminskih receptora ( $D_{1-5}$ ),  $D_2$  i  $D_3$  su najčešći ciljevi djelovanja antipsihotika. Genetičke varijante receptora  $D_2$  pokazale su različite odgovore na terapiju, primjerice, alel *Del* polimorfizma – 141-C *Ins/Del* doveden je u vezu sa slabijim poboljšanjem nakon tretmana antipsihoticima. Osobe s alelima C/C polimorfizma 1102-T/C kod varijante serotoninskog receptora 5-HT<sub>2A</sub> pokazale su manju vjerojatnost odgovora na klopazin (Arranz i de Leon, 2007). Tsai i sur. (2000), te Kohlrausch i sur. (2010) doveli su u vezu pojavu alela S' kod polimorfizma HTTLPR/rs25531 serotoninskog prijenosnika s lošijim terapijskim odgovorom na klopazin.

## 1.5. Nuspojave primjene antipsihotika

Ekstrapiramidne nuspojave koje se javljaju kao rezultat uzimanja primarno tipičnih antipsihotika možemo podijeliti na akutne (akutna distonična reakcija, parkinsonizam, akatizija) i kronične (tardivna diskinezija, distonija). Ove motoričke nuspojave, osim fizičke nestabilnosti i poremećaja kretanja, uzrokuju i psihološku neugodu i stres oboljelima, što sasvim sigurno otežava njihov socijalni oporavak, te značajno utječe na redovitost terapije koja je vrlo bitna pri sprečavanju povratka bolesti (Kane, 2011).



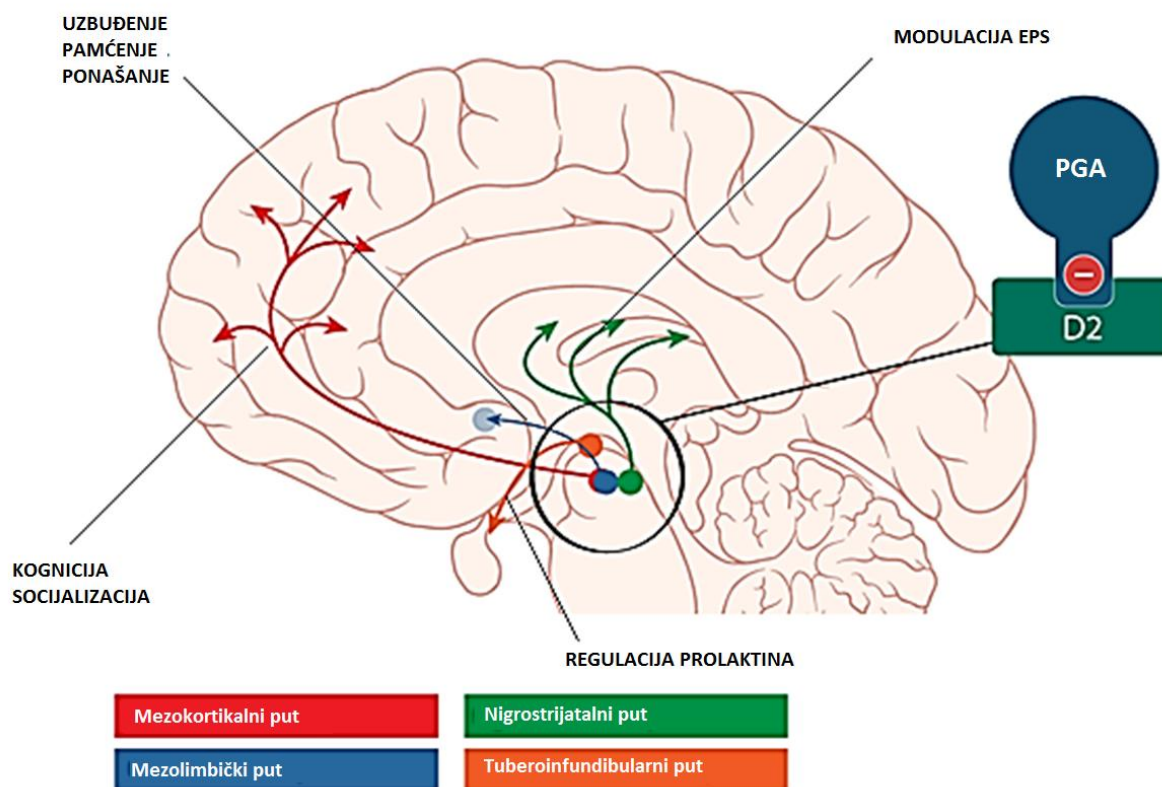
Slika 7. Ekstrapiramidne nuspojave antipsihotika. Simptomi parkinsonizma, akutne distonije, akatizije i tardivne diskinezije (preuzeto i modificirano s [www.study-blue.com](http://www.study-blue.com))

Antipsihotici druge generacije, iako pokazuju umjereno smanjenje pojave EPS, te imaju značajno manju vjerojatnost razvoja tardivne diskinezije (Lencz i Malhotra, 2009), pokazuju sklonost izazivanju metaboličkih smetnji poput dobivanja na težini, hiperglikemije i hipertrigliceridemije (Lencz i Malhotra, 2009, Parsons i sur., 2009). Pretilost predstavlja ozbiljnu prijetnju zdravlju oboljelih od shizofrenije, a višak kilograma koji je rezultat antipsihotičke terapije teško je ukloniti čak i uz stroge režime prehrane i tjelovježbe (Lencz i Malhotra, 2009).

Značajna veza pronađena je između doze nekih antipsihotika i pojave EPS. Tako je, primjerice, utvrđeno da su kod većih doza olanzapina, risperidona i ziprasidona češće zabilježene ekstrapiramidalne nuspojave (Kane, 2011).

Tardivna diskinezija, kao ireverzibilna i kronična bolest, ozbiljna je nuspojava tipičnih antipsihotika. Očituje se nekontroliranim, čestim i brzim pokretima, najčešće usta i jezika i može uzrokovati društvenu stigmju, te teškoće u uključivanju u svakodnevni život, primjerice pri zapošljavanju. Kod starijih bolesnika, tardivna diskinezija može prouzročiti probleme sa zubima i hranjenjem. Kane (2011) navodi primjere studija koje pokazuju incidenciju tardivne diskinezije od 5.3 do 6.3 % pri uzimanju tipičnih antipsihotika.

Iako točni mehanizmi pojave ekstrapiramidnih nuspojava nisu poznati, vjeruje se da je blokada strijatalnih receptora D<sub>2</sub> odgovorna za njihovo javljanje.



Slika 8. Put kojim tipični antipsihotici djeluju na nastanak ekstrapiramidnih nuspojava (PGA – Prva generacija antipsihotika). Smatra se da do EPS dolazi blokiranjem dopaminske aktivnosti u nigrostrijatalnom putu (preuzeto i modificirano s [www.psychopharmacologyinstitute.com](http://www.psychopharmacologyinstitute.com))

Utvrđivanje međudjelovanja dopaminskog i serotoninskog sustava (Di Giovanni i sur., 2008) pomoglo je objasniti kako atipični antipsihotici smanjuju pojavu EPS preko antagonizma serotoninskih receptora. Istraženi su neki od polimorfizama dopaminskog i serotoninskog sustava kako bi se utvrdilo imaju li kakve veze s etiologijom EPS, primjerice polimorfizam Taq1A gena *DRD2* za receptor dopamina D<sub>2</sub>, polimorfizam jedne baze MscI u genu za dopaminski receptor D<sub>3</sub> (*DRD3*), polimorfizam minisatelitnih ponavljanja u genu za prijenosnik dopamina (*DAT1*), polimorfizmi u genu za serotoninski receptor 5-HT<sub>2A</sub> (*5HTR2A*) te polimorfizam *Ins/Del* u promotorskoj regiji gena za prijenosnik serotonina (*5HTTLPR*). Güzey i sur. (2007) utvrdili su značajno veću učestalost alela A1 u genu *DRD2* te 9-ponavljajućeg alela u genu za prijenosnik dopamina kod bolesnika s EPS.

Al Hadithy i sur. (2009) su istražili povezanost polimorfizama na genima za dopaminski receptor D<sub>3</sub> te serotoninske receptore 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub> s pojavom tardivne diskinezije. Utvrđena je povezanost polimorfizma Ser9Gly gena za receptor D<sub>3</sub> i polimorfizma Cys23Ser u genu za receptor 5-HT<sub>2C</sub> s pojavom nuspojave, a nije potvrđena za alel -1438GNA na genu za receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Reynolds i sur. (2005) također potvrđuju povezanost polimorfizma Cys23Ser gena za receptor 5-HT<sub>2C</sub> sa tardivnom diskinezijom.

Farmakogenetički pristup liječenju danas je aktualan jer omogućuje nužnu individualizaciju terapije, što je posebno važno kod bolesti kao što je shizofrenija. Složenost uzroka bolesti te simptoma koji izoliraju pojedinca od društva i normalnog života zahtjeva individualan pristup liječenju ili barem ublažavanju simptoma. Ekstrapiramidne nuspojave lijekova ograničavaju bolesnika u svakodnevnom funkcioniranju i uzrokuju prekide terapije, čime se riskira vraćanje akutne faze bolesti. Stoga je bitan svaki korak u otkrivanju genske podloge odgovora na liječenje antipsihoticima.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog diplomskog rada je da su varijante gena za serotoninske receptore rizični čimbenik za razvoj akutnih ekstrapiramidnih nuspojava nakon primjene antipsihotika prve generacije. Stoga je cilj istraživanja utvrditi moguću povezanost polimorfizma rs13212041 u genu za serotoninski receptor 5-HT1B u oboljelih od shizofrenije, s pojavom akutnih ekstrapiramidnih nuspojava nakon liječenja tipičnim antipsihotikom haloperidolom. Rezultati istraživanja trebali bi doprinijeti mogućnosti individualne prilagodbe terapije shizofrenih bolesnika.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Predloženo istraživanje obuhvatilo je 200 osoba oboljelih od shizofrenije, te primljenih na liječenje u Psihijatrijsku bolnicu Vrapče u Zagrebu. Svi ispitanici koji su sudjelovali u istraživanju bili su bijelci muškog spola i hrvatskog podrijetla. Dijagnoza shizofrenije postavljena je prema MKB-10 (deseta revizija međunarodne klasifikacije bolesti) i DSM-IV (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th. Edition; American Psychiatric Association, 1994*) kriterijima. Intenzitet bolesti i intenzitet pojedinih skupina simptoma bolesnika procijenio se ocjenskom ljestvicom PANSS (eng. *Positive and Negative Syndrome Scale; Kay i sur., 1987*) tijekom prvih nekoliko dana nakon što su ispitanici primljeni na liječenje. Demografski podaci i podaci o povijesti bolesti ispitanika prikupljeni su iz kliničkog intervjua i medicinskih nalaza. Bolesnici su isključeni iz studije ukoliko su imali: dijagnosticiranu ozbiljnu neurološku bolest, anamnezu o teškoj traumi glave, dijagnosticiranu tešku tjelesnu bolest npr. malignu bolest, tešku bolest srca, bubrega, jetre, pluća ili metaboličku bolest, anamnezu o preboljenom malignom neuroleptičkom sindromu i ovisnost bilo koje vrste u zadnjih šest mjeseci. U istraživanje su uključene samo one osobe koje su pristale dati uzorak krvi i sudjelovati u istraživanju, što su potvrdile svojim pismenim informativnim pristankom. Istraživanje je u potpunosti provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, te odobreno od strane Etičkog povjerenstva Psihijatrijske bolnice Vrapče.

Tijekom dva tjedna bolesnici su liječeni primjenom prosječne doze antipsihotika haloperidola (15 mg/dan; oralno ili intramuskularno) i pratećom terapijom diazepamom do 40 mg dnevno u slučaju nemira, nesanice i anksioznosti. Razvoj akutnih ekstrapiramidalnih nuspojava (EPS) procjenjivao se standardiziranom ocjenskim ljestvicama: ESRS (eng. *Extrapyramidal Symptom Rating Scale; Simpson i Angus, 1970*), SAS (eng. *Simpson-Angus Rating Scale; Simpson i Angus, 1970*) i BARS (eng. *Barnes Akathisia Rating Scale; Barnes, 1989, 1992*). Nakon dva tjedna liječenja ispitanici su podijeljeni na one koji su razvili akutne ekstrapiramidalne nuspojave (SAS skor > 3) i one bez nuspojava (SAS skor ≤ 3).

### 3.2. Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja

Ispitanicima su uzeti uzorci krvi volumena 8 ml u plastične šprice s 2 ml antikoagulansa ACD (*acid citrate dextrose*), koji su zatim pohranjeni pri  $-20^{\circ}\text{C}$  u zamrzivaču. Genomsku DNA iz krvi smo izolirali metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988). Smrznute uzorke smo otopili pri sobnoj temperaturi te izmješali na valjkastoj mješalici 20 minuta. Odvojili smo 300  $\mu\text{l}$  u sterilnu mikroeprevetu od 1.5 ml i dodali 900  $\mu\text{l}$  hladnog pufera za lizu eritrocita (*RCLB, Red cell lysis buffer*) te dobro promješali na rotirajućoj mješalici. Ostavili smo uzorke da stoje 10 minuta na ledu, nakon čega smo ih centrifugirali 2 minute pri 13400 x g ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant u kojem se nalaze raspadnuti eritrociti smo odlili, a talog pročistili ponavljanjem postupka resuspendiranja u puferu za lizu eritrocita i centrifugiranja tri puta.

Na pročišćeni talog koji sadrži leukocite i ostale stanične dijelove dodali smo 300  $\mu\text{l}$  natrij-EDTA pufera i 30  $\mu\text{l}$  10% SDS-a. Lagano smo promiješali i dodali 1.5  $\mu\text{l}$  proteinaze K. Nakon dodatnog miješanja ostavili smo uzorke da se inkubiraju pri  $56^{\circ}\text{C}$  uz miješanje na termomikseru 1.5-2 sata. Pri ovom postupku dolazi do liziranja leukocita.

Nakon inkubacije ohladili smo uzorke pri sobnoj temperaturi, dodali 160  $\mu\text{l}$  5 mM NaCl, sve skupa promiješali na rotirajućoj mješalici. Centrifugirali smo 5 minuta pri 13400 x g ( $20^{\circ}\text{C}$ ) pri čemu se DNA izdvojila u supernatant. Izdvojili smo supernatant u novu eprevetu od 1.5 ml i dodali 800  $\mu\text{l}$  hladnog izopropanola koji nakon miješanja zgušnjava DNA pa ju možemo vidjeti golim okom. Centrifugirali smo uzorak 2 minute pri 12000 x g ( $20^{\circ}\text{C}$ ), dolili supernatant i dodali 250  $\mu\text{l}$  75% etanola. Ponovno smo centrifugirali (2 minute, 12000 x g,  $20^{\circ}\text{C}$ ), odlili supernatant i ostavili talog da se suši na zraku 15-ak minuta. Dodali smo 100  $\mu\text{l}$  Tris-EDTA pufera i ostavili pri  $37^{\circ}\text{C}$  uz miješanje kako bi se DNA dobro otopila. Tako pripremljene uzorke pohranili smo u hladnjak pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Određivanje genotipova metodom *real-time* PCR-a

Iz uzoraka DNA ispitanika utvrđivali smo prisutnost T ili C baze na mjestu polimorfizma rs13212041 gena *HTR1B* koji kodira za serotoninški receptor 5-HT<sub>1B</sub>, a nalazi se na kromosomskoj lokaciji 6q14.3–q16.3 (Jin i sur., 1991). Primjenili smo metodu alelne diskriminacije polimorfizma promjene jedne baze (SNP, *single nucleotide polymorphism*) uz pomoć 5' nukleazne reakcije koja koristi fluorogene probe i umnažanje specifičnih odsječaka DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR, *polymerase chain reaction*) i njihovu detekciju u jednom koraku.

Ova metoda se temelji na hibridizaciji ciljnog slijeda DNA i fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde specifične za pojedini alel. Oligonukleotidna sonda obilježena je fluorescentnom bojom (*reporter*) i prigušivačem (*quencher*) koji se nalaze na suprotnim stranama sonde. Ukoliko dođe do hibridizacije cijele sonde DNA polimeraza Taq pocijepat će fluorescentnu boju sa sonde i povećat će se intenzitet njezine fluorescencije s udaljavanjem od prigušivača. Fluorescencija se odmah mjeri uređajem „ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus“ prema protokolu koji predlaže Applied Biosystems (TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol, 2006) i utvrđuje se prisutnost alela. U sustavu s dva alela kao što je naš koriste se dvije različite sonde TaqMan MGB (*minor groove binder*). Sastoje se od obilježavajućih boja VIC i FAM koje se nalaze na 5' krajevima odgovarajućih sondi. MGB sekvenca na 3' kraju sondi omogućava povećanu temperaturu mekšanja ( $T_m$ ) i dizajn kraćih sondi koje su bolje za što strožu alelnu diskriminaciju.

Uzorke za genotipizaciju smo pripremili odmrzavanjem i pripremom razrijeđenja u destiliranoj vodi, kako bismo dobili između 1 i 20 ng DNA nakon PCR-a. Odpipetirali smo po 4.5  $\mu$ l svakog od pripremljenih uzoraka u jažice reakcijske pločice (*96-well reaction plate*). U jažice smo zatim dodali 5.5  $\mu$ l reakcijske mješavine (5  $\mu$ l univerzalne mješavine TaqMan + 0.5  $\mu$ l 40xTaqMan mješavine za genotipizaciju ciljanog SNP-a). Reakcijske pločice smo zatvorili i centrifugirali 1-2 minute pri 6720 x g . Pločice smo zatim ubacili u uređaj i pokrenuli ciklus PCR-a prema tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije

Vrijeme i temperatura pojedine faze reakcije		
Početni korak	Denaturacija	Vežanje/Prodljivanje
	40 ciklusa	
10 min 95°C	15 sec 92°C	1 min 60°C

### 3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program «*GraphPad Prism version 4.00 for Windows*» (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Skupine ispitanika uspoređivane su prema dobi i bodovima ocjenskih ljestvica (izraženih kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) primjenom Student t-testa ili jednostruke analize varijance (ANOVA) popraćene Newman-Keuls testom u slučaju normalne raspodjele podataka, dok su se u slučaju da ne postoji normalna raspodjela podataka, primijenili Mann-Whitney test ili Kruskal-Wallisova ANOVA popraćena Mann-Whitney testom. Značajnost odstupanja dobivene raspodjele genotipova od očekivane (Hardy-Weinbergova raspodjela) kao i razlike u raspodjeli genotipova i alela istraživanih polimorfizama između različitih skupina određivala se primjenom  $\chi^2$  test-a ili Fisher-ovog testa (eng. Fischer exact test). Statistički značajnim smatrane su one razlike kod kojih je vjerojatnost p bila manja od 0.05.

## 4. REZULTATI

Predloženo istraživanje obuhvatilo je 200 osoba oboljelih od shizofrenije muškog spola i hrvatskog podrijetla, liječenih antipsihotikom haloperidolom tijekom dva tjedna. Prosječna dob ispitanika uključenih u studiju bila je  $35.93 \pm 10.07$  godina. Od ukupnog broja ispitanika, njih 95 (47.5%) razvilo je akutne ekstrapiramidalne sindrome, odnosno na SAS ocjenskoj ljestvici imalo je SAS skor  $> 3$ . Nakon dva tjedna terapije haloperidolom, 45 (22.5%) bolesnika razvilo je akatiziju, 37 (18.5%) akutnu distoniju, te 64 (32.0%) diskineziju (Tablica 2).

Tablica 2. Broj i postotak ispitanika koji je razvio akutne ekstrapiramidalne nuspojave nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna

Ispitanici s dijagnozom shizofrenije	Ekstrapiramidalne nuspojave	Akatizija	Akutna distonija	Diskinezija
200 (100%)	95 (47.5%)	45 (22.5%)	37 (18.5%)	64 (32.0%)

Uzorci DNA izolirani iz krvi svih ispitanika podvrgnuti su genotipizaciji polimorfizma rs13212041 u genu HTR1B koji se nalazi na kromosomu 6, a kodira za serotoninški receptor 5-HT1B.

Kao što je prikazano u tablici 3., frekvencije opaženih genotipova polimorfizma rs13212041 u bolesnika oboljelih od shizofrenije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Tablica 3. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs13212041

Genotipovi		CC	CT	TT
p = 0.139584	Dobiveno	5 (2.50%)	72 (36.00%)	123 (61.50%)
	Očekivano	8.4 (4.20%)	65.2 (32.60%)	126.4 (63.20%)

ukoliko je  $p < 0.05$  rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

U ispitanika oboljelih od shizofrenije nakon 2 tjedna monoterapije tipičnim antipsihotikom haloperidolom razvoj ekstrapiramidalnih nuspojava evaluiran je primjenom standardiziranih ocjenskih skala BARS, SAS i ESRS. Broj bodova na navedenim ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs13212041 u genu HTR1B (Tablica 4, slika 9).

S obzirom da rezultati nisu bili raspodijeljeni prema normalnoj raspodjeli podataka, za njihovu statističku analizu primijenila se Kruskal-Valisova ANOVA i Dunn-ov *post-hoc* test višestruke komparacije. Kruskal-Valisova ANOVA nije utvrdila značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na SAS ( $H = 4.093$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.1292$ ) i ESRS ( $H = 3.797$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.1498$ ) ocjenskoj skali. Međutim, statistički značajna razlika između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu, utvrđena je Kruskal-Valisova ANOVA-om u broju bodova na BARS ocjenskoj skali ( $H = 8.487$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.0144$ ). Dunn-ov *post-hoc* test višestruke komparacije pokazao je da statistički značajnu razliku ( $P < 0.05$ ) u broju bodova na BARS ocjenskoj skali između ispitanika koji su nosili CT u odnosu na ispitanike sa genotipom TT, tj. bolesnici, nosioci genotipa TT imali su značajno više bodova na BARS ocjenskoj skali.

Tablica 4. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs13212041

OCJENSKA SKALA	CC (n=5)		CT (n=72)		TT (n=123)	
	srednja vrijednost	standardna pogreška	srednja vrijednost	standardna pogreška	srednja vrijednost	standardna pogreška
<b>BARS</b>	0.80	0.80	0.81	0.28	<b>1.91*</b>	0.29
<b>SAS</b>	6.20	2.13	3.87	0.56	5.57	0.55
<b>ESRS</b>	22.40	7.78	19.67	2.33	28.60	2.44

\*p < 0.05 prema CT genotipu (Dunn-ov test nakon Kruskal-Valisove ANOVA-e)

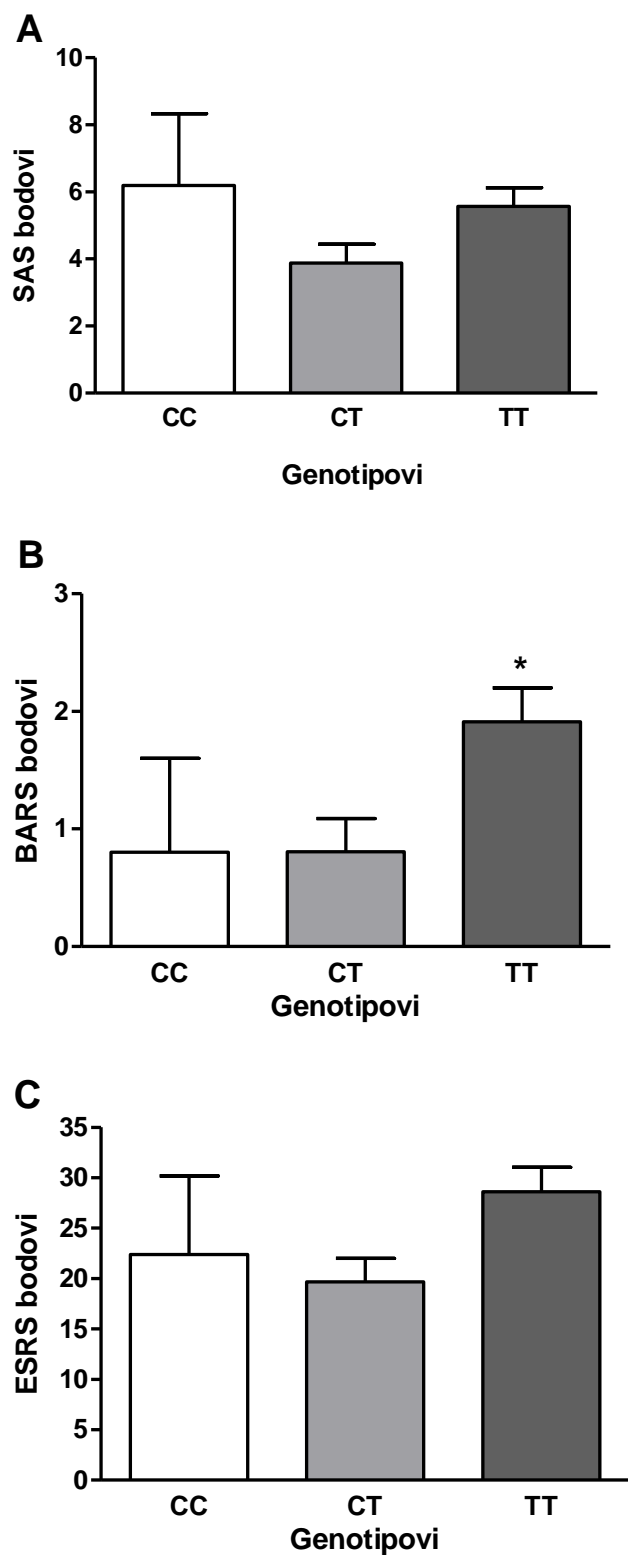
Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T, polimorfizma rs13212041 u genu *HTR1B* (Tablica 5, slika 10).

Tablica 5. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela T, polimorfizma rs13212041

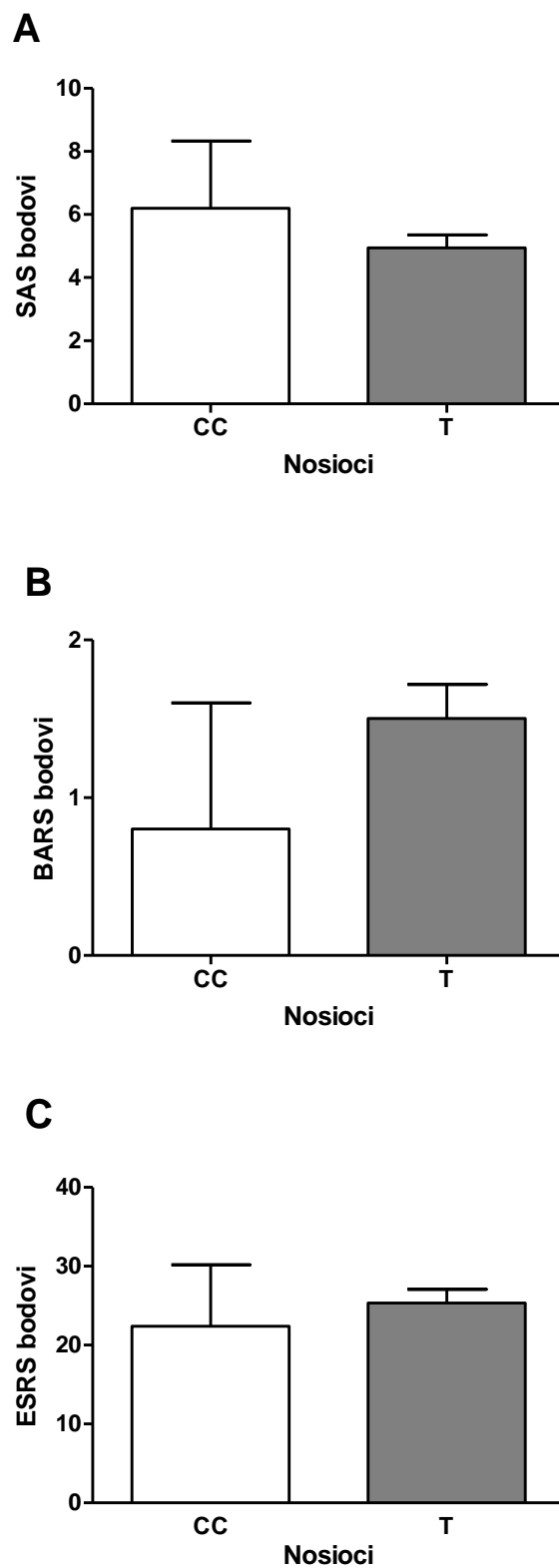
OCJENSKA SKALA	CC (n=5)		T (n=195)	
	srednja vrijednost	standardna pogreška	srednja vrijednost	standardna pogreška
<b>BARS</b>	0.80	0.80	1.50	0.21
<b>SAS</b>	6.20	2.13	4.94	0.41
<b>ESRS</b>	22.40	7.78	25.30	1.78

Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T, u broju bodova na SAS ( $U = 376.5$ ,  $p = 0.3871$ ), BARS ( $U = 459.0$ ,  $p = 0.8256$ ) i ESRS ( $U = 485.5$ ,  $p = 0.9906$ ) ocjenskoj skali.





Slika 9. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs13212041- Slika prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. \* $p < 0.05$  prema CT genotipu (Dunn-ov test nakon Kruskal-Valisove ANOVA-e)



Slika 10. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela T, polimorfizma rs13212041. Slika prikazuje srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška.

Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs13212041 u genu *HTR1B* (Tablica 6, slika 11).

Tablica 6. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs13212041

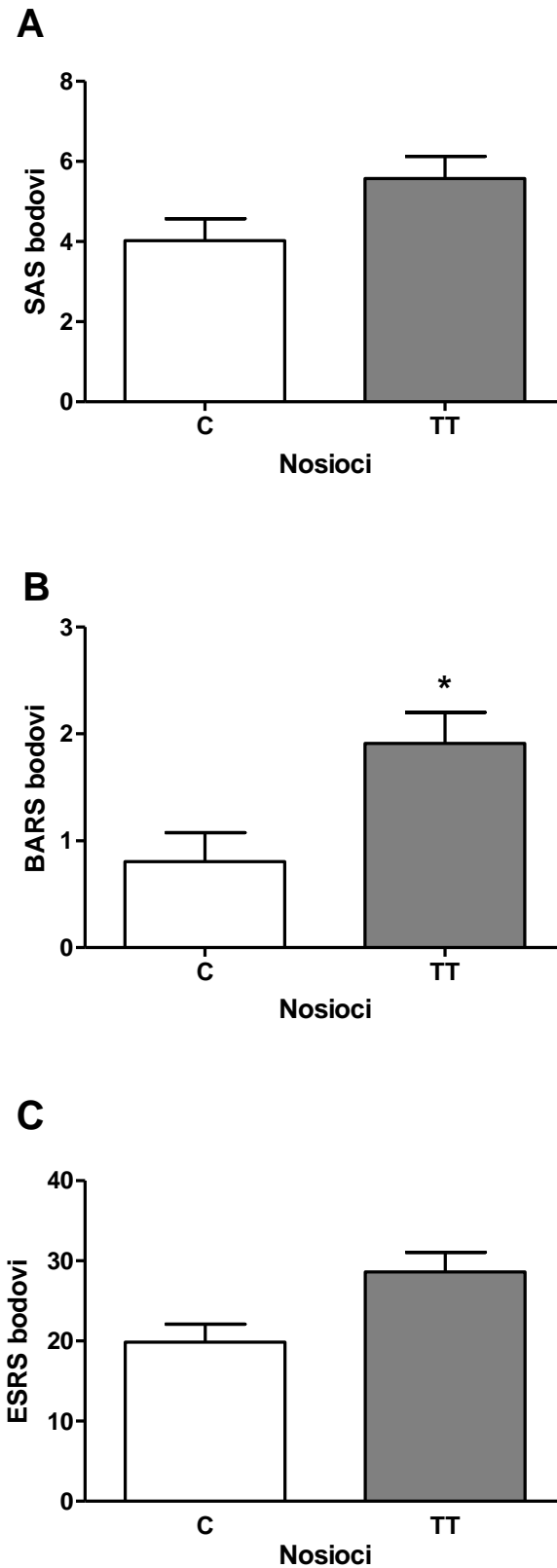
OCJENSKA SKALA	TT (n=123)		C (n=77)	
	srednja vrijednost	standardna pogreška	srednja vrijednost	standardna pogreška
<b>BARS</b>	1.91	0.29	0.80	0.27
<b>SAS</b>	5.57	0.55	4.03	0.54
<b>ESRS</b>	28.60	2.44	19.84	2.22

Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T, u broju bodova na SAS ( $U = 4117$ ,  $p = 0.1193$ ) i ESRS ( $U = 3988$ ,  $p = 0.0600$ ) ocjenskoj skali. Međutim, statistički značajna razlika između ispitanika oboljelih od shizofrenije koji nose homozigotni genotip CC i onih koji nose alel T, polimorfizma rs13212041 u genu *HTR1B*, utvrđena je Mann-Whitney testom u broju bodova na BARS ocjenskoj skali ( $U = 3885$ ,  $p = 0.0274$ ).

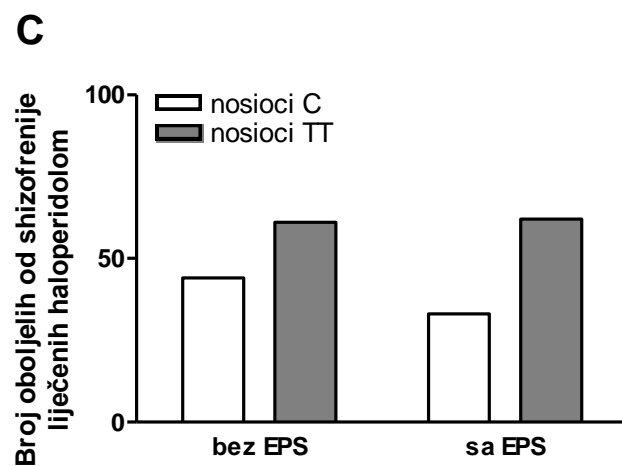
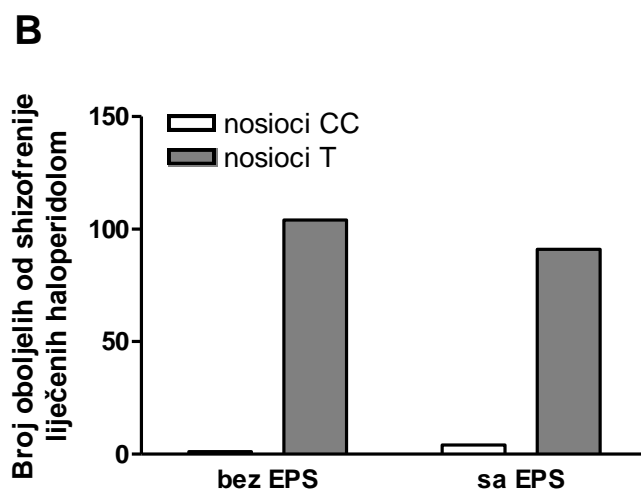
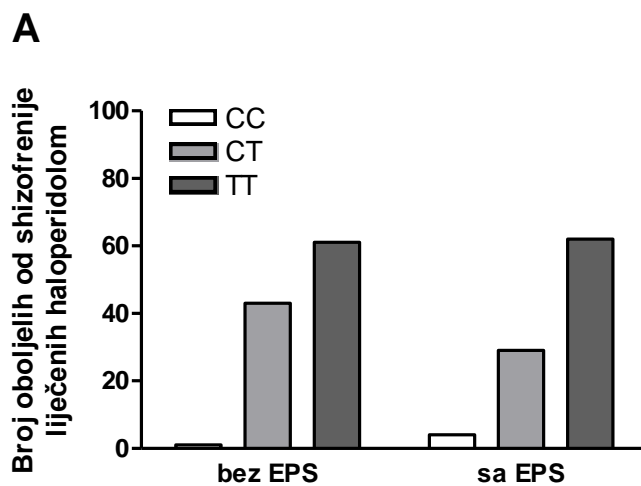
Kao što je prikazano u tablici 7 i na slici 12A, usporedba genotipova ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne ekstrapiramidalne nuspojave (EPS) (SAS skor  $> 3$ ) i na one bez nuspojava (SAS skor  $\leq 3$ ) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike ( $\chi^2 = 4.040$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.1326$ ) ( $\chi^2$ -test).

Tablica 7. Raspodjela genotipova polimorfizma rs13212041 u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akutnih ekstrapiramidalnih nuspojava nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna (postotak izražen prema ukupnom broju ispitanika)

<b>Genotipovi</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
<b>sa ekstrapiramidalnim nuspojavama</b>	4 (2%)	29 (14,5%)	62 (31%)
<b>bez ekstrapiramidalnih nuspojava</b>	1 (0,5%)	43 (21,5%)	61 (30,5%)



Slika 11. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju ekstrapiramidalnih nuspojava, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs13212041. Slika prikazuje srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška. \* $p < 0.03$  prema nosiocima C alela (Mann-Whitney test)



Slika 12. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa CC, odnosno nosioca genotipa TT u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akutnih ekstrapiramidalnih nuspojava nakon terapije haloperidolom

Statistički značajne razlike nisu također utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez akutnih ekstrapiramidalnih nuspojava (EPS) nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T ( $p = 0.1928$ , Fisher-ov test) (Slika 12B), odnosno na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C ( $p = 0.3122$ , Fisher-ov test) (Tablica 8).

Tablica 8. Razvoj akutnih ekstrapiramidalnih nuspojava u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela T, odnosno prema nosiocima genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs13212041 (postotak izražen prema ukupnom broju ispitanika)

Nosioci	CC	T
<b>sa ekstrapiramidalnim nuspojavama</b>	4 (2%)	91 (45,5%)
<b>bez ekstrapiramidalnih nuspojava</b>	1(0,5%)	104 (52%)
Nosioci	TT	C
<b>sa ekstrapiramidalnim nuspojavama</b>	33 (16,5%)	62 (31%)
<b>bez ekstrapiramidalnih nuspojava</b>	44 (22%)	61(30,5%)

Tablica 9. Raspodjela genotipova polimorfizma rs13212041 u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna (postotak izražen prema ukupnom broju ispitanika)

Genotipovi	CC	CT	TT
<b>sa akatizijom</b>	1 (0,5%)	8 (4%)	36 (18%)
<b>bez akatizije</b>	4 (2%)	64 (32%)	87 (43,5%)
<b>sa akutnom distonijom</b>	1 (0,5%)	11 (5,5%)	25 (12,5%)
<b>bez akutne distonije</b>	4 (2%)	61 (30,5%)	98 (49%)
<b>sa diskinezijom</b>	0	21 (10,5%)	43 (21,5%)
<b>bez diskinezije</b>	5 (2,5%)	51 (25,5%)	80 (40%)

Tablica 9. prikazuje raspodjelu genotipova polimorfizma rs13212041 u genu *HTR1B*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna. Na tablici 10. prikazana je raspodjela nosioca genotipa CC naspram nosioca alela T, odnosno nosioca genotipa TT naspram nosioca alela T, polimorfizma rs13212041 u genu *HTR1B*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna.



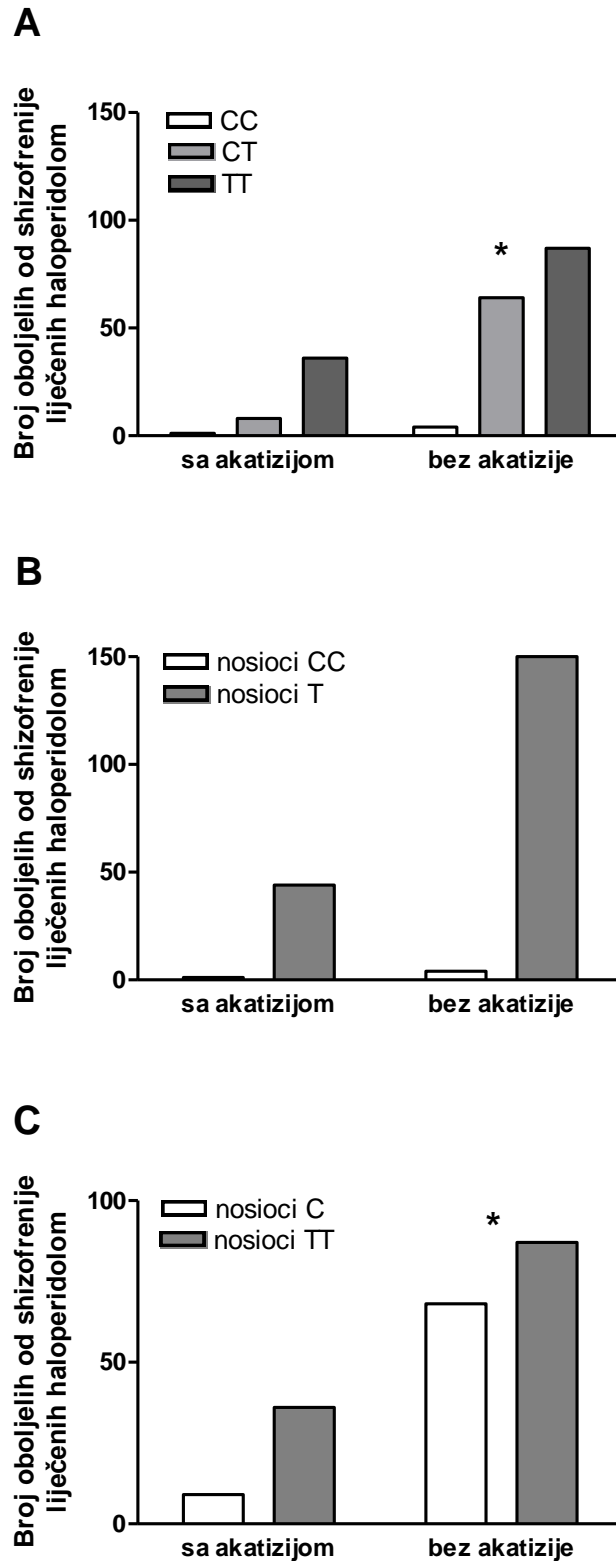
Tablica 10. Razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela T, odnosno prema nosiocima genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs13212041 (postotak izražen prema ukupnom broju ispitanika)

<b>Nosioci</b>	<b>CC</b>	<b>T</b>
<b>sa akatizijom</b>	1 (0,5%)	44 (22%)
<b>bez akatizije</b>	4 (2%)	151 (75,5%)
<b>sa akutnom distonijom</b>	1 (0,5%)	36 (18%)
<b>bez akutne distonije</b>	4 (2%)	159 (79,5%)
<b>sa diskinezijom</b>	0	64 (32%)
<b>bez diskinezije</b>	5 (2,5%)	131 (65,5%)
<b>Nosioci</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>
<b>sa akatizijom</b>	36 (18%)	9 (4,5%)
<b>bez akatizije</b>	87 (43,5%)	68 (34%)
<b>sa akutnom distonijom</b>	25 (12,5%)	12 (6%)
<b>bez akutne distonije</b>	98 (49%)	65 (32,5%)
<b>sa diskinezijom</b>	43 (21,5%)	21 (10,5%)
<b>bez diskinezije</b>	80 (40%)	56 (28%)

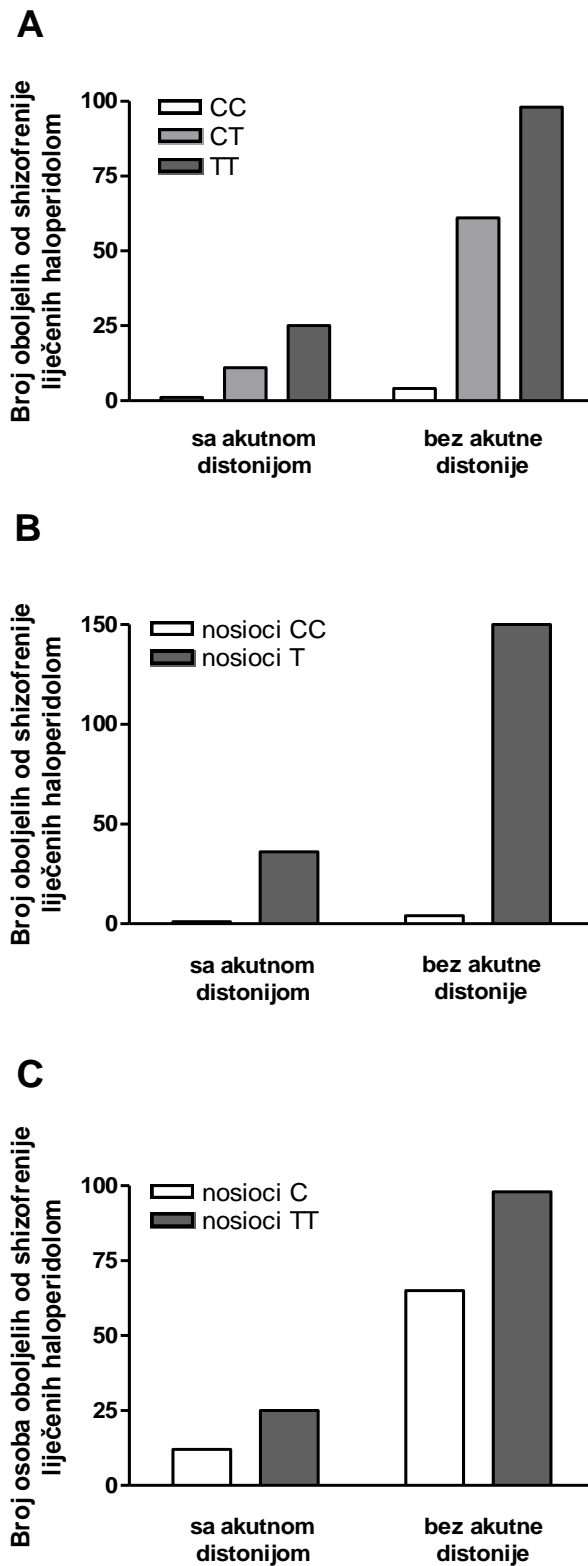
Kao što se vidi i na slici 13A, statistički značajnu razliku ( $\chi^2 = 8.605$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.0135$ ) u frekvenciji genotipova utvrdili smo u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom ( $\chi^2$ -test).

Nadalje, statistički značajne razlike utvrđene su između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akatizije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C ( $p = 0.0050$ , Fisher-ov test) (Slika 13C), ali ne i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T ( $p = 1.0000$ , Fisher-ov test) (Slika 13B).

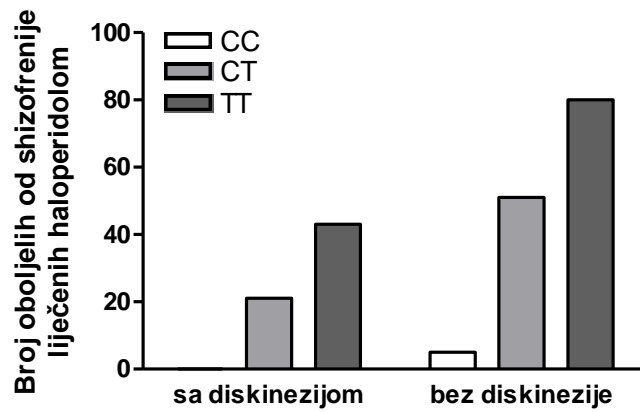
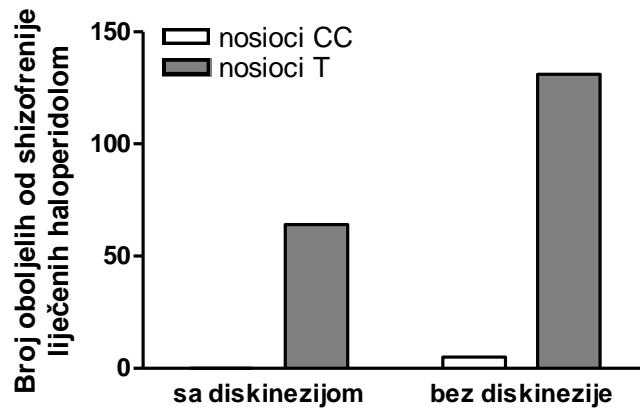
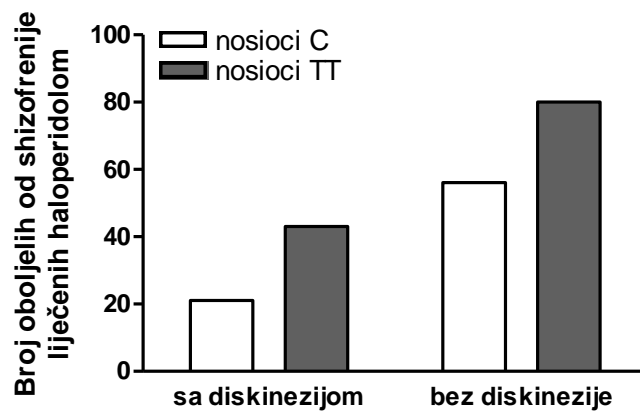
Nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom ( $\chi^2 = 0.7750$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.6787$ ) ( $\chi^2$ -test) (Slika 14A). Također, nismo pronašli značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T ( $p = 1.0000$ , Fisher-ov test) (Slika 14B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C ( $p = 0.4575$ , Fisher-ov test) (Slika 14C).



Slika 13. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa CC, odnosno nosioca genotipa TT u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom



Slika 14. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa CC, odnosno nosioca genotipa TT u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akutne distonije nakon terapije haloperidolom

**A****B****C**

Slika 15. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa CC, odnosno nosioca genotipa TT u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju diskinezije nakon terapije haloperidolom

Kao što je prikazano na slici 15A, u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, primjenom  $\chi^2$ -testa nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $\chi^2 = 3.114$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,2108$ ). Također, statistički značajnih razlika nije bilo između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T ( $p = 0.1790$ , Fisher-ov test) (Slika 15B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C ( $p = 0,2789$ , Fisher-ov test) (Slika 15C).

## 5. RASPRAVA

Jedan od glavnih neurokemijskih i neurotransitorskih biljega shizofrenije predstavlja promjena subkortikalne dopaminergičke aktivnosti za vrijeme akutne psihotičke faze bolesti, na temelju čega je predložena tzv. dopaminska teorija shizofrenije (Bray i sur., 2010). U skladu s ovom hipotezom je i primjena antipsihotika, lijekova koji se primijenjuju u liječenju shizofrenije a koji djeluju uglavnom putem dopaminskog sustava. Naime, svi do danas poznati antipsihotici pokazuju afinitet za dopaminske receptore D2, te se smatra da je vezanje za receptore D2 «nužno i dostatno» za njihovu učinkovitost (Kapur i Seeman, 2001). Međutim, i serotoninski receptori poput receptora 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub>, također mogu biti mjesta djelovanja antipsihotika (Miyamoto i sur., 2005).

To je u opet u skladu s činjenicom da, uz utvrđenu hiperaktivnost dopaminskih neurona (Brisch i sur., 2014), brojni dokazi upućuju i na poremećenu funkciju serotoninskog sustava u shizofreniji. Naime, prekomjerna serotoninska stimulacija u moždanoj kori osoba s shizofrenijom, osobito u anteriornom cingulatnom korteksu (ACC) i dorzolateralnom frontalnom režnju dovodi do poremećaja glutamatne signalizacije i posljedično do smanjenog metabolizma neurona, sinaptičke atrofije i gubitka sive tvari, u skladu s načelima plastičnosti mozga. Prema tzv. serotoninskoj hipotezi shizofrenije normalna dopaminska transmisija u oslabljenom ACC izaziva pozitivne simptome, a hibernacija prednjeg režnja izaziva negativne simptome i kognitivne smetnje (Eggers, 2013).

Motoričke nuspojave tipičnih antipsihotika nastaju primarno zbog blokade dopaminskih receptora u nigrostrijatalnom području i posljedične prekomjerne aktivnosti acetilkolinuskog sustava, što se klinički prezentira kao ekstrapiramidne nuspojave. Zbog međudnosa antagoniziranja receptora 5-HT<sub>2</sub> i posljedičnog oslobađanja dopamina, koji se natječe za receptore D2 s antipsihotikom, atipični antipsihotici izazivaju znatno manje ekstrapiramidnih nuspojava u nigrostrijatalnom putu od tipičnih antipsihotika poput haloperidola (Kapur i sur., 2000). Stoga su ekstrapiramidne nuspojave rijetke u bolesnika liječenih atipičnim antipsihoticima, te su njihove najčešće nuspojave povećanje tjelesne težine i metabolički sindrom (Miyamoto i sur., 2005).

Na temelju brojnih dokaza koji upućuju da i serotoninski sustav igra važnu ulogu u posredovanju djelovanja antipsihotika, istraživana je potencijalna povezanost genskih varijacija serotoninskih receptora, posebice receptora 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> i 5-HT<sub>6</sub>, s terapijskim

odgovorom na antipsihotike. U većem broju studija utvrđena je povezanost polimorfizama rs6313 (T102C), rs6311 (A-1438G) i rs6314 (His452Tyr) u genu za receptor 5-HT<sub>2A</sub> s terapeutskim odgovorom antipsihotika. Nekoliko polimorfizama u genu za receptor 5-HT<sub>2C</sub> također se povezuje s odgovorom na antipsihotičke lijekove, između kojih je najviše proučavan rs6318 (Cys23Ser). Pojedina istraživanja pronašla su i povezanost genskog polimorfizma rs1805054 (C267T) receptora 5-HT<sub>6</sub> s učinkovitosti antipsihotika (Arranz i de Leon, 2007; Zhang i Malhotra, 2011).

U vezi uključenosti serotoninskog sustava u razvoj nuspojava antipsihotika, farmakogenetička istraživanja fokusirala su se primarno na povećanje tjelesne težine, dok ih se relativno malo bavilo razvojem ekstrapiramidnih nuspojava (Güzey i sur., 2007). Činjenica da se atipični antipsihotici vežu za serotoninske receptore i u manjoj mjeri izazivaju tardivnu diskineziju, sugerira potencijalnu protektivnu ulogu serotoninskog sustava. Naime, osim dopaminskog sustava i serotoninski mehanizmi mogu biti također uključeni u razvoj ekstrapiramidnih nuspojava, bilo utjecajem na otpuštanje dopamina ili preko serotoninskih receptora, koji također predstavljaju molekularne ciljeve antipsihotika.

Nekoliko podtipova serotoninskih receptora uključujući receptore 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> i 5-HT<sub>4</sub> potiče otpuštanje dopamina, dok receptor 5-HT<sub>2C</sub> posreduje inhibicijski učinak serotonina na otpuštanje dopamina (Alex i Pehek, 2007). Stoga npr. blokada receptora 5-HT<sub>2A</sub> može doprinijeti normalizaciji razine otpuštanja dopamina (O'Neill i sur., 1999) i tako ostvariti antipsihotičku aktivnost. S druge strane, prekliničke studije sugerirale su da aktivacija inhibicijskih autoreceptora 5-HT<sub>1A</sub> također može spriječiti pojavu ekstrapiramidnih nuspojava putem blokade receptora D2 u striatumu (Lucas i sur., 1997)

S obzirom da postoje jake neuroanatomske i funkcionalne interakcije serotoninskog i dopaminskog sustava, te da serotoninski sustav u velikoj mjeri regulira i modulira aktivnost dopaminskog sustava, kao i obratno (Navailles i De Deurwaerdère, 2011), moguće je da određene varijacije gena serotoninskih receptora mogu utjecati na razvoj ekstrapiramidnih nuspojava tipičnih antipsihotika poput haloperidola, koji svoje učinke ostvaruju primarno putem dopaminskih receptora.

Di Giovanni i sur. (2008) istražili su dokaze o prisutnosti serotonergičkih neurona u području substantiae nigre i ventralnom tegmentalnom području. Serotonergički neuroni pronađeni su i u području dorzalne raphe nuclei, a njihove projekcije u području bogatom dopaminergičkih neuronima: corpus striatum, globus pallidus, nucleus accumbens, amigdala.



Prisutnost receptore 5-HT pokazana je u mezokortikolimbickom i nigro-strijatalnom dopaminskom sustavu. Tip serotoninskog receptora 5-HT<sub>1B</sub> pronađen je poglavito na dopaminskom sustavu substantia nigre pars reticulata (Di Giovanni i sur., 2008). Serotonin koji djeluje na dopaminergički sustav može i inhibirati i potaknuti lučenje dopamina.

Dopaminski sustav djeluje i obrnutim putem na serotoninski, kako je pokazano pronalaskom aferentnih puteva u raphe nuclei koji polaze od substantia nigre (Sakai i sur., 1977). Dakle, međusobna interakcija, inhibicija i ekscitacija, postoji između sustava dopamina i serotonina.

Premda su pojedina istraživanja na manjem broju ispitanika utvrdila povezanost tardivne diskinezije i polimorfizama 102T/C i -1438G/A u genu za receptor 5-HT<sub>2A</sub>, kao i polimorfizama poput Cys23Ser, -697G/C i -759C/T u genu za receptor 5-HT<sub>2C</sub>, rezultati nisu ujednačeni (Reynolds i sur., 2005; Al Hadithy i sur. 2009; Arranz i de Leon, 2007; Zhang i Malhotra, 2011; Knol i sur., 2013).

Svrha ovog istraživanja bila je istražiti odnos između mutacija gena za serotoninski receptor 5-HT<sub>1B</sub> i pojave akutnih ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika haloperidola u osoba oboljelih od shizofrenije.

Kao što je već spomenuto, haloperidol pripada antipsihoticima prve generacije i jedan je od najčešće korištenih antipsihotika u liječenju shizofrenije. Mehanizam njegovog djelovanja je snažno vezanje na dopaminske D<sub>2</sub> receptore i spora disocijacija te na taj način smanjuje aktivnost dopaminskog sustava u mezolimbickom kortikalnom putu (Kim i Stahl, 2010). Međutim, pri zauzetosti receptora većoj od 80% haloperidol može izazvati ekstrapiramidne nuspojave (Miyamoto et al., 2005).

Doziranje haloperidola u našem istraživanju odgovara preporučenim prosječnim dozama lijeka (12-20 mg na dan), s obzirom da se smatra da veće doze od ovih značajno povećavaju rizik od razvoja EPS. Međutim, Zimbroff i sur. (1997) pokazali su da čak i male doze haloperidola (4 mg/dan) rezultiraju pojavom EPS. Ukupni postotak oboljelih od shizofrenije koji su razvili ekstrapiramidne nuspojave u našem istraživanju odgovara rezultatima prethodnih studija o pojavi EPS kod liječenja haloperidolom (Kane, 2011).

U našem istraživanju nismo utvrdili značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na SAS i ESRS ocjenskoj skali, ali je utvrđena statistički značajna razlika između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih

prema genotipu. Naime, BARS ocjenska ljestvica služi za ocjenu akatizije i naši rezultati su pokazali značajnu razliku u broju bodova na BARS ocjenskoj skali između ispitanika koji su nosili CT u odnosu na ispitanike sa TT genotipom, tj. bolesnici, nosioci TT genotipa imali su značajno više bodova na BARS ocjenskoj skali. Također, statistički značajna raspodjela genotipa polimorfizma rs13212041 utvrđena je prema razvoju simptoma akatizije, opet pokazujući značajnu razliku u raspodjeli genotipa TT u odnosu na nosioce C alela.

Akatizija je akutni poremećaj pokreta karakteriziran unutarnjim osjećajem nemira, nelagode i boli koji potiče oboljeloga na kretanje i prekidanje mirovanja. Javlja se spontano i kod ljudi koji boluju od Parkinsonove bolesti. Pretpostavlja se da je uzrokovana smanjenjem dopaminske aktivnosti iz srednjeg mozga prema ventralno-strijatalnom području (Stahl i Lonnen, 2011). Moguće je da promjena u receptoru serotonina uzrokovana polimorfizmom baze u genu koji ga kodira utječe na jaču inhibiciju dopaminergičkih neurona u srednjem mozgu i ventralno-strijatalnom području.

Koliko nam je poznato ovo je prvo istraživanje koje je utvrdilo povezanost pojedinog polimorfizma u genu za serotoninski receptor 5-HT<sub>1B</sub>. S druge strane, sugerirana je povezanost receptora 5HT<sub>1B</sub> sa diskinezijom izazvanom tretmanom s L-DOPA-om u osobaoboljelih od Parkinsonove bolesti (Muñoz i sur. 2008, Morin i sur. 2015)

Međutim, u našem istraživanju nije utvrđena nikakva povezanost polimorfizma rs13212041 u genu za serotoninski receptor 5-HT<sub>1B</sub> sa razvojem akutne distonije i diskinezije u shizofrenih bolesnika, iako ove EPS pokazuju postotak pojave među ispitanicima već potvrđen u prijašnjim studijama.

Dobiveni rezultati istraživanja trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju genetskih čimbenika uključenih u pojavu akutnih ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika i usmjeriti daljnja istraživanja neurobioloških mehanizama značajnih u razvoju novih pristupa liječenju shizofrenije. Dobiveni podaci mogli bi pomoći kliničarima da individualiziraju farmakoterapiju shizofrenih bolesnika te da prevencijom neželjenih nuspojava antipsihotika povećaju uspješnost liječenja i kvalitetu života oboljelih od shizofrenije. Međutim neophodna su daljnja genetska istraživanja uloge serotoninskog sustava u razvoju ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika. Bilo bi zanimljivo vidjeti rezultate genetičkih analiza ostalih tipova serotoninskih receptora te istražiti postoji li haplotipska povezanost pojedinih gena za serotoninske receptore s pojavom EPS.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Od ukupnog broja uključenih ispitanika, njih 95 (47.5%) razvilo je akutne ekstrapiramidne sindrome. nakon dva tjedna terapije haloperidolom, pri čemu je 45 (22.5%) bolesnika razvilo akatiziju, 37 (18.5%) akutnu distoniju, te 64 (32.0%) diskineziju.

2. U istraživanju nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na SAS i ESRS ocjenskoj skali između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs13212041 u genu za serotonininski receptor 5-HT1B.

3. Naši rezultati su pokazali značajnu razliku u broju bodova na BARS ocjenskoj skali između ispitanika koji su nosili genotip CT u odnosu na ispitanike sa TT genotipom, tj. bolesnici, nosioci TT genotipa imali su značajno više bodova na BARS ocjenskoj skali.

4. Nisu utvrđene statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela T, u broju bodova na SAS, BARS i ESRS ocjenskoj skali.

5. Značajna razlika između ispitanika oboljelih od shizofrenije koji nose homozigotni genotip CC i onih koji nose alel T, polimorfizma rs13212041 u genu HTR1B, utvrđena je u broju bodova na BARS ocjenskoj skali.

6. Usporedba genotipova ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne ekstrapiramidne nuspojave (SAS skor > 3) i na one bez nuspojava (SAS skor ≤ 3) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike.

7. Statistički značajne razlike nisu utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez akutnih ekstrapiramidnih nuspojava nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T, tj. na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C.

8. Značajnu razliku u frekvenciji genotipova utvrdili smo u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom.

9. Statistički značajne razlike utvrđene su između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akatizije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C, ali ne i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T.

10. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom.

11. Nismo pronašli značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T, kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C.

12. U raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, nisu utvrđene statistički značajne razlike.

13. Statistički značajnih razlika nije bilo između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela T, kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa TT naspram nosioca alela C.

14. Rezultati rada potvrđuju našu hipotezu da su neke varijante gena za serotoninске receptore rizičnije za razvoj ekstrapiramidnih nuspojava pri primjeni antipsihotika prve generacije.

15. Utjecaj serotoninских receptora na pojavu nuspojava kod tipičnih antipsihotika ukazuju i na povezanost dopaminskog i serotoninского sustava u etiologiji shizofrenije.

16. Proširena istraživanja polimorfizama gena za serotoninске receptore trebala bi pojasniti te veze, a u liječenju osoba oboljelih od shizofrenije omogućiti individualizaciju farmakoterapije te smanjenjem pojave neželjenih nuspojava osigurati oboljelima bolju kvalitetu života i veće šanse za oporavak.

## 7. LITERATURA

1. Abel, K.M., Drake, R., Goldstein, J.M. (2010): Sex differences in schizophrenia. *International Review of Psychiatry* **22**(5): 417-428.
2. Alex, K.D., Pehek, E.A. (2007): Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology & Therapeutics* **113**: 296-320.
3. Al Hadithy, A.F.Y., Ivanova, S.A., Pechlivanoglou, P., Semke, A., Fedorenko, O., Kornetova, E., Ryadovaya, L., Brouwers, J.R.B.J., Wilffert, B., Bruggeman, R., Loonen, A.J.M. (2009): Tridive dyskinesia and DRD2, HTR2A and HTR2C gene polymorphisms in Russian psychiatric patients from Siberia. *Progress in Neuro-Psycho pharmacology and Biological Psychiatry* **33**: 475-481.
4. Arranz, M., de Leon, J. (2007): Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research. *Molecular psychiatry* **12**: 707-747.
5. Begić, D. (2011): Psihopatologija. Medicinska naklada, Zagreb.
6. Benassir, H., Sridhar, S., Tech, M., Abdel-Razek, T.T. (2010): Schizophrenia – an overview and its management. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **1**(1): 63-67.
7. Berry, N., Jobanputra, V., Pal, H. (2003): Molecular genetics of schizophrenia: a critical review. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* **28**(6): 415-429.
8. Bilder, R.M., Goldman, R.S., Volavka, J., Czobor, P. et al. (2002): Neurocognitive effects of clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder. *American Journal of Psychiatry* **159**: 1018-1028.
9. Bondy, B., Spellmann, I. (2007): Pharmacogenetics of antipsychotics: useful for the clinician? *Current Opinion in Psychiatry* **20**: 126-130.
10. Bray, N.J., Leweke, F.M., Kapur, S., Meyer-Lindenberg, A. (2010): The neurobiology of schizophrenia: New leads and avenues for treatment. *Current Opinion in Neurobiology* **20**: 810-815.
11. Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Bielau, H., Bernstein, H.G., Steiner, J., et al. (2014): The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Frontiers in Psychiatry* **5**: 1-11.

12. Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., Esposito, E. (2008): Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Progress in Brain Research* **172**: 45-71.
13. Eggers, A.E.(2013): A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Medical Hypotheses* **6**: 791-794.
14. Fatemi, H.S., Folsom, T.D. (2009): The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia, Revisited. *Schizophrenia Bulletin* **35**(3): 528-548.
15. Gao, K., Kemp, D.E., Ganocy, S.J., Gajwani, P., Xia, G., Calabrese, J.R. (2012): Antipsychotic-Induced Extrapyramidal Side Effects in Bipolar Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **28**(2): 203-209.
16. Güzey, C., Scordo, M.G., Spina, E., Landsem, V.M., Spigset, O. (2007): Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: Associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. *European Journal of Clinical Pharmacology* **63**: 233-241.
17. Harrison, P.J., Owen, M.J. (2003): Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* **361**: 417-419.
18. Harrop, C., Trower, P. (2001): Why does schizophrenia develop at late adolescence?. *Clinical Psychology Review* **21**(2): 241-266.
19. Jin, H., Oksenberg, D., Ashkenazi, A., Peroutka, S.J., Dincan, A.M.V., Rozmahel, R., Yang, Y., Mengod, G., Palacios, J.M., O'Dowd, B.F. (1992): Characterization of the Human 5-Hydroxytryptamine<sub>1B</sub> Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **9**:5735-5738.
20. Kane, J. (2001): Extrapyramidal side effects are unacceptable. *European Neuropsychopharmacology* **11**: 397-403.
21. Kapur, S., Seeman, P. (2001): Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *American Journal of Psychiatry* **158**: 360-369.
22. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. (2000): Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **157**:514–520.
23. Karlsson, H., Bachmann, S., Schröder, J., McArthur, J., Torrey, E.F., Yolken, R.H. (2001): Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *PNAS* **98**(8): 4634-4639.

24. Kaut, T., Cadenhead, K.S. (2010): Treatment Implications of the Schizophrenia Prodrome. U: Swerdlow, N.R. (ur) *Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 97-121.
25. Kendler, K.S., Myers, J.M., O'Neill, F.A., Martin, R., Murphy, B., MacLean, C.J., Walsh, D., Straub, R.E. (2000): Clinical Features of Schizophrenia and Linkage to Chromosomes 5q, 6p, 8p, and 10p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *American Journal of Psychiatry* **157**: 402-408.
26. Kim, D.H., Stahl, S.M. (2010): Antipsychotic Drug Development. U: Swerdlow, N.R. (ur) *Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 123-139.
27. Kohlrausch, F.B., Salatino-Oliveira, A., Gama, C.S., Lobato, M.I., Belmonte-de-Abreu, P., Hutz, M.H. (2010): Influence of serotonin transporter gene polymorphisms on clozapine response in Brazilian schizophrenics. *Journal of Psychiatric Research* **44**:1158-1162.
28. Lencz, T., Malhotra, A.K. (2009): Pharmacogenetics of antipsychotic-induced side effects. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **11**: 405-415.
29. Lindenmayer, J., Bernstein-Hyman, R., Grochowski, S. (1994): A new five factor model of schizophrenia. *Psychiatric Quarterly* **65**(4): 299-322.
30. Loonen, A.J.M., Stahl, S.M. (2011). The Mechanism of Drug-induced Akathisia. *CNS Spectrums* **16**: 7-10.
31. Lucas, G., Bonhomme, N., De Deurwaerdere, P., Le Moal, M., Spampinato, U. (1997): 8-OH-DPAT, a 5-HT<sub>1A</sub> agonist and ritanserin, a 5-HT<sub>2A/C</sub> antagonist, reverse haloperidol-induced catalepsy in rats independently of striatal dopamine release. *Psychopharmacology* **131**: 57-63.
32. Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E., Lieberman, J.A. (2005): Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular psychiatry* **10**: 79-104.
33. Mednick, S.A., Machon, R.A., Huttunen, M.O., Bonett, D. (1988): Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to an Influenza Epidemic. *Archives of General Psychiatry* **45**(2): 189-192.
34. Morin, N., Morissette, M., Gregoire, L., Rajput, A., Rajput, A.H., Di Paolo, T. (2015): Contribution of brain serotonin subtype 1B receptors in levodopa-induced motor complications. *Neuropharmacology* **99**: 356-368.

35. Navailles, S., De Deurwaerdere, P. (2011): Presynaptic control of serotonin on striatal dopamine function. *Psychopharmacology* **213**: 213-242.
36. Parsons, B., Allison, D.B., Loebel, A., Williams, K., Giller, E., Romano, S., Siu, C. (2009): Weight effects associated with antipsychotics: A comprehensive database analysis. *Schizophrenia Research* **110**: 103-110.
37. Powell, S.B., (2010): Models of Neurodevelopmental Abnormalities in Schizophrenia. U: Swerdlow, N.R. (ur) *Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 435-481.
38. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A., McNamara, J.O., White, L.E. (2008): Neuroscience. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, U.S.A.
39. Reynolds, G.P., Templeman L.A., Zhang Z.J. (2005): The role of 5-HT<sub>2C</sub> receptor polymorphisms in the pharmacogenetics of antipsychotic drug treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **29**(6): 1021-1028.
40. Sakai, K., Salvert, D., Touret, M., Jouvett, M. (1977): Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualised by the horseradish peroxidase technique. *Brain research* **137**: 11-35.
41. Tsai, G., Coyle, J.T. (2002): Glutamatergic Mechanisms in Schizophrenia. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**: 165-179.
42. Tsai, S., Hong, C., Yu, Y.W., Lin, C., Song, H., Lai, H., Yang, K. (2000): Association study of a functional serotonin transporter gene polymorphism with schizophrenia, psychopathology and clozapine response. *Schizophrenia Research* **44**: 177-181.
43. Volavka, J., Czobor, P., Sheitman, B., Lindenmayer, J., et al. (2004): Clozapine, Olanzapine, Risperidone, and Haloperidol in the Treatment of Patients With Chronic Schizophrenia and Schizoaffective Disorder. *FOCUS: The Journal of Lifelong Learning in Psychiatry* **2**: 59-67.
44. Xu, M., Xing, Q., Li, S., Zheng, Y., et al. (2010): Pharmacogenetic effects of dopamine transporter gene polymorphisms on response to chlorpromazine and clozapine and on extrapyramidal syndrome in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **34**: 1062-1032.
45. Zhang, J., Malhotra, A.K. (2011): Pharmacogenetics and Antipsychotics: Therapeutic Efficacy and Side Effects Prediction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **7**: 9-37.



46. Zimbroff, D.L., Kane, J.M., Tamminga, C.A., Daniel, D.G., et al.(1997): Controlled, dose-response study of sertindole and haloperidol in the treatment of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **154**: 782-791.

## ŽIVOTOPIS

Ana Hrgovčić je rođena 3.1.1990. godine u Zagrebu. Djetinjstvo je provela u Slavanskom Brodu, gdje je i pohađala osnovnu školu Ivana Brlić Mažuranić. 2014. godine upisala je opću gimnaziju Družbe sestara milosrdnica u Zagrebu, a nakon završetka započinje preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Stječe zvanje prvostupnika biologije 2011. godine, i upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Botanika. Iduće godine upisuje i drugi diplomski studij, modul Fiziologija i imunobiologija na smjeru Eksperimentalna biologija.

U zimskom semestru 2013. godine sudjelovala je u programu studentske razmjene Erasmus i provodi 5 mjeseci na Sveučilištu u Beču, gdje je odslušala i položila kolegije s diplomskog programa Behavior, Neurobiology and Cognition. Završava studij Fiziologije i imunologije 2015. godine obranom diplomskog rada pod naslovom „Povezanost polimorfizma gena za serotonininski receptor 5-HT1B i akutnih ekstrapiramidnih nuspojava antipsihotika haloperidola u oboljelih od shizofrenije“ te stječe zvanje magistre eksperimentalne biologije.