Povezanost polimorfizma 13. introna gena za monoamin-oksidazu tipa B i njezine aktivnosti u trombocitima sa simptomima shizofrenije

Pašalić, Lea

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:217:050364

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lea Pašalić

Povezanost polimorfizma 13. introna gena za monoamin-oksidazu tipa B i njezine aktivnosti u trombocitima sa simptomima shizofrenije

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Gordane Nedić Erjavec, znanstvene suradnice. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc. Aleksandra Maršavelski.

Zahvale

Najprije, veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici dr.sc. Gordani Nedić Erjavec, znanstvenoj suradnici, na vodstvu, pomoći, izuzetnom strpljenju i trudu uloženom u ovaj diplomski rad!

Također, zahvaljujem doc.dr.sc. Aleksandri Maršavelski, nastavnici, na susretljivosti i pomoći.

Zahvaljujem i članovima-ocjeniteljima radnje, prof.dr.sc. Ivi Juranović Cindrić i prof.dr.sc. Biserki Prugovečki.

SADRŽAJ

SAŽETAK viii
abstract x
1. Uvod 1
2. Literaturni pregled 2
2.1. Shizofrenija 2
2.1.1. Epidemiologija shizofrenije 2
2.1.2. Etiologija shizofrenije 3
2.1.3. Simptomi shizofrenije 5
2.2. Monoamin-oksidaza 6
2.2.1. Monoamin-oksidaza A i Monomain-oksidaza-B 7
2.2.2. Monoamin-oksidaza B 9
2.2.3. Polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* 10
2.2.4. Aktivnost trombocitne MAO-B 11
2.2.5. Monoamin-oksidaza i shizofrenija 11
3. Materijal i metode 13
3.1. Ispitanici 13
3.2. Obrada uzoraka krvi i izolacija trombocita 15
3.3. Određivanje aktivnosti MAO-B u trombocitima 16
3.4. Određivanje koncentracije proteina u trombocitima 17
3.5. Izolacija DNA metodom isoljavanja 18
3.6. Određivanje genotipa obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* 20
3.7. Statistička obrada podataka 21
4. Rezultati 22
4.1. Aktivnost trombocitne MAO-B 22
4.2. Polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* 29
5. Rasprava 33
5.1. Povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B sa simptomima shizofrenije 33
5.2. Povezanost polimorfizma 13. introna gena za MAO-B sa simptomima shizofrenije 36
6. Zaključak 38
7. Popis korištenih kratica: 39
8. Literaturni izvori 40
9. Životopis 45

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Povezanost polimorfizma 13. introna gena za monoamin-oksidazu tipa B i njezine aktivnosti u trombocitima sa simptomima shizofrenije

Lea Pašalić

Neurobiološka podloga shizofrenije uključuje promjene dopaminergičkog sustava za čiju normalnu funkciju je odgovoran i enzim monoamin-oksidaza B (MAO-B). Cilj rada bio je istražiti postojanje povezanosti jačine simptoma shizofrenije s polimorfizmom 13. introna gena za MAO-B te s njezinom aktivnošću u trombocitima. Studija je uključila 399 ispitanika oba spola oboljelih od shizofrenije čiji simptomi su procijenjeni ljestvicom pozitivnih i negativnih simptoma (PANSS). Genotipizacija je provedena lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu, a aktivnost trombocitne MAO-B mjerena je spektroflourimetrijski. Pronađena je povišena aktivnost trombocitne MAO-B u muškaraca s izraženijim ukupnim i negativnim te simptomima koji se odnose na kogniciju. Jačina pozitivnih, općih i psihotičkih simptoma je povezana s povišenom aktivnošću trombocitne MAO-B samo u muškaraca pušača. Nema povezanosti intenziteta simptoma s aktivnošću trombocitne MAO-B kod žena, kao ni s polimorfizmom 13. introna gena *MAO-B* kod muškaraca i žena. Aktivnost trombocitne MAO-B odražava intenzitet pojedinih PANSS simptoma kod muškaraca oboljelih od shizofrenije.

(45 stranica, 18 slika, 11 tablica, 108 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: monoamin-oksidaza tipa B, ljestvica pozitivnih i negativnih simptoma, polimorfizam 13. introna gena *MAO-B*, shizofrenija

Mentor: dr. sc. Gordana Nedić Erjavec, znanstveni suradnik
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Zamjena: doc.dr.sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 30.rujna.2019.

Abstract

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

ABSTRACT

Association of monoamineoxidase type B intron 13 polymorphism and its activity in platelets with symptoms of schizophrenia

Lea Pašalić

The neurobiological background of schizophrenia involves changes in the dopaminergic system whose normal function also depends on the enzyme monoamine oxidase B (MAO-B). The aim of this study was to investigate the relationship between the severity of schizophrenia symptoms with the *MAO-B* intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity. The study included 399 schizophrenia subjects evaluated by the Positive and Negative Syndrom Scale (PANSS). Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction, while platelet MAO-B activity was measured spectrofluorimetrically. Increased platelet MAO-B activity was found in men with more pronounced total, negative and cognitive symptoms. The severity of positive, general and psychotic symptoms is associated with increased platelet MAO-B activity only in male smokers. There is no association of symptoms' intensities with platelet MAO-B activity in women, nor with the *MAO-B* intron 13 polymorphism in men and women. Platelet MAO-B activity reflects the intensity of specific PANSS symptoms in men with schizophrenia.

(45 pages, 18 figures, 11 tables, 108 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: monoamine oxidase B, Positive and Negative Syndrome Scale, MAO-B intron 13 polymorphism, schizophrenia

Mentor: Dr. Gordana Nedić Erjavec, Research Associate
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
3. Dr. Biserka Prugovečki, Professor

Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 30.september.2019.

1. Uvod

Pojam 'shizofrenija' je prvi puta predložio švicarski psihijatar Eugen Bleuler, 1911. godine. Pojam potječe od grčkih riječi “schizo” što znači “rascjep” i “phren” sa značenjem “razum”.[1] Shizofrenija se definira kao kronični mentalni poremećaj karakteriziran različitim kognitivnim, emocionalnim i bihevioralnim disfunkcijama.[2] Neurobiološka podloga shizofrenije uključuje promjene dopaminergičkog sustava za čiju normalnu funkciju je, između ostalog, odgovaran i enzim monoamin-oksidaza (MAO).[3]

U perifernoj krvi čovjeka, točnije u trombocitima, nalazimo MAO tipa B (MAO-B), koja je po aminokiselinskom sastavu identična enzimu MAO-B iz mozga.[4] Aktivnost trombocitne MAO-B se u literaturi navodi kao mogući biološki pokazatelj različitih neuropsihijatrijskih poremećaja uključujući depresiju, alkoholizam, psihotičke te neurodegenerativne bolesti.[5,6] Brojni čimbenici utječu na aktivnost MAO-B, a jedan od mogućih je i polimorfizam gena *MAO-B*. Za polimorfizam zamjene jedne baze (adenin/gvanin) u 13. intronu gena *MAO-B* (rs1799836) se navodi da bi, kroz utjecaj na ekspresiju samog gena, mogao posredno utjecati i na aktivnost enzima MAO-B.[7]

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti postoji li povezanost simptoma shizofrenije s polimorfizmom zamjene jedne baze u 13. intronu gena za MAO-B te s njezinom aktivnošću u trombocitima.

2. Literaturni pregled

2.1. Shizofrenija

Shizofrenija je složeni, heterogeni, bihevioralni i kognitivni poremećaj, uzrokovan poremećajima u razvoju mozga do kojih dolazi utjecajem genetskih ili okolišnih čimbenika ili kombinacijom oba.[8] Osobe s dijagnozom shizofrenije imaju isprekidane, ali dugoročne psihičke probleme te varirajuće stope funkcionalnih oštećenja i socijalne invalidnosti.[9] Stopa nezaposlenosti oboljelih od shizofrenije zapanjujuće je visoka te iznosi od 60 do 90% u različitim dijelovima svijeta.[10] Dva najteža izazova su razumjeti uzrok i patogenezu poremećaja te razviti nove, učinkovite i prihvatljive terapije.[8] Terapija obuhvaća uzimanje antipsihotika u kombinaciji s psihološkim terapijama, društvenom podrškom i rehabilitacijom.[8] Napredak u genomici, epidemiologiji i neuroznanosti doveo je do velikog pomaka u razumijevanju shizofrenije te su mogućnosti za daljnji napredak velike, ali isto tako i vrlo izazovne.[8]

2.1.1. Epidemiologija shizofrenije

Stopa prevalencije shizofrenije u Hrvatskoj iznosi 3,94, a u svijetu 0,6 do 17,0 na 1000 stanovnika.[1] Prosječan životni rizik za obolijevanje od shizofrenije iznosi 1%.[1] Takav podatak ukazuje na značajnu zastupljenost osoba oboljelih od shizofrenije u općoj populaciji. Podjednako se pojavljuje kod muškaraca i kod žena,[1] a uočena je razlika u životnoj dobi javljanja bolesti kod žena i muškaraca. Prema dosadašnjim istraživanjima, više od polovice oboljelih muškaraca obolijeva prije dvadeset i pete godine života, dok se u toj dobnoj skupini nalazi samo trećina oboljelih žena.[11] Devedeset posto oboljelih od shizofrenije u dobi je između šesnaeste i pedeset pete godine života.[11] Oboljelima od shizofrenije životni vijek je kraći u odnosu na opću populaciju. Pritom kod muškaraca govorimo o 10, a kod žena o 9 godina kraćem životnom vijeku.[1] Rizik od suicida u osoba oboljelih od shizofrenije je veći do 12 puta u odnosu na zdravu populaciju te prosječna stopa suicida iznosi 6,5%.[12] Istraživanja pokazuju da se shizofrenija češće javlja u osoba koje su u srodstvu sa shizofrenim bolesnicima.[13]

2.1.2. Etiologija shizofrenije

Etiologija shizofrenije još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je predispozicija pojedinca za razvoj ove bolesti određena genetskim i okolišnim čimbenicima koji utječu na rani razvoj mozga.[14] Genetskoj komponenti u prilog ide povećana učestalost shizofrenije u nekim obiteljima.[13] Istraživanja na jednojajčanim blizancima upućuju na postojanje konkordantnosti u rasponu od 40 do 50%,[15] što je puno više nego u dvojajčanih blizanaca kod kojih konkordantnost iznosi 10-19%.[16] S obzirom da je konkordantnost kod jednojajčanih blizanaca manja od 100%, nameće se zaključak da su, osim genetike, važni i drugi etiološki čimbenici. Neki aspekti poremećaja povezani su sa specifičnom neurobiološkom podlogom, što je objašnjeno u neurobiološkim teorijama u koje spadaju neurorazvojna, neurodegenerativna i neurotransmiterska teorija.

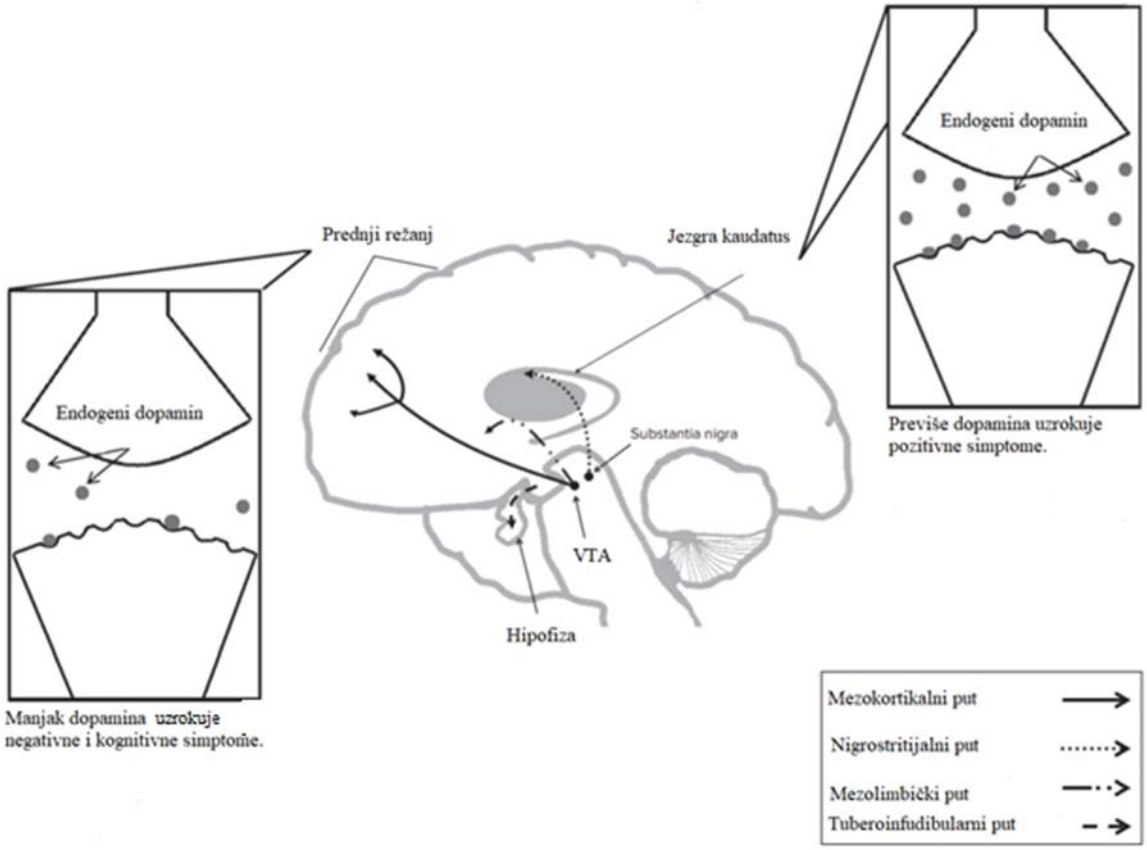
Neurorazvojna teorija prvi puta se spominje osamdesetih godina dvadesetog stoljeća,[17,18] a nastoji objasniti neuralne abnormalnosti pronađene u shizofreniji kroz nenormalan rani neuralni razvoj i neurogenezu.

Neurodegenerativna teorija shizofrenije temelji se na uočenoj konstantnoj progresiji i mentalnom padu tijekom bolesti[19] što je glavna karakteristika neurodegenerativnih bolesti.

U podlozi neurotransmiterske teorije nalaze se disfunkcije neurotransmiterskih sustava u mozgu kao dio kliničke slike shizofrenije. Neurotransmiteri su molekule koje imaju ulogu kemijskih glasnika, prenose signal od jednog neurona do drugog i na taj način obavljaju prijenos živčanog impulsa. Disfunkcija i disregulacija može nastupiti na različitim razinama, od sinteze, pohranjivanja, oslobađanja, inaktivacije ili metabolizma.[1] U shizofreniji se događaju promjene gotovo svih neurotransmiterskih sustava, a najistraženija je uloga dopaminergičkog i glutamatergičkog,[20] pri čemu se glutamat navodi i kao potencijalna karika koja povezuje neurorazvojnu i neurodegenerativnu teoriju.[21]

2. Literaturni pregled

Dopaminergička teorija povezuje shizofreniju s povećanom aktivnošću dopaminergičkog sustava.[22] Dopamin je glavni kateholaminski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu. Uključen je u regulaciju raznih funkcija uključujući lokomotorne aktivnosti, emocije i afekt.[23] Dopamin se sintetizira iz aminokiseline tirozina, a dopaminergičke projekcije u središnjem živčanom sustavu su podijeljene u 4 glavna sustava: nigrostrijatalni, mezolimbički, mezokortikalni i tuberoinfundibularni [24] (Slika 1).



Slika 1. Dopaminergičke projekcije i uloga dopaminergičkog sustava u shizofreniji[25]

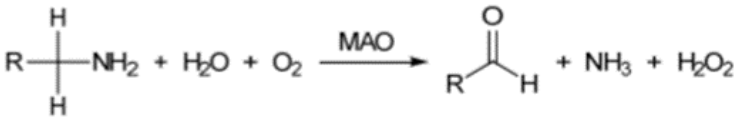
Postoji 5 podtipova dopaminskih receptora koje dijelimo u dvije skupine - tip D1 koji uključuje receptore D1 i D5 te tip D2 koji obuhvaća receptore D2, D3 i D4. Nenormalna aktivnost dopaminskih receptora povezuje se s brojnim simptomima shizofrenije.[25] Povećana aktivnost dopamina u mezolimbičkom putu mozga (dio srednjeg mozga koji uključuje mezencefalon i limbičke strukture) povezuje se s pozitivnim simptomima shizofrenije.[26] Smanjena aktivnost dopamina u mezokortikalnom području (uključuje mezencefalon i kortikalne strukture) povezuje se s negativnim simptomima i kogntivnim deficitima kod osoba oboljelih od shizofrenije.[25] Nigrostritijalni i tuberoinfundibularni put nisu izravno uključeni u patofiziologiju shizofrenije.[25] Niska razina dopamina u nigrostrijatalnom putu dovodi do motoričkih smetnji, a u tuberoinfundibularnom putu do povećanih razina prolaktina te rezultira galaktorejom, amenorejom i smanjenim libidom.[25]

2.1.3. Simptomi shizofrenije

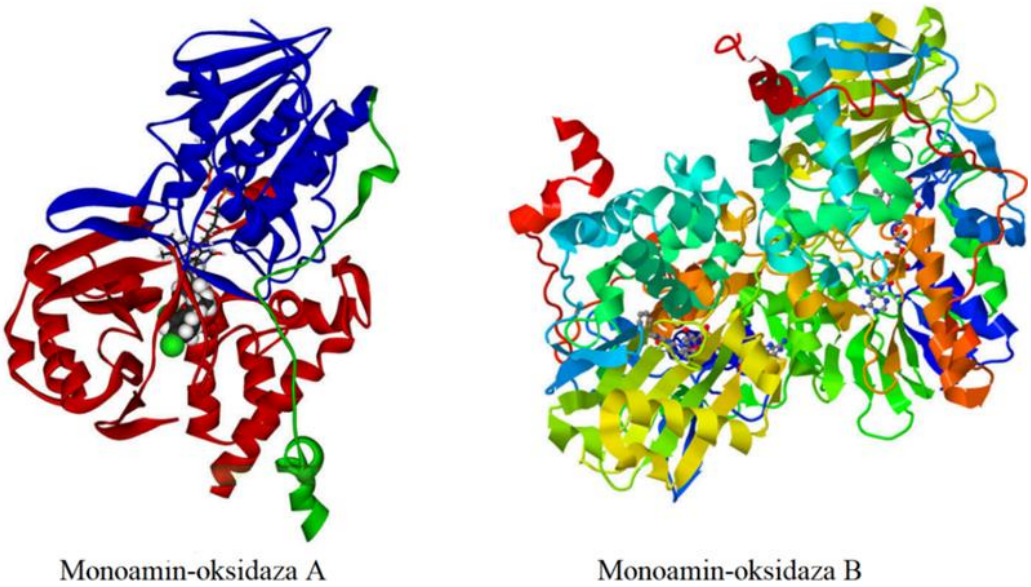
Shizofreniju karakterizira raznolika psihopatologija. Glavne značajke su pozitivni simptomi (sumanutost i halucinacije, takozvani psihotički simptomi u kojima je izgubljen kontakt s realnošću), negativni simptomi (oslabljena motivacija, redukcija spontanog govora, socijalno povlačenje) i kognitivna oštećenja.[8] Kognitivna oštećenja su relativno stabilna i djelomično neovisna o drugim simptomima shizofrenije.[27] Pozitivni simptomi imaju tendenciju povlačenja i vraćanja, iako su kod nekih bolesnika prisutni i dugoročno.[8] Negativni i kognitivni simptomi uglavnom su kronični i povezuju se s dugotrajnim utjecajem na socijalnu funkciju.[8] Uobičajeno korištena ljestvica za procjenu simptoma shizofrenije je ljestvica pozitivnih i negativnih simptoma (PANSS). Njezinih 30 stavki izvorno je podijeljeno u podljestvice: pozitivna ljestvica (P1-P7), negativna ljestvica (N1-N7) i opća psihopatološka ljestvica (G1-G16). Prva epizoda psihoze obično se javlja u adolescentskoj dobi ili u ranoj odrasloj dobi, ali često joj prethodi prodromalna faza.[28] U nekim slučajevima, premorbidna oštećenja u kogniciji ili socijalnom funkcioniranju mogu se manifestirati mnogo ranije prije prve psihotičke epizode,[29] dok je u drugim slučajevima prva pojava iznenadna kod do tada funkcionalnog pojedinca.[8] Dijagnoza se provodi klinički na temelju anamneze i procjenom mentalnog stanja od strane liječnika psihijatra.[8]

2.2. Monoamin-oksidaza

Monoamin-oksidaza (MAO) je flavoenzim sisavaca vezan na vanjsku mitohondrijsku membranu.[30] Enzim MAO katalizira oksidativnu deaminaciju brojnih neurološki važnih amina uključujući dopamin, noradrenalin, adrenalin, serotonin, benzilamin i feniletilamin.[30] Također, MAO katalizira oksidaciju sekundarnih, dok oksidaciju tercijarnih amina katalizira malo ili ne katalizira uopće.[30] Monoamin-oksidaza katalizira oksidativnu deaminaciju amina u njihove odgovarajuće imine koji se tada neenzimatski hidroliziraju do konačnih karbonilnih spojeva i amonijaka.[31] Enzim se sam regenerira u svoj aktivni oblik pomoću molekularnog kisika, O_2, koji se reducira u vodikov peroksid, H_2O_2, prema jednadžbi:



Postoje dva izoenzima monoamin-oksidaze, tip A (MAO-A) i tip B (MAO-B) (Slika 2). Zbog svoje središnje uloge u metabolizmu neurotransmitera, predmet su brojnih biokemijskih i farmakoloških istraživanja.[30]

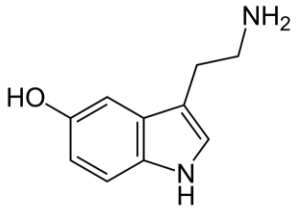


Slika 2. Izoenzimi monoamin-oksidaze[32]

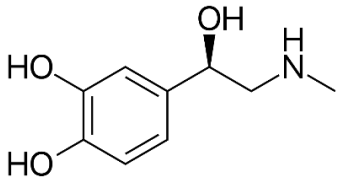
2.2.1. Monoamin-oksidaza A i Monomain-oksidaza-B

Iako izoenzimi MAO-A i MAO-B imaju oko 70% sličnosti u sekvencama, konzerviranu pentapeptidnu sekvencu (Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr) koja veže identični kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD) i sličan mehanizam djelovanja, ipak postoje određene razlike među njima.[33] Navedeni izoenzimi međusobno se razlikuju u tkivnoj raspodjeli, specifičnosti prema supstratima, osjetljivosti na inhibitore, ekspresiji tijekom rasta i razvoja i imunološkim osobinama.[7] Oba enzima prisutna su u različitim tkivima u tijelu s najvišim razinama ekspresije u jetri i mozgu.[7] Neke vrste stanica pretežno eksprimiraju jedan tip MAO enzima pa tako u placenti dominira enzim MAO-A, a u trombocitima i limfocitima isključivo enzim MAO-B.[34,35] U mozgu je izoenzim MAO-A prisutan u kateholaminergičkim neuronima i degradira sterički zaklonjene amine kao što su serotonin, adrenalin i noradrenalin (slika 3).[36] Monoamin-oksidaza tipa B uglavnom je zastupljena u periventrikularnoj regiji hipotalamusa i u području *substantia nigra* gdje metabolizira male amine kao što su feniletilamin i benzilamin (slika 3).[37] Dopamin i tiramin su supstrati oba izoenzima monoamin-oksidaze.[38]

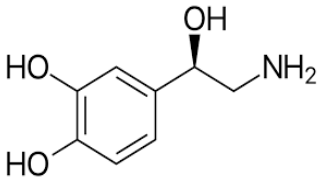
A)



Serotonin

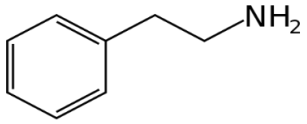


Adrenalin

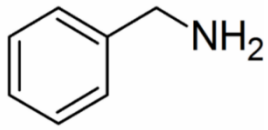


Noradrenalin

B)

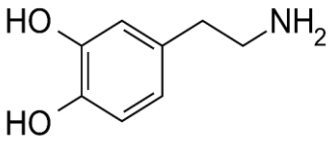


Feniletilamin

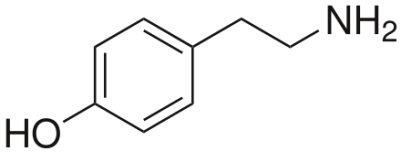


Benzilamin

C)



Dopamin

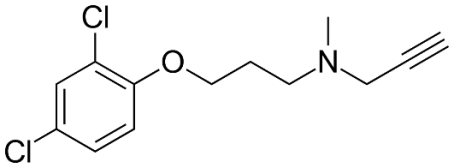


Tiramin

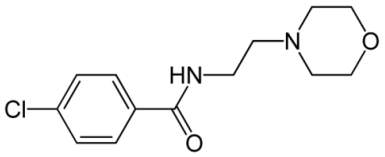
Slika 3. Specifični supstrati enzima MAO-A (A, C) i MAO-B (B, C)

Glavni inhibitori MAO-A su klorgilin i moklobemid, a L-deprenil i pargilin su inhibitori MAO-B (Slika 4).[36] Inhibitori MAO-A se koriste kao antidepresivi, a inhibitori MAO-B primjenjuju se u liječenju Parkinsonove i Alzheimerove bolesti.[36]

A)

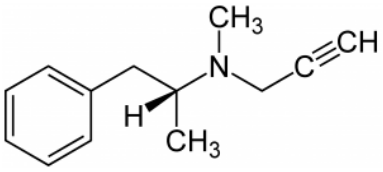


Klorgilin

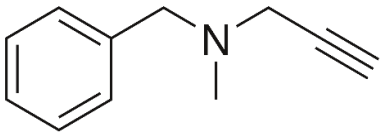


Moklobemid

B)



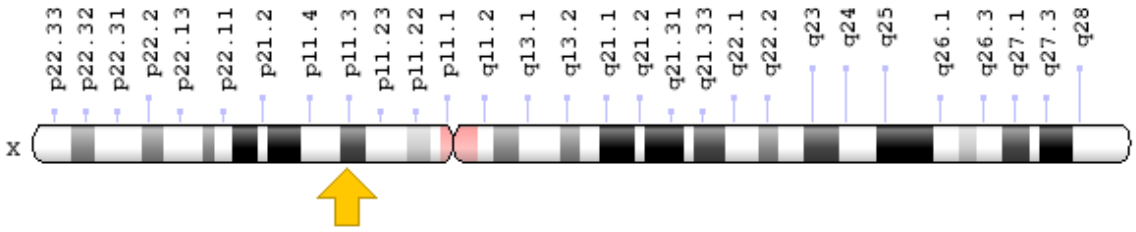
L- deprenil



Pargilin

Slika 4. Strukture inhibitora izoenzima MAO-A (A) i MAO-B (B)

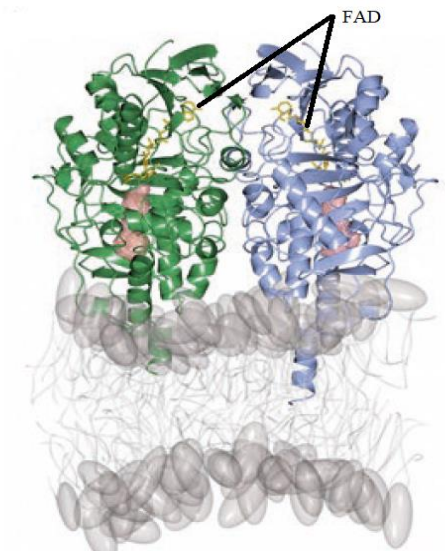
Geni za MAO-A i MAO-B s identičnom intronsko-egzonskom (15 egzona i 14 introna) organizacijom smješteni su na X kromosomu, regija Xp11.23- Xp 11.4. [39] (Slika 5). Smatra se da su oba proteina nastala od zajedničkog pretka zbog preklapanja veza između introna i egzona oba gena.[39]



Slika 5. Položaj gena za MAO-A i MAO-B na kromosomu X[40]

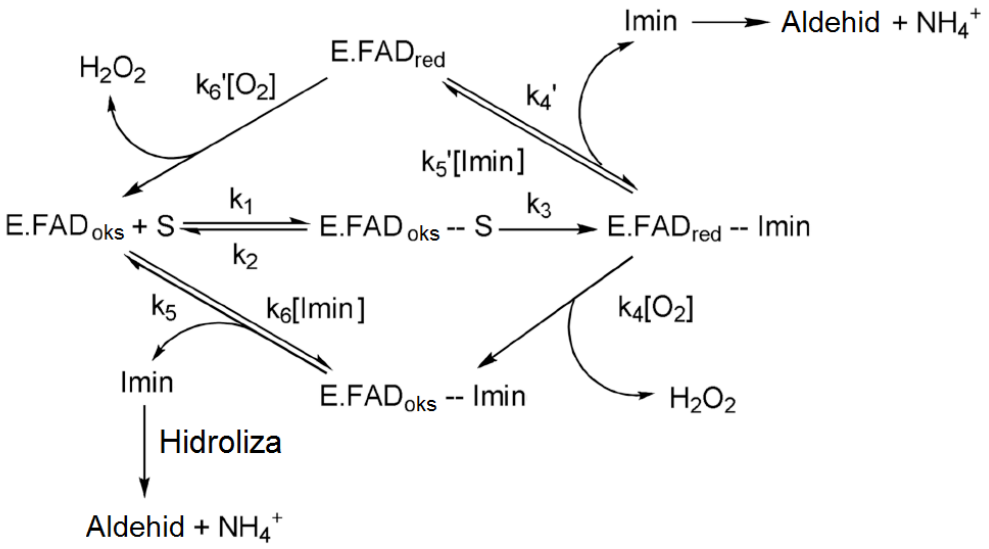
2.2.2. Monoamin-oksidaza B

Prva kristalna struktura ljudskog enzima MAO-B dobivena je 2002. godine do rezolucije od 3.0 Å .[41] Enzim se sastoji od 520 aminokiselina te kristalizira kao dimer.[41] Enzim MAO-B (Slika 6) po jedinici monomera sadrži koenzim FAD, esencijalan za katalizu.[41] Koenzim FAD se kovalentno veže na enzim preko tioeterske veze između cisteinkog ostatka (Cys 397) i 8α-metilena izoaloksazinskog prstena.[42] Osim domene koja sadrži kovalentno vezani kofaktor FAD, svaka monomerna jedinica sadrži još i domenu na koju se veže supstrat [43] te C-terminalnu domenu koja je transmembranska α uzvojnica od 39 aminokiselina.[43]



Slika 6. Kristalna struktura ljudske MAO-B, prezentirana kao proteinski dimer umetnut u fosfolipidni dvosloj [30]

Kao što je već ranije spomenuto, enzim MAO-B katalizira oksidativnu deaminaciju endogenih i egzogenih amina te se može koristiti kao biološki pokazatelj određenih psihijatrijskih poremećaja i poremećaja ponašanja.[44] Oksidativna deaminacija odvija se na način prikazan na Slici 7. Amin se oksidira u imin uz istovremenu redukciju FAD-a. U sljedećem koraku reducirani FAD reoksidira se molekularnim kisikom te nastaje vodikov peroksid. U zadnjem koraku imin je neenzimatski hidroliziran do stabilnog aldehidskog produkta.



Slika 7. Opća formula reakcije koju katalizira MAO [45]

2.2.3. Polimorfizam 13. introna gena *MAO-B*

Najčešći polimorfizam gena *MAO-B* (rs1799836) događa se u polimorfnoj regiji njegovog 13. introna i uključuje promjenu jedne baze, adenina (A) ili gvanina (G).[46] Radi se o zamjeni baza na položaju 36 bp uzvodno od granice 13. introna i 14. egzona.[46] Smatra se da bi to mogao biti funkcionalni polimorfizam, odnosno da bi mogao utjecati na aktivnost enzima MAO-B.[47,7] Genetski polimorfizam povezan s promijenjenom aktivnošću enzima mogao bi igrati značajnu ulogu u etiologiji shizofrenije.[48] Polimorfizam ne mijenja proteinsku sekvencu, ali bi, zbog svog položaja, mogao utjecati na stabilnost i/ili translaciju mRNA MAO-B.[47] Prema nekim istraživanjima se alel G povezuje s višom enzimskom aktivnošću trombocitne MAO-B nego alel A.[49] Za razliku od toga, u ljudskom mozgu je pokazana smanjena aktivnost enzima kod nosioca alela G.[47]

2.2.4. Aktivnost trombocitne MAO-B

Pretpostavlja se da promjene u aktivnosti trombocitne MAO-B utječu na stupanj osjetljivosti na određene psihijatrijske poremećaje kao i na sam početak razvoja bolesti.[50] Prema dosadašnjim istraživanjima, promjene u aktivnosti trombocitne MAO-B povezane su s depresijom, alkoholizmom, psihotičkim poremećajima i neurodegenerativnim bolestima.[5,6] Brojni čimbenici, kao što su dob, spol i pušenje, utječu na aktivnost trombocitne MAO-B.[51,52,53,54] Nakon četrdesete godine života dolazi do porasta aktivnosti MAO-B, vjerojatno kao posljedica promjena u membranskom mikrookolišu enzima uslijed starenjem izazvanih degenerativnih promjena. Isti mehanizam vjerojatno dovodi do povišenja aktivnosti MAO-B u neurodegenerativnim bolestima kao što su Alzheimerova, Parkinsonova ili Huntingtonova bolest.[55] Spol i pušenje su dva čimbenika koja bitno određuje aktivnost trombocitne MAO-B. Tako je ona kod muškaraca u pravilu niža nego kod žena,[56] a kod pušača niža nego kod nepušača.[57] Budući da se promjene u aktivnosti trombocitne MAO-B javljaju kod različitih psihopatologija, upavo je ona potencijalni biomarker različitih poremećaja ponašanja kao što su agresivnost, ovisnost, žudnja za senzacijama, impulzivnost i podložnost psihijatrijskim poremećajima.[49,50,58,59,60,] Smatra se da je aktivnost MAO-B u trombocitima općeniti pokazatelj psihopatoloških značajki, kontrole impulsa, dezinhibiranih i drugih rizičnih ponašanja.[58,59,61]

2.2.5. Monoamin-oksidaza i shizofrenija

U skladu s dopaminergičkom teorijom patogeneze shizofrenije, niža aktivnost enzima MAO uzrokuje povećanje razine dopamina i kao takva predstavlja čimbenik razvoja shizofrenije.[62] Studije povezanosti su pokazale da bi genski lokus koji doprinosi predispoziciji za razvoj shizofrenije mogao biti smješten unutar regije gena za enzime MAO.[63] Za funkcionalni polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja (VNTR) sekvence duge 30 bp smješten u promotorskoj regiji gena *MAO-A* (uVNTR),[64] pokazana je povezanost s agresivnim ponašanjem u shizofreniji.[65,66] Također, postoje dokazi o povezanosti određenih haplotipova gena *MAO-A* sa shizofrenijom kod muškaraca,[67] dok s druge strane neke meta-analize niječu povezanost polimorfizama gena *MAO-A* i shizofrenije.[68] Kod polimorfizma 13. introna gena *MAO-B* je pronađena povezanost s težinom afektivnog ravnanja, odnosno ravnodušnosti prema emocijama, kod osoba oboljelih od shizofrenije.[69] Konkretno, visoki stupanj afektivnog ravnanja je bio posebno izražen u žena s genotipom GG.[69]

Kod trombocitne MAO-B je uočeno sniženje aktivnosti kod oboljelih od shizofrenije,[70,71] a i nekoliko drugih istraživanja ukazuje na to da je enzim MAO-B povezan sa shizofrenijom.[63,72,73] Također, uočena je povezanost aktivnosti trombocitne MAO s negativnim simptomima shizofrenije kod muških oboljelih osoba.[74]

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

U ispitivanje je uključeno 399 ispitanika oboljelih od shizofrenije, od kojih 212 žena i 187 muškaraca. Dob ispitanika, izražena kao medijan (1.-3. kvartil) iznosila je 49 (43-57) godina kod žena te 45 (35-52) kod muškaraca.

Ispitanici su liječeni u Klinici za psihijatriju Vrapče. Simptomi ispitanika su procijenjeni od strane liječnika psihijatra pomoću ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma (PANSS). Ljestvica se sastoji od 30 stavki izvorno podijeljenih u glavne podljestvice koje pokrivaju pozitivne (P1-P7), negativne (N1-N7) i opće psihopatološke (G1-G16) simptome (Tablica 1). Postoje i dodatne podljestvice (Tablica 2) koje su nastale grupacijom određenih simptoma glavnih podljestvica, a odnose se na simptome kognitivnih smetnji (PANSScog), ekscitacije (PANSSexc), psihoze (PANSSpsy) i depresije (PANSSdep). Pri evaluaciji ispitanika uzete su obzir glavne, kao i dodatne, podljestvice. Svakoj od 30 stavki dodjeluju se bodovi od 1 do 7 prema jasno definiranom kriteriju, pri čemu razina psihopatologije raste na skali bodovanja (1 = odsustvo simptoma, 2 = minimalni simptomi, 3 = blagi simptomi, 4 = umjereni simptomi, 5 = umjereno jaki simptomi, 6 = jaki simptomi, 7 = ekstremni simptomi). Kako bi se ispitanici mogli grupirati ovisno o broju ostvarenih PANSS bodova na one s blažim i težim simptomima, granične vrijednosti za svaku podljestvicu su dobivene tako da se ukupan broj stavki svake podljestvice pomnoži s brojem bodova koji označava prisustvo minimalno umjerenih simptoma (Tablica 3). Svi ispitanici s većim ili jednakim brojem ostvarenih bodova od granične vrijednosti za pojedinu podljestvicu pripadali su skupini ispitanika s težim simptomima.

Tablica 1. Glavne podljestvice i stavke PANSS-a

Pozitivni simptomi (PANSSpos)	**Negativni simptomi (PANSSneg)**	**Opći psihopatološki simptomi (PANSSgen)**
P1- sumanutost P2-dezorganizacija mišljenja P3- halucinatorno ponašanje P4- uzbuđenje P5- grandioznost P6- sumnjičavost/progananje P7- neprijateljstvo	N1- zatupljen afekt N2- emocionalno povlačenje N3- siromaštvo odnosa N4-pasivno socijalno povlačenje N5- teškoće u apstraktnom mišljenju N6- nedostatak spontanosti i nesmetanog toka konverzacije N7- stereotipna mišljenja	G1- somatske brige G2- anksioznost G3- osjećaj krivnje G4- napetost G5- manirizmi i stav tijela G6- depresija G7- motorička retardacija G8- nesuradnja G9- neobičan tijek misli G10- dezorjentacija G11- oskudna pažnja G12- nedostatak rasuđivanja G13- poremećaj volje G14- slaba kontrola impulsa G15- zaokupljenost G16- aktivno socijalno izbjegavanje

Tablica 2. Dodatne podljestvice PANSS-a

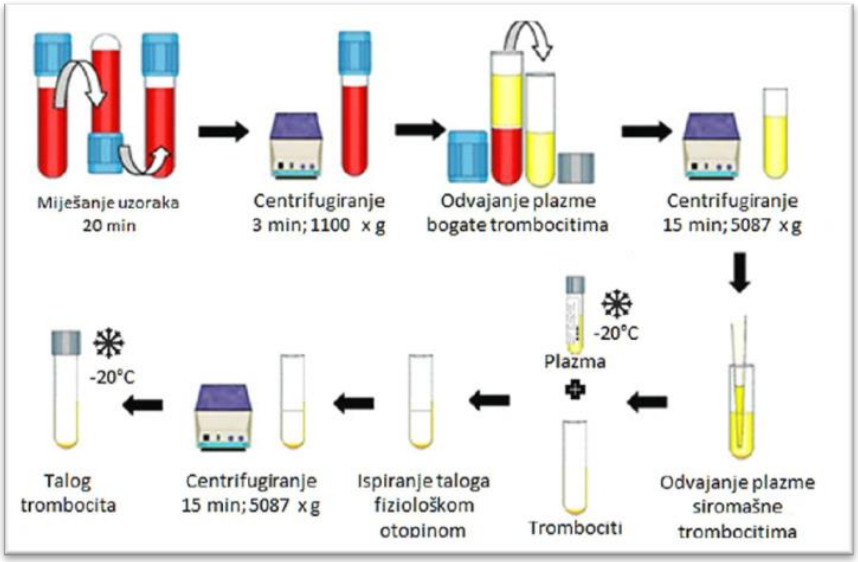
Kognitivni simptomi (PANSScog)	P2+N5+G10+G11 (ref.75)
Simptomi ekscitacije (PANSSexc)	P4+P7+G4+G8+G14 (ref.76)
Psihotički simptomi (PANSSpsy)	P1+P2+P3+P6 (ref.76)
Depresivni simptomi (PANSSdep)	G1+G2+G3+G6 (ref.77)

Tablica 3. Granične vrijednosti dodatnih PANSS podljestvica

PANSS podljestvica	Granična vrijednost
PANSStot	120
PANSSpos	28
PANSSneg	28
PANSSgen	64
PANSScog	16
PANSSexc	20
PANSSpsy	16
PANSSdep	16

3.2. Obrada uzoraka krvi i izolacija trombocita

Uzorci pune krvi centrifugiraju se (1100 x g 3 minute) kako bi se odvojila krvna plazma bogata trombocitima. Dobiveni supernatant, plazma bogata trombocitima, ponovo se centrifugira 15 min pri 5087 x g. Nakon centrifugiranja nastane talog u kojemu se nalaze istaloženi trombociti. Dobiveni talog ispire se fiziološkom otopinom te opet centrifugira. Nakon toga, dobiveni istaloženi trombociti pohranjunju se na -20 °C. Cijeli postupak opisan je na Slici 8.



Slika 8. Postupak obrade uzoraka krvi[78]

3.3. Određivanje aktivnosti MAO-B u trombocitima

Aktivnost MAO-B u trombocitima određuje se spektrofluorimetrijski uz supstrat kinuramin, metodom po Krajl-u.[79] Za određivanje aktivnosti trombocitne MAO-B potreban je talog trombocita dobiven obradom uzoraka pune krvi.

Kemikalije:

- 0,736 mmol dm^{-3} kinuramin (Sigma Aldrich, SAD)
- Matična otopina (2 mmol dm^{-3}) 4-hidroksikinolina (Sigma Aldrich, SAD)
- Kiseli fosfatni pufer (0,5 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 x H_2O) (Kemika, Hrvatska)
- Lužnati fosfatni pufer (0,5 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 x $2H_2O$) (Kemika, Hrvatska)
- 1 mol dm^{-3} NaOH (Kemika, Hrvatska)

Postupak:

1.) Priprema trombocitnog homogenata

Prvi korak je razbijanje trombocitnog homogenata soniciranjem. Talog trombocita odmrzne se na sobnoj temperaturi te se na njega dodaje 1,5 mL reH_2O, pipetom se podiže talog te se uzorci vorteksiraju. Nakon toga se trombociti razaraju soniciranjem u ultrazvučnoj kupelji (20 kHz, amplituda 8 x 10^{-3} mm kroz 60 s). Osim uzoraka, potrebno je pripremiti prazne probe i standarde različitih koncentracija, sve u duplikatu.

2.) Priprema standarda

Priprema standarda opisana je u Tablici 6. Razgradni produkt kinuramina, kao supstrata za MAO-B, je 4-hidroksikinolin te se kao standardi koriste 5 nmol dm^{-3}, 2,5 nmol dm^{-3}, 1,25 nmol dm^{-3}, 0,562 nmol dm^{-3} i 0,313 nmol dm^{-3} vodene otopine 4-hidroksikinolina.

3.) Pripremanje reakcijske smjese

U staklene epruvete dodaje se za 100 μL soniciranog taloga trombocita (uzorak i prazna proba) ili po 100 μL standarda svake koncentracije. Nakon toga uzorcima i praznim probama dodaje se 800 μL, a standardima 900 μL fosfatnog pufera (pH = 7,4; kiseli fosfatni pufer titriran lužnatim fosfornim puferom). Nakon dodavanja sve se izmiješa vorteks miješalicom. Neposredno prije inkubacije samo u epruvete s uzorcima dodaje se 100 μL kinuramina. Slijedi inkubacija od sat vremena u vodenoj kupelji pri 37°C. Reakcija razgradnje kinuramina se zaustavlja prekidom inkubacije i dodavanjem 2 mL hladne 1 mol dm^{-3} otopine NaOH. Nakon toga se u epruvete s praznim probama dodaje 100 μL kinuramina.

4.) Mjerenje

Uređaj Varian Cary Eclipse (Agilent technologies, SAD) koristi se za mjerenje intenziteta fluorescencije u uzorcima, standardima i praznim probama uz ekscitaciju pri valnoj duljini od 310 nm i emisiju pri 380 nm. Pritom se aktivnost trombocitne MAO-B izračuna prema fluorescenciji poznatih koncentracija 4-hidroksikinolina u standardima. U istim uzorcima se određuje i koncentracija ukupnih proteina te se aktivnost trombocitne MAO-B izražava kao količina 4-hidroksikinolina nastalog razgradnjom kinuramina tijekom jednog sata u odnosnu na količinu ukupnih proteina u uzorku.

Tablica 4. Priprema standarda u postupku mjerenja aktivnosti trombocitne MAO-B

STANDARD	**KONCENTRACIJA γ (ng mL^{-1})**	**PRIPREMA**
1	726	125 µL matične otopine 4-hidroksikinolina + 4,875 H_2O
2	363	1 mL standarda 1 + 1 mL H_2O
3	181	1 mL standarda 2 + 1 mL H_2O
4	90	1 mL standarda 3 + 1 mL H_2O
5	45	1 mL standarda 4 + 1 mL H_2O

3.4. Određivanje koncentracije proteina u trombocitima

Koncentracija ukupnih proteina u trombocitnom homogenatu određena je metodom po Lowryu.[80]

<u>Kemikalije:</u>

- 0,1 mol dm^{-3} HCl (Kemika, Hrvatska)
- 0,5% goveđi serumski albumin (BSA) (Sigma Aldrich, SAD)
- ABC otopina :
    - 2%-tna vodena otopina Na_2CO_3 (Kemika)
    - 1%-tna vodena otopina $CuSO_4$ (Kemika)
    - 2%-tna vodena otopina K-Na tartarat (Kemika)
- Reagens Folin-Ciocalteau (Sigma Aldrich, SAD)

Postupak :

Potrebno je pripremiti ABC otopinu te standarde različitih koncentracija. Matična otopina BSA dobije se otapanjem 5 mg BSA u 1 mL 0,1 mol dm^{-3} HCl. Koncentracija proteina određuje se u triplikatu s otopinama BSA (25, 12, 6 ng mL^{-1}) kao standardima. Standardi BSA priređuju se kako je opisano u Tablici 5.

Tablica 5. Priprema standarda u postupku mjerenja koncentracije ukupnih proteina u uzorku trombocita

STANDARD	KONCENTRACIJA γ (ng mL^{-1})	PRIPREMA
1	25	200 µL BSA matične otopine + 200 µL 0,1 mol dm^{-3} HCl
2	12	200 µL standarda 1 + 200 µL 0,1 mol dm^{-3} HCl
3	6	200 µL standarda 2 + 200 µL 0,1 mol dm^{-3} HCl

U staklenu epruvetu dodaje se 10 µL soniciranih trombocita i 2 mL ABC otopine te se ostavi 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodaje se 200 µL reagensa Folin-Ciocalteau (razrijeđen vodom u omjeru 1:1). Nakon inkubacije od 30 minuta pri sobnoj temperaturi, potrebno je izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 700 nm. Isti postupak provodi se s praznim probama (10 µL 0,1 mol dm^{-3} HCl) i standardima (10 µL otopine BSA). Koncentracija proteina u uzorcima se izračuna iz apsorbancije smjese prema apsorbanciji poznatih koncentracija.

3.5. Izolacija DNA metodom isoljavanja

Genomska DNA izolirana je iz krvi metodom isoljavanja koju je utemeljio Miller sa suradnicima.[81]

Kemikalije:

- Pufer za lizu eritrocita, pH 7,6:
    - 10 mmol dm^{-3} Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich, SAD),
    - 5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ (Kemika, Hrvatska)
    - 10 mmol dm^{-3} NaCl (Kemika, Hrvatska)
- Pufer Na-EDTA, pH 8:
    - 75 mmol dm^{-3} NaCl (Kemika, Hrvatska)
    - 25 mmol dm^{-3} Na_2EDTA (Fluka, Švicarska)

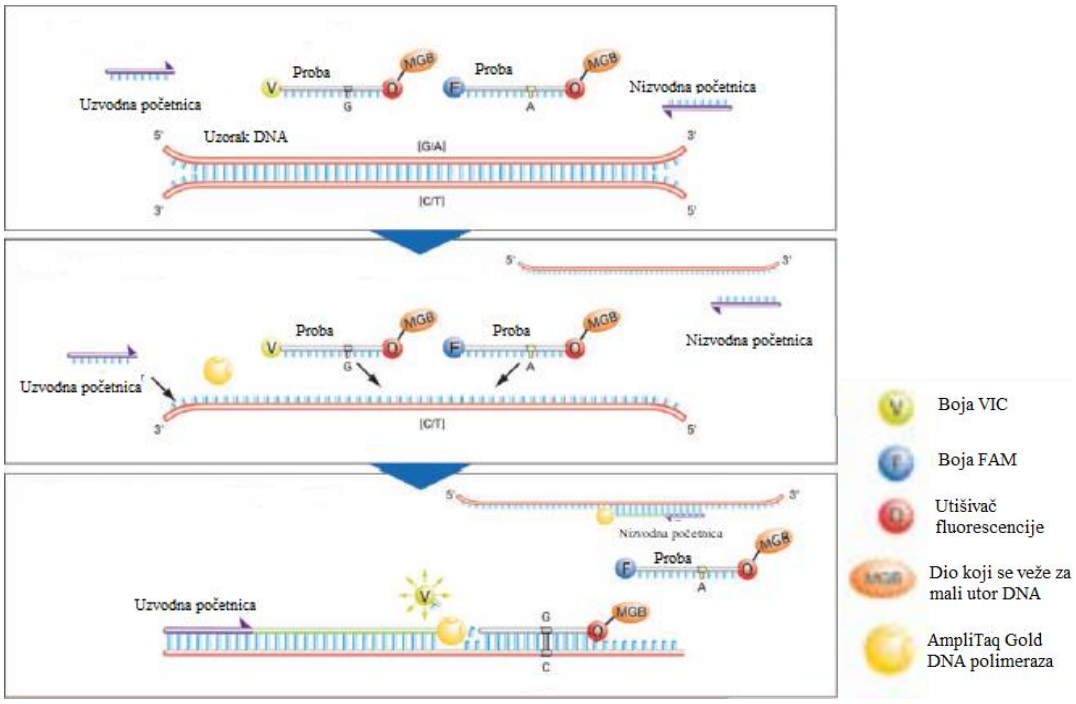
- Proteinaza K (20 mg/mL) (TaKaRa Bio, Japan),
- 10% natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich,SAD),
- 5 mol dm^{-3} vodena otopina NaCl (Kemika,Hrvatska)
- 75%-tna vodena otopina etanola (Gram-Mol, min.99,5%, p.a.):
- Izopropanol (Gram-Mol, min. 99,5%, p.a.)
- Pufer Tris-EDTA, pH 7,6 :
    - 10 mmol dm^{-3} Tris (Trizma base, Sigma Aldrich, SAD)
    - 1 mmol dm^{-3} EDTA (Fluka, Švicarska)

Postupak:

Uzorci krvi se odmrznu na sobnoj temperaturi te se miješaju na valjkastoj miješalici 15 minuta dok se ne homogeniziraju. U mikroepruvete (1,5 mL) se izdvoji 300 µL krvi, doda 900 µL hladnog pufera za lizu eritrocita, promiješa na vortkes miješalici, a zatim ostavi 10 min na ledu. Slijedi centrifugiranje (13400 x g, 2 min, 4°C) kako bi se istaložili leukociti. Mikropipetom se pažljivo ukloni supernatant s eritrocitima. Postupak se ponavlja još 3 puta kako bi se dovoljno isprao talog leukocita. Na prethodno isprani talog redom se dodaje: 300 µL Na-EDTA pufera (nakon dodatka potrebno je promiješati na vorteks miješalici), 30 µL 10% SDS-a i 1,5 µL proteinaze K. Epruvete se zatvore te se sadržaj lagano promiješa. Slijedi inkubacija u trajanju 1,5-2 h na 56°C uz miješanje pri 500 rpm. Nakon inkubacije i hlađenja uzoraka pri sobnoj temperaturi, dodaje se 250 µL 5 mol dm^{-3} NaCl te se sve promiješa na vorteks miješalici i centrifugira (13400 x g, 5 min, 4°C). U supernatantu ostaje DNA, a u talogu ostali stanični dijelovi. Supernatant se prenosi u nove mikroepruvete te mu se dodaje 800 µL hladnog izopropanola. Dodatkom izopropanola, epruvete se zatvaraju te se lagano promiješa sve dok se ne pojavi talog DNA. Dobiveni talog istaloži se centrifugiranjem (12000 x g, 2 min, 4°C). Supernatant se odlije, a talog ispere 75%-tnim etanolom i istaloži centrifugiranjem (12000 x g, 2 min, 4°C). Supernatant se odlije, a talog osuši ostavljanjem otvorenih mikroepruveta pri 37 °C (15-30 min) kako bi etanol ispario. Istaložena DNA se otapa u 100 µL pufera tris-EDTA pri sobnoj temperaturi. DNA se pohranjuje pri -20°C. Koncentracija i čistoća dobivene DNA određuje se spektrofotometrijski uređajem NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.6. Određivanje genotipa obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B*

Polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* je polimorfizam zamjene jedne baze (A/G). Genotipizacija se vrši metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) u stvarnom vremenu (real time PCR) korištenjem komercijalno dostupnog kompleta za genotipizaciju TaqMan® tvrtke Applied Biosystems (SAD). Lančana reakcija polimerazom metoda je umnažanja specifičnog odsječka DNA *in vitro*. Metoda se temelji na ponavljanju ciklusa od 3 koraka, a to su: toplinska denaturacija lanaca DNA kalupa, slijepljivanje početnica na komplementarne dijelove DNA te sinteza komplementarnih lanaca pomoću DNA-polimeraze. Reakcijska smjesa za PCR se sastoji od DNA kalupa, dNTP-ova, početnica, termostabilne DNA-polimeraze i pripadajućeg pufera. TaqMan® reakcijska smjesa sadrži i dvije oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obilježene VIC ili FAM fluorescentom bojom, a na 3' kraju vezan je utišivač fluorescencije koji sprječava njihovu fluorescenciju. Probe se specifično vežu na komplementarni slijed u DNA kalupu koji se nalazi unutar polimorfnog mjesta. Nakon što je DNA polimeraza 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću otcijepi od probe, boja više nije pod utjecajem utišivača te se fluorescencija bilježi kao signal. Jačina i vrsta fluorescentnog signala služe za određivanje genotipa. Radi se o homozigotu ukoliko je zabilježen signal jedne fluorescentne boje, a o heterozigotu ukoliko je zabilježen signal obje boje.



Slika 9. Shematski prikaz PCR metode u stvarnom vremenu[82]

Postupak:

U istraživanju se koristi genomska DNA, izolirana iz uzoraka krvi metodom isoljavanja. Genotipizacija se provodi u uređaju ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) prema uputama proizvođača. Korišten je komercijalno dostupan TaqMan® komplet za određivanje polimorfizma jedne baze (Applied Biosystems, SAD). Sastav reakcijske smjese i uvjeti rekacije za vrijeme genotipizacije prikazani su u Tablici 6 i 7.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu, konačnog volumena 10 µL

Sastojak	**Volumen (µL)**
2 x TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju	5 (konačna koncentracija 1 x)
40 x TaqMan® mješavina početnica i proba	0,25 (konačna koncentracija 1 x)
1 x Tris-EDTA pufer	0,25
Genomska DNA	4,5 (konačna količina DNA 1-20 ng)

Tablica 7. Uvjeti reakcije genotipizacije PCR-om u stvarnom vremenu

	Inicijacija	**Denaturacija**	**Vezanje i produljivanje početnica**
Temperatura	95 °C	92 °C	60 °C
Vrijeme	10 min	15 s	90 s
Broj ciklusa	1	50	

3.7. Statistička obrada podataka

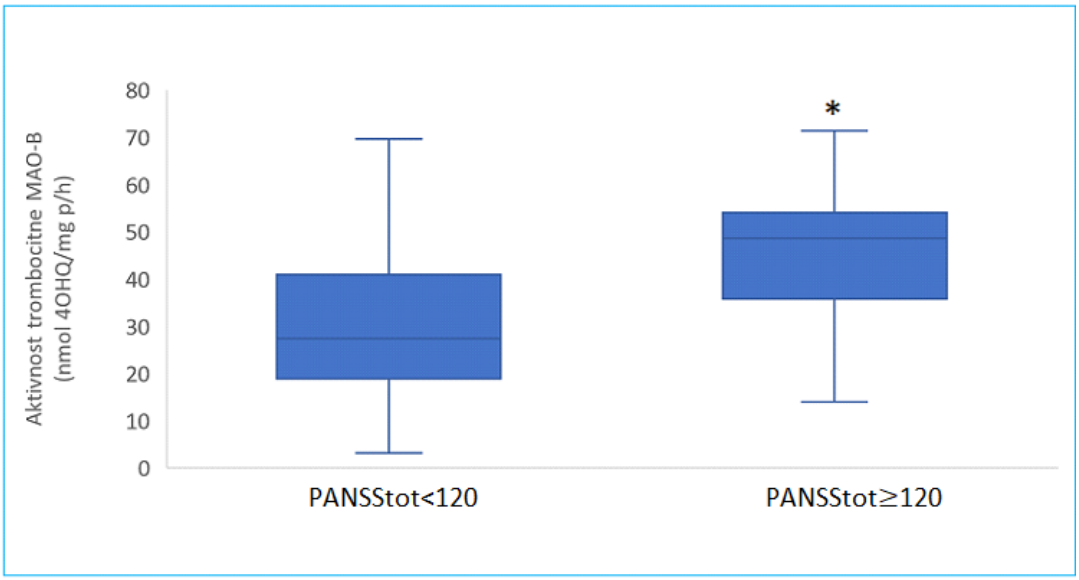
Podaci su obrađeni u statističkom programu Sigma Stat 3,5 (Jandell Scientific Corp., SAD). Za usporedbu numeričkih podataka normalne distribucije između dviju skupina korišten je Studentov t-test. U slučaju nenormalne distribucije korištena je neparametrijska inačica, Mann-Whitney test. Za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže korišten je χ^2-test.

4. Rezultati

Mjerenje aktivnosti trombocitne MAO-B i genotipizacija obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* provedeni su u ukupno 399 ispitanika, od kojih 187 muškaraca i 212 žena. Zbog činjenice da je gen *MAO-B* smješten na kromosomu X te kod muškaraca ne postoji heterozigotni genotip, učestalost genotipova ispitivana je odvojeno za muškarce i žene. Također, uzimajući u obzir u literaturi poznate[53,54] i ovom studijom potvrđene razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B ovisno o spolu (U=10890,50; P=0,029) i pušenju (U=2353,00; P=0,008), statistička obrada rezultata koji se odnose na aktivnost trombocitne MAO-B, provedena je uz podjelu po spolu i ovisnosti o pušenju. Također, sve analize su provedene uz podjelu ispitanika na one s više (teži simptomi) ili manje (lakši simptomi) ostvarenih bodova na PANSS podljestvicama.

4.1. Aktivnost trombocitne MAO-B

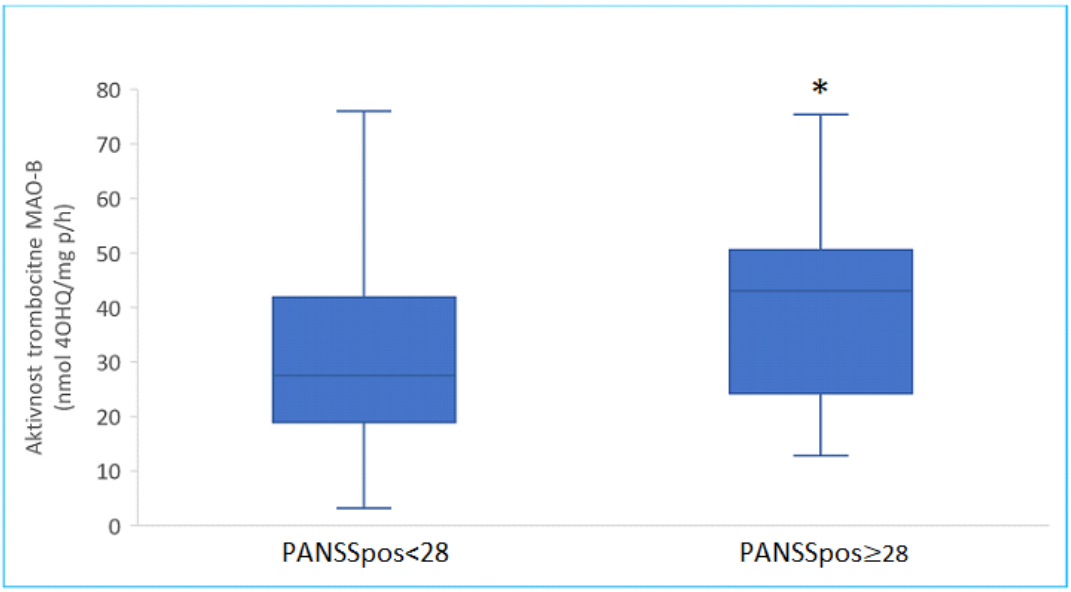
Aktivnost trombocitne MAO-B je bila značajno povišena (Slika 10) kod muškaraca pušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSStot podljestvici.



Slika 10. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSStot. *U=549,00; P= <0,001; Mann Whitney test

4. Rezultati

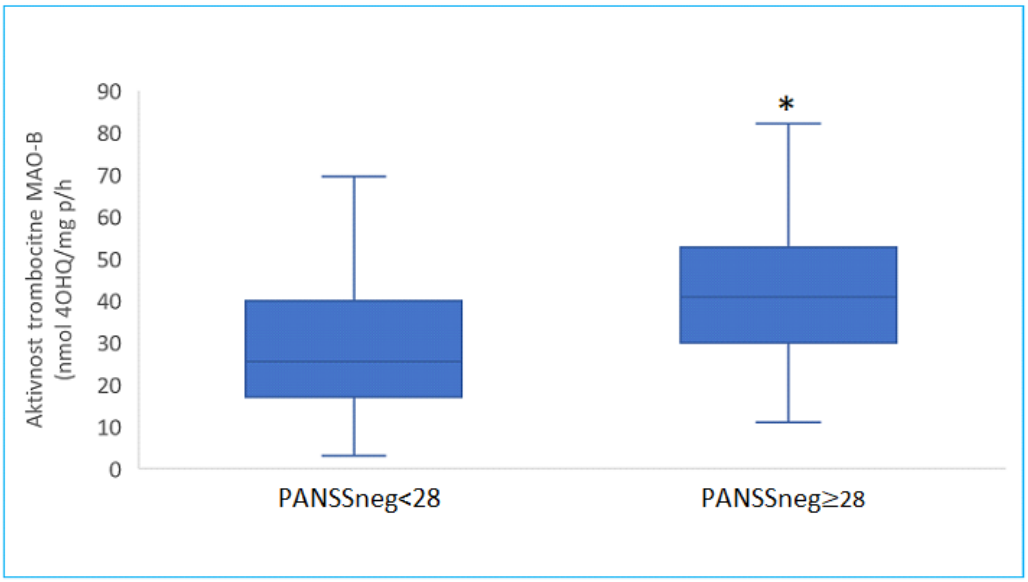
Aktivnost MAO-B je bila povišena (Slika 11) u trombocitima muškaraca pušača s većim brojem bodova u odnosu na muškarce pušače s manjim brojem bodova ostvarenim na PANSSpos podljestvici.



Slika 11. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSSpos. *U=979,50; P=0,005; Mann Whitney test

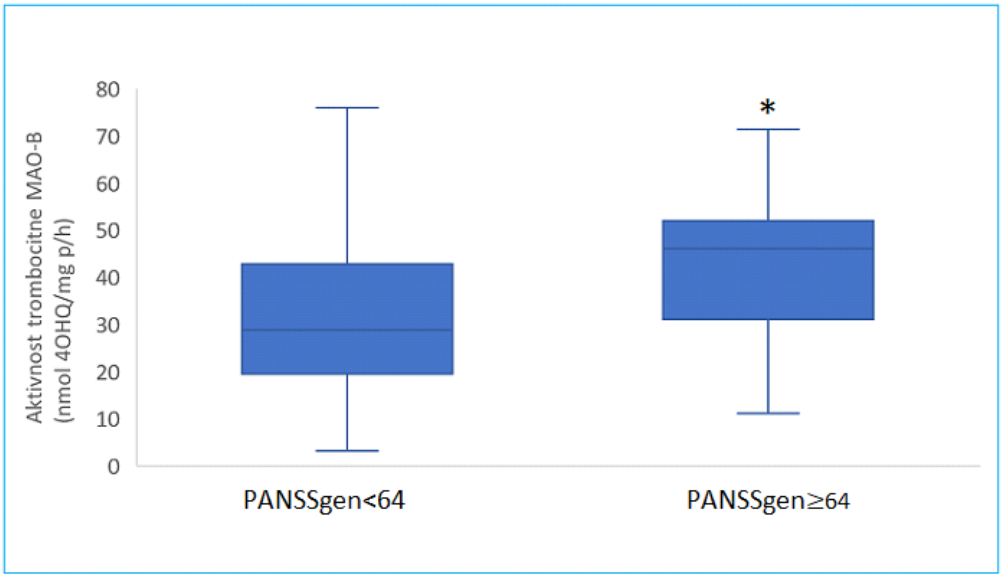
Također, aktivnost trombocitne MAO-B je bila značajno povišena (Slika 12) kod muškaraca pušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSSneg podljestvici u odnosu na muškarace pušače s manjim brojem ostvarenih bodova.

4. Rezultati



Slika 12. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSSneg. *U=1131,000; P=<0,001; Mann Whitney test

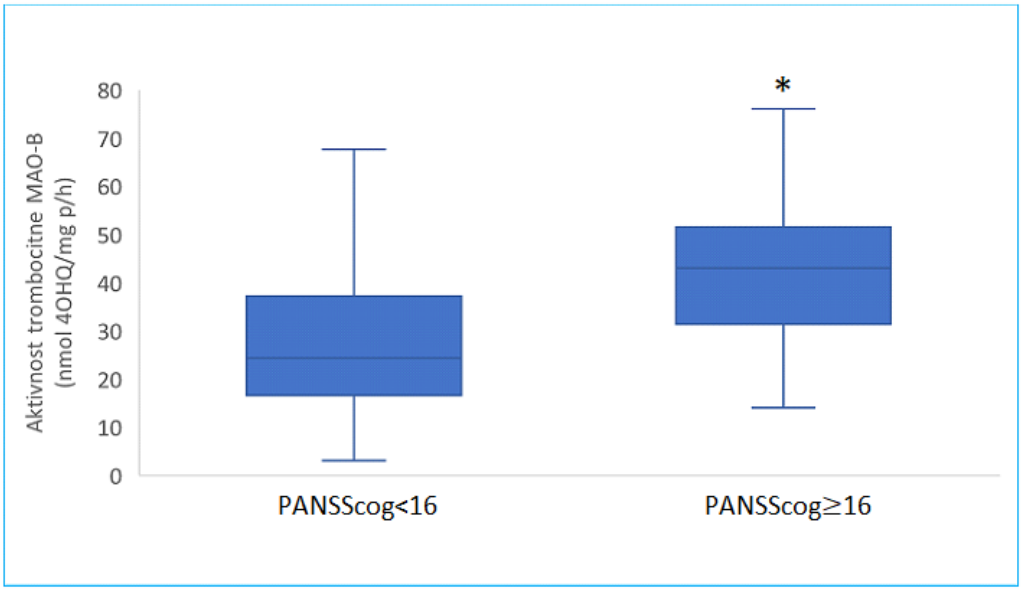
Kod muškaraca pušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSSgen podljestvici uočena je znatno povišena (Slika 13) aktivnost trombocitne MAO-B u odnosu na muškarce pušače s manjim brojem bodova.



Slika 13. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSSgen. *U=500,000; P=0,023; Mann Whitney test

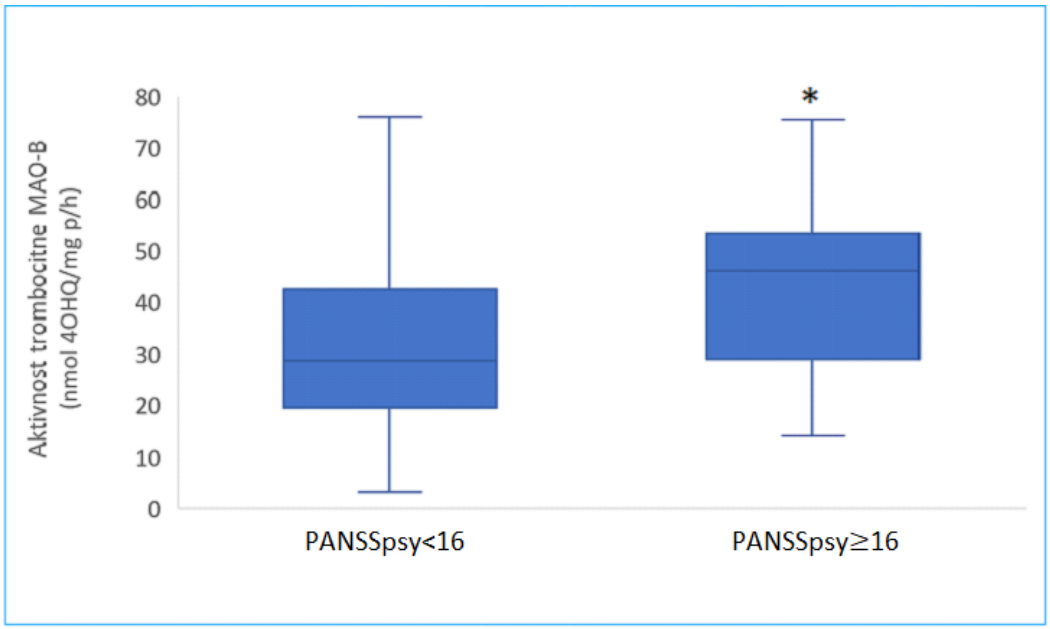
4. Rezultati

Na slici 14 može se vidjeti da je aktivnost trombocitne MAO-B bila značajno povišena kod muškaraca pušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSScog podljestvici u odnosu na muškarce pušače s manjim brojem bodova na istoj PANSS podljestvici.



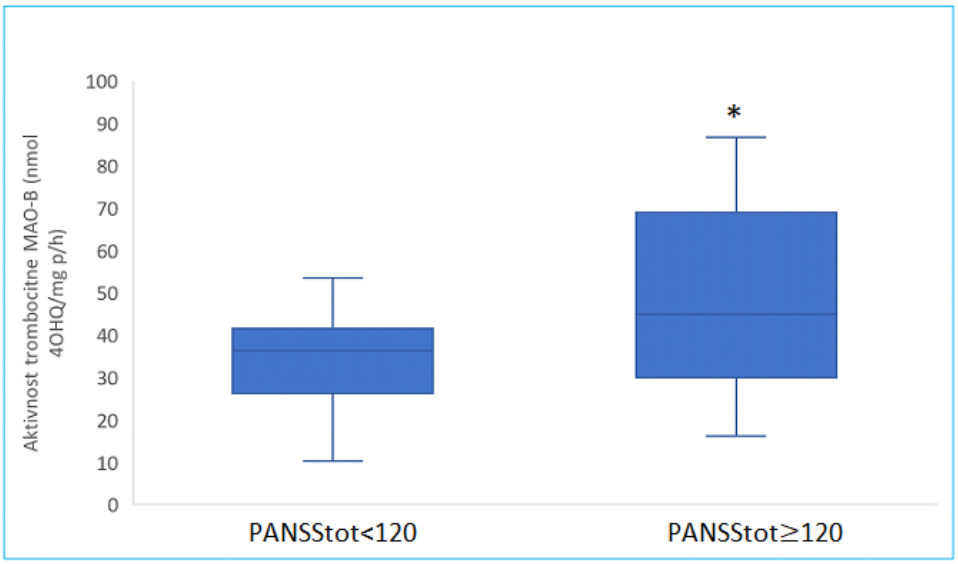
Slika 14. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSScog. *U=970,000; P=<0,001; Mann Whitney test

Aktivnost trombocitne MAO-B nije se značajno razlikovala između muškaraca pušača podijeljenih obzirom na broj ostvarenih bodova na PANSSexc (U=813,00; P=0,092) i PANSSdep (U=429,00; P=0,084) podljestvicama, ali je bila značajno povišena kod muškaraca pušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSSpsy podljestvici u odnosu na muškarce pušače s manjim brojem bodova na PANSSpsy podljestvici (Slika 15).



Slika 15. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca pušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSSpsy. *U=564,000; P=0,014; Mann Whitney test

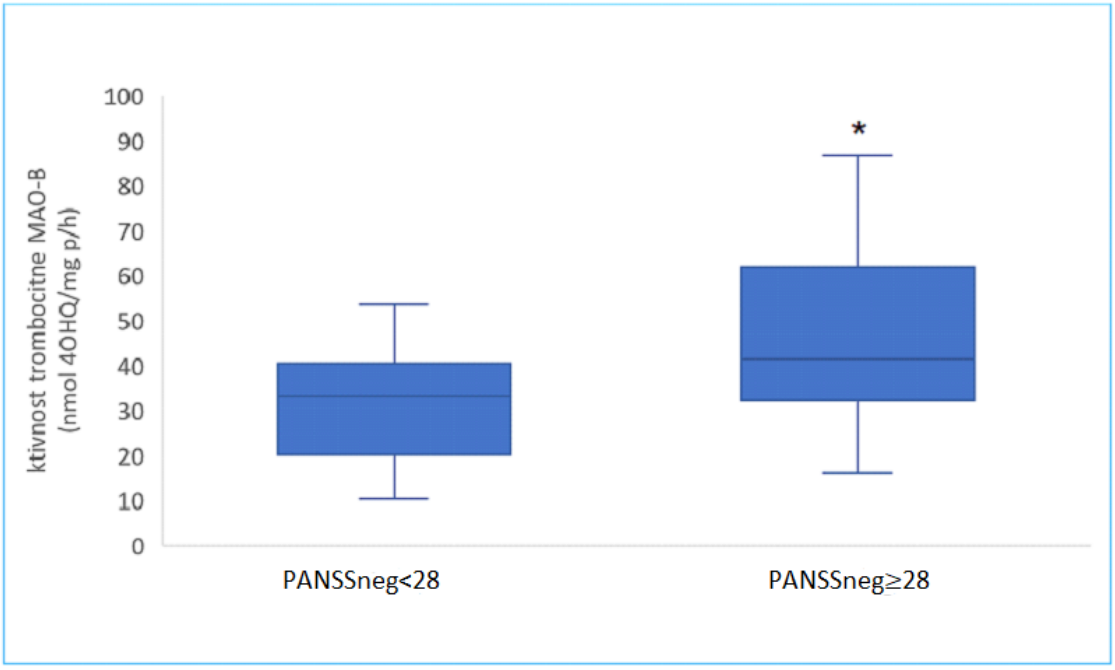
Znatno povišena (Slika 16) aktivnost trombocitne MAO-B očituje se kod muškaraca nepušača s većim brojem bodova ostvarenim na PANSStot podljestvici u odnosu na muškarce nepušače s manjim brojem bodova.



Slika 16. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca nepušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSStot. *t=-2,9; P= 0,027; Studentov t-test

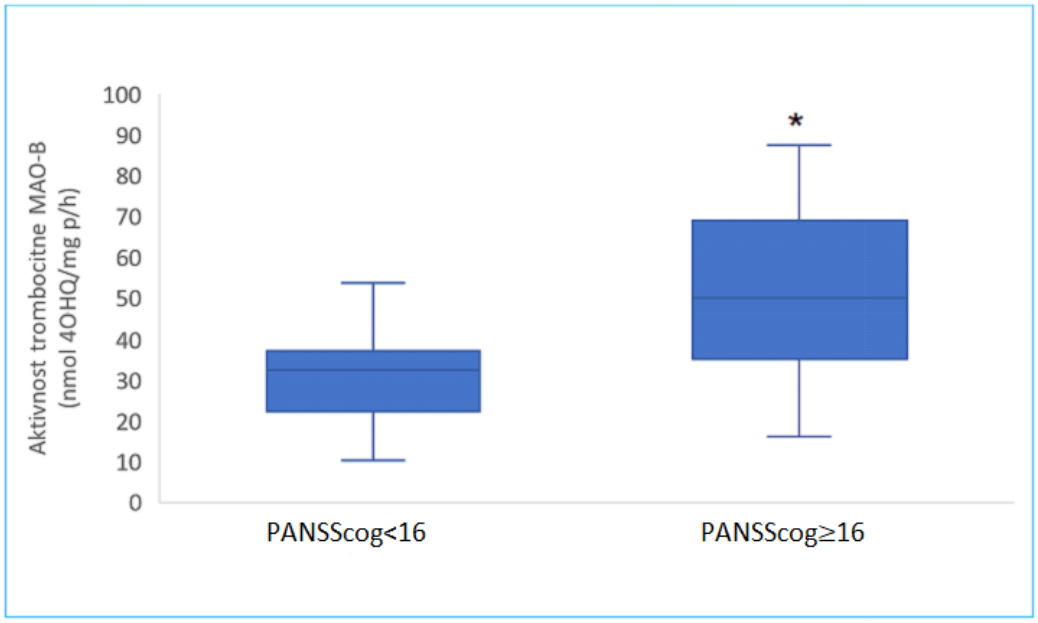
4. Rezultati

Nije uočena značajna razlika (U=243,00; P=0,662) u aktivnosti trombocitne MAO-B kod muškaraca nepušača podijeljenih obzirom na broj ostvarenih bodova na PANSSpos podljestvici. Za razliku od toga, kod muškaraca nepušača uočena je značajno niža aktivnost trombocitne MAO-B kod onih s ostvarenim manjim, nego kod onih s ostvarenim većim brojem bodova na PANSSneg podljestvici (Slika 17).



Slika 17. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca nepušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSSneg, t = -2,9; P = 0,006; Studentov t-test

Aktivnost trombocitne MAO-B je bila manja kod muškaraca nepušača s manjim u odnosu na one s većim brojem bodova ostvarenim na PANSScog podljestvici (Slika 18).



Slika 18. Aktivnost trombocitne MAO-B kod muškaraca nepušača oboljelih od shizofrenije podijeljenih obzirom na broj bodova ostvaren na ljestvici PANSScog. *U=107,000; P=<0,001; Mann Whitney test

Kod podjele muškaraca nepušača obzirom na broj bodova ostvarenih na podljestvicama PANSSgen (t=-0,86, P=0,395), PANSSexc (U=200,00; P=0,337), PANSSpsy (U=163,00; P=0,435) i PANSSdepr (U=69,00; P=0,181) nije uočena značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B.

Kod žena ovisnih o pušenju niti jedna ispitanica nije ostvarila veći broj bodova od graničnih vrijednosti za podljestvice PANSStot, PANSSgen, PANSScog, PANSSpsy i PANSSdepr, dok kod podjele prema bodovima na podljestvicama PANSSpos (U=1041,00; P=0,202), PANSSneg (U=302,00; P= 0,139) i PANSSexc (U=741,00; P=0,153) nije uočena značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B. Žene nepušači nisu ostvarile veći broj bodova od granične vrijednosti na podljestvicama PANSStot, PANSSgen, PANSScog, PANSSpsy i PANSSdepr, a nije uočena značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B kod podjele prema ostvarenom broju bodova na PANSSpos (t=0,451; P=0,653), PANSSneg (t=0,326; P=0,750) i PANSSexc (t=1,485; P= 0,142) podljestvicama.

4.2. Polimorfizam 13. introna gena *MAO-B*

Kod ženskih ispitanika nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P=0,09). Kod muških ispitanika odstupanje od Hardy-Weinbergove nije testirano s obzirom da je MAO-B X-vezani gen te ne postoji heterozigotni genotip. Nije pronađena značajna razlika u učestalosti genotipova obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* kod muškaraca oboljelih od shizofrenije i podjeljenih prema broju bodova ostvarenih na PANSS podljestvicama (Tablica 8)

Tablica 8. Učestalost genotipova obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* kod muškaraca oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema broju bodova ostvarenim na pojedinim PANSS podljestvicama

PANSS podljestvica	**Broj bodova**	**MAO-B genotip N (%)**	
		A	G
PANSStot	< 120	90 (58,8)	63 (41,2)
	≥ 120	22 (64,7)	12 (35,3)
		χ^2=0,19; df=1; P=0,660	
PANSSpos	< 28	85 (59,0)	59 (41,0)
	≥ 28	27 (62,8)	16 (37,2)
		χ^2=0,07; df=1; P=0,791	
PANSSneg	< 28	75 (60,0)	50 (40,0)
	≥ 28	37 (59,7)	25 (40,3)
		χ^2=0,01 df=1 P=0,908	
PANSSgen	< 64	96 (58,9)	67 (41,1)
	≥ 64	16 (66,7)	8 (33,3)
		χ^2= 0,25 df=1 P=0,616	
PANSScog	< 16	75 (60,0)	50 (40,0)
	≥ 16	37 (59,7)	25 (40,3)
		χ^2=0,01 df=1 P=0,908	
PANSSexc	< 20	94 (58,4)	67 (41,6)
	≥ 20	18 (69,2)	8 (30,8)
		χ^2= 0,69; df=1; P=0,406	
PANSpsy	< 16	96 (59,3)	66(40,7)
	≥ 16	16 (64,0)	9 (36,0)
		χ^2= 0,05 df=1; P=0,817	
PANSSdep	< 16	104 (60,5)	68 (39,5)
	≥ 16	8 (53,3)	7 (46,7)
		χ^2= 0,07 df=1 P=0,790	

Kod žena, kao i kod muškaraca, nije pronađena značajna razlika u učestalosti genotipova obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* oboljelih od shizofrenije i podjeljenih prema broju bodova ostvarenih na PANSS podljestvicama (Tablica 9). Prilikom podjele prema broju ostvarenih bodova na pojedinim PANSS podljestvicama, niti jedna ili samo jedna ispitanica su ostvarile broj bodova veći od granične vrijednsoti te u tom slučaju nije bilo moguće provesti statističku analizu (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela MAO-B genotipova kod žena oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema broju bodova ostvarenim na pojedinim PANSS podljestvicama.

PANSS podljestvica	**PANSS bodovi**	**MAO-B genotip N (%)**		
		AA	AG	GG
PANSStot	< 120	58 (27,5)	117 (55,4)	36 (17,1)
	≥ 120	1(100,0)	0 (0)	0 (0)
PANSSpos	< 28	52(27,8)	101 (54,0)	34 (18,2)
	≥ 28	7(28,0)	16 (64,0)	2 (8,0)
		x^2= 1,75; df=2; P=0,418		
PANSSneg	< 28	57 (27,9)	113 (55,4)	34 (16,7)
	≥ 28	2 (25,0)	4 (50,0)	2 (25,0)
		x^2= 0,38; df=2; P= 0,827		
PANSSgen	< 64	59(27,8)	117(55,2)	36(17)
	≥ 64	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PANSScog	< 16	58 (27,5)	117 (55,4)	36 (17,1)
	≥ 16	1 (100)	0 (0)	0 (0)
PANSSexc	< 20	55 (28,4)	106 (54,6)	33 (17,0)
	≥ 20	4 (22,2)	11 (61,1)	3 (16,7)
		x^2= 0,35; df=2; P= 0,840		
PANSpsy	< 16	59 (28,0)	116 (55,0)	36(17,0)
	≥ 16	0 (0)	1 (100)	0 (0)
PANSSdep	< 16	59 (27,8)	117 (55,2)	36 (17,0)
	≥ 16	0 (0)	0 (0)	0 (0)

4. Rezultati

Kako bi se ispitao doprinos pojedinog alela gena *MAO-B* težini simptoma procijenjenih PANSS podljestvicama, ženski ispitanici su dodatno podijeljeni obzirom na to jesu li nosioci alela A (Tablica 10) odnosno alela G (Tablica 11) gena *MAO-B*. Pritom nisu pronađene značajne razlike u učestalosti genotipova obzirom na polmorfizam 13. introna gena *MAO-B* kod žena oboljelih od shizofrenije i podjeljenih prema broju bodova ostvarenih na PANSS podljestvicama (Tablice 10 i 11).

Tablica 10. Raspodjela genotipova MAO-B (A nosioci i GG homozigoti) kod žena oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema broju bodova ostvarenih na pojedinim PANSS podljestvicama.

PANSS podljestvica	**Broj bodova**	**MAO-B A nosioci N (%)**	
		A	GG
PANSStot	< 120	175 (82,9)	36 (17,1)
	≥ 120	1 (100)	0 (0)
PANSSpos	< 28	153 (81,8)	34 (18,2)
	≥ 28	23 (92,0)	2 (8,0)
		x^2= 0,9880 df=1 P=0,322	
PANSSneg	< 28	170 (83,3)	34 (16,7)
	≥ 28	6 (75,0)	2 (25,0)
		x^2= 0,0185; df=1; P=0,892	
PANSSgen	< 64	112 (75,7)	36 (24,3)
	≥ 64	0 (0)	0 (0)
PANSScog	< 16	175 (82,9)	36 (17,1)
	≥ 16	1 (100)	0 (0)
PANSSexc	< 20	161 (83,0)	33 (17,0)
	≥ 20	15 (83,3)	3 (16,7)
		x^2=0,0847; df=1; P=0,771	
PANSpsy	< 16	175 (82,9)	36 (17,1)
	≥ 16	1 (100)	0 (0)
PANSSdep	< 16	112 (75,7)	36 (24,3)
	≥ 16	0 (0)	0 (0)

Tablica 11. Raspodjela MAO-B genotipova (G nosioci i AA homozigoti) kod žena oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema broju bodova ostvarenim na pojedinim PANSS podljestvicama.

PANSS podljestvica	**Broj bodova**	**MAO-B G nosioci N (%)**	
		AA	G
PANSStot	< 120	58 (27,5)	153 (72,5)
	≥ 120	1 (100)	0 (0)
PANSSpos	< 28	52 (27,8)	135 (72,2)
	≥ 28	7 (28,0)	18 (72,0)
		x^2=0,0473; df=1; P=0,828	
PANSSneg	< 28	57 (27,9)	147 (72,1)
	≥ 28	2 (25,0)	6 (75,0)
		x^2=0,0484; df=1; P=0,826	
PANSSgen	< 64	59 (44,0)	75 (56,0)
	≥ 64	0 (0)	0 (0)
PANSScog	< 16	58 (27,5)	153 (72,5)
	≥ 16	1 (100)	0 (0)
PANSSexc	< 20	55 (28,4)	139 (71,6)
	≥ 20	4 (22,2)	14 (77,8)
		x^2=0,0784; df=1; P=0,779	
PANSpsy	< 16	59 (28,0)	152 (72,0)
	≥ 16	0 (0)	1 (100)
PANSSdep	< 16	59 (44,0)	75 (56,0)
	≥ 16	0 (0)	0 (0)

5. Rasprava

U ovom radu praćena je povezanost aktivnosti trobocitne MAO-B, kao i polimorfizma 13. introna gena za MAO-B, sa simptomima shizofrenije procijenjenim od strane liječnika psihijatra prema ljestvici pozitivnih i negativnih simptoma. Istraživanje je obuhvatilo 399 ispitanika, od kojih 187 muškaraca i 212 žena. Analiza je provedena uz podjelu po spolu i ovisnosti o pušenju, a ispitanici su podijeljeni na one s više (teži simptomi) ili manje (lakši simptomi) ostvarenih bodova na PANSS podljestvicama.

5.1. Povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B sa simptomima shizofrenije

U psihopatološkom poremećaju kao što je shizofrenija, različiti obrasci ponašanja, odnosno simptomi, različito ovise o biološkim varijablama.[83] U ovom radu pronađeni su različiti tipovi povezanosti aktivnosti trombocitne MAO-B i pojedine skupine simptoma shizofrenije kategoriziranih PANSS podljestvicama. Aktivnost trombocitne MAO-B je prethodno predložena kao periferni pokazatelj različitih disinhibitornih poremećaja kao što su impulzivno i rizično ponašanje, traženje novotarija te značajke osobnosti povezane s psihopatologijom ili agresijom.[59,84] Povećanje, kao i smanjenje aktivnosti MAO-B, predstavlja biološku ranjivost na različita ponašanja te nema jednostave ili linearne povezanosti između patoloških obrazaca ponašanja i monoaminergičkog sustava.[60] Nadalje, pretpostavlja se da bi niska aktivnost MAO-B mogla predstavljati nespecifični pokazatelj koji indicira predispoziciju za psihopatologiju vjerojatnije generalno, nego za specifična ponašanja odnosno pojedine simptome.[59] Kao što je već ranije spomenuto, aktivnost MAO-B ovisi o spolu. Ovom studijom su potvrđene razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B ovisno o spolu i pušenju, s povišenom aktivnošću pronađenom kod žena u odnosu na muškarce te kod nepušača u odnosu na pušače, sukladno navodima iz literature.[49,53,54,56,58] Već su otprije poznata istraživanja koja potvrđuju inhibicijski učinak pušenja na aktivnost trombocitne MAO-B,[53,58,85,86], a najvjerojatnije kao posljedicu epigenetskih modifikacija izazvanih pušenjem, odnosno snižene metilacije promotora gena *MAO-B* koja uzrokuje povećanu sintezu istoimenog proteina.[87] U konačnici, pušenje potiče pojačanu sintezu MAO-B kako bi se nadomjestila snižena aktivnost enzima izazvana deprivacijom kisika uslijed pušenja.[88] Spolom izazvane razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B objašnjavaju se većom koncentracijom samog proteina u trombocitima žena u odnosu na

muškarce. Naime, spolom izazvane razlike nestaju ukoliko se aktivnost enzima korigira obzirom na količinu samog proteina.[89]

U ovom radu je uspoređena aktivnosti trombocitne MAO-B između ispitanika s ostvarenim većim i ispitanika s manjim brojem bodova ostvarenim na pojedinim podljestvicama PANSS. Kada govorimo o muškarcima pušačima uključenim u naše istraživanje, rezultati su pokazali značajnu razliku u aktivnosti trombocitne MAO-B između onih s većim brojem bodova ostvarenih na PANSStot, PANSSpos, PANSSneg, PANSSgen, PANSScog i PANSSpsy i onih sa manjim brojem bodova ostvarenih na istim ljestvicama. Aktivnost trombocitne MAO-B bila je značajno povišena kod ispitanika sa ostvarenim većim, u odnosu na one s manjim brojem bodova na prethodno navedenim ljestvicama. Nije postojala bitna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ispitanika sa manjim i većim brojem ostvarenih bodova kada je riječ o PANSSexc i PANSSdepr ljestvici. Kod muškaraca nepušača, aktivnost trombocitne MAO-B bila je povišena kod onih s većim brojem bodova na PANSStot, PANSSneg i PANSScog ljestvicama, dok kod podjele obzirom na PANSSpos, PANSSgen, PANSSexc, PANSSpsy i PANSSdepr podljestvice nije bila uočena razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B. Kod žena pušača, kao i kod žena nepušača, nisu pronađene razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B nakon podjele ispitanica ovisno o broju bodova ostvarenih na PANSS ljestvicama.

Uvidom u literaturu nije pronađeno puno znanstvenih radova koji su proučavali promjene aktivnosti trombocitne MAO-B ovisno o težini simptoma procijenjenih PANSS-om. Među našim rezultatima svakako treba istaknuti povezanost povišene aktivnosti trombocitne MAO-B s ostvarenim većim brojem bodova na PANSStot, PANSSneg i PANSScog ljestvicama koju pronalazimo kod svih muškaraca neovisno o pušenju. Kako PANSStot bodovi daju važnu informaciju o općem psihopatološkom stanju u shizofrenih bolesnika, zanimljivo je uočiti povezanost povišene aktivnosti trombocitne MAO-B i teže psihopatologije u shizofreniji. Ovaj rezultat je još zanimljiviji ukoliko se uzme u obzir i činjenica da je, prema otprije poznatim rezultatima, aktivnost trombocitne MAO-B bila snižena[90] ili se nije razlikovala u shizofrenih ispitanika u usporedbi s kontrolnim ispitanicima.[91] Kako naša studija nije uključila i skupinu zdravih kontrolnih ispitanika, ne možemo uspoređivati u tom smjeru, ali niti isključiti važnost pronađene povišene aktivnosti trombocitne MAO-B kao pokazatelja teže psihopatologije unutar skupine shizofrenih bolesnika.

Nekonzistentni rezultati vezani za aktivnost trombocitne MAO-B u shizofreniji kao i heterogenost same bolesti, potaknuli su znanstvenike da istraže aktivnost trombocitne MAO-B u pojedinim podgrupama i specifičnim simptomima. Neke studije su pritom izvijestile o sniženoj aktivnosti trombocitne MAO-B u paranoidnom podtipu shizofrenije.[92] Paranoidni

simptomi poput halucinacija i deluzija uvršteni su u pozitivne simptome PANSS-a, a u našem radu se veći broj bodova ostvarenih na PANSSpos podljestvici dovodi u vezu s povišenom aktivnošću trombocitne MAO-B u muškaraca pušača. Ista povezanost je izostala kod muškaraca nepušača te kod žena. Međutim, uzimajući u obzir činjenicu da je evaluacija bolesnika u našoj i studiji Meltzer i Zureick[92] provedena koristeći različite kliničke instrumente (PANSS naspram SADS-C), ne bi bilo ispravno smatrati ih istovjetnima pa se ne može ni zaključiti da se radi o oprečnim rezultatima.

Također, iz literature je poznata značajna pozitivna korelacija između negativnih simptoma i aktivnosti trombocitne MAO-B kod muškaraca, uz izostanak iste kod žena.[74] Ti rezultati su u skladu s našim nalazima povišene aktivnosti trombocitne MAO-B povezane s većim brojem bodova na PANSSneg podljestvici kod muškaraca. Pritom korelacija između aktivnosti trombocitne MAO-B i negativnih simptoma indicira da bi jedan od supstrata MAO-B (serotonin ili dopamin) mogao biti važan za razumijevanje etiologije negativnih simptoma u shizofreniji.[74] Međutim, opet je važno istaknuti da je evaluacije simptoma u spomenutoj studiji rađena koristeći druge kliničke instrumente od onih korištenih u našoj studiji.

Broj bodova na PANSScog podljestvici nespecifično odražava kognitivne sposobnosti često narušene u shizofreniji[27] te naši rezultati, potvrđeni u muškaraca neovisno o pušenju, upućuju na važnu povezanost povišene aktivnosti trombocitne MAO-B s lošijim kognitivnim sposobnostima. Brojne studije su pokazale da monoaminergički sustav ima odlučujuću ulogu u kogniciji na biomolekularnom nivou, uključujući memoriju,[93] orijentaciju,[94] pažnju,[95] paranoidno razmišljanje[96] te ponašanje i emocije[93,97]. Povišene razine monoamina kao rezultat promjena izazvanih aktiviranim enzimima MAO potiču promjene ostalih neurotransmiterskih sustava u mozgu (glutamatergički, acetilkolin esteraza, serotonergički, noradrenalinski) vodeći pritom do kognitivne manjkavosti.[98] Temeljem naših rezultata, za pretpostaviti je da se povećana aktivacija MAO-B u središnjem živčanom sustavu odražava i na periferiji što trombocitnoj MAO-B daje potencijal pokazatelja oslabljenih kognitivnih sposobnosti u bolesnika sa shizofrenijom.

Povezanost većeg broja bodova na PANSSgen i povišene aktivnosti trombocitne MAO-B pronađena je samo kod muškaraca ovisnih o pušenju. Možemo diskutirati da je parcijalna povezanost PANSSgen bodova i aktivnosti trombocitne MAO-B izazvana širinom simptoma koje ova podljestvica uključuje. Tako se opći psihopatološki simptomi uglavnom odnose na kogniciju, ali uključuje i druge simptome poput somatskih problema, depresije i anksioznosti (Tablica 1). Naime, povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B i kognicije već je prethodno raspravljena, dok istovremeno postoje studije koje niječu povezanost aktivnosti MAO-B u

trombocitima s dijagnozom depresije ili anksioznosti.[99] Osim toga, u našoj studiji je također u potpunosti izostala povezanost depresivnih simptoma procijenjenih prema podljestvici PANSSdep s aktivnošću trombocitne MAO-B.

U skladu s objavljenim studijama,[76] u ovom radu se veći broj PANSSpsy bodova povezuje s povišenom aktivnošću trombocitne MAO-B kod shizofrenih bolesnika ovisnih o pušenju, dok je povezanost izostala kod nepušača. Švob Štrac i suradnici[76] su ispitivali aktivnost trombocitne MAO-B kod muških ispitanika s posttraumatskim stresnim poremećajem (PTSP) kod kojih je izraženost psihotičkih simptoma procijenjena na jednak način kao u ovoj studiji. Iako je opisana povezanost pronađena samo kod muškaraca pušača, nakon usporedbe s ostalim literaturnim podacima[60,100] koji opisuju sličnu povezanost, svakako ne smijemo zanemariti činjenicu da povišena aktivnost trombocitne MAO-B može odražavati prisustvo psihotičkih simptoma u shizofreniji.

Kod shizofrenih bolesnika, agitacija se često procjenjuje koristeći PANSSexc podljestvicu[101-104] te se često navodi kao jedna od jednostavnijih i najintuitivnijih ljestvica za procjenu simptoma agitacije.[101,102,104-107] Prethodna studija[108] je izvijestila o povišenoj aktivnosti trombocitne MAO-B kod agitiranih u odnosu na neagitirane ispitanike, dok je u našoj studiji u potpunosti izostala povezanost aktivnosti trombocitne MAO-B i simptoma agitacije. U navedenoj studiji evaluacija simptoma agitacije je također provedena prema broju bodova na PANSSexc podljestvici, međutim postoje velike razlike u uzorcima ispitanika što može biti razlog neslaganju rezultata. Naime, navedena studija je provedena na uzorku odraslih muških ispitanika oboljelih od shizofrenije i adolescenata s poremećajem ponašanja, dok naša studija uključuje odrasle osobe oba spola samo s dijagnozom shizofrenije.

5.2. Povezanost polimorfizma 13. introna gena za MAO-B sa simptomima shizofrenije

Najčešći polimorfizam gena *MAO-B* nalazi se u polimorfnoj ponavljajućoj regiji njegovog 13. introna i uključuje promjenu jedne baze, adenina (A), odnosno gvanina (G).[46] U ovom radu proučavana je razlika u učestalosti genotipova obzirom na polimorfizam 13. introna gena *MAO-B* kod ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih po spolu i broju bodova ostvarenim na PANSS ljestvicama. Iako postoje studije koje povezuju dijagnozu shizofrenije s polimorfizmom 13. introna gena *MAO-B*,[48,62] u našoj studiji je potpuno izostala povezanost polimorfizma 13. introna gena *MAO-B* kod muškaraca ili žena s ozbiljnošću simptoma procijenjenih PANSS ljestvicama. Istraživanje provedeno na španjolskoj populaciji shizofrenih

bolesnika[62] predložilo je G alel gena *MAO-B* kao rizični faktor za razvoj shizofrenije, ali samo u ženskih ispitanika sa shizofrenijom. Iako su žene nosioci dvaju alela gena *MAO-B* smještenog na kromosomu X, a muškarci samo jednog, teško je procijeniti postoji li kod žena aditivni učinak i koliko je on kod svake žene utjecan nasumičnom deaktivacijom jednog kromosoma X tijekom embriogeneze.[62]

Ne postoji puno studija koje su proučavale izravnu vezu polimorfizma 13. introna gena *MAO-B* i težine simptoma u shizofreniji, a naši rezultati su u skladu s postojećim. Naime, postojanje ozbiljnih simptomi agitacije, procijenjenih prema PANSSexc, kod odraslih muškaraca sa shizofrenijom i muških adolescenata s poremećajem ponašanja nije povezano s polimorfizmom 13. introna gena *MAO-B*.[108] Također, ratni veterani oboljeli od PTSP-a, nosioci alela G ili A gena *MAO-B* nisu se razlikovali u težini psihotičkih i simptoma agitacije, procijenjenih prema PANSSexc odnosno PANSSpsy.[76]

6. Zaključak

- Potvrđene su razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B ovisno o spolu i pušenju, s povišenom aktivnošću pronađenom kod žena u odnosu na muškarce te kod nepušača u odnosu na pušače
- Aktivnost trombocitne MAO-B je povišena kod muškaraca pušača s ostvarenim većim brojem bodova na podljestvicama PANSStot, PANSSpos, PANSSneg, PANSSgen, PANSScog i PANSSpsy u odnosu na muškarce pušače s manjim brojem bodova ostvarenih na istim podljestvicama
- Kod muškaraca pušača nije pronađena značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ispitanika s manjim i većim brojem ostvarenih bodova na podljestvicama PANSSexc i PANSSdep
- Aktivnost trombocitne MAO-B je povišena kod muškaraca nepušača s ostvarenim većim brojem bodova na podljestvicama PANSStot, PANSSneg i PANSScog u odnosu na muškarce nepušače s manjim brojem bodova ostvarenih na istim podljestvicama
- Kod muškaraca nepušača nije pronađena značajna razlika u aktivnosti trombocitne MAO-B između ispitanika s manjim i većim brojem ostvarenih bodova na podljestvicama PANSSpos, PANSSgen, PANSSexc, PANSSpsy i PANSSdep
- Kod žena pušača, kao i kod žena nepušača, nisu pronađene razlike u aktivnosti trombocitne MAO-B nakon podjele ispitanica ovisno o broju bodova ostvarenih na PANSS ljestvicama
- Izostala je povezanost polimorfizma 13. introna gena *MAO-B* s ozbiljnošću simptoma procijenjenih PANSS podljestvicama kod muškaraca i žena oboljelih od shizofrenije

7. Popis korištenih kratica:

- A - adenin
- bp - parova baza
- BSA - goveđi serumski albumin
- Cys - cistein
- dNTP - deoksiribonukleozid trifosfat
- FAD - Flavin adenin dinukleotid
- G - gvanin
- Gly - glicin
- MAO - monoamin-oksidaza
- MAO-A - monoamin-oksidaza A
- MAO-B - monoamin-oksidaza B
- mRNA - glasniča ribonukleinska kiselina
- PANSS - Ljestvica pozitivnih i negativnih simptoma
- PANSScog – podljestvica kognitivih simptoma
- PANSSdep – podljestvica depresivnih simptoma
- PANSSexc – podljestvica simptoma ekscitacije
- PANSSgen – ljestvica općih psihopatoloških simptoma
- PANSSneg – ljestvica negativnih simptoma
- PANSSpos – ljestvica pozitivnih simptoma
- PANSSpsy – podljestvica psihotičkih simptoma
- PCR - lančana reakcija polimeraze
- SDS - natrijev dodecil sulfat
- Ser - serotonin
- Tyr - tirozin
- VNTR - varijabilan broj ponavljanja

8. Literaturni izvori

[1] P. Folnegović Grošić, *Objektivnost terapijskog odgovora u liječenju prve epizode shizofrenih bolesnika novim antipsihoticima*, Doktorski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.

[2] D. Begić, V. Jukić, V. Medved, *Psihijatrija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2005, str. 190-195.

[3] J. Meiser, D. Weindl, K. Hiller, *Cell Commun. Signal* **11** (2013) 34.

[4] K. Chen, H.F. Wu, J.C. Shih, *J. Neurochem.* **61** (1993) 187-190.

[5] R. Adolfsson , C.G. Gottfries, L. Oreland, A. Wiberg, B. Winblad, *Life Sci.* **27** (1980) 1029–1034.

[6] M. Sandler, V. Glover, A. Clow, J. Jarman, *Adv. Neurol.* **60** (1993) 238–241.

[7] E. Jakubauskiene, V. Janaviciute, I. Peciuliene, P. Söderkvist, A. Kanopka, *Febs. Letters* **586** (2012) 3698-3704.

[8] M. J. Owen, A. Sawa, P. B. Mortensen, *The Lancet* **388** (2016) 86-97.

[9] R. Tandon, H.A. Nasrallah, M.S. Keshavan, *Schizophr. Res.* **110** (2009) 1-23.

[10] A. Jonsdottir, G. Waghorn, *Ment. Health Rev. J.* **20** (2015) 13–27.

[11] D. Ostojić *Ljetopis socijalnog rada* **19** (2012) 53-72.

[12] M. Nordentoft, P.B. Mortensen, C.B. Pedersen, *Arch. Gen. Psychiatry* **68** (2011) 1058-1060.

[13] I. Escudero, M. Johnstone, *Curr. Psychiatry Rep*. **16** (2014) 502.

[14] S.M. Stahl, *Stahls essential psychopharmacology*, Cambridge University Press, New York 2008, str. 247-327.

[15] A.G. Cardano, E.J. Marshall, B. Coid, A.M. Macdonald, T.R. Ribchester, N.J. Davies, P Venturi, L.A. Jonese, S.W. Lewis, *Arch. Gen. Psychiatry* **56** (1999) 162-168.

[16] M. Fischer, *Br. J. Psychiatry* **118** (1971) 43-52.

[17] D.R. Weinberger, *The Neurology of Schizophr. Elsevier* (1986) 387– 405.

[18] R.M. Murray , S.W. Lewis, *Br. Med. J.* **295** (1987) 681-682.

[19] J.L. Knoll, D.L. Garver, J.E. Ramberg, S.J. Kingsbury, D. Croissant, B. McDermott, *Schizophr. Bull* **24** (1998) 365-379.

[20] M. Laruelle, *Curr. Opin. Pharmacol*. **14 (**2014) 97-102.

[21] M.S. Keshavan, *J. Psychiatr Res.* **33** (1999) 513-521.

[22] P.J. Siekmeier, D.P. van Maanen, *Neuropsychopharmacology* **39** (2014) 1713-1721.

[23] J.M. Robinson, S. W. Missale, C.Caron , *Neuropharmacology* **35** (1996) 1503–1519.

8. Literaturni izvor

[24] G. Ayano, *J. Ment. Disord. Treat.* **2** (2016) 106-109.

[25] K.R. Patel, J. Cherian, K. Gohil, D. Atkinson, *P&T* **39** (2014) 638-645.

[26] H. Lavretsky, *Clinical Handbook of Schizophrenia*, Guilford Press, New York 2008, str. 3–12.

[27] R.E. Nielsen, E. Lindström, G.K. Telléus, S. Levander, *Nord J. Psychiatry* **68** (2014) 573–578.

[28] J.A. Lieberman, D .Perkins, M. Chakos, F. Jarskog, K. Boteva, J. Gilmore, *Biol. Psychiatry* **50** (2001) 884-897.

[29] K.E. Lewandowski, B.M. Cohen, D. Ongur, *Psychol. Med.* **41** (2011) 225-241.

[30] D.E. Edmondson, C. Binda u J. R. Harris (ur.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function,* Vol 87, Springer, Germany, 2018, str. 117.-141.

[31] A. Maršavelski, R. Vianello, *Chem. Eur. J.* **23** (2017) 2915 – 2925.

[32] https://www.creative-enzymes.com/similar/monoamine-oxidase_436.html (preuzeto 5.veljače 2019)

[33] J. R. Miller, D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 23515–23525.

[34] J.C. Shih, J. Grimsby, K. Chen, *J. Neural Transm. Suppl.* **32** (1990) 41–47.

[35] J. Grimsby, N.C. Lan, R. Neve, K. Chen, J.C. Shih, *J. Neurochem*. **55** (1990) 1166–1169.

[36] M. Yamada, H. Yasuhara, *Clinical NeuroToxicology* **25** (2004) 215.

[37] S. Carradori, M.C. Gidaro, A. Petzer, G. Costa, P. Guglielmi, P. Chimenti, S. Alcaro, J.P. Petzer, *J. Agric. Food Chem*. **64** (2016) 9004−9011.

[38] K.F. Tipton, S. Boyce, J. O'Sullivan, G.P. Davey, J. Healey, *Curr. Med. Chem*. **11** (2004) 1965−1982.

[39] J. Grimsby, K. Chen, L. Wang, N.C. Lan, J.C. Shih, *Neurobiology* **88** (1991) 3637-3638.

[40] https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MAOA (preuzeto 7. veljače 2019.)

[41] C. Binda, P. Newton-Vinson , F. Hubalek, D.E. Edmondson, A. Mattevi, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 22-26.

[42] R.M. Geha, K. Chen , J. Wouters , F. Ooms ,J.C. Shih, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 17209-17216.

[43] K. Chen, H.F. Wu, J. Grimsby, J.C. Shih, *Mol. Pharmacol.* **46** (1994) 1226-1233.

[44] L. Oreland, J. Hallman, M. Damberg, *Curr. Med. Chem.* (2004) 2007-2016.

[45] M. D. Berry, A. V. Juorio, I. A. Paterson, *Prog. Neurobiol.* **42** (1994) 375–391.

[46] J.H. Kurth, M.C. Kurth, S.E. Poduslo, J.D. Schwankhaus, *Ann. Neurol.* **33** (1993) 368-372.

[47] J. Balciuniene, L. Emilsson, L. Oreland , U. Pettersson , E. Jazin, *Hum. Genet.* **110** (2002) 1-7.

[48] Y.L.Wei, C.X. Li, S.B. Li, Y. Liu, L. Hu, *Behav. Brain Funct.* **7** (2011) 42.

[49] H. Garpenstrand, J. Ekblom, K. Forslund, G. Rylander, L. Oreland, *J. Neural. Transm.* **107** (2000) 523–530.

[50] D. Schalling, M. Asberg, G. Edman, *L. Acta psychiat. scand.* **76** (1987) 172-182.

[51] J.S. Fowler, N. D. Volkow, G.J. Wang, J. Logan, N. Pappas, C. Shea, R. MacGregor, *Neurobiology of Aging* **18** (1997) 431–435.

[52] L.D. Snell, J. Glanz, B. Tabakoff, *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26** (2002) 1105-1113.

[53] L. Oreland, M. Damberg, J. Hallman, H. Garpenstrand, *J. Neural Transm.* **109** (2002) 963-975.

[54] J.S. Fowler, J. Logan, G.J. Wang, N.D. Wolkow, *Neurotoxicology* **24** (2003) 75-82.

[55] L. Oreland, C.G. Gottfries, *Neuro-Psychopharmacol Biol. Psychiatr.* **10** (1986) 533-540.

[56] T. Coccini, G. Randine, AF Castoldi, L. Balloni, P. Baiardi, L. Manzo, *Environ. Toxicol. Phar.* **19** (2005) 715-720.

[57] J.S. Fowler, J. Logan, G.J. Wang, ND. Volkow, F. Telang,W. Zhu, P. Vaska, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (2003) 11600–11605.

[58] L. Oreland, J. Hallman, M. Damberg, *Curr. Med. Chem.* (2004) 2007-2016.

[59] V.V. Ruchkin, R.A. Koposov, B. Klinteberg, L. Oreland, E.L. Grigorenko, *J. Abnorm. Psychol.* **114** (2005) 477-482.

[60] M. Paaver, D. Eensoo, A. Pulver, J. Harro, *Psychopharmacology* **186** (2006) 32-40.

[61] J. Harro , K. Fischer, S. Vansteelandt, M. Harro, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14** (2004) 65-69.

[62] P. Gasso, M. Bernando, S. Mas, A. Crescenti, C. Garcia, E. Parellada, *Neuropsychobiology* **58** (2008) 65-70.

[63] J Wei, G.P. Hemmings, *Psychiatric Genetics* **9** (1999) 177–181.

[64] S.Z. Sabol, S. Hu, D. Hamer, *Human Genetics* **103** (1998) 273-279.

[65] A. Fresan, B. Camarena, R. Apiquian, A. Aguilar, N. Urraca, H. Nicolini , *Neuropsychobiology* **55** (2007) 171-175.

[66] S. Zammit, G. Jones, S.J. Jones, *American Journal of Medical Genetics- Neuropsychiatric Genetics* **128** (2004) 19-20.

[67] HT Qiu, HQ Meng, C Song, MH Xiu, DC Chen, FY Zhu, GY Wu, TA Kosten, TR Kosten, XY Zhang, *Brain Res.* **1287** (2009) 67-73.

[68] D. Li , L. He, *American Journal of Medical Genetics B* **147** (2008) 174–178.

[69] B. Camarena, A. Fresán, A. Aguilar, R. Escamilla, R. Saracco, J. Palacios, A. Tovilla, H. Nicolini, *ISRN Psychiatry* (2012) 1-5.

[70] L. E. DeLisi , T. J. Crow, *Schizophrenia Bulletin* **15** (1989) 431-440.

[71] W. H. Berrettini, W. H. Vogel, *American Journal of Psychiatry* **134** (1977) 805–806.

[72] J. Dann, L. E. DeLisi, M. *Psychiatry Research* **70** (1977) 131–143.

[73] N. Carrera, J. Sanjuan, M. D.Molto, *American Journal of Medical Genetics B* **5** (2009) 369–374.

[74] R. J. Lewine, H. Y. Meltzer, *Psychiatry Research* **12** (1984) 99–109.

[75] E. Lindström, E. Tuninger, S. Levander, *Nord J. Psychiatry* **66** (2012) 33–39.

[76] D. Švob Štrac, Z. Kovačić Petrović, M. Nikolac Perković, D. Umolac, G. Nedić Erjavec, N. Pivac, *Stress* **19** (2016) 362–373.

[77] V.P. Kontaxakis, B.J. Havaki-Kontaxaki, S.S. Stamouli, M.M. Margariti, C.T. Collias , G.N. Christodoulou, *Eur Psychiatry* **15** (2000) 274-277.

[78] M. Nikolac Perković, doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015, str. 217.

[79] M Krajl, *Biochem. Pharmacol.* **14** (1965) 1684-1686.

[80] O.H. Lowry, R N.J., A.L. Farr, R.J. Randall, *Journal of Biological Chemistry* **193** (1951) 265-275.

[81] S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky, *Nucleic Acids Res*. **16** (1988) 1215.

[82]https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf

83] M.B. Bowers, *Schizophrenia Bulletin* **6** *(1980)* 393-403.

[84] E.G. Stalenheim, *Psychiatry. Res.* **121** (2004) 281–291.

[85] I. Berlin, S. Said, O. Spreux-Varoquaux, R. Olivares, J.M. Launay, A.J. *Biological Psychiatry* **38** (1995) 756–761.

[86] N. Pivac, D. Mück-Šeler, D. Kozarić-Kovačić, M. Mustapić, K. Nenadić-Šviglin, M. Deželjin, *Psychopharmacology* **182** (2005) 194–196.

[87] J.M. Launay, M. Del Pino, G. Chironi , J. Callebert, K. Peoc'h , J.L. Mégnien, J. Mallet, A. Simon, F. Rendu, *PLoS One*. **4** (2009) 7959.

[88] F. Rendu, K. Peoc'h, I. Berlin, D. Thomas, J.M. Launay, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8** (2011) 136-147.

[89] L.D. Snell, J. Glanz, B. Tabakoff, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **26** (2002) 1105–1113.

[90] M. Baron, M. Levitt, R. Gruen, J. Kane, L. Asnis, *Am. J. Psychiatry*. **141** (1984) 836-842.

8. Literaturni izvor

[91] M.A. Marcolin, JM. Davis, *Schizophr Res*. **7** (1992) 249-267.

[92] H.Y. Meltzer, J.L. Zureick, *Psychiatry Research* **22** (1987) 99–109.

[93] J.H. Barnett, K. Xu, J. Heron, D. Goldman, P.B. Jones, *Am. J. Med. Genet B Neuropsychiatr. Genet.* **156** (2011) 158–167.

[94] R.G. Heimberg, M.R. Liebowitz, D.A. Hope, F.R. Schneier, C.S. Holt, L.A. Welkowitz, H.R. Juster, R. Campeas, M.A. Bruch, M. Cloitre, B. Fallon, D.F. Klein, *Arch. Gen. Psychiatry.* **55** (1998) 1133–1141.

[95] D.M. Goldstein, R.L. Goldberg, *J. Clin. Psychiatry.* **47** (1981**)**

[96] A. Delcker, H.J. Gaertner, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **1** (1991) 177–180.

[97] R.A. Danilova, T.A. Moskvityna, M.F. Obukhova, M.V. Belopolskaya, I.P. Ashmarin, *Neurochem Res*. **24** (1999) 1147–1151.

[98] Z. Cai, *Mol. Med. Rep.* **9** (2014) 1533-1541.

[99] A. Khan, E. Lee, S. Dager, T. Hyde, V. Raisys, D. Avery, D. Dunner, *Biological Psychiatry* **21** (1986) 847–849.

[100] N. Pivac, J. Knežević, D. Kozarić-Kovačić, M. Deželjin, M. Mustapić, D. Rak, T.Matijevic, *J. Affect. Disord.* **103** (2007) 131–138.

[101] L. Citrome, X. Meng, M. Hochfeld, *Schizophr. Res.* **131** (2011) 75-81.

[102] A. Montoya , A. Valladares, L. Lizán, L. San , R. Escobar , S. Paz, *Health Qual Life Outcomes* **9** (2011) 18.

[103] J.W. Swanson, M.S. Swartz, *Schizophr Bull.* **30** (2004) 3-20.

[104] J. Volavka, *Advances in Psychiatry*. **2014** (2014) 196281.

[105] R.W. Baker, B.J. Kinon, G.A. Maguire, H. Liu, A.L., *J .Clin. Psychopharmacol*. **23** (2003) 342-348.

[106] M.D. Lesem, T.K. Tran-Johnson, R.A. Riesenberg, D. Feifel, M.H. Allen, R. Fishman, D.A. Spyker, J.H, Kehne, J.V. Cassella, *J. Psychiatry*. **198** (2011) 51–58.

[107] J.P. Lindenmayer, C.A. Bossie, M. Kujawa, Y. Zhu, C.M. Canuso, *Psychopathology* **4** (2008) 264-270.

[108] M. Nikolac Perković, D. Švob Štrac, G. Nedić Erjavec, S. Uzun, J. Podobnik , O. Kozumplik, S. Vlatković, N. Pivac, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **69** (2016) 131-146.

9. Životopis

Osobni podatci

Ime i prezime: Lea Pašalić

Datum rođenja: 14. srpnja 1994.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Svete Ane, Osijek

2009.–2013. Prirodoslovna-matematička gimnazija u Osijeku

2013.–2016. Preddiplomski studij kemije na Odjelu za Kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera, Osijek

2016.-2019. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb