

# Povezanost koncentracije trombocitnog serotonina i polimorfizma gena za monoaminooksidazu tipa A sa simptomima agitacije u psihijatrijskih bolesnika

---

Umolac, Danica

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:535394>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



DANICA UMOLAC

**POVEZANOST KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA I  
POLIMORFIZMA GENA ZA MONOAMINOOKSIDAZU TIP A SA  
SIMPTOMIMA AGITACIJE U PSIHIJATRIJSKIH BOLESNIKA**

**Diplomski rad**

Zagreb 2017.

DANICA UMOLAC

**POVEZANOST KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA I  
POLIMORFIZMA GENA ZA MONOAMINOOKSIDAZU TIP A SA  
SIMPTOMIMA AGITACIJE U PSIHIJATRIJSKIH BOLESNIKA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra kemije

Zagreb 2017.

Ova je diplomatska radnja, izrađena u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, pod vodstvom prof. dr. sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice, predana na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar kemije.

## Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem mentorici prof. dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, na njezinom vodstvu, korisnim savjetima i svesrdnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, želim se posebno zahvaliti svojoj neposrednoj voditeljici, dr.sc. Matei Nikolac Perković, na svekolikoj pomoći prilikom eksperimentalne izrade ove radnje te na korisnim savjetima i pomoći kod pisanja radnje.

Zahvaljujem i doc. dr. sc. Morani Dulić, nastavnici, na njezinoj susretljivosti i na njezinim korisnim komentarima. Uz to zahvaljujem i članovima-ocjeniteljima radnje, doc. dr. sc. Gordanu Horvatu i prof. dr. sc. Sandi Rončević.

Zahvaljujem se i dr. sc. Dubravki Švob Štrac i mag. mol. biol. Luciji Tudor na suradnji, konkretnim savjetima, komentarima i strpljenju.

Na kraju, najveću zahvalnost za svoja postignuća pripisujem svojoj baki i djedu na njihovoj bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Veliko Hvala svima!

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1.	Fiziologija serotonina u organizmu.....	2
2.1.1.	Središnji odjeljak serotonergičkog sustava .....	5
2.1.2.	Periferni odjeljak serotonergičnog sustava.....	7
2.2.	Monoaminooksidaza .....	8
2.2.1.	Izoenzimi monoaminooksidaze.....	8
2.2.2.	Geni za monoaminooksidazu tipa A i tipa B.....	11
2.3.	Agitacija i agresija.....	12
2.3.1.	Poremećaj ophođenja .....	13
2.3.2.	Shizofrenija .....	14
2.3.3.	Posttraumatski stresni poremećaj .....	15
2.4.	Uloga serotoninskog sustava u agitaciji i agresivnom ponašanju.....	17
3.	MATERIJALI I METODE .....	20
3.1.	Ispitanici.....	20
3.2.	Obrada uzoraka krvi i izolacija trombocita.....	21
3.3.	Određivanje koncentracije trombocitnog serotonina .....	22
3.4.	Određivanje koncentracije trombocitnih proteina.....	23
3.5.	Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja.....	24
3.6.	Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam <i>MAOA-uVNTR</i> .....	26
3.7.	Statistička obrada podataka.....	29
4.	REZULTATI.....	30
4.1.	Demografski podaci .....	30
4.2.	Koncentracija trombocitnog serotonina .....	32
4.2.1.	Povezanost dijagnoze s koncentracijom trombocitnog serotonina .....	32
4.2.2.	Povezanost pušenja s koncentracijom trombocitnog serotonina.....	33
4.2.3.	Povezanost agitacije i koncentracije trombocitnog serotonina .....	34
4.3.	Polimorfizam <i>MAOA-uVNTR</i> .....	36
4.3.1.	Povezanost dijagnoze s polimorfizmom <i>MAOA-uVNTR</i> .....	36
4.3.2.	Povezanost agitacije s polimorfizmom <i>MAOA-uVNTR</i> .....	37
4.4.	Povezanost polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i> i koncentracije trombocitnog serotonina.....	39

5.	RASPRAVA .....	41
5.1.	Agitacija kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja .....	41
5.2.	Povezanost koncentracije trombocitnog serotonina s agitacijom kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja .....	42
5.3.	Povezanost polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i> s agitacijom kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja .....	45
5.4.	Povezanost polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i> i koncentracije trombocitnog serotonina.	47
6.	ZAKLJUČAK .....	48
7.	LITERATURNI VRELA .....	50
8.	POPIS KORIŠTENIH KRATICA .....	55
9.	DODATAK .....	viii
10.	ŽIVOTOPIS .....	ix

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno–matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

**Povezanost koncentracije trombocitnog serotonina i polimorfizma gena za monoaminooksidazu tipa A sa simptomima agitacije u psihijatrijskih bolesnika**

*Danica Umolac*

Institut „Ruđer Bošković“, Bijenička cesta 54, Zagreb

Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb

Agitacija podrazumijeva psihičku i tjelesnu uznemirenost koja se često javlja kod različitih psihijatrijskih poremećaja. Neurobiološka podloga agitacije nije potpuno jasna. Dosadašnja saznanja predlažu moguću ulogu serotoninog (5-HT) sustava i njegovih komponenti, kao što je enzim monoaminooksidaza tipa A (MAO-A), u agitaciji. Cilj ovog istraživanja bio je razjasniti povezanost funkcionalnog polimorfizma gena *MAOA (MAOA-uVNTR)* i koncentracije trombocitnog 5-HT sa simptomima agitacije kod osoba oboljelih od shizofrenije, posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP) ili poremećaja ophođenja. Rezultati ovog rada pokazuju da su muški ispitanici s poremećajem ophođenja, u odnosu na ispitanike sa shizofrenijom i PTSP-om, bili češće agitirani, imali višu koncentraciju trombocitnog 5-HT i bili češće nositelji alela L-MAO-A koji se povezuje sa smanjenom ekspresijom gena *MAOA*. Koncentracija trombocitnog 5-HT povišena je i kod agitiranih shizofrenih bolesnika u odnosu na neagitirane. Zaključno, koncentracija 5-HT varira ovisno o dijagnozi i agitaciji, ali polimorfizam *MAOA-uVNTR* ne može se povezati s agitacijom.

(58 stranice, 16 slika, 10 tablica, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb

Ključne riječi: agitacija, MAO-A, polimorfizam, poremećaj ophođenja, PTSP, serotonin, shizofrenija

Mentor: dr. sc. Nela Pivac, zn. savj., izv. prof.

Nastavnik: dr.sc. Morana Dulić. doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Morana Dulić, doc.  
dr. sc. Gordan Horvat, doc.  
dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Rad prihvaćen:



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Graduation Thesis

**The association of platelet serotonin concentration and polymorphism of the monoamine oxidase type A gene with symptoms of agitation in psychiatric patients**

*Danica Umolac*

Institute Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb

Agitation refers to psychological and physical restlessness which often occurs in various psychiatric disorders. Neurobiological basis of agitation is not completely understood. Previous findings suggest a possible role of serotonergic (5-HT) system and its components, such as monoamine oxidase A (MAO-A), in agitation. The aim of this study was to clarify the association of *MAOA* functional polymorphism (*MAOA-uVNTR*) and platelet 5-HT concentration with the symptoms of agitation in patients with schizophrenia, posttraumatic stress disorder (PTSD), or conduct disorder. Results of this study show that male subjects with conduct disorder were more frequently agitated, had increased platelet 5-HT concentration and were more frequent carriers of allele L-MAO-A, which is associated with decreased expression of *MAOA*, compared to subjects with schizophrenia and PTSD. Platelet 5-HT concentration was higher in agitated than in non-agitated schizophrenic patients. In conclusion, diagnosis and agitation significantly affect platelet 5-HT concentration, while there is no association between *MAOA-uVNTR* polymorphism and agitation.

(58 pages, 16 figures, 10 tables, original language: Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb

Key words: agitation, conduct disorder, MAO-A, polymorphism, PTSD, serotonin, schizophrenia

Supervisor: Dr. Nela Pivac, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Morana Dulić, Asst. Prof.  
Dr. Gordan Horvat, Asst. Prof.  
Dr. Sanda Rončević, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

# 1. UVOD

Agitacija je pojam koji opisuje svaku fizičku i psihičku uznemirenost, a odnosi se na motoričku agitaciju, iritabilnost, nemir i neprijateljski nastrojeno ponašanje koje vrlo brzo može dovesti do potencijalno opasnog ponašanja te fizičke i verbalne agresije. Agitacija je često prisutna kod različitih psihijatrijskih poremećaja (shizofrenija, bipolarni poremećaj, posttraumatski stresni poremećaj (PTSP), poremećaji ponašanja i poremećaji osobnosti) čime dodatno narušava kliničku sliku pacijenta. Agitacija može imati vrlo negativne fizičke i psihološke posljedice na same pacijente, ali i na njihovu okolinu.

Serotonin (5-HT) kao neurotransmitter sudjeluje u složenom procesu komunikacije između neurona, a posreduje čitav niz središnjih i perifernih funkcija. Između ostalog, uključen je u modulaciju brojnih fizioloških funkcija kao što su prehrana, spavanje, seksualno ponašanje, cirkadijani i neuroendokrini ritmovi, raspoloženje, itd. Dosadašnja istraživanja upućuju na moguću vezu između agresivnog ponašanja i promijenjene funkcije serotoninskog sustava.<sup>1</sup>

Zanimljiva je i uloga potencijalne genetičke kontrole pojedinih komponenti koje sudjeluju u metabolizmu 5-HT, njegovom otpuštanju i djelovanju unutar sinapse. U te komponente ubraja se i enzim monoaminoooksidaza tipa A (MAO-A) koja sudjeluje u razgradnji biogenih amina.<sup>2,3</sup> Varijante polimorfizma *MAOA-uVNTR*, smještenog unutar promotorske regije gena *MAOA*, koje imaju manji broj uzastopnih ponavljanja (2 ili 3), i dovode do više ekspresije MAO-A i samim time do niže koncentracije 5-HT, povezuju se s impulzivnim i agresivnim ponašanjem<sup>4,5</sup> te ozbiljnim kriminalnim ponašanjem.<sup>6</sup>

Zbog nedostatka pouzdanih podataka u literaturi, cilj ovog diplomskog rada je istražiti postoji li povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i koncentracije 5-HT u trombocitima sa simptomima agitacije kod osoba oboljelih od shizofrenije ili PTSP-a te kod osoba s poremećajima ponašanja. Istraživanja genetičkih varijanti gena *MAOA* te promjena u koncentraciji trombocitnog 5-HT mogla bi doprinijeti shvaćanju uloge serotoninskog sustava u razvoju simptoma agitacije kod navedenih psihijatrijskih poremećaja.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Fiziologija serotonina u organizmu

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je biogeni amin koji se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana. U početku je bio identificiran kao vazokonstriksijska tvar, koja se oslobađa prilikom koagulacije krvi, a kasnije i kao monoaminski neurotransmiter u mozgu. Kemijska struktura 5-HT iz enterokromafinih stanica crijeva otkrivena je još 1937. godine. Naknadno je sintetiziran, nakon čega je otkrivena i funkcija 5-HT kao neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu (SŽS), a istraživanja vezana za 5-HT intenzivirana su nakon njegovog pronalaska u hipofizi. Najviše 5-HT se sintetizira u enterokromafinim stanicama crijeva, a također se sintetizira i u serotonergičnim neuronima SŽS-a, te u hipofizi.<sup>1</sup> 5-HT je uključen u regulaciju neuroendokrinog sustava, raspoloženja i fizioloških funkcija te ponašanja.<sup>7</sup> Djeluje na velik broj fizioloških funkcija, npr. kardiovaskularnu i gastrointestinalnu regulaciju, apetit, sitost, disanje i termoregulaciju, osjetljivost na bol, cikluse spavanja i budnosti, motornu aktivnost, reproduktivne i senzorne funkcije, kao i na različite vrste ponašanja, kao što su agresija, agitacija, kontrola impulsa, anksioznost, suicidalno ponašanje, seksualno ponašanje, ali i na kognitivne funkcije kao što su pamćenje i učenje.<sup>8</sup>

Poremećaji funkcije serotoninskog sustava povezuju se s pojavom određenih psihijatrijskih poremećaja, kao što su depresija, razne vrste ovisnosti i anksioznih poremećaja, shizofrenija, anoreksija, te s osobinama ličnosti poput agresivnosti, impulzivnosti ili poremećajem pažnje, ali i za neurološke poremećaje poput migrene, Alzheimerove bolesti i epilepsije.<sup>9,10</sup>

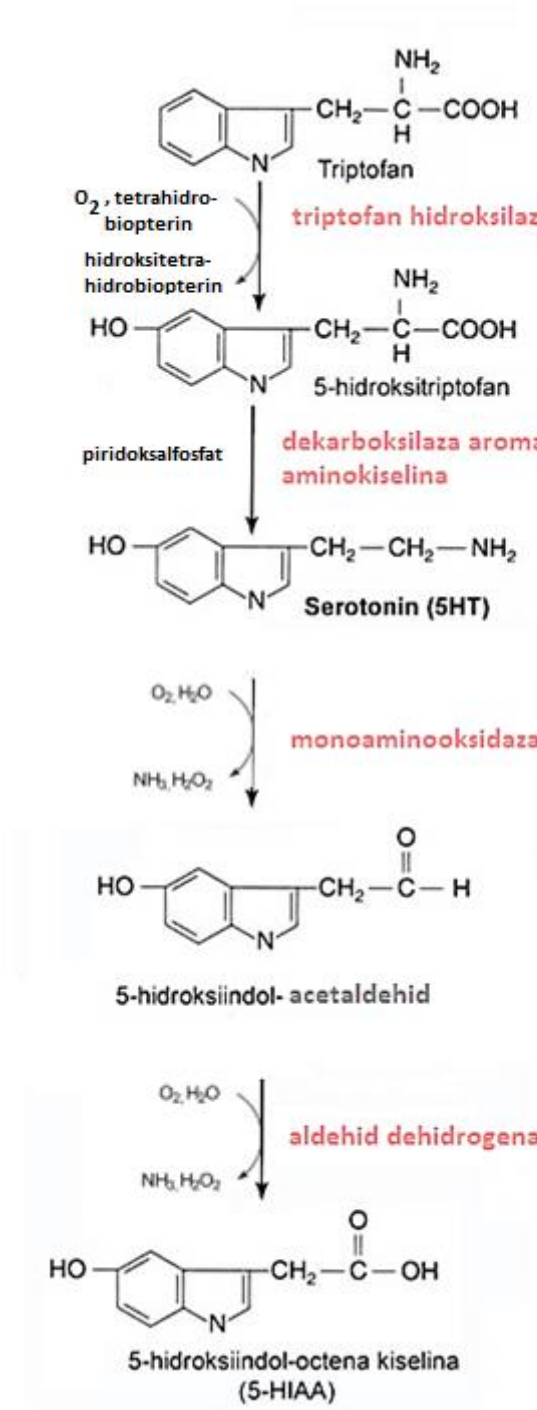
U organizmu se 5-HT sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana pomoću enzima triptofan hidroksilaze (TPH) (**Slika 1**). Najveći dio, oko 95% 5-HT, sintetizira se u enterokromafinim stanicama tankog crijeva (tzv. Kultschitzkyjeve stanice), a ostatak se sintetizira u mozgu i perifernim organima te potom krvotokom dopijeva u pluća gdje se metabolizira.<sup>11</sup> Trombociti ne sintetiziraju 5-HT, već se 5-HT aktivnim transportom unosi u trombocite uz pomoć transmembranskog serotoninskog transportera (5-HTT ili SERT), a potom aktivnim transportom, uz pomoć adenozin difosfata (ADP), unosi u mjehuriće, tzv. guste granule (engl. *dense bodies*).

Budući da je 5-HT hidrofилna supstanca, ne može prijeći krvno-moždanu barijeru, ali istu može prijeći njegov prekursor triptofan. Molekula 5-HT sintetizira se iz aminokiseline L-triptofana, koji se djelovanjem TPH prevodi u 5-hidroksitriptofan, a potom, djelovanjem dekarboksilaze aromatskih aminokiselina, u 5-HT (**Slika 2**). Taj proces odvija se samo u stanicama koje sadrže TPH, a to su serotonergični neuroni u jezgrama rafe moždanog debla te, na periferiji, enterokromafine stanice tankog crijeva.



**Slika 1.** Sinteza serotonina

Kod sisavaca se nalaze dvije izoforme TPH, enzima koji je jedini specifičan za biosintezu 5-HT. Triptofan-hidroksilaza 1 (TPH1) nalazi se pretežito u perifernom sustavu, dok je triptofan-hidroksilaza 2 (TPH2) dominantna u mozgu.<sup>9,11</sup> Mozak ima vlastitu sintezu i razgradnju 5-HT koja je odvojena krvno-moždanom barijerom od perifernog serotoninskog odjeljka. Sintetizirani 5-HT pohranjuje se u specifičnim vezikulama presinaptičkih završetaka serotonergičnih neurona. Podraženi presinaptički neuron oslobađa 5-HT u sinaptičku pukotinu gdje 5-HT ima funkciju neurotransmitera. U razgradnji 5-HT glavnu ulogu ima enzim monoaminooksidaza (MAO), čijim djelovanjem nastaje 5-hidroksiindolacetaldehid. On se najvećim dijelom, posredstvom aldehyd-dehidrogenaze, prevodi u konačni metabolit razgradnje 5-HT, 5-hidroksiindol octenu kiselinu ili 5-HIAA (**Slika 2**). Enzim MAO također postoji u 2 izoforme.<sup>11</sup> Enzim MAO tipa A (MAO-A) je u najvećoj koncentraciji prisutan u placenti, plućima, jetri, slezeni i crijevu, dok je MAO tipa B (MAO-B) najviše eksprimiran u trombocitima i glija stanicama.



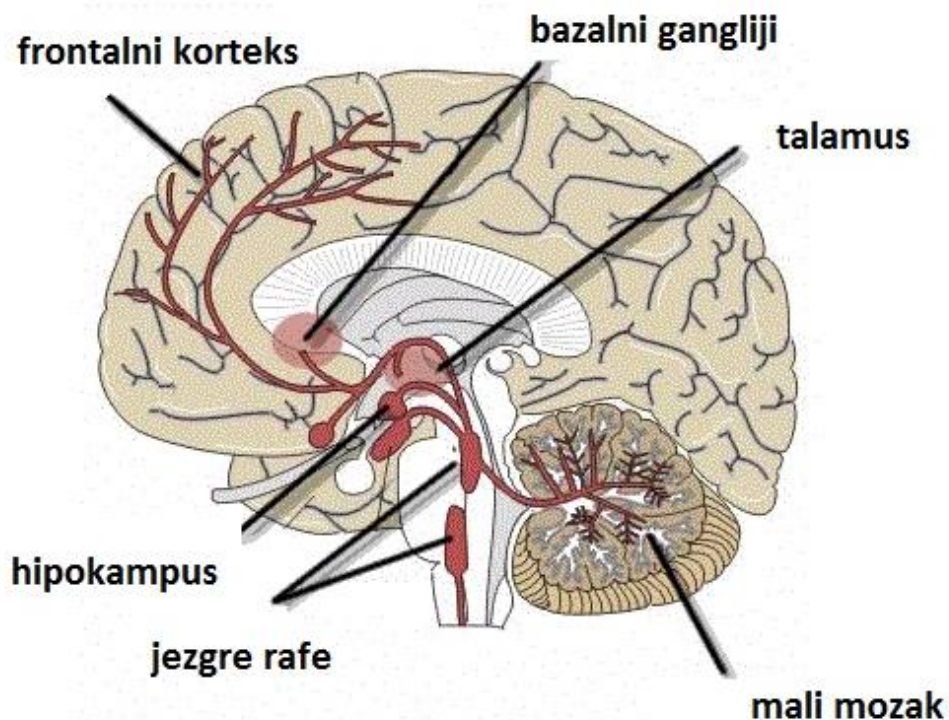
**Slika 2.** Metabolizam serotonina

Zbog ograničene distribucije i visoke konstante  $K_m$ , TPH je limitirajući čimbenik u sintezi 5-HT. Samo 5% od ukupnog metabolizma triptofana koristi se za sintezu 5-HT. Ovako mali postotak može se objasniti specifičnom lokalizacijom TPH u mozgu i enterokromafinim stanicama. Oko 95% metabolizma triptofana odvija se u jetri za sintezu kinureina.<sup>11</sup>

Različiti podražaji mogu potaknuti otpuštanje 5-HT iz enterokromafinih stanica. Nakon izlučivanja uz ostale crijevne hormone, 5-HT povećava protok krvi u gastrointestinalnom traktu. Nakon prvog prolaska kroz jetru, 30-80% 5-HT metabolizira se djelovanjem MAO do 5-HIAA, koja se izlučuje putem bubrega. Većina preostalog 5-HT (90%) metabolizira se u plućima, a preostalih 10% 5-HT gotovo u potpunosti preuzimaju trombociti, koji ga pohranjuju sve do oslobađanja u procesu zgrušavanja krvi. Homeostaza 5-HT u čovjeka se dešava kroz dva metabolički odvojena odjeljka; središnji i periferni, koji su odvojeni krvno-moždanom barijerom nepropusnom za 5-HT, ali propusnom za prekursor triptofan i metabolit 5-HIAA.

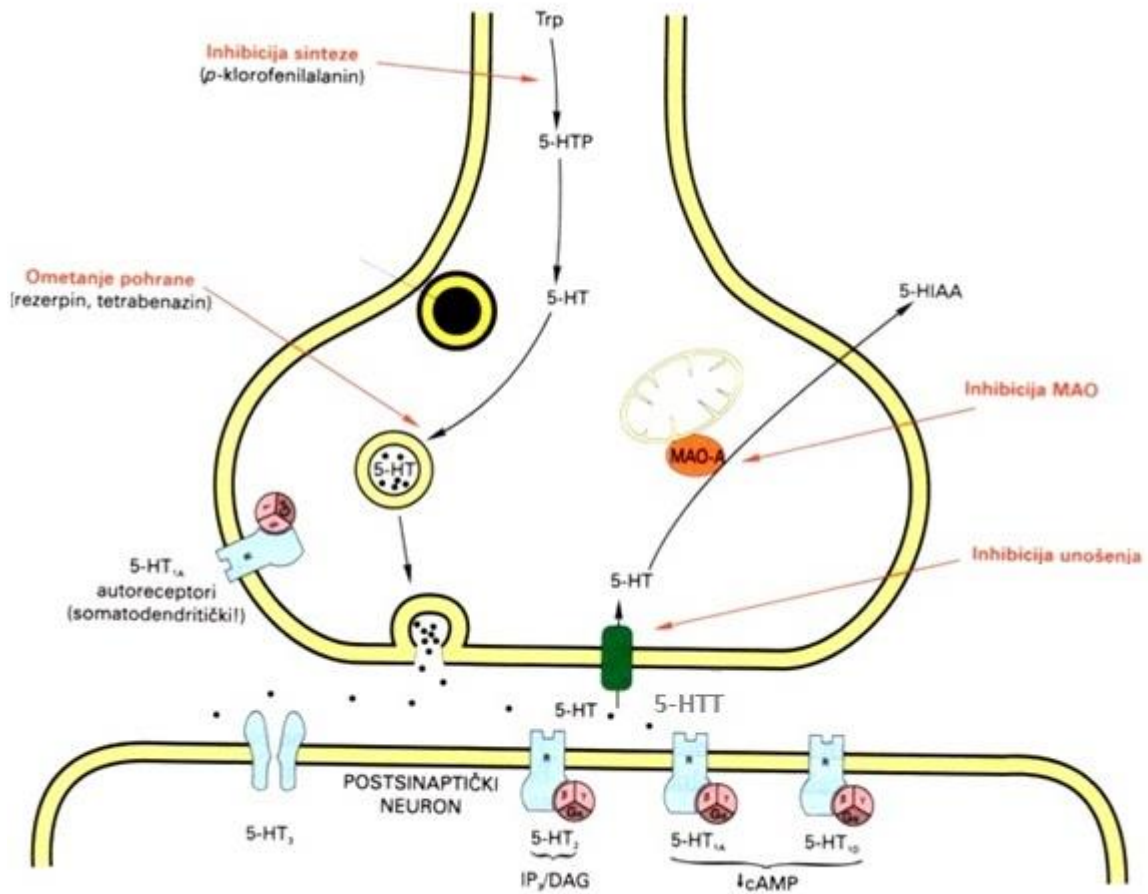
### 2.1.1. Središnji odjeljak serotonergičkog sustava

Središnji odjeljak serotonergičnog sustava predstavljaju 5-HT neuroni okupljeni u jezgre rafe (lat. *nuclei raphe*) u moždanom deblu koji se projiciraju u sve dijelove mozga i kralježničke moždine (**Slika 3**). 5-HT neuroni iz medijalne se jezgre rafe projiciraju u hipokampus i hipotalamus, a iz dorzalne jezgre rafe u hipotalamus, kaudatus i putamen.<sup>12</sup>



**Slika 3.** Serotoninski putevi u mozgu<sup>13</sup>

Sintetizirani 5-HT pohranjuje se u specifičnim vezikulama presinaptičkih završetaka serotonergičnih neurona. Podražen presinaptički neuron oslobađa 5-HT u sinaptičku pukotinu gdje 5-HT ima funkciju neurotransmitera (**Slika 4**).



**Slika 4.** Idealizirana sinaptička pukotina između dva neurona koja pokazuje ulogu MAO-A u katabolizmu serotonina<sup>14</sup>

Nakon sinteze, 5-HT se pakira u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog monoaminskog transportera. Sintetizirani 5-HT otpuštanjem iz presinaptičkog neurona i vezanjem za receptore na postsinaptičkom neuronu sudjeluje u komunikaciji između neurona te prijenosu signala (**Slika 4**). Nakon prijenosa impulsa, 5-HT se vraća u presinaptički neuron pomoću 5-HTT smještenog na površini neurona te se razgrađuje djelovanjem MAO.

### 2.1.2. Periferni odjeljak serotonergičnog sustava

U perifernom serotoninskom odjeljku, koji sadrži oko 90% ukupnog 5-HT, glavni izvor sinteze 5-HT su enterokromafine stanice crijeva koje otpuštaju dio 5-HT u krvotok, odakle veći dio aktivnim transportom pohranjuju trombociti, a glavno mjesto razgradnje 5-HT su pluća.

Trombociti su, uz serotonergične neurone i enterokromafine stanice, najbogatiji izvor 5-HT. Iako se trombociti strukturno, funkcionalno i ontogenetski razlikuju od neurona, elementi trombocitnog 5-HT sustava gotovo su identični onima u 5-HT neuronima. Te se sličnosti baziraju na sličnom unosu 5-HT te sličnim procesima pohrane i otpuštanja 5-HT.<sup>15,16,17,18</sup>

S druge strane, postoje značajne razlike između neurona i trombocita. U prvom redu, razlika je u tome što trombociti nemaju jezgru, ne provode električne impulse, imaju kraći životni vijek i ne sintetiziraju 5-HT, već ga aktivnim transportom, pomoću 5-HTT u trombocitnoj membrani, pohranjuju iz krvne plazme u guste granule. Na površini trombocita, nalazi se 5-HT receptor tipa 2A koji, nakon vezanja 5-HT, aktivira promjenu oblika trombocita i reakciju otpuštanja sadržaja iz granula i agregaciju trombocita izazvanu 5-HT.<sup>15</sup> Na 5-HTT odnosno vezno mjesto za 5-HT vežu se antidepresivi, inhibitori aktivnog unosa 5-HT i on je ciljno mjesto djelovanja selektivnih inhibitora ponovnog unosa 5-HT (SIPUS-a).<sup>16</sup> Mnoge studije podržale su povezanost između serotoninskih trombocitnih pokazatelja i psihopatoloških stanja.<sup>17</sup> Prednosti ovog pristupa istraživanja SŽS-a je u manje invazivnim metodama istraživanja u odnosu na metode poput lumbalne punkcije za određivanje koncentracije 5-HIAA u likvoru te u odnosu na neuroendokrine probe, koje zahtijevaju administraciju određenih hormona i/ili lijekova. Koncentracija 5-HT u trombocitima individualno je stabilna u zdravih osoba.<sup>18</sup>



## **2.2. Monoaminooksidaza**

Enzim MAO integralni je protein vanjske membrane mitohondrija smješten u mozgu i perifernim organima. Katalizira oksidativnu deaminaciju različitih endogenih i egzogenih amina. Ovaj flavoenzim odgovoran je za metabolizam i regulaciju koncentracije mnogih izuzetno važnih neurotransmitera, kao što su dopamin, histamin, 5-HT te adrenalin, ali i različitih amina (benzilamina i feniletilamina).<sup>19</sup> Na taj način MAO izravno djeluje na koncentraciju aminskih neurotransmitera, ali i brojnih ksenobiotika.<sup>19</sup> Utjecajem na koncentraciju neurotransmitera, MAO utječe na raspoloženje, pokretanje, budnost i memoriju. Disfunkcija MAO povezuje se s mnogim patološkim stanjima poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, Huntingtonove bolesti i shizofrenije.<sup>20,21</sup>

### **2.2.1. Izoenzimi monoaminooksidaze**

Enzim MAO javlja se u obliku dva izoenzima; MAO-A i MAO-B. Izoenzimi (ili izoenzimi) su enzimi koji se međusobno razlikuju u aminokiselinskom slijedu, ali kataliziraju istu kemijsku reakciju.<sup>19</sup> Izoenzimi se obično razlikuju po kinetičkim parametrima (primjerice, imaju različitu Michaelisovu konstantu) ili je njihova aktivnost regulirana različitim biokemijskim mehanizmima. Razlikuju se po glavnim supstratima, inhibitorima te smještaju u organizmu. Enzim MAO-A veličine je 61 kDa, a MAO-B 55 kDa.<sup>19</sup> Osim po veličini, dva tipa enzima razlikuju se i prema supstratima. MAO-A primarno katalizira oksidativnu deaminaciju 5-HT i noradrenalina, a glavni supstrati MAO-B su dopamin i egzogeni amini poput benzilamina i feniletilamina.<sup>19</sup> Glavni inhibitori MAO-A su klogilin i moklobemid, a inhibitori MAO-B su L-deprenil i pargilin.<sup>22</sup> Inhibitori MAO svoju primjenu nalaze kao antidepresivi i neuroprotektivni lijekovi, pri čemu se MAO-A inhibitori primjenjuju kao antidepresivi, a MAO-B inhibitori u liječenju Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.<sup>22</sup>

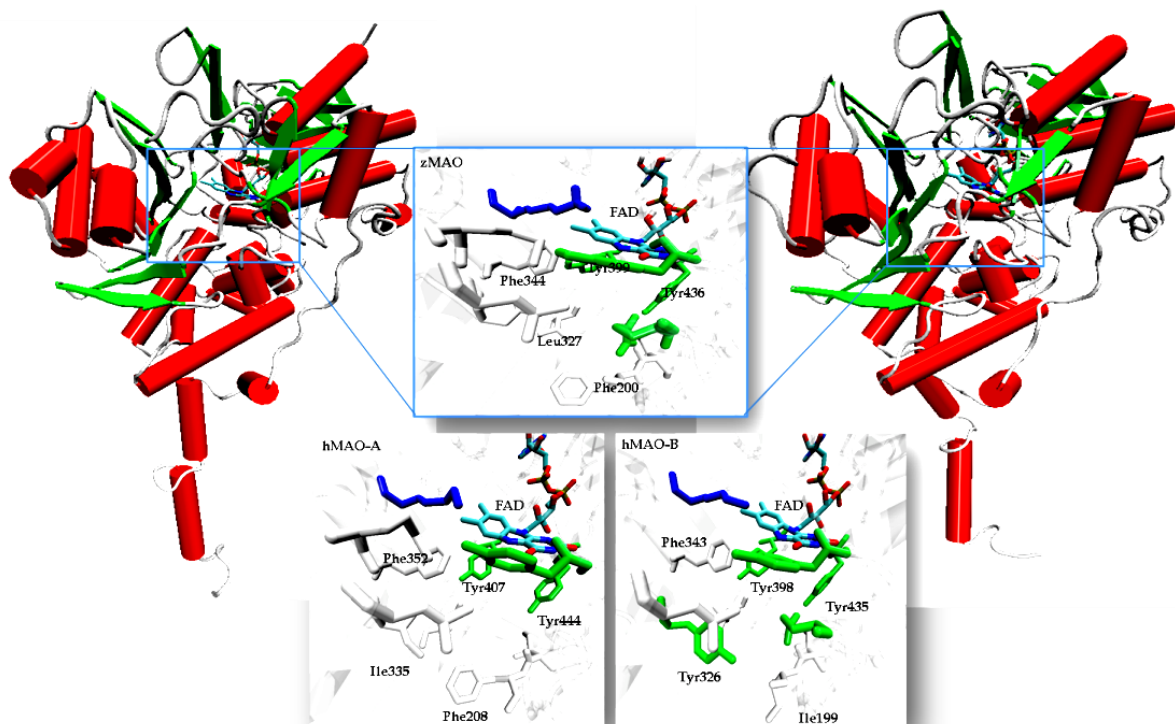
Enzim MAO-A je u mozgu smješten unutar kateholaminergičnih neurona, a rjeđe u glija stanicama, dok se MAO-B pretežito nalazi u glija stanicama i serotonergičnim neuronima.<sup>23</sup> MAO u mozgu degradira štetne amine i na taj način sprječava oštećenje neurona. Na periferiji su izoenzimi MAO zajedno eksprimirani u brojnim tkivima, osim u placenti gdje je eksprimirana samo MAO-A te u trombocitima i limfocitima gdje je eksprimirana samo MAO-B forma.<sup>24,25</sup>

Ekspresija enzima MAO se kod čovjeka mijenja tijekom životnih stadija. Tako je u mozgu fetusa zastupljenija MAO-A, dok u mozgu odraslih osoba prevladava MAO-B, a uzrok tome je dominacija MAO-B u glija stanicama koje proliferiraju tijekom cijelog života čovjeka.<sup>23</sup>

Osim što regulira koncentraciju neurotransmitera u mozgu, MAO na periferiji osigurava obranu od različitih potencijalno toksičnih aaminskih spojeva unesenih hranom ili nastalih metabolizmom tvari. Zbog svoje važne uloge u regulaciji raspoloženja, emocija i ponašanja, aktivnost MAO povezuje se s patofiziologijom različitih mentalnih i neurodegenerativnih poremećaja.<sup>20</sup>

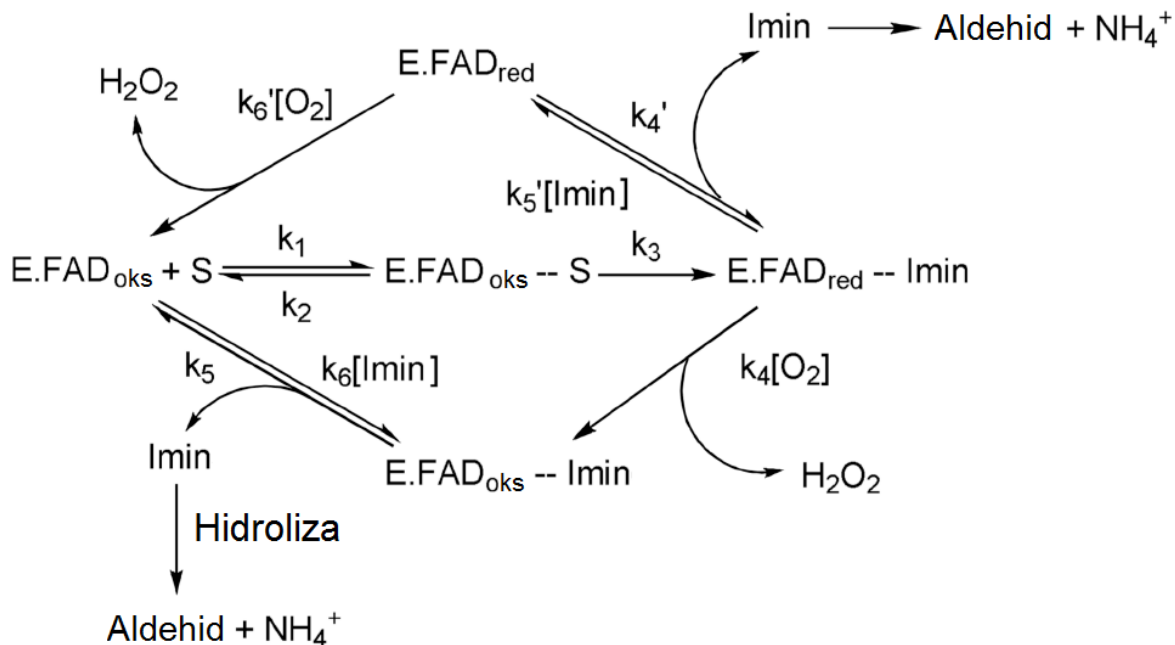
Sličnost aminokiselinskog slijeda dvaju izoenzima iznosi 70%.<sup>26</sup> Izoenzimi su sastavljeni od dvije jednake podjedinice od 59 kDa odnosno 58 kDa. Svaka podjedinica sadrži 4 visoko konzervirane domene bitne za funkcioniranje enzima. U prvoj N-terminalnoj domeni nalazi se karakteristični  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  motiv za koji se veže ADP, a u drugoj domeni nalazi se vezno mjesto supstrata. U trećoj domeni je vezno mjesto za flavin-adenin-dinukleotid (FAD), dok je četvrta domena C-terminalna domena u kojoj se nalazi transmembranski  $\alpha$ -heliks.<sup>27</sup> Transmembranski  $\alpha$ -heliks čine 32 aminokiseline i izrazito je bitan za funkcioniranje enzima, a visoko je konzerviran između izoenzima te između različitih vrsta. Aktivno mjesto MAO-A enzima prikazano je na **Slici 5**.

Vezno mjesto supstrata, unutar druge domene, čine aromatski bočni ogranci Tyr-398, Tyr-435, Tyr-326 (određuje specifičnost) te katalitički ostatak Cys-365.<sup>28</sup> Uz proteinski dio (apoenzim), MAO posjeduje i koenzim FAD. Svaka podjedinica enzima veže jednu molekulu koenzima. FAD se za treću domenu enzima veže kovalentnim i nekovalentnim interakcijama. Koenzim je  $8\alpha$ -CH<sub>3</sub> skupinom kovalentno vezan na Cys-406 u MAO-A odnosno Cys-397 u MAO-B. Nekovalentne interakcije koenzim ostvaruje preko aminokiselina Glu-34, Tyr-44, Thr-45, Lys-296 i Trp-388. Ako se naruši neka od ovih interakcija dolazi do inaktivacije enzima.<sup>28</sup>



**Slika 5.** Aktivno mjesto MAO-A<sup>29</sup>

MAO katalizira reakciju oksidativne deaminacije endogenih i egzogenih amina u organizmu koja se odvija u tri stupnja.<sup>19</sup> Prvo dolazi do oksidacije supstrata popraćene redukcijom FAD-a (**Slika 6**). Zatim se FAD reoksidira kisikom uz nastanak vodikovog peroksida (**Slika 6**). Naposljetku nastaje imin početnog supstrata koji spontano hidrolizira do aldehida (**Slika 6**).<sup>19</sup>



Slika 6. Opća formula reakcija koju katalizira MAO<sup>19</sup>

### 2.2.2. Geni za monoaminooksidazu tipa A i tipa B

MAO-A i MAO-B forme kodirane su s dva različita gena smještena jedan do drugog na kraćem kraku kromosoma X, regija Xp11.23-11.4. (Slika 7). Oba gena sadrže 15 eksona i 14 introna. Budući da se veze između eksona i introna oba gena preklapaju, smatra se da su nastali duplikacijom od zajedničkog pretka.<sup>24</sup> Promotorske regije izoenzima su također visoko konzervirane te dijele 60% homologije u sekvenci. Oba promotora sadrže GC-bogate regije, no razlikuju se u organizaciji transkripcijskih elemenata. Upravo zbog toga smatra se da dolazi do razlike u specifičnoj ekspresiji izoenzimau stanicama različitih tkiva.<sup>30</sup>



Slika 7. Položaj gena za MAO-A i MAO-B na kromosomu X (označeno crveno)<sup>31</sup>

### 2.3. Agitacija i agresija

Agitacija je pojam koji opisuje svaku fizičku i psihičku uznemirenost i unutarnja tenzija, a uključuje motoričku agitaciju, iritabilnost, nemir i neprijateljski nastrojeno ponašanje koje vrlo brzo može dovesti do potencijalno opasnog ponašanja te fizičke i verbalne agresije<sup>32</sup> i nasilničkog ponašanja.<sup>33</sup> Posljednjih desetljeća agresivno, antisocijalno i nasilničko ponašanje je u stalnom je porastu. Progresija težine simptoma agitacije dovodi do agresivnog i nasilničkog ponašanja.<sup>33</sup> Taj uznemirujući razvoj dokumentiraju službene kriminalističke statistike u raznim zapadnim industrijskim zemljama.<sup>34</sup> Tako na primjer, Sjedinjene Američke Države izvješćuju o stopostotnom porastu broja nasilnih prekršaja od 1983. do 1993., pri čemu je gotovo isti porast zabilježen u dječaka i djevojčica koji su tuženi zbog delinkventnog ponašanja. Prevalencija agitacije se kreće od 4,3 do 10 %.<sup>34</sup>

Agresija se definira kao fizički ili verbalni oblik ponašanja koji ima namjeru povrede osobe ili objekta.<sup>34</sup> Ključan je čimbenik u definiciji agresije upravo namjera, te je stoga agresija namjerno ponašanje s ciljem nanošenja fizičke ili psihičke boli. Postoje spolne razlike u agresivnosti. Muškarci su fizički agresivniji od žena, dok kod iskazivanja verbalne agresije razlike nema. Razlikuju se dvije vrste agresije, neprijateljska i instrumentalna. Neprijateljska agresija je izazvana emocijama. Do takvog oblika agresije dolazi u situacijama koje pojedinac doživljava provocirajućima. Javlja se srdžba, što često rezultira napadima. Instrumentalna agresija je napad, ali sa svrhom postizanja nekog cilja. Tada se agresija ne pojavljuje sama od sebe, nego je osoba svjesna da agresivnim ponašanjem postiže neki cilj.<sup>33,34</sup> Ona se javlja u situacijama kada je izvor agresije nepristupačan ili ga se osoba boji. Analizirajući uzroke agresije, psiholozi su formirali tri teorije o agresivnosti, agresija kao urođeno ponašanje, agresija kao odgovor na frustraciju i agresija kao naučeno ponašanje.<sup>35</sup>

Agitacija je često prisutna kod različitih psihijatrijskih poremećaja (shizofrenije, bipolarnog poremećaja, posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP), poremećaja ophođenja i poremećaja osobnosti, poremećaja pažnje s hiperaktivnosti, drugih psihotičnih poremećaja), intoksikacija alkoholom i drogama te kod drugih medicinskih stanja (npr. demencije, traume glave, encefalitisa, meningitisa, encefalopatije, hipoksije, napadaja), čime se dodatno pogoršava klinička slika tih bolesti.<sup>32,34</sup> Agresivno ponašanje i agitacija predstavljaju i javnozdravstveni problem jer agitacija može prijeći u nasilno ponašanje koje karakterizira fizičko i verbalno neprijateljstvo, iritabilno i nekooperativno ponašanje, prijetnje, napadi na druge osobe i druga patološka ponašanja.<sup>32</sup> Agitacija se često javlja kao verbalna ili fizička agresija, a može biti usmjerena na različite objekte i osobe.

Neurobiološka podloga agitacije nije potpuno jasna, no pretpostavlja se da nastaje radi poremećaja u funkcioniranju serotoninskog, dopaminskog i noradrenalinskog, glutamatergičkog i GABA (gama-aminomaslačna kiselina)-ergičkog neurotransmitorskog sustava.<sup>32</sup>

Kako agitacija može imati vrlo negativne fizičke i psihološke posljedice na same bolesnike, ali i njihovu okolinu, intenzivno se radi na istraživanju neurobioloških mehanizama koji su u podlozi agitacije, a koji bi mogli razjasniti mehanizam nastanka agitacije u svrhu prevencije i boljeg liječenja.<sup>34</sup>

### **2.3.1. Poremećaj ophođenja**

Poremećaj ophođenja je psihijatrijski poremećaj koji uključuje trajni model ponašanja kojim su povrijeđena temeljna prava drugih ili važnije društvene norme ili pravila primjerena dobi. Karakteristični simptomi, koji se javljaju u zadnjih 12 mjeseci te moraju postojati unazad zadnjih 6 mjeseci, uključuju agresivno ponašanje prema ljudima i životinjama (7 simptoma); uništavanje imovine (2 simptoma); prijevaru ili krađu (3 simptoma) te ozbiljno narušavanje pravila (3 simptoma). Navedeni simptomi trebaju biti takvog intenziteta da uzrokuju klinički značajno oštećenje socijalnog, akademskog ili radnog funkcioniranja.<sup>36</sup>

Poremećaj ophođenja je poremećaj koji predstavlja veliko opterećenje za društvo, kako u financijskom, tako i u socijalnom pogledu. Briga o djeci s poremećajem ophođenja zahtjeva posebne odgojne postupke te dugotrajni angažman ustanova psihosocijalne skrbi i sudova za maloljetnike. Antisocijalno i agresivno ponašanje ograničava pojedince, njihove odnose s drugima i koči napredak društva u cjelini. Poremećaj ophođenja odlikuje se neustaljenim ponašanjem te postoji nekoliko tipova poremećaja ophođenja.<sup>37</sup> Djeca i adolescenti koji imaju poremećaj s nasilnim ponašanjem su sebična, ne ophode se lijepo prema drugima i nedostaje im osjećaj grižnje savjesti. Osobe s poremećajem ophođenja zbog pripadnosti grupi odani su svojim prijateljima, a loše se ponašaju prema onima koji ne pripadaju grupi. Neka djeca i adolescenti pokazuju znakove više poremećaja. Osobe kod kojih je dijagnosticiran poremećaj s prkošenjem i suprotstavljanjem imaju negativno, ljutito i obrambeno ponašanje, ali bez negativnog stava prema drugima. Takvim je osobama poznata razlika između dobrog i lošeg, te osjećaju grižnju savjesti ako učine nešto loše. Premda se u početku poremećaj s prkošenjem i suprotstavljanjem ne ubraja u poremećaj ophođenja, s vremenom prelazi u njegov blagi oblik. Psihoterapijom je moguće poboljšati djetetovo samopouzdanje i kontrolu, što dovodi do poboljšanja ponašanja. Najčešće se pokazuje da je najbolji način liječenja udaljavanje djeteta

iz loše sredine i uspostavljanje discipline. Poremećaj socijalnog ponašanja djece često je kroničnog karaktera, teško se liječi i smatra se glavnim prethodnikom antisocijalnog ponašanja u odrasloj dobi. Kod antisocijalnih odraslih osoba povećan je rizik od doživljavanja neuspjeha u poslovnom životu, bračnih problema i problema sa zakonom i pravnih sankcija. Budući da su roditelji s takvim poremećajem skloni i kod svoje djece izazvati takvo ponašanje, sheme agresivnog ponašanja prenose se kroz generacije.<sup>37,38</sup>

### **2.3.2. Shizofrenija**

Shizofrenija je jedna od najčešćih psihijatrijskih bolesti. Oko 1% svjetskog stanovništva boluje od shizofrenije.<sup>39</sup> Ovaj psihijatrijski poremećaj karakteriziran je psihotičnim epizodama (s halucinacijama, sumanutim idejama i dezorganiziranim ponašanjem), intervalima gdje dominira apatija, povlačenjem iz socijalnog okruženja i emocionalnom tuposti. Shizofrenija oboljeloj osobi onemogućava razlikovanje stvarnih (realnih) od nestvarnih (nerealnih) doživljaja ili iskustava, ometa logičko razmišljanje, normalne osjećajne doživljaje prema drugim osobama te narušava njeno društveno funkcioniranje. Premda je simptome bolesti u velikoj mjeri moguće liječiti, ipak je to kompleksna bolest koju prati snažna stigmatizacija bolesnika. Često se percipira kao vrsta invaliditeta pri čemu osoba nije u stanju brinuti se za sebe, educirati se ili zadržati posao.<sup>39</sup> Bolest može početi naglo, iznenada, no u većini slučajeva ona se razvija tijekom nekoliko mjeseci pa čak i godinama. Najčešći simptomi su poteškoće s koncentracijom, napetost, nemogućnost spavanja i sl. Kao i u svakoj bolesti simptomi se razlikuju od bolesnika do bolesnika, a svome tijeku ima razdoblja kada se simptomi povlače ili ublažavaju te razdoblja pogoršanja.<sup>40</sup>

Simptomi shizofrenije uobičajeno se dijele na: pozitivne, negativne, kognitivne (spoznajne) i afektivne (simptomi promijenjenog raspoloženja).<sup>33</sup> Pozitivni simptomi uključuju sumanute ideje, smetnje i poremećaje mišljenja, halucinacije te čudno ponašanje. Sumanute ideje su lažna uvjerenja ili zablude nastale na nerealnoj osnovi, tj. nemaju podlogu u realnoj životnoj situaciji, pa su nedostupne korekciji. Shizofreni bolesnik može imati različite smetnje mišljenja, ponekad mu misli vrlo brzo skreću od jedne ideje na drugu, bez jasna slijeda i povezanosti, ili su mu misli "blokirane". Negativni simptomi shizofrenije uključuju gubitak sposobnosti osjećajnog doživljavanja i izražavanja, gubitak energije, volje i inicijative, gubitak sposobnosti uživanja i zanimanja za dotadašnje aktivnosti, teškoće koncentracije. Često se javljaju i simptomi rizične agresivnosti koji uključuju bijes, nezadovoljstvo i iritaciju usmjerenu prema drugima te teškoće u odgađanju zadovoljenja.

Bolesnik traži da se njegove potrebe zadovoljavaju odmah i postaje uznemiren kada je zadovoljavanje potreba ili želja odgođeno. Shizofrenija je povezana s povećanim rizikom za agresivno ponašanje i nasilje.<sup>34</sup> Brojne studije su uputile na povećanu učestalost agresivnosti i počinjenja ubojstva u shizofrenih bolesnika u odnosu na ostalu populaciju. Najiscrpnije podatke o toj povezanosti pregledno su izloženi nedavno.<sup>34</sup> Pokazano je da 14 % bolesnika sa shizofrenijom pokazuje agitaciju kod prijema, dok ih 20 % ima epizode agitacije tijekom života.<sup>34</sup> Studija provedena u Njemačkoj pokazala je da od 1662 shizofrenih pacijenata njih 169 (11%) bilo osuđeno za kriminal, a 94 (6%) za nasilje.<sup>40</sup>

### **2.3.3. Posttraumatski stresni poremećaj**

PTSP je psihijatrijski poremećaj koji nastaje kao posljedica ekstremne traume ili po život opasne stresne situacije koja uključuje smrtnu opasnost, ozbiljne fizičke povrede, prijetnju psihičkom ili fizičkom integritetu osobe, i koju ta osoba doživljava izrazito traumatično.<sup>33</sup> Traumatski doživljaji koji mogu izazvati PTSP su ratne traume, terorizam, industrijske i prirodne katastrofe, silovanja, svjedočenje o ranjavanju ili smrti bliskih osoba, zanemarivanje, fizički nasrtaji, otmice, talačke situacije i zlostavljanje u djetinjstvu. Simptome PTSP-a mogu ponovo pobuditi i sjećanja na središnji stresni (nasilni) događaj, poput slika, zvukova ili mirisa. Za žrtve zlostavljanja društveni svijet postaje opasnim mjestom u kojem ljudi iz okoline predstavljaju prijetnju sigurnosti. U pamćenje žrtve urezuje se obrazac ljudske okrutnosti zbog koje napadnuta osoba sa strahom gleda na sve što nalikuje samom napadu koji je izazvao traumu.<sup>41</sup> Uz postojanje traumatskog događaja, za dijagnozu PTSP-a potreban je razvoj simptoma ponavljajućih intruzivnih sjećanja na traumatski događaj, ponovna proživljavanja traumatskog događaja u budnom stanju ili snovima, a često je i izbjegavanje bilo kakvih događaja koji podsjećaju na preživjelu traumu, jaka vegetativna stigmatiziranost, gubitak samopouzdanja, povlačenje iz društva, nesаница i izrazito sniženi prag na frustracije. Kako sve osobe koje su bile izložene traumatskom iskustvu ne razvijaju PTSP, njegova neurobiološka podloga još uvijek nije sasvim jasna. Etiopatogeneza PTSP-a još nije dovoljno istražena i smatra se da, osim izlaganja traumatskom iskustvu, uključuje interakciju različitih okolišnih, bioloških i genetičkih čimbenika. Uz već navedene simptome, PTSP često prate i poremećaji spavanja, razdražljivost, ljutnja i agresija, što uvelike ometa funkcioniranje osobe i drastično narušava kvalitetu života pojedinca. U Hrvatskoj postoji mnogo oboljelih od PTSP-a, kao posljedica trauma doživljenih tijekom Domovinskog rata. Jedan od simptoma koji se javljaju u okviru kliničke slike PTSP-a jest i agresivno te nasilno ponašanje. Učestalost agresije i nasilničkog



ponašanja u ratnih veterana je različita. Utvrđena je značajno veća pojava agresije u veterana s dijagnozom PTSP-a u odnosu na veterane koji nemaju PTSP.<sup>42</sup> Unutar slike PTSP-a, vrste agresivnog ponašanja su raznolike i često se kombiniraju. Prevladava autoagresivno ponašanje, koje je okrenuto prema samome sebi (npr. suicidalno ponašanje), ali i heteroagresivno ponašanje, u okviru kojega dominiraju verbalna agresija i impulzivne tjelesne reakcije.<sup>42</sup> Te su reakcije češće prema nepoznatim osobama, dok je verbalna agresija češće usmjerena prema poznatim osobama. U pojavi agresivnog ponašanja kod veterana s PTSP-om važnu ulogu imaju duljina obrazovanja, nizak socioekonomski status, zlostavljanje kojima su bili izloženi u djetinjstvu te raniji oblici agresivnog ponašanja (prije sudjelovanja u ratnim zbivanjima).

Bitni je čimbenik u nastanku PTSP-a stresor i podrška okoline nakon traumatskog događaja te struktura ličnosti. Zbog jake i nekontrolirane amplitude emocija pri traumatskom događaju dolazi do poremećaja u procesuiranju traumatskih sjećanja, kondicioniranja strahom i nemogućnost inhibicije takvih sjećanja. Neuroanatomske regije koje sudjeluju u odgovorima na stres i strah su hipokampus, amigdala i prefrontalni korteks. Od neurobioloških promjena, PTSP karakterizira poremećeno funkcioniranje osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN) i neurotransmitskih sustava: glutamata, GABA, noradrenalina, 5-HT, dopamina i opioidnog sustava. Razne studije su pokazale da simptomi PTSP-a mogu potaknuti nasilno ponašanje.<sup>43,44,45</sup> Agitacija, koja uključuje i povećanu osjetljivost na vanjski ili unutarnji podražaj, razdražljivost, neprijateljstvo i neprimjerene psihomotorne i / ili verbalne aktivnosti, može biti i povezana s verbalnom ili fizičkom agresijom.<sup>35</sup>

## 2.4. Uloga serotoninskog sustava u agitaciji i agresivnom ponašanju

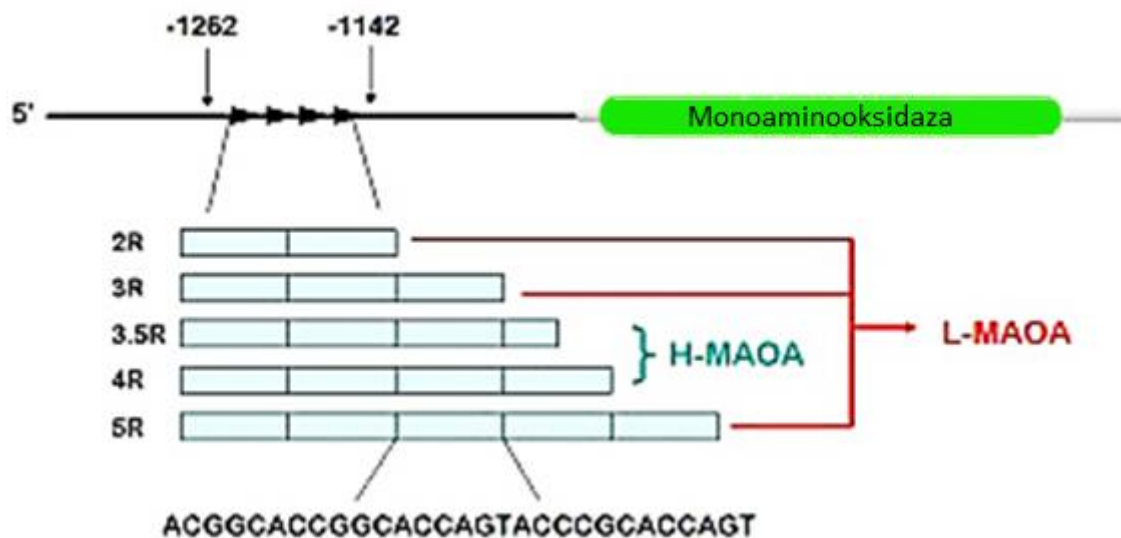
Brojna istraživanja uputila su na važnu ulogu neurotransmitera 5-HT u etiopatogenezi agresije. Istraživanje na kriminalnim počiniteljima<sup>46</sup> pokazalo je da je koncentracija 5-HT u plazmi počinitelja kriminalnih radnji viša nego u kontrolnih ispitanika. Iako je u radu pokazano postojanje razlika u koncentraciji 5-HT u plazmi između kriminalnih počinitelja i kontrolnih ispitanika, nije pronađena značajna povezanost s bodovima na skali agresivnosti, zbog čega su potrebne detaljnije studije da se dobiveni rezultati dodatno pojašne. Međutim, u spomenutom radu istaknuto je da se 5-HT u krvi može koristiti kao indirektna mjera središnjeg 5-HT, jer postoje sličnosti u metaboličkoj kontroli sinteze 5-HT i sličnost u ponovnom unosu 5-HT u trombocite. Iz navedenog proizlazi da 5-HT u krvi može biti upotrijebljen kao indirektni pokazatelj stanja u središnjem serotoninskom sustavu. Autori navode da povišeni 5-HT u krvi, ako je pozitivno koreliran s nasilnošću, reflektira promijenjenu 5-HT aktivnost u SŽS-u. Također je pokazano da je 5-HT u punoj krvi povišen u nasilnih prema nenasilnim muškim ispitanicima koji su počinili ubojstvo.<sup>46</sup>

Sličnosti između serotoninskih pokazatelja u trombocitima i onih u neuronima omogućili su korištenje perifernog modela, trombocita koji su lako dostupan biološki materijal, kako bi se dobio djelomičan uvid u neke djelove funkcioniranja 5-HT sustava koji su slični onim u neuronima. Proučavanje sadržaja 5-HT u trombocitima, tj. perifernom 5-HT sustavu, važno je zbog praćenja promjene njegove koncentracije i istraživanja moguće povezanosti s određenim psihijatrijskim poremećajima. Međutim, izrazito je važno u utvrđivanju razine 5-HT na periferiji uzeti u obzir i činjenicu uzima li neki depresivni bolesnik antidepresive ili ne, jer antidepresivi, a posebice selektivni inhibitori ponovnog unosa 5-HT (SSRI), značajno snižavaju koncentraciju trombocitnog 5-HT.<sup>47,48</sup> Mnoge studije<sup>47,48,49,50,51,52,53</sup> podržale su povezanost između 5-HT trombocitnih pokazatelja i određene psihopatologije, podupirući činjenicu da se isti mogu koristiti i kao periferni pokazatelji određenih simptoma u psihijatrijskim bolestima.<sup>51,52,53</sup>

Zhang i suradnici<sup>54</sup> predlažu koncentraciju trombocitnog 5-HT kao jedan od potencijalnih biomarkera za PTSP. U skladu s hipotezom da će koncentracija bilo kojeg perifernog biokemijskog pokazatelja biti povezana s određenim simptomima, a ne s dijagnostičkim entitetom, pokazano je da je koncentracija trombocitnog 5-HT povezana s agresijom u osoba s poremećajima ličnosti te kod agresivnih autista ili u ispitanika s PTSP-om koji su razvili psihotičke simptome.<sup>53</sup>

O genetskoj podlozi agresije ili agitacije nema jednoznačnih podataka. Između gena kandidata koji se istražuju u području agresivnosti i agitacije je i gen za enzim MAO-A, koji je uključen u metabolizam dopamina, 5-HT i noradrenalina.<sup>40</sup> Smatra se da su varijante gena *MAOA* povezane s agresivnim ponašanjem. Točkasta mutacija u genu *MAOA*<sup>55</sup> povezana je s impulzivno-agresivnim ponašanjem, razdražljivošću, destruktivnim i drugim antisocijalnim ponašanjima. Ovu rijetku genetsku bolest, poznatu kao Brunnerov sindrom, karakterizira niži koeficijent inteligencije, impulzivno ponašanje (kao što je palež, hiperseksualnost i nasilje) te poremećaji spavanja i varijacija raspoloženja. Brunnerov sindrom pronađen je u muških potomaka jedne danske obitelji, a kasnije je potvrđen u samo 4 druge obitelji. Radi tog nalaza su istraživanja usmjerena na povezanost varijacija gena *MAOA* i agresije.

Polimorfizam promjenjivog broja uzastopnih ponavljanja (VNTR), koji je smješten 1,2 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije gena *MAOA*, smatra se funkcionalnim polimorfizmom (*MAOA-uVNTR*) i povezuje se s efikasnosti transkripcije gena. Sastoji se od 30 bp ponavljajuće sekvencije koja je najčešće prisutna u 2, 3, 3,5, 4 ili 5 kopija (**Slika 8**).<sup>2</sup> Genetičke varijante s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR*, koje imaju manji broj uzastopnih ponavljanja (2, 3 ali i 5), povezuju se sa slabijom efikasnosti transkripcije gena *MAOA*.<sup>2</sup> Varijante s većim brojem ponavljanja (3,5 i 4) povezuju se s većom transkripcijskom aktivnosti.<sup>1</sup> Među najčešćim alelima u populaciji su varijanta s 4 ponavljanja i varijanta s 3 ponavljanja.<sup>2,3,56</sup> Najrjeđe se javlja varijanta s 2 kopije koja se povezuje s izrazito agresivnim ponašanjem kod teških kriminalaca.<sup>6</sup> Viša frekvencija alela sa 3,5 i 4 ponavljanja pronađena je kod ispitanika sa shizofrenijom koji su pokazivali agresivno ponašanje.<sup>57</sup> Uobičajeno je da se varijante povezane sa slabijom transkripcijskom efikasnosti označe kao MAOA-L (engl. *Low activity*) ili L-MAO-A, dok se varijante povezane s boljom transkripcijskom efikasnosti označavaju kao MAOA-H (engl. *High activity*) ili H-MAO-A.



**Slika 8.** Genetičke varijante s obzirom na polimorfizam promjenjivog broja uzastopnih ponavljanja (*MAOA-uVNTR*) smještene uzvodno od mjesta početka transkripcije gena *MAOA*. L-MAOA, varijante povezane sa slabijom transkripcijskom efikasnosti gena *MAOA*; H-MAOA, varijante povezane s boljom transkripcijskom efikasnosti gena *MAOA*<sup>58</sup>

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 566 ispitanika muškog spola s psihijatrijskim dijagnozama shizofrenije, PTSP-a i poremećaja ponašanja, postavljenim prema kriterijima navedenima u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 4. Izdanje.<sup>36</sup>

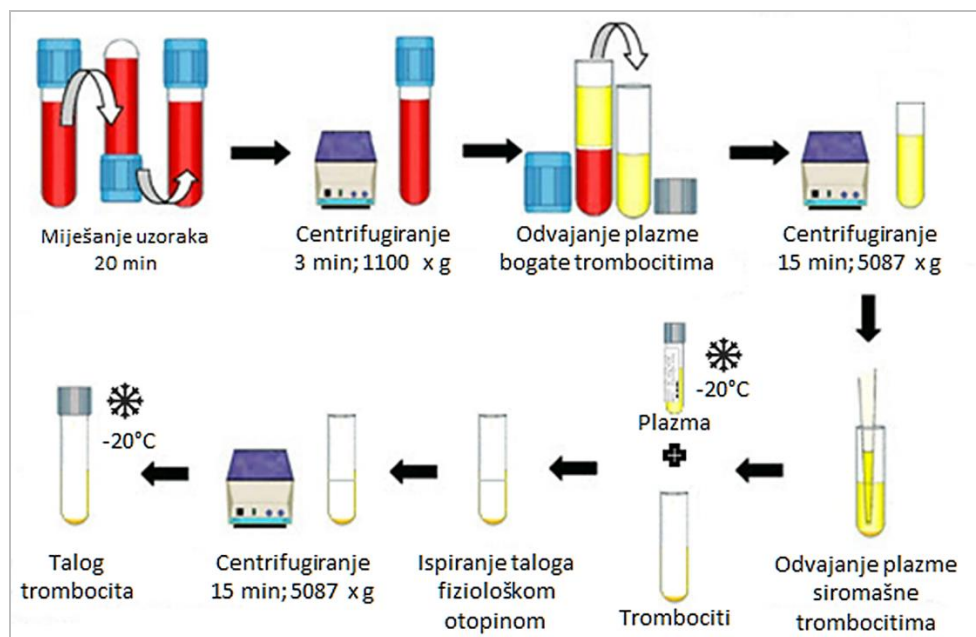
Za procjenu simptoma agitacije kod ispitanika sa shizofrenijom i PTSP-om korištena je komponenta ocjenske ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma bolesti (PANSS, engl. *Positive and Negative Syndrome Scale*)<sup>59</sup> koja se odnosi na ekscitiranost (PANSS-EC). Ova podskala se sastoji od 5 čestica PANSS-a: uzbuđenje (P4), neprijateljstvo (P7), napetost (G4), nesuradnja (G8), slaba kontrola impulsa (G14). Sve čestice PANSS-a boduju se vrijednostima od 1 do 7 (1=odsutvo simptoma, 2=minimalni simptomi, 3=blagi simptomi, 4=umjereni simptomi, 5=umjereni do ozbiljni simptomi, 6=ozbiljni simptomi, 7=ekstremni simptomi), a ozbiljna agitacija definira se kao broj bodova na posdljestvici PANSS-EC koji je jednak ili veći od 20, od ukupno mogućih 35 bodova.<sup>60,61</sup>

Kod adolescenata se u pravilu ne koristi ljestvica PANSS za procjenu stupnja agitacije već se koriste određene komponente Hare strukturiranog ocjenskog upitnika za psihopatiju – verzija za mladež (PCL-YV, engl. *Hare Psychopathy Checklist: Youth Version*)<sup>62</sup> i skala otvorene agresivnosti – modificirana verzija (OAS-M, engl. *Overt Aggression Scale-Modified*).<sup>63</sup> Kao agitirani adolescenti s poremećajem ophođenja uzeti su oni koji su imali: 1) broj bodova  $\geq 3$  (od mogućih 5) u sklopu domene ljestvice OAS-M koja se odnosi na podljestvicu subjektivne iritabilnosti, a što odgovara simptomima napetosti (G4) u sklopu podljestvice PANSS-EC; 2) ukupan broj bodova  $\geq 6$  (od mogućih 10) u sklopu domene ljestvice OAS-M koja se odnosi na iritabilnost, a što odgovara slaboj kontroli impulsa (G14) na podljestvici PANSS-EC; 3) ukupan broj bodova na domeni ljestvice OAS-M koja se odnosi na agresiju  $\geq 30$  (od mogućih 135), a što odgovara uzbuđenju (P4) u sklopu podljestvice PANSS-EC; 4) ukupan broj bodova na ljestvici OAS-M  $\geq 40$  (od mogućih 161), a što odgovara neprijateljskom ponašanju (P7) u sklopu podljestvice PANSS-EC; 5) ukupan broj bodova na ljestvici PCL-YV  $\geq 20$  (od mogućih 40), a što odgovara nesuradnji (G8) u sklopu podljestvice PANSS-EC. Na ovaj način su adolescenti s poremećajem ophođenja podijeljeni na one koji su trenutno teško agitirani (što je indikacija za hospitalizaciju i farmakološko liječenje) te na one koji trenutno nisu ozbiljnije agitirani.<sup>64,65</sup>

Ispitanici sa shizofrenijom i PTSP-om prikupljeni su u suradnji s Psihijatrijskom bolnicom Vrapče u Zagrebu, a adolescenti s poremećajima ophođenja u suradnji s popravnim domovima unutar Zagreba i Zagrebačke županije.

### 3.2. Obrada uzoraka krvi i izolacija trombocita

Obrada uzoraka krvi i izolacija trombocita prikazana je na **Slici 9**. Kako bi se dobila krvna plazma bogata trombocitima, uzorci pune krvi centrifugirani su na  $1100 \times g$  3 minute. Dobiveni supernatant, odnosno plazma s trombocitima, ponovno je centrifugirana na  $5087 \times g$  sljedećih 15 minuta. Centrifugiranjem dobiva se talog sa sedimentiranim trombocitima. Dobiveni talog ispran je fiziološkom otopinom te ponovno centrifugiran. Dobiveni sedimentirani trombociti pohranjeni su na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  do postupka određivanja koncentracije trombocitnog 5-HT.



**Slika 9.** Postupak obrade uzoraka krvi<sup>66</sup>

### 3.3. Određivanje koncentracije trombocitnog serotonina

Koncentracija trombocitnog 5-HT određena je spektrofotometrijski pomoću Varian Cary Eclipse spektrofotometra. Za svaki uzorak, koncentracija trombocitnog 5-HT korigirana je za vrijednost koncentracije ukupnih proteina u uzorku koja se određuje klasičnom metodom po Lowryju.<sup>67</sup> (poglavlje 3.4)

#### **Kemikalije:**

- HCl (Kemika, 37%, p.a.): 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopina u reH<sub>2</sub>O i 1 M otopina u reH<sub>2</sub>O
- ZnSO<sub>4</sub> (Gram-Mol): 5%-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
- NaOH (Kemika): 1 mol dm<sup>-3</sup> otopina u reH<sub>2</sub>O
- L-cistein (Sigma Aldrich): 0,1%-tna otopina u 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl
- ortoftalaldehida (OPT; Sigma Aldrich): 0,05%-tna otopina u 1 mol dm<sup>-3</sup> HCl
- 5-HT (Sigma Aldrich)

#### **Postupak:**

Za određivanje koncentracije 5-HT, talogu trombocita doda se 1,5 ml deionizirane vode (reH<sub>2</sub>O), talog se podigne pipetom te vorteksira, a nakon toga trombociti se razbijaju soniciranjem (20 kHz, amplituda 8 x 10<sup>-3</sup> mm kroz 60 s). Razbijeni trombociti, uzorci standarda i slijepe probe (deionizirana voda) analiziraju se u duplikatima. Početna otopina 5-HT pripremljena je otapanjem 23,5 mg 5-HT u 50 ml 0,1 M HCl. Prvi standard čini 100 µl početne otopine 5-HT i 9,9 ml reH<sub>2</sub>O. Drugi standard priprema se razrijeđenjem 2,5 ml prvog standarda sa 7,5 ml reH<sub>2</sub>O, treći razrijeđenjem 4 ml drugog standarda sa 4 ml reH<sub>2</sub>O, četvrti razrijeđivanjem 3 ml trećeg standarda sa 3 ml reH<sub>2</sub>O, te posljednji peti razrijeđenjem 2 ml četvrtog stanarda sa 2 ml reH<sub>2</sub>O. Na taj način dobije se pet standarda različitih koncentracija (2000 ng ml<sup>-1</sup>, 500 ng ml<sup>-1</sup>, 250 ng ml<sup>-1</sup>, 125 ng ml<sup>-1</sup> i 63 ng ml<sup>-1</sup>). U plastične epruvete doda se 1,2 ml sonikata, a zatim redom u sve epruvete, uključujući i standarde i slijepe probe, doda se po 1 ml 5% otopine ZnSO<sub>4</sub>. Odmah po dodatku ZnSO<sub>4</sub> svaki se uzorak vorteksira i brzo doda 0,5 ml 1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH (čuvana na sobnoj temperaturi). Sadržaj se dobro izmiješa na vorteks miješalici, ostavi stajati 5 minuta, nakon čega se centrifugira 15 minuta na 5087 x g na +4 °C. Pipetom se prebaci 2 ml supernatanta u set staklenih vatrostalnih epruveta te se redom u sve epruvete doda po 0,2 ml otopine L-cisteina i 1 ml otopine OPT-a. Epruvete se urone u kipuću vodu i kuhaju 10 minuta. Tim postupkom pojačava se prirodna fluorescencija

5-HT koja se mjeri na Varian Cary Eclipse spektrofluorimetru pri valnim duljinama od 345 nm (ekscitacija) i 485 nm (emisija). Pri zagrijavanju uzoraka, odnosno pri kuhanju u kipućoj vodi, dolazi do reakcije 5-HT i OPT-a pri čemu nastaje stabilni fluorofor. *L*-cistein se dodaje kako bi spriječio oksidaciju 5-HT. Koncentracija 5-HT u uzorcima izračunava se prema standardima poznate koncentracije 5-HT nakon oduzimanja vrijednosti fluorescencije slijepe probe i izražava se u nmol po mg trombocitnih proteina.

### 3.4. Određivanje koncentracije trombocitnih proteina

Koncentracija ukupnih trombocitnih proteina određena je metodom prema Lowryju<sup>67</sup> koja je dovoljno osjetljiva za određivanje vrlo malih koncentracija proteina, 0,10 - 2 mg ml<sup>-1</sup>, tj. 0,005 – 0,10 mg ml<sup>-1</sup> <sup>68,69</sup>

#### **Kemikalije:**

- HCl (Kemika, 37%, p.a.): 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopina u reH<sub>2</sub>O
- goveđi serumski albumin (BSA; Sigma Aldrich)
- ABC smjesa:
  - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika): 2%-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
  - CuSO<sub>4</sub> (Kemika): 1%-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
  - K-Na tartarat (Kemika): 2%-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich)

#### **Postupak:**

Prije samog postupka određivanja koncentracije proteina metodom prema Lowryju<sup>67</sup>, pripremi se ABC smjesa te standardi različitih koncentracija. Kao standard koristi se otopina BSA. Matična otopina BSA dobije se otapanjem 5 mg BSA u 1 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. Standardi se pripreme razrjeđivanjem matične otopine BSA pomoću 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. Prvi standard čini 200 µl matične otopine BSA i 200 µl 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. Drugi standard se pripremi razrjeđenjem 200 µl prvog standarda s 200 µl 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl, a treći jednakim razrjeđenjem drugog standarda. Na taj način dobiju se tri standarda različitih koncentracija (2,50 mg ml<sup>-1</sup>, 1,25 mg ml<sup>-1</sup>, 0,63 mg ml<sup>-1</sup>). U praznu probu doda se 10 µl 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. ABC otopina pripremi se miješanjem 140 ml 2% otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4 ml 2% otopine K-Na



tartarata i 1,4 ml 1% otopine CuSO<sub>4</sub>. Kako bi mjerenje bilo što preciznije, svi uzorci, standardi i prazne probe, priređuju se u triplikatima. Kao uzorci koriste se trombociti razbijeni soniciranjem (20 kHz, amplituda  $8 \times 10^{-3}$  mm kroz 60 s). Kao prazna proba koristi se 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl. U svaku epruvetu stavi se 10 µl uzorka, standarda ili 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl, i na to se doda 2 ml ABC smjese. Smjesa se ostavi stajati 10 minuta, a zatim se doda 0,2 ml Folin-Ciocalteu reagensa koji je razrijeđen vodom u omjeru 1:1. Nakon 30 minuta spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 700 nm.

### 3.5. Izolacija DNA iz krvi metodom izoljavanja

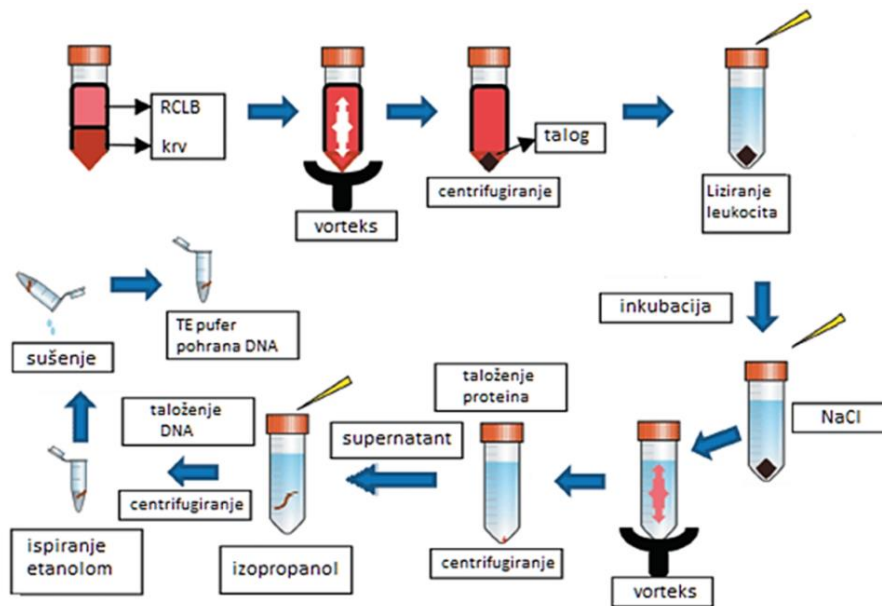
Izolacija DNA napravljena je metodom izoljavanja koju je opisao Miller sa suradnicima (Slika 10).<sup>70</sup>

#### Kemikalije:

- pufer za lizu eritrocita (RCLB pufer, engl. *Red Cell Lysis Buffer*), pH 7,6:
  - 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (Sigma Aldrich)
  - 5 mmol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub> (Kemika)
  - 10 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl (Kemika)
- SE pufer (sodium EDTA), pH 8,0:
  - 75 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl (Kemika)
  - 25 mmol dm<sup>-3</sup> Na<sub>2</sub>EDTA (Fluka)
- NaCl (Kemika): 5 mol dm<sup>-3</sup> otopina u reH<sub>2</sub>O
- proteinaza K (TaKaRa, 20 mg ml<sup>-1</sup>)
- sodium dodecil sulfat (SDS; Sigma Aldrich): 10%-tna otopina
- etanol (Gram-Mol, min. 99,5%, p.a.): 75%-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
- izopropanol (Gram-Mol, min. 99,5%, p.a.)
- TE pufer (Tris-EDTA), pH 7,6:
  - 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (Sigma Aldrich)
  - 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA (Fluka)

### **Postupak:**

Uzorci krvi se odmrznu i miješaju na valjkastoj miješalici (roleru) 15 min kako bi se homogenizirali. U Eppendorf epruvetu od 1,5 ml stavi se 300  $\mu\text{l}$  krvi i doda 900  $\mu\text{l}$  hladnog RCLB pufera. Dobivena smjesa promiješa se na vorteks miješalici (15-20 s), a zatim se ostavi 10 min na ledu. Nakon stajanja na ledu lizirani eritrociti se centrifugiranjem (13400 x g, 2 min, +4 °C) odvoje od netaknutih leukocita. Pri tome lizirani eritrociti ostanu u supernatantu, a netaknuti leukociti se istalože. Postupak ispiranja istaloženih leukocita s RCLB puferom ponovi se tri puta kako bi se uklonili svi lizirani eritrociti. Na isprani talog leukocita doda se 300  $\mu\text{l}$  SE pufera, 1,5  $\mu\text{l}$  proteinaze K i 30  $\mu\text{l}$  10%-tnog SDS-a. *Eppendorf* epruvete lagano se okrenu par puta rukom kako bi se sadržaj dobro izmiješao. Inkubacijom u termobloku na 56°C, 1,5-2 h uz miješanje (500 rpm), postiže se liziranje leukocita. Nakon inkubacije, uzorci se ohlade na sobnu temperaturu, a u *Eppendorf* epruvete doda se 250  $\mu\text{l}$  5 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaCl nakon čega se smjesa kratko miješa vorteks miješalicom. Centrifugiranjem (13 400 x g, 5 min, +4°C) DNA ostaje u supernatantu, a ostali stanični dijelovi se istalože. Supernatant se prelije u nove označene *Eppendorf* epruvete te mu se doda 800  $\mu\text{l}$  hladnog izopropanola. Nakon dodatka izopropanola, *Eppendorf* epruvete se zatvore i okrenu par puta, dok se ne pojavi precipitat DNA. Slijedi centrifugiranje (12 000 x g, 2 min, +4°C) kako bi se DNA istaložila. Supernatant se odlije te se na talog doda 250  $\mu\text{l}$  75%-tnog etanola. Nakon centrifugiranja (12 000 x g, 2 min), supernatant se odlije, *Eppendorf* epruvete se ocijede na papiru i ostave 15-30 min otvorene u termobloku na 37 °C, kako bi ispario etanol. Na talog se doda 100  $\mu\text{l}$  TE pufera te se ostavi preko noći da se DNA otopi, nakon čega se pohranjuje na +4°C. Koncentracija i čistoća dobivene DNA određuje se spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). Koncentracija DNA izolirane metodom isoljavanja iz 300  $\mu\text{l}$  pune krvi, i pohranjene u TE puferu, iznosi u prosjeku oko 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .



Slika 10. Postupak izolacije DNA iz krv metodom isoljavanja <sup>66</sup>

### 3.6. Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR*

Lančana reakcija polimerazom je *in vitro* metoda za umnažanje nukleotidnih sekvenci duljine od nekoliko kb do nekoliko desetaka kb pri čemu se od vrlo male početne količine DNA može dobiti vrlo velika količina umnožene DNA u vrlo kratkom vremenu. Reakcijska smjesa za PCR sastoji se od DNA kalupa, oligonukleotidnih početnica koje odgovaraju 3' krajevima regije koja se želi umnožiti na oba polinukleotidna lanca, dNTP-ova, uz dodatak termostabilne DNA-polimeraze koja zadržava aktivnost i pri visokim temperaturama. Za uspješno umnažanje potrebno je da je smjesa otopljena u puferu koji pogoduje korištenoj polimerazi, ali i da sadrži potrebnu količinu dvovalentnih kationa (obično  $Mg^{2+}$ ) potrebnih za asocijaciju DNA kalupa s početnicama i polimerazom. Metoda se temelji na ponavljanju ciklusa od 3 koraka. U prvom koraku dolazi do denaturacije DNA kalupa, odnosno odvajanja polinukleotidnih lanaca. U idućem koraku slijedi sljepljivanje (prianjanje) početnica na komplementarne dijelove DNA. Nakon sljepljivanja početnica temperatura se diže na  $72^{\circ}C$  kako bi se omogućilo termostabilnoj DNA-polimerazi da replicira DNA lance na koje su se vezale početnice dovoljno brzo i efikasno, a bez da dođe do preuranjenog odvajanja početnica s kalupa. Cijeli se postupak ponavlja 20-35 puta. Na kraju zadanog broja ciklusa, smjesa se ostavi još određeni broj minuta na  $72^{\circ}C$  kako bi se popunili svi potencijalno nedovršeni DNA lanci. Rezultat je eksponencijalna ( $2^n$ ) količina umnožene DNA.

## Kemikalije:

### LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR):

- Tfi polimeraza (5 U, Invitrogen)
- Tfi pufer (5x, Invitrogen)
- Q otopina (Qiagen)
- dNTP (100 mmol dm<sup>-3</sup>, Roche)
- MgCl<sub>2</sub> (50 mmol dm<sup>-3</sup>, Invitrogen)
- Oligonukleotidne početnice (25 μmol dm<sup>-3</sup>, Sigma)

### ELEKTROFOREZA:

- agaroz (Type I-A: Low, SIGMA)
- 100 pb DNA standard (1 μg μl<sup>-1</sup>, Invitrogen)
- Loading Buffer (6x, sastav: 36% glicerol, 0,05% Bromphenol Blue, 0,05% Xilene Glycol, 30 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA)
- TAE pufer (1x)
  - 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (Sigma Aldrich)
  - 5 mmol dm<sup>-3</sup> natrij-acetat (Fluka)
  - 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA (Fluka)
- SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen)

## Postupak:

U istraživanju koristi se genomska DNA izolirana iz krvi (leukocita) ispitanika metodom isoljavanja. Za određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* koristi se metoda PCR u ukupnom volumenu od 15 μl, u trajanju od 35 ciklusa. Dobiveni produkti razdvajaju se elektroforezom na 2,5 %-tnom gelu agaroze. U gel se dodaje boja SYBR<sup>®</sup> Safe prema uputama proizvođača, a razdvojeni fragmenti DNA vizualiziraju se na UV transiluminatoru. Reakcijska smjesa korištena u ovom istraživanju prikazana je u **Tablici 1.**, a uvjeti reakcije u **Tablici 2.** Sekvenca početnica je prikazana u **Tablici 3.** Pronađena su ponavljanja s 3 ili 4 kopija koja su razvrstana kao alel L-MAO-A (uključuje 3 ponavljanja i karakteriziran je niskom aktivnošću enzima) i alel H-MAO-A (s 4 ponavljanja) koji je

karakteriziran s visokom aktivnošću enzima. Pet kopija ponavljanja je pronađeno kod samo jednog ispitanika te je taj podatak isključen iz studije.

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese za PCR (ukupni volumen 15  $\mu$ l)

Sastojak reakcijske smjese	Dodani volumen	Konačna koncentracija u smjeri
Genomska DNA otopljena u TE puferu	1,5 $\mu$ l	$\sim 10$ ng/ $\mu$ l
Forward (uzvodna) početnica	0,5 $\mu$ l	0,75 $\mu$ mol dm <sup>-3</sup>
Reverse (nizvodna) početnica	0,5 $\mu$ l	0,75 $\mu$ mol dm <sup>-3</sup>
dNTP	1,5 $\mu$ l	0,25 mmol dm <sup>-3</sup>
MgCl <sub>2</sub>	0,5 $\mu$ l	1,2 mmol dm <sup>-3</sup>
Q otopina	3,0 $\mu$ l	1 x
5X Tfi pufer	3,0 $\mu$ l	1 x
Tfi DNA polimeraza	0,3 $\mu$ l	1 U
H <sub>2</sub> O	4,2 $\mu$ l	

**Tablica 2.** Uvjeti lančane reakcije polimeraze

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5,0	1
Denaturacija	94	0,5	35
Vezivanje početnica	57	0,5	
Produljenje početnica	72	1,0	
Završno produljenje	72	7,0	1

**Tablica 3.** Sekvence početnica

Početnica	Sekvenca (5'-3')
Uzvodna početnica ( F )	ACAGCCTGACCGTGGAGAAG
Nizvodna početnica ( R )	GAACGTGACGCTCCATTCGGA

### 3.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza napravljena je pomoću statističkog programa Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Corp., SAD). Kolmogorov-Smirnov test korišten je za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih parametara. Budući da su svi parametri bili normalno distribuirani, za analizu su korišteni parametrijski testovi, kao što su Studentov t-test (za dvije skupine podataka) i jednosmjerna ili dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), kod usporedbe tri ili više skupina podataka. Za analize u kojima je bilo potrebno provjeriti utjecaj većeg broja nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu korištena je metoda višestruke linearne regresije. Frekvencije alela između pojedinih ispitivanih skupina uspoređivane su  $\chi^2$ -testom. Kako bi se provjerilo koji alel najviše doprinosi značajnosti dobivenoj  $\chi^2$ -testom, korišteni su standardizirani reziduali i vrijednost R. Razina značajnosti  $\alpha$  za sve analize postavljena je na 0,05; a svi korišteni testovi su dvosmjerni.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 566 ispitanika muškog spola koji su podijeljeni prema dijagnozi na: ispitanike s dijagnozom PTSP-a (N=220; 38,8%), ispitanike s dijagnozom shizofrenije (N=173, 30,6%) te ispitanike s dijagnozom poremećaja ophođenja (N=173, 30,6%). Svi klinički i demografski parametri prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (medijan i interkvartilni raspon).

Bolesnici uključeni u istraživanje bili su u dobi između 14 i 64 godine s prosječnom dobi od  $40,2 \pm 11,6$  (medijan je 41,0, a interkvartilni raspon 35,0 – 48,5). Za procjenu simptoma agitacije kod ispitanika sa shizofrenijom i PTSP-om korištena je podljestvica PANSS-EC, a kod adolescenata s dijagnozom poremećaja ophođenja korištene su određene komponente ljestvica PCL-YV i OAS-M. Svi ispitanici su prema broju bodova na navedenim psihijatrijskim ljestvicama biti razvrstani na one sa i one bez simptoma agitacije. Ispitanici sa shizofrenijom i PTSP-om prikupljeni su u suradnji s kliničarima psihijatrima u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče u Zagrebu, a adolescenti s poremećajima ponašanja u suradnji s popravnim domovima unutar Zagreba i Zagrebačke županije, gdje su stručnjaci psihijatri postavili dijagnoze i napravili evaluaciju prema gore navedenim psihijatrijskim ljestvicama. Na PANSS ljestvici ispitanici su imali od 36 do 169 bodova s prosječnom vrijednosti bodova od  $76,3 \pm 29,6$  (medijan je 72,0, a interkvartili raspon 49,0 - 98,0), dok su na podljestvici PANSS-EC prikupili od 6 do 30 bodova. Prosječna vrijednost bodova na navedenoj podljestvici iznosila je  $13,2 \pm 4,6$  (medijan iznosi 12,0, a interkvartilni raspon 10,0 - 16,0).

**Tablica 4.** Usporedba učestalosti agitiranih ispitanika po dijagnozama

	DIJAGNOZA		
AGITACIJA	PTSP N=220	SCH N=173	PO N=173
Agitirani	14 (6,4%)	26 (15,0%)	72 (41,6%)
Neagitirani	206 (93,6%)	147 (85,0%)	101 (58,4%)
$\chi^2$ -test	$\chi^2=79,39$ ; df=2; <b>p&lt;0,001</b>		

N, broj ispitanika; PO, poremećaj ophođenja; PTSP, post-traumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija

Nakon podjele ispitanika s obzirom na agitiranost, vidljivo je da postoji značajna razlika ( $\chi^2=79,39$ ;  $df=2$ ;  $p<0,0001$ ) u udjelu agitiranih i neagitiranih ispitanika između istraživanih dijagnostičkih skupina, što proizlazi iz značajno većeg udjela agitiranih ispitanika u skupini adolescenata s poremećajem ophođenja (41,6%) u odnosu na ispitanike s dijagnozom PTSP-a (6,4% agitiranih) te ispitanike s dijagnozom shizofrenije (15,0% agitiranih) (**Tablica 4**). Zbog navedene razlike u udjelu agitiranih i neagitiranih ispitanika po dijagnostičkim skupinama u svim daljnjim analizama u obzir je uzeta i dijagnoza.

Dobiveni rezultati također pokazuju da postoji statistički značajna razlika s obzirom na dob između ispitivanih dijagnostičkih skupina ( $F=196,35$ ;  $df=2, 285$ ;  $p<0,001$ ). Glavna razlika u dobi proizlazi iz činjenice da su ispitanici s poremećajem ophođenja mlađi od ispitanika s dijagnozom shizofrenije ili PTSP-a, što je i očekivano.



## 4.2. Koncentracija trombocitnog serotonina

Svim ispitanicima određena je koncentracija 5-HT u trombocitima. Najniža izmjerena vrijednost je 0,11 nmol po mg proteina, a najviša 2,95 nmol po mg proteina. Prosječna vrijednost je  $1,18 \pm 0,57$  nmol po mg proteina (medijan je 1,15; s interkvartilnim rasponom od 0,78 do 1,53). Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da podaci slijede normalnu raspodjelu ( $p=0,544$ ), te je u daljnjim izračunima korištena parametrijska statistika.

### 4.2.1. Povezanost dijagnoze s koncentracijom trombocitnog serotonina

Rezultati ANOVA-e pokazuju da postoji značajna razlika ( $p<0,001$ ) u koncentraciji trombocitnog 5-HT između promatranih dijagnostičkih skupina (**Tablica 5**).

Tukeyev post-hoc test pokazao je da je dobivena razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT zapravo posljedica značajno više koncentracije 5-HT kod osoba s poremećajem ophođenja u odnosu na ispitanike s dijagnozom PTSP-a ( $p<0,001$ ) te u odnosu na ispitanike sa shizofrenijom ( $p<0,001$ ) (**Tablica 5**). Usporedbom tih vrijednosti s vrijednostima 5-HT u zdravih ispitanika ( $F=26,23$ ;  $p=0,0001$ ; ANOVA), uključenih u prije objavljenoj studiji,<sup>71</sup> zdravi muški ispitanici imali su značajno nižu koncentraciju trombocitnog 5-HT ( $1,01 \pm 0,44$ ; raspon od 0,41 do 2,94 nmol po mg proteina) u odnosu na bolesnike sa shizofrenijom ( $p=0,016$ ) i ispitanike s poremećajem ophođenja ( $p<0,0001$ ), ali ne i odnosu na ispitanike s PTSP-om.

**Tablica 5.** Koncentracija trombocitnog 5-HT u različitim dijagnostičkim skupinama

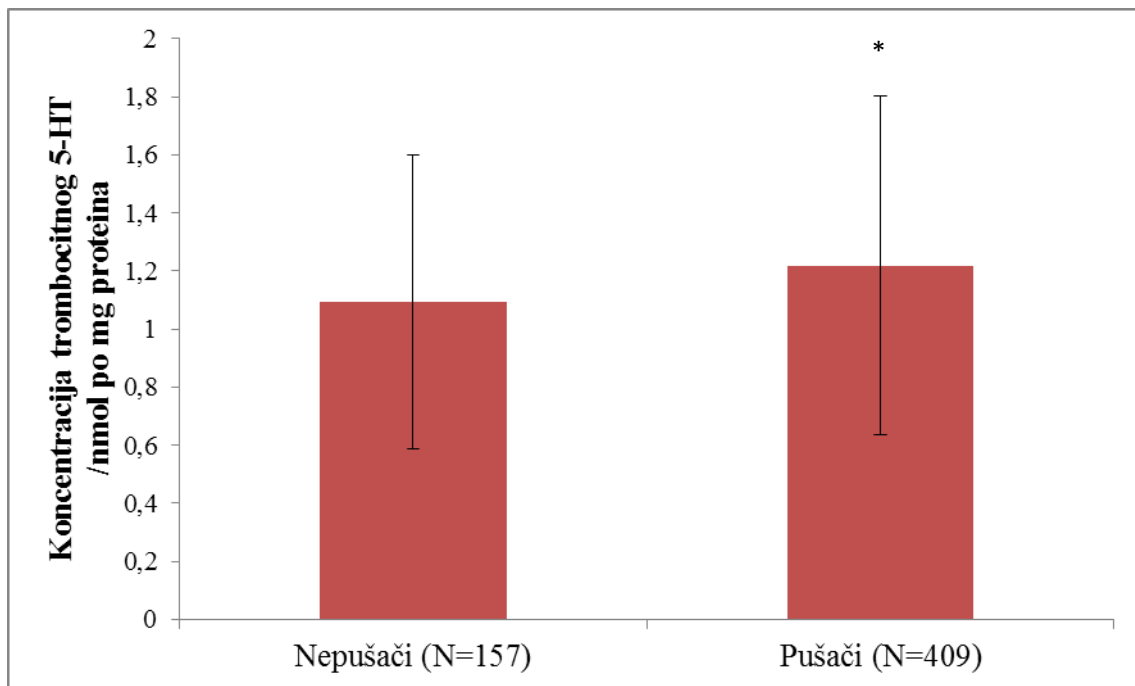
DIJAGNOZA	N	Koncentracija trombocitnog 5-HT / nmol po mg proteina (Srednja vrijednost $\pm$ SD)	ANOVA
PTSP	220	$1,04 \pm 0,45$	$F=22,20$ ; $df =2$ ; $p<0,001$
SCH	173	$1,14 \pm 0,60$	
PO	173	$1,41 \pm 0,60^*$	

N, broj ispitanika; PO, poremećaj ophođenja; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija

\*  $p<0,001$  vs. PTSP i vs. SCH (Tukeyev post-hoc test)

#### 4.2.2. Povezanost pušenja s koncentracijom trombocitnog serotonina

Kako bi provjerili utječe li pušenje cigareta na koncentraciju trombocitnog 5-HT, svi su ispitanici dodatno podijeljeni na pušače i nepušače. Pronađeno je da postoji značajno viša koncentracija trombocitnog 5-HT kod pušača u odnosu na nepušače ( $t=-2,38$ ;  $df=564$ ;  $p=0,018$ ) (Slika 11).

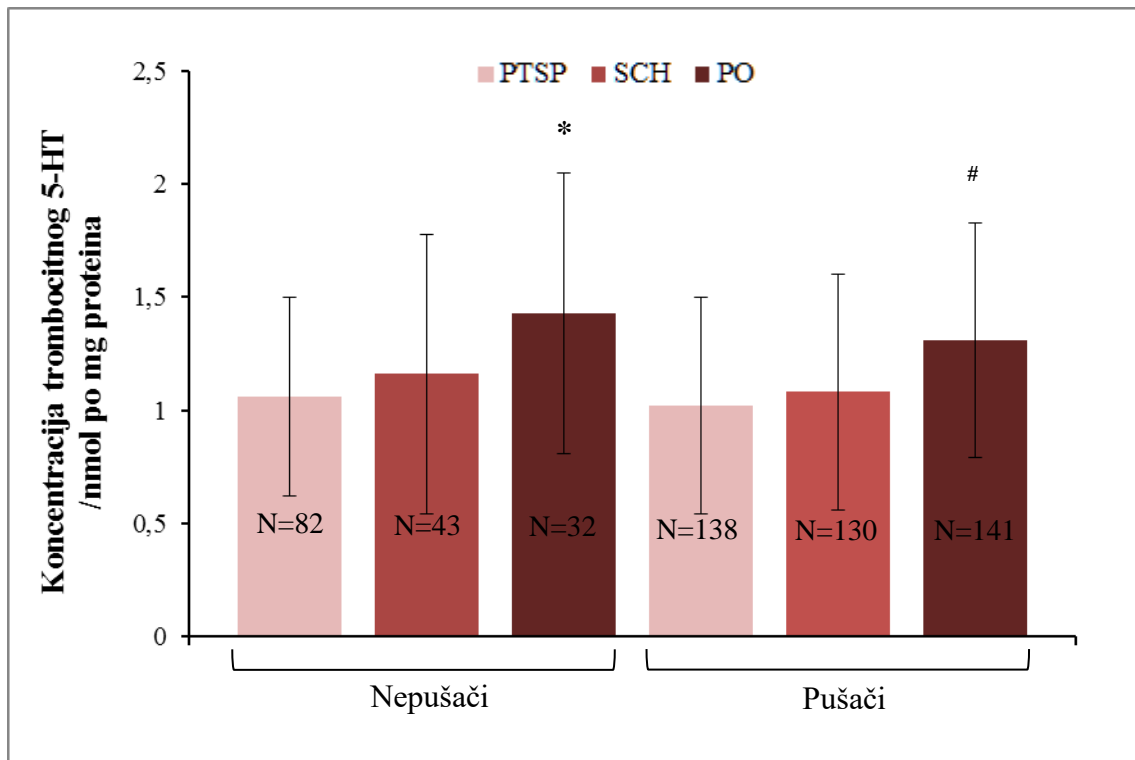


**Slika 11.** Koncentracija trombocitnog 5-HT kod nepušača i pušača

\*  $p=0,018$  vs. nepušači

Utjecaj pušenja i dijagnoze na koncentraciju trombocitnog 5-HT istražen je i korištenjem dvostruke ANOVA-e koja je pokazala da, kada se u obzir uzme i dijagnoza ispitanika, ne postoji značajan utjecaj pušenja ( $F=2,29$ ;  $df=1,560$ ;  $P=0,131$ ) na koncentraciju 5-HT u trombocitima, ali se zadržava značajan utjecaj dijagnoze ( $F=12,73$ ;  $df=2,560$ ;  $P<0,001$ ) na analiziranu koncentraciju trombocitnog 5-HT (Slika 12). Također, nakon podjele ispitanika prema pušačkom statusu, provjereno je postoji li još uvijek razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT u odnosu na dijagnozu. Nakon podjele ispitanika prema dijagnozi, zadržala se značajna razlika u koncentraciji trombocitnog 5-HT između ispitanika s različitim dijagnozama i kod pušača ( $F=16,02$ ;  $df=2,406$ ;  $p<0,001$ ) i nepušača ( $F=3,93$ ;  $df=2,154$ ;  $p=0,022$ ) (Slika 12). I kod pušača i nepušača, dobivena razlika je posljedica značajnije više koncentracije trombocitnog 5-HT kod osoba s poremećajem ophođenja u odnosu na druge

dvije dijagnostičke skupine (**Slika 12**). Dobiveni rezultati upućuju da u daljnim analizama u obzir treba uzeti dijagnozu ispitanika.



**Slika 12.** Koncentracija trombocitnog 5-HT kod pušača i nepušača nakon podjele prema dijagnozi

PO, poremećaj ophođenja; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija

\*  $p < 0,001$  vs. PTSP nepušači i vs. SCH nepušači (Tukeyev post-hoc test)

#  $p = 0,005$  vs. PTSP pušači (Tukeyev post-hoc test)

#### 4.2.3. Povezanost agitacije i koncentracije trombocitnog serotonina

Kako bi istražili postoji li povezanost koncentracije trombocitnog 5-HT s agitacijom, odnosno agresivnim ponašanjem, kod pojedinih dijagnostičkih skupina, svi ispitanici su dodatno podijeljeni na agitirane i neagitirane ispitanike. Rezultati pokazuju da unutar podskupine neagitiranih ispitanika postoji značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u koncentraciji trombocitnog 5-HT s obzirom na dijagnozu (**Tablica 6**), zbog značajno više koncentracije trombocitnog 5-HT kod neagitiranih ispitanika s poremećajem ophođenja u odnosu na neagitirane ispitanike s PTSP-om i shizofrenijom ( $p < 0,001$ ; Tukeyjev post-hoc test). Ova razlika nije vidljiva kod agitiranih ispitanika s poremećajem ophođenja, PTSP-om i shizofrenijom ( $p = 0,268$ ) (**Tablica 6**).

Zbog značajne povezanosti psihijatrijske dijagnoze i koncentracije trombocitnog 5-HT, kod svih dijagnostičkih skupina zasebno je istraživana povezanost agitacije s razinom trombocitnog 5-HT (**Tablica 6**). Iz **Tablice 6** je vidljivo da kod ispitanika sa shizofrenijom postoji značajna razlika u koncentraciji 5-HT između agitiranih i neagitiranih ispitanika ( $p=0,012$ ), jer agitirani ispitanici imaju značajno višu koncentraciju trombocitnog 5-HT nego neagitirani shizofreni bolesnici. Ta se razlika gubi u ispitanika s PTSP-om ili kod ispitanika s poremećajem ophođenja, jer je njihova koncentracija trombocitnog 5-HT slična između agitiranih i neagitiranih ispitanika (**Tablica 6**).

**Tablica 6.** Povezanost agresije i koncentracije 5-HT između pojedinih dijagnostičkih skupina

DIJAGNOZA	Koncentracija trombocitnog 5-HT / nmol po mg proteina (Srednja vrijednost $\pm$ SD)		t-test
	Agitirani	Neagitirani	
PTSP	1,17 $\pm$ 0,48	1,03 $\pm$ 0,45	t=-1,12; df=218; p=0,265
SCH	1,41 $\pm$ 0,44	1,09 $\pm$ 0,61	t=-2,53; df=171; <b>p=0,012</b>
PO	1,41 $\pm$ 0,53	1,40 $\pm$ 0,65*	t=-0,10; df=171; p=0,920
ANOVA	F=1,33; df=2,109; p=0,268	F=15,69;df=2,451; <b>p&lt;0,001</b>	

PO, poremećaj ophođenja; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija

\*  $p<0,001$  vs. neagitirani PTSP i vs. neagitirani SCH; Tukeyjev post-hoc test.

S obzirom na značajan utjecaj i dijagnoze i pušenja na vrijednosti koncentracije 5-HT u trombocitima, napravljena je dodatna analiza povezanosti agitacije s koncentracijom 5-HT u trombocitima metodom višestruke linearne regresije u kojoj je koncentracija 5-HT bila zavisna varijabla, a kao neovisne varijable su uključeni agitacija, pušenje i dijagnoza. Iz dobivenog statistički značajnog modela ( $F=15,92$ ;  $df=3,562$ ;  $p<0,001$ ), vidi se da taj model dobro opisuje 7,3% ( $R^2_{adj}=0,073$ ) varijacije u koncentraciji 5-HT, a značajnu povezanost s koncentracijom 5-HT imaju dijagnoza ( $t=-2,09$ ;  $p=0,037$ ) i agitirano ponašanje ( $t=4,98$ ;  $p<0,0001$ ).

### 4.3. Polimorfizam *MAOA-uVNTR*

Genotipizacija s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* provedena je klasičnom metodom PCR uz razdvajanje produkata reakcije elektroforezom na agaroznom gelu. Prema dobivenim rezultatima izračunate su frekvencije distribucije alela s obzirom na dijagnoze. Svi su ispitanici razvrstani u nosioce alela L-MAO-A (uključuje 3 ponavljanja i karakteriziran je niskom aktivnošću enzima) i nosioce alela H-MAO-A (s 4 ponavljanja) koji je karakteriziran s visokom aktivnošću enzima.

#### 4.3.1. Povezanost dijagnoze s polimorfizmom *MAOA-uVNTR*

Kako bi se provjerilo postoji li razlika u distribuciji alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između pojedinih dijagnostičkih skupina, korišten je  $\chi^2$ -test. Rezultati su pokazali da se ispitivane skupine značajno razlikuju u distribuciji alela H-MAO-A i L-MAO-A ( $p=0,012$ ) zbog značajno većeg udjela alela L-MAO-A (standardizirani rezidual  $R=1,92$ ) kod ispitanika s dijagnozom poremećaja ophođenja u odnosu na ostale dijagnostičke skupine (**Tablica 7**).

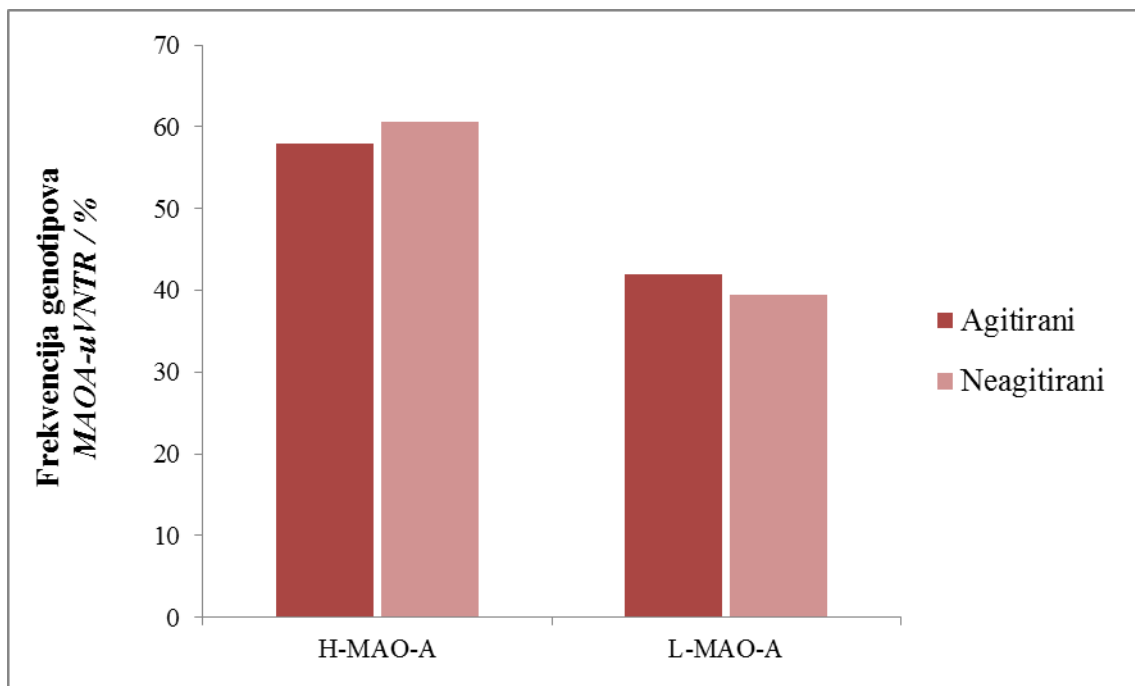
**Tablica 7.** Raspodjela alela obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* unutar promatranih dijagnostičkih skupina

MAOA-uVNTR	DIJAGNOZA			$\chi^2$ -test
	PTSP N (%)	SCH N (%)	PO N (%)	
H-MAO-A	141 (64,1)	111 (64,2)	88 (50,9)	$\chi^2=8,799$ ; $df=2$ ; <b><math>p=0,012</math></b>
L-MAO-A	79 (35,9)	62 (35,8)	85 (49,1)*	

H-MAO-A, alel s većim brojem ponavljanja; L-MAO-A, alel s manjim brojem ponavljanja; PO, poremećaj ophođenja; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija; \*standardizirani rezidual  $R=1,92$  (alel L-MAO-A doprinosi značajnosti u  $\chi^2$  testu).

### 4.3.2. Povezanost agitacije s polimorfizmom *MAOA-uVNTR*

Kako bi istražili postoji li povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* s agitacijom, svi ispitanici su dodatno podijeljeni na agitirane i neagitirane ispitanike. Unutar agitiranih ispitanika, pronađeno je 58% osoba s varijantom H-MAO-A i 42% osoba s varijantom L-MAO-A. Kod neagitiranih ispitanika, bilo je 60,6% osoba s varijantom H-MAO-A i 39,4% osoba s varijantom L-MAO-A. Kada su uspoređeni svi ispitanici zajedno, neovisno o dijagnozi, rezultati su pokazali da nema značajne razlike ( $\chi^2=0,15$ ;  $df=1$ ;  $p=0,702$ ) u distribuciji alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između agitiranih i neagitiranih ispitanika (**Slika 13**).



**Slika 13.** Raspodjela alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između agitiranih i neagitiranih ispitanika

H-MAO-A, alel s većim brojem ponavljanja; L-MAO-A, alel s manjim brojem ponavljanja

**Tablica 8.** Raspodjela alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između ispitanika podijeljenih na agitirane i neagitirane ispitanike te prema dijagnozama

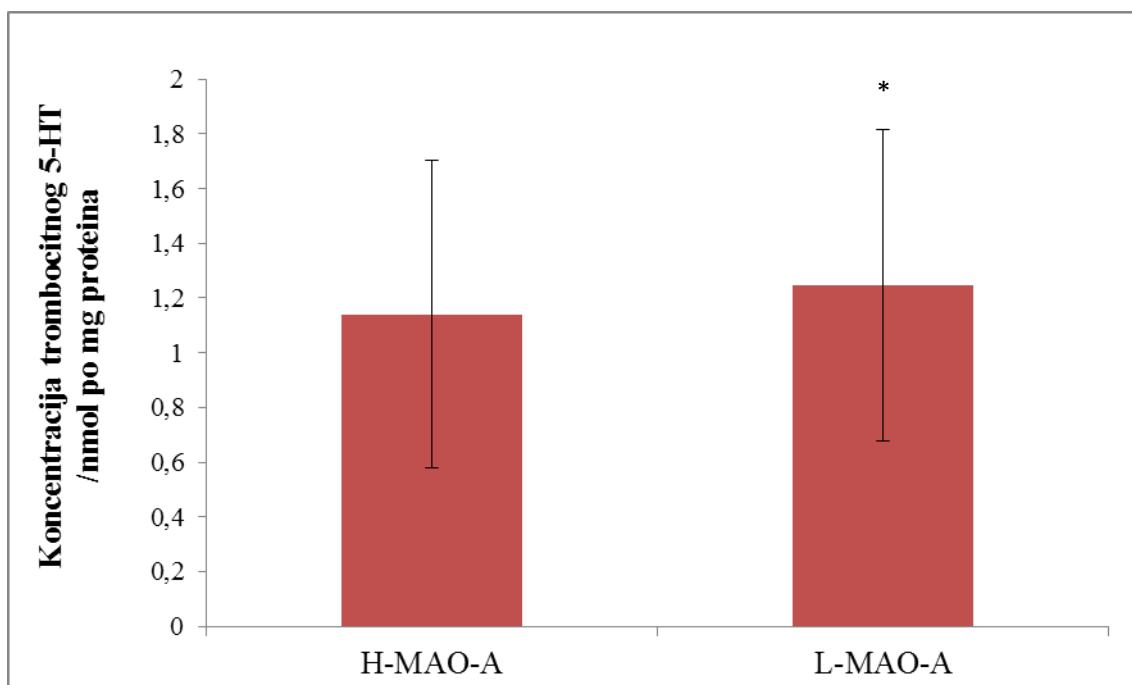
DIJAGNOZA	AGITACIJA	<i>MAOA-uVNTR</i>	
		H-MAO-A	L-MAO-A
PTSP	Agitirani N (%)	12 (85,7 %)	2 (14,2 %)
	Neagitirani N (%)	129 (62,6 %)	77 (37,4 %)
	$\chi^2$ -test	$\chi^2=2,12$ ; df = 1 ; p = 0,146	
SCH	Agitirani N (%)	14 (53,9 %)	12 (46,1 %)
	Neagitirani N (%)	97 (66,0 %)	50 (34,0 %)
	$\chi^2$ -test	$\chi^2 = 0,94$ ; df = 1 ; p = 0,333	
PO	Agitirani N (%)	39 (54,2 %)	33 (45,8 %)
	Neagitirani N (%)	49 (48,5 %)	52 (51,5 %)
	$\chi^2$ -test	$\chi^2 = 0,34$ ; df = 1 ; p = 0,563	

H-MAO-A, alel s većim brojem ponavljanja; L-MAO-A, alel s manjim brojem ponavljanja; PO, poremećaj ophođenja; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; SCH, shizofrenija

Zbog razlike u distribuciji alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između pojedinih dijagnostičkih skupina, kod svih dijagnostičkih skupina zasebno je istraživana povezanost agitacije sa spomenutim polimorfizmom (**Tablica 8**). Iz **Table 8** je vidljivo da u slučaju shizofrenije (p=0,333), PTSP-a (p=0,146) i poremećaja ophođenja (p=0,563) ne postoji značajna povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i agitacije. Naime, nisu pronađene značajne razlike u frekvenciji pojavljivanja alela H-MAO-A i alela L-MAO-A unutar skupina ispitanika sa shizofrenijom, PTSP-om ili poremećajem ophođenja, podijeljenih na agitirane i neagitirane.

#### 4.4. Povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i koncentracije trombocitnog serotonina

Kako bi se istražila potencijalna povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i koncentracije trombocitnog 5-HT, svi ispitanici su podijeljeni na nosioce varijante H-MAO-A ili L-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* (Slika 14). Usporedba koncentracije trombocitnog 5-HT između ispitanika podijeljenih s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* upućuje na značajnu razliku između nosioca alela H-MAO-A i alela L-MAO-A ( $t=2,21$ ;  $df=564$ ;  $p=0,028$ ), odnosno na nižu koncentraciju trombocitnog 5-HT kod ispitanika koji su nosioci varijante H-MAO-A (Slika 14).



Slika 14. Usporedba koncentracije trombocitnog 5-HT između ispitanika podijeljenih na nosioce alela H-MAO-A ili L-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* H-MAO-A, alel s s većim brojem ponavljanja; L-MAO-A, alel s manjim brojem ponavljanja

Kako bi se dodatno napravila korekcija za potencijalni učinak pušenja i agitacije na koncentraciju trombocitnog 5-HT, napravljena je dodatna analiza povezanosti polimorfizma *MAOA-uVNTR* s koncentracijom 5-HT u trombocitima metodom višestruke linearne regresije u kojoj je koncentracija 5-HT uzeta kao zavisna varijabla, a kao neovisne varijable uključeni su agitacija, pušenje i polimorfizam *MAOA-uVNTR*. Iz dobivenog statistički značajnog modela ( $F=8,90$ ;  $df=3, 562$ ;  $p<0,001$ ) vidi se da model dobro opisuje 4,0% ( $R^2_{adj}=0,040$ )



varijacije u koncentraciji 5-HT, a značajan utjecaj na koncentraciju 5-HT imaju pušenje ( $t=-2,09$ ;  $p=0,037$ ), agitacija ( $t=-4,00$ ;  $p<0,0001$ ) te polimorfizam *MAOA-uVNTR* ( $t=2,12$ ;  $p=0,035$ ).

Čak i kada se u isti model višestruke linearne regresije uvrsti dodatno i dijagnoza, model ostaje značajan ( $F=12,65$ ;  $df=4,561$ ;  $p<0,001$ ), ali isključivo zbog značajne povezanosti dijagnoze ( $t=4,78$ ;  $p<0,0001$ ) i agitacije ( $t=-2,12$ ;  $p=0,034$ ) s koncentracijom trombocitnog 5-HT, dok se značajan utjecaj pušenja ( $t=-1,33$ ;  $p=0,183$ ) i polimorfizma *MAOA-uVNTR* ( $t=1,64$ ;  $p=0,101$ ) gubi.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Agitacija kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja

U provedeno istraživanje uključeno je ukupno 566 ispitanika muškog spola koji su podijeljeni prema dijagnozi na: ispitanike s dijagnozom PTSP-a, ispitanike s dijagnozom shizofrenije te ispitanike s dijagnozom poremećaja ophođenja. Uključen je sličan udio ispitanika prema dijagnozama: 39% ispitanika s PTSP-om, te po 31% ispitanika sa shizofrenijom ili s poremećajem ophođenja. Isključni kriterij je bio ženski spol zbog činjenice da se agresija kod psihijatrijskih bolesnika češće javlja u muških nego u ženskih osoba.<sup>35</sup> Osim toga i poremećaj ophođenja se češće javlja u muških nego u ženskih adolescenata ispod 18 godina.<sup>72</sup>

Agitacija je procijenjena pomoću podljestvice PANSS-EC kod ispitanika sa shizofrenijom i PTSP-om. Za razlikovanje agitiranih od neagitiranih ispitanika, uzeta je lomna vrijednost od 20 ili više bodova na podljestvici PANSS-EC.<sup>60,61</sup> Kod adolescenata s dijagnozom poremećaja ophođenja u pravilu se ne koristi ljestvica PANSS pa je agitacija procijenjena pomoću određenih komponenti ljestvica PCL-YV i OAS-M.<sup>62,63</sup> Kod tih ispitanika su kombinirani brojevi bodova na određenim ljestvicama kao bi ih se podijelilo na teško agitirane i one koji nisu ozbiljnije agitirani.<sup>66,73</sup> Kao teško agitirani uzeti su oni ispitanici s poremećajem ophođenja koji su imali 3 ili više bodova na domeni ljestvice OAS-M koja se odnosi na podljestvicu subjektivne iritabilnosti, 6 ili više bodova na domeni ljestvice OAS-M koja se odnosi na iritabilnost, 30 ili više bodova na domeni ljestvice OAS-M koja se odnosi na agresiju te ukupan broj bodova 40 ili više na ljestvici OAS-M. Uz to je još bilo važno da ispitanici imaju 20 ili više bodova na ljestvici PCL-YV. Nakon podjele prema agresivnom ponašanju, tj. prema stupnjevima agitacije, postojala je značajna razlika između udjela agitiranih i neagitiranih ispitanika između različitih dijagnostičkih skupina. Naime, pronađeno je značajno više agitiranih (42%) adolescenata s poremećajem ophođenja u odnosu na agitirane ispitanike s PTSP-om (6%) ili agitirane bolesnike sa shizofrenijom (15%). Taj se nalaz slaže s literaturnim podacima koji upućuju da su poremećaji ophođenja i poremećaji osobnosti najčešće povezani s nasilničkim i agresivnim ponašanjem.<sup>35</sup> Agresivno ponašanje prisutno je i kod 15% bolesnika sa shizofrenijom u našoj studiji. Osobe sa shizofrenijom sklone su nasilničkom i kriminalnom ponašanju, te su naši podatci u skladu s podacima koji su proizašli iz velike longitudinalne švedske studije koja je uključila 8000 ispitanika i koja je pratila kriminalne presude osobama sa shizofrenijom.<sup>74</sup> Spomenuta studija je utvrdila da je,

unutar 8000 shizofreničara, njih 13% pokazalo nasilničko kriminalno ponašanje, u odnosu na 5% kriminalnih pokušaja u općoj populaciji.<sup>74</sup> U našoj studiji samo je 6% ispitanika s PTSP-om bilo ozbiljno agitirano. Taj nalaz nije očekivan jer postoji mnoštvo literaturnih podataka koji upućuju na značajnu povezanost simptoma PTSP-a i agresije kod veterana i kod civilnih ispitanika.<sup>75,76,77,78,79</sup> PTSP izazvan ratnom traumom također je značajno povezan s ljutnjom i agresijom.<sup>71</sup> Niska razina agitacije u naših ispitanika s PTSP-om možda se može objasniti razlikama u evaluaciji i upotrebi kliničkih procjenskih ljestvica za agitaciju, ljutnju i agresiju. Također, u našoj studiji sudjelovali su bolesnici s PTSP-om koji su sami potražili bolničku i psihijatrijsku pomoć pa su može pretpostaviti da se u našem slučaju radi ipako manje agresivnim bolesnicima u odnosu na osobe koje nisu u sustavu tretmana za PTSP.

## **5.2. Povezanost koncentracije trombocitnog serotonina s agitacijom kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja**

Naši su rezultati pokazali da se koncentracija trombocitnog 5-HT-a značajno razlikuje između ispitanika s poremećajem ophođenja te ispitanika s dijagnozom PTSP-a i shizofrenije. Ispitanici s poremećajem ophođenja imali su značajno višu koncentraciju trombocitnog 5-HT u odnosu na ispitanike s dijagnozom PTSP-a i ispitanika sa shizofrenijom. Kada se te promjene koncentracije trombocitnog 5-HT usporede s vrijednostima 5-HT u zdravim ispitanicima, koncentracija trombocitnog 5-HT u ispitanika s PTSP-om je slična onoj dobivenoj u zdravih muških ispitanika hrvatskog podrijetla,<sup>71</sup> dok je koncentracija trombocitnog 5-HT u bolesnika sa shizofrenijom i u ispitanika s poremećajem ophođenja značajno povišena prema koncentraciji trombocitnog 5-HT u zdravih ispitanika.<sup>71</sup> S obzirom na to da se promjene u koncentraciji 5-HT, njegovoj neurotransmisiji i metabolizmu povezuju s različitim patološkim ponašanjima, impulzivnošću i agresivnim ponašanjem i agitacijom,<sup>3</sup> postoji mogućnost da je u našem slučaju povišena koncentracija trombocitnog 5-HT kod ispitanika s poremećajem ophođenja zapravo povezana s većim udjelom agresivnih ili impulzivnih ispitanika unutar ove dijagnostičke skupine u odnosu na ispitanike s dijagnozom PTSP-a ili shizofrenije.

Budući da je iz literature poznato da pušenje utječe na koncentraciju trombocitnog 5-HT,<sup>42</sup> iako postoje i rezultati koji nisu uočili značajan učinak pušenja cigareta na koncentraciju trombocitnog 5-HT,<sup>81</sup> mi smo u našem istraživanju uključili pušački status kao

dodatnu varijablu u pojedinim statističkim analizama. U našoj studiji viša koncentracija trombocitnog 5-HT pronađena je kod pušača u odnosu na nepušače prije podjele ispitanika na pojedine dijagnostičke skupine. Međutim, ta se značajna razlika gubi kada se ispitanici podijele na one s dijagnozom poremećaja ophođenja, PTSP-a ili shizofrenije, jer nema značajne razlike u koncentraciji trombocitnog 5-HT između pušača i nepušača u pojedinim dijagnostičkim skupinama. Rezultati također upućuju na to da je koncentracija trombocitnog 5-HT i dalje značajno viša kod pušača s poremećajem ophođenja u odnosu na pušače s dijagnozom PTSP-a ili shizofrenije, te kod nepušača s dijagnozom poremećaja ophođenja u odnosu na nepušače s PTSP-om.

Kada su naši ispitanici podijeljeni prema stupnju agitacije na agitirane i neagitirane ispitanike s poremećajem ophođenja, dijagnozom PTSP-a ili shizofrenije, unutar podskupine neagitiranih ispitanika, koncentracija trombocitnog 5-HT bila je značajno viša kod neagitiranih ispitanika s poremećajem ophođenja u odnosu na neagitirane ispitanike s PTSP-om i shizofrenijom. S druge strane, kod agitiranih ispitanika, koncentracija trombocitnog 5-HT nije se značajno razlikovala između pojedinih dijagnostičkih skupina. Taj bi se nalaz mogao objasniti činjenicom da ispitanici s poremećajem ophođenja imaju i inače povišenu koncentraciju trombocitnog 5-HT (koja je vezana za dijagnozu) u odnosu na ispitanike s PTSP-om i shizofrenijom, te se koncentracija 5-HT u trombocitima nije dodatno povisila u prisustvu agresivnih simptoma.

Kada su uspoređene koncentracije trombocitnog 5-HT između agitiranih i neagitiranih ispitanika unutar pojedinih dijagnostičkih skupina, tada je vidljivo da samo u slučaju osoba s dijagnozom shizofrenije postoji statistički značajno viša koncentracija trombocitnog 5-HT kod agitiranih u odnosu na neagitirane bolesnike. Taj se nalaz djelomično slaže s povišenom koncentracijom trombocitnog 5-HT u bolesnika sa shizofrenijom koji su imali predominantno pozitivne simptome prema shizofrenim bolesnicima s predominantno negativnim simptomima,<sup>40</sup> te s rezultatima koji pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju između trombocitnog 5-HT i prisutnog ili cjeloživotnog neprijateljstva i agresije kod bolesnika s depresijom i komorbidnim graničnim poremećajem osobnosti.<sup>82</sup>

Sličan trend povišene koncentracije trombocitnog 5-HT kod agitiranih ispitanika vidljiv je i kod osoba s dijagnozom PTSP-a, ali pronađena razlika tu nije statistički značajna. Nalaz o sličnoj koncentraciji trombocitnog 5-HT u ispitanika s PTSP-om, sa ili bez simptoma agitacije, nije u skladu s ranije utvrđenom značajno višom koncentracijom trombocitnog 5-HT u ispitanika s PTSP-om koji su imali izražene psihotičke simptome prema veteranima s PTSP-

om bez psihotičkih simptoma.<sup>53</sup> Kako se u ovoj studiji koncentracija trombocitnog 5-HT nije značajno razlikovala između ispitanika s PTSP-om sa ili bez agitacije, može se pretpostaviti da su u ovu studiju uključeni ispitanici s PTSP-om koji nisu razvili neke od psihotičkih simptoma u sklopu agresivnog ponašanja. Osim toga, dobivene razlike u vrijednostima 5-HT mogu se tumačiti i razlikama u pristupu evaluaciji agitacije prema podskali PANSS-EC<sup>66</sup> u odnosu na evaluaciju psihotičnih simptoma prema skali PANSS.<sup>53</sup>

U slučaju osoba s poremećajem ophođenja, nije bilo značajne razlike između agitiranih i neagitiranih ispitanika s obzirom na koncentraciju trombocitnog 5-HT, što bi moglo biti posljedica općenito više koncentracije 5-HT u trombocitima osoba s dijagnozom poremećaja ophođenja, radi karakterističnih simptoma koji negativno utječu na socijalno, akademsko ili radno funkcioniranje, u odnosu na druge dvije ispitivane dijagnostičke kategorije.

Zbog značajne povezanosti dijagnoza i koncentracije trombocitnog 5-HT, te zbog nalaza iz literature koji upućuju na mogući učinak pušenja na razinu ovog neurotransmitera na periferiji, napravljene su analize koje uključuju obje ove zavisne varijable. Metoda višestruke linearne regresije, u kojoj je koncentracija 5-HT uzeta kao zavisna varijabla, a kao neovisne varijable uključene su agitacija, pušenje i dijagnoza, utvrdila je da je koncentracija trombocitnog 5-HT značajno povezana s dijagnozom i agitacijom. Dobiveni model upućuje na zaključak da isti dobro opisuje 7,3% varijacije u koncentraciji 5-HT u trombocitima. Ove nalaze potkrepljuju i nalazi iz literature koji pokazuju da je koncentracija trombocitnog 5-HT povezana s agresijom u osoba s poremećajima ličnosti<sup>82</sup> te s agresijom u autizmu.<sup>83</sup> Naime, koncentracija 5-HT u punoj krvi razlikovala se između agresivnih i neagresivnih autističnih osoba i bila je obrnuto povezana sa samoozlijeđivanjem.<sup>83</sup> Također je pokazano da je koncentracija trombocitnog 5-HT viša u djece te mladih Nizozemaca sa autizmom i pervazivnim poremećajem nego u osoba s mentalnom retardacijom ili kontrolnih ispitanika.<sup>84</sup> U zaključku, podatci iz literature, kao i podatci ove sadašnje studije, upućuju na zaključak da su razne vrste agresivnog ponašanja te agitacija, koje se javljaju u sklopu kliničkih slika različitih mentalnih poremećaja, povezane s promijenjenom koncentracijom trombocitnog 5-HT.

### **5.3. Povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* s agitacijom kod ispitanika s dijagnozom posttraumatskog stresnog poremećaja, shizofrenije ili poremećaja ophođenja**

Polimorfizam *MAOA-uVNTR* često se istražuje jer se aktivnost enzima MAO-A povezuje s različitim psihijatrijskim poremećajima i poremećajima ponašanja, pa tako i agresivnim ponašanjem. Kako bi se utvrdila neurobiološka podloga agresije i razlog tim devijantnim ponašanjima, sve se češće istražuje povezanost određenih gena kandidata i čimbenika iz okoline (interakcija gen-okoliš). Jedan od najčešće istraživanih gena kandidata jest gen *MAOA* i njegov funkcionalni polimorfizam *MAOA-uVNTR* unutar promotorske regije. Taj je polimorfizam važan jer se varijante s 2 ili 3 ponavljanja povezuju sa smanjenom transkripcijskom aktivnosti gena *MAOA*.<sup>2,3</sup>

U našoj studiji istražena je povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* s agitiranim ponašanjem kod ispitanika s poremećajem ophođenja, shizofrenijom i PTSP-om. U našem uzorku nije bilo ispitanika koji su imali alel sa 2 ponavljanja, nego su pronađeni samo ispitanici s 3, 4 ili 5 ponavljanja s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR*. Međutim, 5 ponavljanja je pronađeno samo kod jednog ispitanika te je taj podatak isključen iz studije. Ispitanici su podijeljeni na nosioce alela s nižom transkripcijskom efikasnosti (3 ponavljanja, alel L-MAO-A) i one koji su nosioci alela s boljom efikasnošću transkripcije (4 ponavljanja, alel H-MAO-A). Utvrđene su značajne razlike u raspodijeli alela H-MAO-A i L-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između ispitanika s različitim dijagnozama. Naime, kod ispitanika s poremećajem ophođenja značajno je veći udio alela L-MAO-A u odnosu na ispitanike sa shizofrenijom i PTSP-om. Taj je nalaz sukladan literaturnim podacima jer je pokazano da se ispitanici nosioci alela L-MAO-A, koja je povezan sa smanjenom transkripcijom gena *MAOA*, mogu češće detektirati unutar grupa povezanih s različitim formama agresivnog ponašanja i agitacije,<sup>4,5</sup> nasilnim kriminalnim ponašanjem,<sup>6</sup> te u ispitanika izvrnutih ranom traumatskom iskustvu ili maltretiranju u djetinjstvu.<sup>85,86,87,88,89</sup> Međutim, nisu svi podatci jednoznačni pa tako u literaturi postoje kontroverzni podatci o povezanosti ili nedostatku povezanosti varijanti H-MAO-A i L-MAO-A s rizikom za razvijanje poremećaja ponašanja, antisocijalnog ponašanja i agresije u odrasloj dobi nakon maltretiranja u djetinjstvu.<sup>92,93,94</sup> Naši ispitanici s poremećajem ophođenja, koji su kao skupina bili jače agitirani i više agresivni od ispitanika sa shizofrenijom i PTSP-om, i koji su pokazali cijeli niz različitih aberantnih ponašanja i simptoma, kao što su agresija i agitacija, bili su

češće nosioci alela L-MAO-A, koji se povezuje sa smanjenom ekspresijom gena za enzim MAO-A, a to je potvrđeno i u ranijim studijama.<sup>88</sup> Zbog toga je zaključeno u sklopu jedne meta analize<sup>88</sup> da promotorski polimorfizam MAOA-uVNTR posreduje u razvoju različitih psihopatoloških poremećaja nakon izlaganja fizičkom zlostavljanju.

Međutim, kada su svi ispitanici podijeljeni na agitirane i neagitirane ispitanike, bez obzira na dijagnozu, pronađena je slična raspodjela alela L-MAO-A i H-MAO-A: 58% osoba s varijantom H-MAO-A i 42% osoba s varijantom L-MAO-A kod agitiranih, te 60,6 % osoba s varijantom H-MAO-A i 39,4 % osoba s varijantom L-MAO-A u neagitiranih ispitanika. Budući da su pronađene razlike u raspodjeli alela s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između pojedinih dijagnostičkih skupina (poremećaja ophođenja, shizofrenije i PTSP-a), istražena je i raspodjela alela gena *MAOA* kod svih ispitanika podijeljenih prema dijagnozama i s obzirom na prisustvo agitacije. Međutim, naši su rezultati pokazali da nema značajne razlike u raspodjeli alela L-MAO-A i H-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između agitiranih i neagitiranih osoba s poremećajem ophođenja, shizofrenijom ili PTSP-om. Ti rezultati upućuju na zaključak da ne postoji značajna povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i agitacije. Naši rezultati nisu potvrdili hipotezu o većoj učestalosti alela L-MAO-A kod agitiranih/agresivnih u odnosu na neagitirane ispitanike, koja je inače pokazana u osoba s mentalnim poremećajima i počiniteljima kriminalnih djela.<sup>4,5,6</sup> Međutim, naši rezultati koji su pokazali da je raspodjela alela L-MAO-A i H-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* slična kod agitiranih i neagitiranih ispitanika s poremećajem ophođenja, shizofrenijom ili PTSP-om, sukladni su drugim podacima iz literature koji također nisu zapazili značajnu povezanost spomenutog polimorfizma s agresivnim ponašanjem i agitacijom, i to kod ispitanika s mentalnim poremećajima kao što su shizofrenija<sup>65,95</sup> ili PTSP<sup>64</sup>, kod agresivnih i neagresivnih počinitelja kriminalnih djela koji su bili alkoholičari, ili u zdravih ispitanika. Sumarno, rezultati naše studije nisu potvrdili hipotezu da je polimorfizam *MAOA-uVNTR* povezan s agitacijom i agresivnim ponašanjem.

#### **5.4. Povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* i koncentracije trombocitnog serotonina**

Sa svrhom da se istraži mogući utjecaj polimorfizma *MAOA-uVNTR* na koncentraciju trombocitnog 5-HT, svi ispitanici su podijeljeni na nosioce alela H-MAO-A ili L-MAO-A. Koncentracija trombocitnog 5-HT značajno se razlikovala između nosioca alela H-MAO-A i L-MAO-A, jer su nosioci alela H-MAO-A imali značajno nižu koncentraciju trombocitnog 5-HT od ispitanika nosioca alela L-MAO-A. Taj je nalaz bio očekivan, jer je alel H-MAO-A povezan s povećanom transkripcijskom aktivnosti gena za enzim MAO-A, koji prvenstveno razgrađuje serotonin i noradrenalin, te su nosioci alela H-MAO-A imali sniženu koncentraciju 5-HT u trombocitima. U literaturi nema dostupnih podataka o utjecaju polimorfizma *MAOA-uVNTR* na koncentraciju trombocitnog 5-HT kod ispitanika s poremećajem ophođenja, shizofrenijom i PTSP-om. Međutim, potpuno je obrnuta povezanost pronađena u autizmu gdje su nosioci alela H-MAO-A imali povišenu koncentraciju 5-HT u trombocitima u odnosu na nosioce alela L-MAO-A.<sup>96</sup>

Navedeni rezultati upućuju na to da bi mogla postojati povezanost između varijanti gena koji kodiraju za proteine uključene u regulaciju razgradnje 5-HT, kao što je enzim MAO-A, i koncentracije 5-HT u trombocitima, upućujući na važnost periferne homeostaze serotoniniskog sustava u različitim mentalnim poremećajima. U našoj studiji je metodom višestruke linearne regresije potvrđeno da su varijacije u koncentraciji 5-HT kod svih ispitanika pod značajnim utjecajem pušenja, agitacije te polimorfizma *MAOA-uVNTR*. Međutim, kada je u isti model uvrštena i dijagnoza kao nezavisna varijabla, rezultati su pokazali da je model zapravo značajan radi značajne povezanosti dijagnoze i agitiranog ponašanja s koncentracijom trombocitnog 5-HT, dok pušenje i polimorfizam *MAOA-uVNTR* više ne pokazuju značajan učinak na koncentraciju trombocitnog 5-HT.



## 6. ZAKLJUČAK

- U istraženom uzorku prisutno je značajno više agitiranih adolescenata s poremećajem ophođenja (42%) u odnosu na agitirane ispitanike s PTSP-om (6%) te agitirane bolesnike sa shizofrenijom (15%).
- Koncentracija trombocitnog 5-HT određena je pomoću spektrofotofluorimetrijske metode.
- Koncentracija trombocitnog 5-HT značajno je povišena kod ispitanika s poremećajem ophođenja u odnosu na ispitanike s PTSP-om ili shizofrenijom.
- Nakon podjele svih ispitanika na agitirane i neagitirane ispitanike, značajno je viša koncentracija trombocitnog 5-HT prisutna kod neagitiranih ispitanika s poremećajem ophođenja u odnosu na neagitirane ispitanike s PTSP-om i shizofrenijom. Isto nije vidljivo u slučaju agitiranih ispitanika.
- Usporedba koncentracije trombocitnog 5-HT između agitiranih i neagitiranih ispitanika unutar pojedinih dijagnostičkih skupina upućuje na to da samo u slučaju osoba s dijagnozom shizofrenije postoji statistički značajno viša koncentracija trombocitnog 5-HT kod agitiranih u odnosu na neagitirane bolesnike.
- Metoda višestruke linearne regresije, u kojoj je koncentracija 5-HT uzeta kao zavisna varijabla, a kao neovisne varijable uključene su agitacija, pušenje i dijagnoza, potvrđuje da na razinu trombocitnog 5-HT značajno utječu dijagnoza i agitacija.
- Genotipizacija s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* učinjena je pomoću lančane reakcije polimerazom, nakon čega su produkti reakcije razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu i vizualizirani na UV svjetlu pomoću fluorescentne boje.
- Prisutna je značajna razlika u raspodjeli alela H-MAO-A i L-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između ispitanika s različitim dijagnozama, zbog značajno većeg udjela alela L-MAO-A kod osoba s poremećajem ophođenja u odnosu na ispitanike sa shizofrenijom i PTSP-om.
- Naši rezultati pokazuju da nema značajne razlike u raspodjeli alela L-MAO-A i H-MAO-A s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR* između agitiranih i neagitiranih osoba s poremećajem ophođenja, shizofrenijom ili PTSP-om.
- Koncentracija trombocitnog 5-HT značajno se razlikuje između nosioca alela H-MAO-A i L-MAO-A zbog značajno niže koncentracije trombocitnog 5-HT kod nosioca alela H-MAO-A.

- Rezultati višestruke linearne regresije potvrđuju da su varijacije u koncentraciji 5-HT kod svih ispitanika pod značajnim utjecajem pušenja, agitacije te polimorfizma *MAOA-uVNTR*, ali, kada se uzme u obzir i dijagnoza ispitanika, tada se gubi značajan utjecaj pušenja i polimorfizma *MAOA-uVNTR* zbog značajnog utjecaja same dijagnoze na razinu trombocitnog 5-HT.

## 7. LITERATURNI VRELA

- [1] M. Bortolato, N. Pivac, D. Muck-Seler, M. Nikolac Perkovic, M. Pessia, G. D. Giovanni, *Neuroscience* **236** (2013) 160–185.
- [2] S. Z. Sabol, S. Hu, D. Hamer, *Hum. Genet.* **103** (1998) 273–279.
- [3] J. Deckert, M. Catalano, Y.V. Syagailo, M. Bosi, O. Okladnova, D. di Bella, M. M. Nöthen, P. Maffei, P. Franke, J. Fritze, W. Maier, P. Propping, H. Beckmann, L. Bellodi, K. P. Lesch, *Hum. Mol. Genet.* **8** (1999) 621–624.
- [4] L. Oreland, K. Nilsson, M. Damberg, J. Hallman, *J. Neural. Transm.* **114** (2007) 817–822.
- [5] J. W. Buckholtz, A. Meyer-Lindenberg, *Trends. Neurosci.* **31** (2008) 120–129.
- [6] K. M. Beaver, M. DeLisi, M. G. Vaughn, J.C. Barnes, *Compr. Psychiatry* **51** (2010) 130–134.
- [7] J. Vanderpool, N. Rosenthal, G. P. Chrousos, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72** (1991) 1382.
- [8] LJ. Oruč, A. Memić, L. Kapur, J. Krehić, *Medix*, specijalizirani medicinski dvomjesečnik, **71** (2007) 79-83.
- [9] K.V. Savelieva, S. Zhao, V. M. Pogorelov, I. Rajan, Q. Yang, E. Cullinan, H. Thomas, T. H. Lanthorn, *PLoS ONE* **3** (2008) e3301.
- [10] T. J. Revett, G. B. Baker, J. Jhamandas, S. Kar, *J. Psychiatry Neurosci.* **38** (2013) 6-23.
- [11] Q. Liu, Q. Yang, W. Sun, P. Vogel, *J. Pharmacol. Exp. Therapy* **325** (2008) 47–55.
- [12] A. Dahlström, K. Fuxe, *Experientia* **20** (1964) 398-399.
- [13] <http://humanphysiology.academy/Neurosciences%202015/Chapter%206/A.6%20Reticular%20Formation.html> (preuzeto 8. ožujka 2017. godine).
- [14] <http://blog.baucominstitute.com/wpcontent/uploads/2015/02/serotonin-neurons-baucominstitute-stress-anxietydepression-blog> (preuzeto 8. ožujka 2017. godine).
- [15] D. J. Walther, J.-U. Peter, S. Bashammakh, H. Hörtnagl, M. Voits, H. Fink, *Science* **299** (2003) 76.
- [16] E. H. Jr. Cook, K. E. Fletcher, M. Wainwright, N. Marks, S. Y. Yan, B. L. Leventhal, *Neurochem.* **63** (1994) 465-469.
- [17] J. D. Flory, J. H. Newcorn, C. Miller, S. Harty, J. M. Br. Halperin, *J. Psychiatry* **190** (2007) 410-414.
- [18] B. Jernej, M. Banović, L. Čičin-Šain, D. Hranilović, M. Balića, D. Orešković, V. Folnegović-Šmalc, *Psychiatry Res.* **94** (2000) 153-62.

- [19] M. D. Berry, A. V. Juorio, I. A. Paterson, *Prog. Neurobiol.* **42** (1994) 375–391.
- [20] L. Oreland, *Monoamine oxidase in neuropsychiatric disorders* VSP Press, Utrecht, 1993, str. 219–247.
- [21] L. Oreland, *Neurotoxicology* **25** (2004) 79-89.
- [22] M. Yamada, H. Yasuhara, *Clinical NeuroToxicology* **25** (2004) 215.
- [23] P. Riederer, C. Konradi, V. Schay, E. Kienzl, G. Birkmayer, W. Danielczyk, E. Sofic, M. B. Youdim, *Adv. Neurol.* **45** (1987) 111-118.
- [24] J. Grimsby, N. C. Lan, R. Neve, K. Chen, J. C. Shih, *J. Neurochem.* **55** (1990) 1166–1169.
- [25] C. H. Donnelly, D. L. Murphy, *Biochem. Pharmacol.* **26** (1977) 853-858.
- [26] J. C. Shih, J. Grimsby, K. Chen, O. S. Zhu, *J. Psychiatry Neurosci.* **18** (1993) 25-32.
- [27] K. Chen, H. F. Wu, J. Grimsby, J. C. Shih, *Mol. Pharmacol.* **46** (1994) 1226-1233.
- [28] J. C. Shih *Neurotoxicology* **25** (2004) 21-30.
- [29] B. H. Moussa Youdim, D. Edmondson, *Nat. Rev. Neurosci.* **7** (2006) 295-309.
- [30] K. Chen, *Neurotoxicology* **25** (2004) 31–36.
- [31] [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAOA#genomic\\_location](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAOA#genomic_location) (preuzeto 6. ožujka 2017. godine).
- [32] J. P. Lindenmayer, *J. Clin. Psychiatry* **61** (2000) Suppl 14: 5-10.
- [33] American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-Peta revizija)*. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013, str. 5–25.
- [34] M. Garriga, I. Pacchiarotti, S. Kasper, S. L. Zeller, M. H. Allen, G. Vázquez, L. Baldaçara, L. San, R. H. McAllister-Williams, K. N. Fountoulakis, P. Courtet, D. Naber, E. W. Chan, A. Fagiolini, H. J. Möller, H. Grunze, P. M. Llorca, R. L. Jaffe, L. N. Yatham, D. Hidalgo-Mazzei, M. Passamar, T. Messer, M. Bernardo, E. Vieta, *W. J. Biol. Psychiatry* **17** (2016) 86-128.
- [35] J. Volavka, *Adv. Psychiatry* **2014** (2014) 196281.
- [36] V. Jukić, G. Arbanas (ur.), *Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, IV revizija*, Naklada Slap, Jastrebarsko, 1996, str. 900
- [37] K. A. Miczek, E. W. Fish, J. F. De Bold, R. M. De Almeida, *Psychopharmacology (Berl)*. **163** (2002) 434-458.
- [38] D. Natarajan, D. Caramaschi, *Front Behav. Neurosci.* **1** (2010) 9.
- [39] G. D. Pearlson, *Ann. Neurol.* **48** (2000) 556-566.
- [40] M. Soyka, *Schizophr. Bull.* **37** (2011) 913-920.

- [41] F. J. Sautter, K. Brailey, M. M. Uddo, M. F. Hamilton, M. G. Beard, A. H. Borges, *J. Trauma Stress* **12** (1999) 73–88.
- [42] C. T. Taft, D. G. Kaloupek, J. A. Schumm, A. D. Marshall, J. Panuzio, D. W. King, T. M. Keane, *J. Abnorm. Psychol.* **116** (2007) 498–507.
- [43] A. Craig Anderson, Brad J. Bushman, *Annu. Rev. Psychol.* **53** (2002) 27-51.
- [44] V. Michopoulos, S. D. Norrholm, T. Jovanovic, *Biol. Psychiatry* **78** (2015) 344-353.
- [45] M. Jakupcak, D. Conybeare, L. Phelps, S. Hunt, H. A. Holmes, B. Felker, M. Klevens, M. E. McFall, *J. Trauma Stress* **20** (2007) 945–954.
- [46] J. Zhou, X. Wang, L. Li, X. Cao, L. Xu, Y. Sun, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **30** (2006) 1435 –1441.
- [47] N. Pivac, D. Mück-Šeler, M. Šagud, M. Jakovljević, M. Mustapić, A. Mihaljević-Peješ, *Biol. Psychiatry* **27** (2003) 759-765.
- [48] D. Muck-Seler, N. Pivac, M. Sagud, M. Jakovljevic, A. Mihaljevic-Peles, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **26** (2002), 1235-1243.
- [49] K. Nenadic-Sviglin, G. Nedic, M. Nikolac, D. Kozaric-Kovacic, T. Stipcevic, D. Muck Seler, N. Pivac, *Alcohol* **45** (2011) 209-216.
- [50] N. Pivac, M. Jakovljević, D. Mück-Šeler, Z. Brzović, *Psychiatry Res.* **73** (1997) 123-132.
- [51] N. Pivac, D. Muck-Seler, M. Mustapic, K. Nenadic-Sviglin, D. Kozaric-Kovacic, *Life Sci.* **76** (2004) 521-531.
- [52] N. Pivac, D. Kozarić-Kovačić, M. Mustapić, Deželjin D, A. Borovečki, M. Grubišić-Ilić, D. Mück-Šeler, *J. Affect. Disord.* **93** (2006) 223-227.
- [53] Z. Kovacic, N. Henigsberg, N. Pivac, G. Nedic, A. Borovecki, *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **32** (2008) 544-551.
- [54] Z.-X. Zhang, Z.-H. Dong, G. C. Román, *Arch. Neurol.* **63** (2006) 782–784.
- [55] H. G. Brunner, M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers, B. A. van Oost, *Science* **262** (1993) 578–580.
- [56] M. Bortolato, J. C. Shih, *Int. Rev. Neurobiol.* **100** (2011) 13–42.
- [57] S. B. Manuck, J. D. Flory, R. E. Ferrell, J. J. Mann, M. F. Muldoon, *Psychiatry Res.* **95** (2002) 9–23.
- [58] <http://teygen564s14.weebly.com/conclusions-and-future-directions.html> (preuzeto 7. ožujka 2016. godine).
- [59] S. R. Kay, A. Fiszbein, L. A. Opler, *Schizophr. Bull.* **13** (1987) 261-276.
- [60] C. B. Baker, M. T. Johnsrud, M. L. Crismon, *Br. J. Psychiatry* **183** (2003) 498– 506.

- [61] A. Montoya, A. Valladares, L. Lizan, L. San, R. Escobar, S. Paz, *Health Qual. Life Outcomes* **9** (2011) 18.
- [62] A. Forth, D. Kosson, R. Hare, *The Hare Psychopathy Checklist: Youth Version, Technical Manual* Multi-Health Systems, New York, 2003.
- [63] E. Coccaro, D. P. Harvey, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **3** (1991) 44-51.
- [64] D. Svob Strac, K. Kovacic Petrovic, M. Nikolac Perkovic, D. Umolac, G. Nedic Erjavec, N. Pivac, *Stress* **26** (2016) 1-12.
- [65] M. Nikolac Perkovic, D. Svob Strac, G. Nedic Erjavec, S. Uzun, J. Podobnik, O. Kozumplik, S. Vlatkovic, N. Pivac, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **69** (2016) 131-146.
- [66] M. Nikolac Perković, doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015, str. 217.
- [67] O. H. Lowry, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
- [68] M. J. Dunn, *Protein determination of total protein concentration* IRL Press, Oxford, 1992.
- [69] N. C. Price (ur.), *Proteins* Bios Scientific Publishers, Academic Press, Oxford, 1996.
- [70] S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 1215.
- [71] N. Pivac, G. Nedić, M. Mustapić, A. Babić, T. Stipčević, F. Borovečki, S. Hajnšek, D. Muck-Šeler, *Neurosci. Lett.* **462** (2009) 45-48.
- [72] R. M. Kaplan, *Clin. Obstet. Gynecol.* **37** (1994) 192-206.
- [73] J. Podobnik, I. Foller Podobnik, N. Grgic, D. Marcinko, N. Pivac, *Psychopharmacology (Berl)*. **220** (2012) 639-641.
- [74] S. Fazel, N. Langstrom, A. Hjern, M. P. Grann, *JAMA* **301** (2009) 2016–2023.
- [75] E. B. Elbogen, H. R. Wagner, S. R. Fuller, P. S. Calhoun, P. M. Kinneer, *Am. J. Psychiatry* **167** (2010) 1051–1058.
- [76] M. Jakupcak, D. Conybeare, L. Phelps, S. Hunt, H. A. Holmes, B. Felker, M. Klevens, M. E. McFall, *J. Trauma Stress* **20** (2007) 945–954.
- [77] R. W. Novaco, C. M. Chemtob, *Psychol. Trauma* **7** (2015) 485–492.
- [78] C. T. Taft, D. G. Kaloupek, J. A. Schumm, A. D. Marshall, J. Panuzio, D. W. King, T. M. Keane, *J. Abnorm. Psychol.* **116** (2007) 498–507.
- [79] C. T. Taft, D. S. Vogt, A. D. Marshall, J. Panuzio, B. L. Niles, *J. Trauma Stress* **20** (2007) 135–145.
- [80] C. T. Taft, S. K. L. Creech, *J. Rehab. Res. Dev.* **49** (2012) 777-788.

- [81] F. Rendu, K. Peoc'h, I. Berlin, D. Thomas, J. M. Launay, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8** (2011) 136-147.
- [82] J. S. Goveas, J. G. Csernansky, E. F. Coccaro, *Psychiatry Res.* **126** (2004) 23–32.
- [83] A. Kolevzon, J. H. Newcorn, L. Kryzak, W. Chaplin, D. Watner, E. Hollander, C. J. Smith, E. H. Jr Cook, J. M. Silverman, *Psychiatry Res.* **175** (2010) 274-276.
- [84] E. J. Mulder, G. M. Anderson, I. P. Kema, A. de Bildt, N. D. van Lang, J. A. den Boer, R. B. Minderaa, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **43** (2004) 491–499.
- [85] C. Aslund, N. Nordquis, E. Comasco, J. Leppert, L. Oreland, K. W. Nilsson, *Behav. Genet.* **41** (2011) 262-272.
- [86] A. Caspi, J. McClay, T. E. Moffitt, J. Mill, J. Martin, I. W. Craig, A. Taylor, R. Poulton, *Science* **297** (2002) 851–854.
- [87] D. M. Fergusson, J. M. Boden, L. J. Horwood, *Child Abuse Negl.* **32** (2008) 607–619.
- [88] J. Kim-Cohen, A. Caspi, A. Taylor, B. Williams, R. Newcombe, I. W. Craig, T. E. Moffitt, *Mol. Psychiatry* **11** (2006) 903–913.
- [89] L. M. Williams, J. M. Gatt, S. A. Kuan, C. Dobson-Stone, D. M. Palmer, R. H. Paul, L. Song, P. T. Costa, P. R. Schofield, E. Gordon, *Neuropsychopharmacology* **34** (2009) 1797–1809.
- [90] D. L. Foley, L. J. Eaves, B. Wormley, J. L. Silberg, H. H. Maes, J. Kuhn, *Arch. Gen. Psychiatry* **61** (2004) 738-744.
- [91] B. C. Haberstick, J. M. Lessem, C. J. Hopfer, A. Smolen, M. A. Ehringer, D. Timberlake, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **135B** (2005) 59-64.
- [92] K. W. Nilsson, R. L. Sjoberg, M. Damberg, J. Leppert, J. Ohrvik, P. O. Alm, L. Lindström, L. Oreland, *Biol. Psychiatry* **59** (2006) 121-127.
- [93] S. E. Young, A. Smolen, J. K. Hewitt, B. C. Haberstick, M. C. Stallings, R. P. Corley, *Am. J. Psychiatry* **163** (2006) 1019-1025.
- [94] D. Huizinga, B. C. Haberstick, A. Smolen, S. Menard, S. E. Young, R. P. Corley, *Biol. Psychiatry* **60** (2006) 677-683.
- [95] S. Zammit, G. Jones, S. J. Jones, N. Norton, R. D. Sanders, C. Milham, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **128B** (2004) 19-20.
- [96] D. Hranilovic, R. Novak, M. Babic, M. Novokmet, Z. Bujas-Petkovic, B. Jernej, *Coll. Antropol.* **32** (2008) 75–80.

## 8. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

ADP: Adenozin difosfat

ANOVA: Jednosmjerna analiza varijance

df: Stupnjevi slobode; engl. *Degrees of Freedom*

F: Varijanca

FAD: Flavín-adenin-dinukleotid

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

MAO: Monoaminooksidaza

MAO-A: Monoaminooksidaza tipa A

MAO-B: Monoaminooksidaza tipa B

p: Statistička vjerojatnost

PANSS: Skala pozitivnih i negativnih psihotičnih simptoma

PCR: lančana reakcija polimerazom, engl. *Polymerase Chain Reaction*

5-HIAA: 5-hidroksiindol octena kiselina

5-HT: 5-hidroksitriptamin (serotonin)

5-HTT: Serotoninski transporteri

PTSP: Posttraumatski stresni poremećaj

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

SŽS: Središnji živčani sustav

TPH: Triptofan hidroksilaza

TPH1: Triptofan-hidroksilaza 1

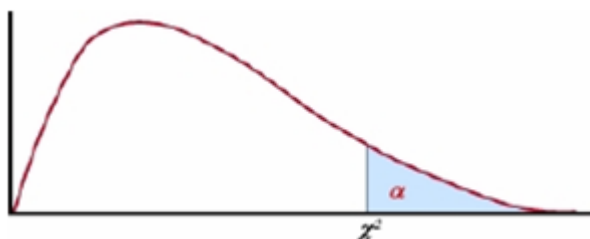
TPH2 Triptofan-hidroksilaza 2

VNTR: Varijabilni broj ponavljajućih sljedova; engl. *Variable Number of Tandem Repeat*

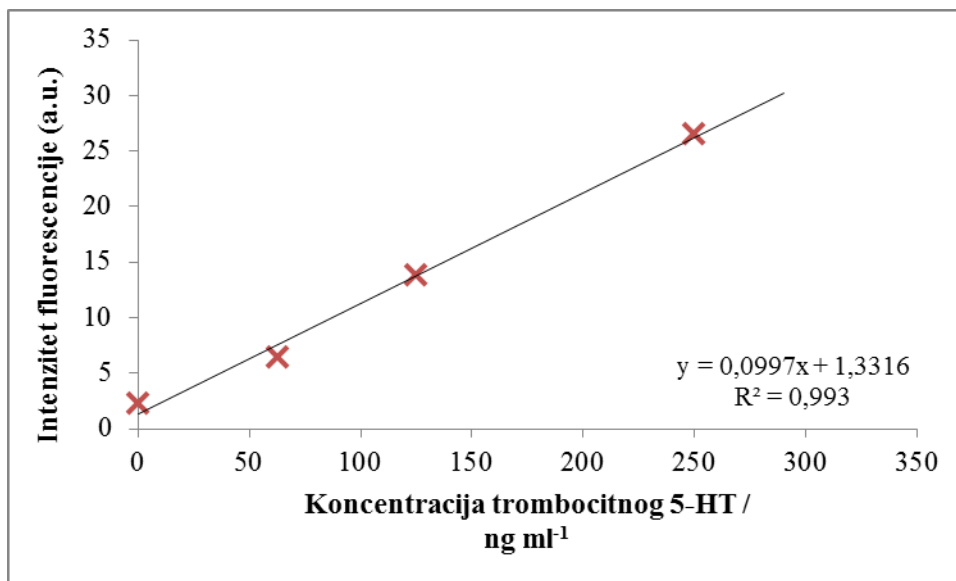


## 9. DODATAK

Tablica 9.  $\chi^2$  raspodjela

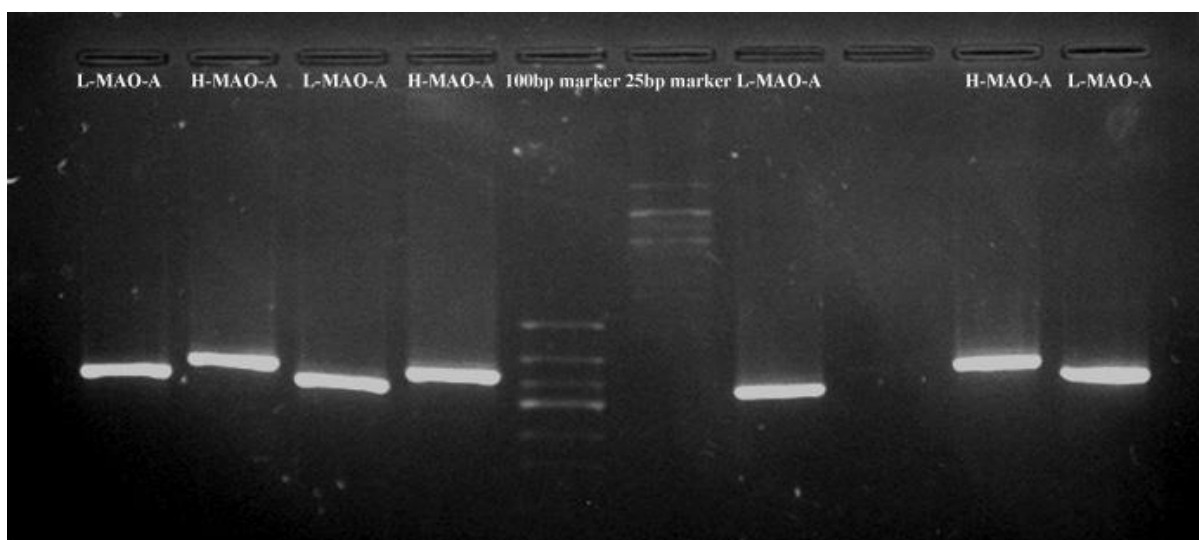


$k$	0,99	0,98	0,95	0,90	0,80	0,50	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,000	0,001	0,004	0,016	0,064	0,455	1,642	2,706	3,841	5,412	6,635	10,828
2	0,020	0,040	0,103	0,211	0,446	1,386	3,219	4,605	5,991	7,824	9,210	13,816
3	0,115	0,185	0,352	0,584	1,005	2,366	4,642	6,251	7,815	9,837	11,345	16,266
4	0,297	0,429	0,711	1,064	1,649	3,357	5,989	7,779	9,488	11,668	13,277	18,467
5	0,554	0,752	1,145	1,610	2,343	4,351	7,289	9,236	11,070	13,388	15,086	20,515
6	0,872	1,134	1,635	2,204	3,070	5,348	8,558	10,645	12,592	15,033	16,812	22,458
7	1,239	1,564	2,167	2,833	3,822	6,346	9,803	12,017	14,067	16,622	18,475	24,322
8	1,646	2,032	2,733	3,490	4,594	7,344	11,030	13,362	15,507	18,168	20,090	26,124
9	2,088	2,532	3,325	4,168	5,380	8,343	12,242	14,684	16,919	19,679	21,666	27,877
10	2,558	3,059	3,940	4,865	6,179	9,342	13,442	15,987	18,307	21,161	23,209	29,588
11	3,053	3,609	4,575	5,578	6,989	10,341	14,631	17,275	19,675	22,618	24,725	31,264
12	3,571	4,178	5,226	6,304	7,807	11,340	15,812	18,549	21,026	24,054	26,217	32,909
13	4,107	4,765	5,892	7,042	8,634	12,340	16,985	19,812	22,362	25,472	27,688	34,528
14	4,660	5,368	6,571	7,790	9,467	13,339	18,151	21,064	23,685	26,873	29,141	36,123
15	5,229	5,985	7,261	8,547	10,307	14,339	19,311	22,307	24,996	28,259	30,578	37,697
16	5,812	6,614	7,962	9,312	11,152	15,338	20,465	23,542	26,296	29,633	32,000	39,252
17	6,408	7,255	8,672	10,085	12,002	16,338	21,615	24,769	27,587	30,995	33,409	40,790
18	7,015	7,906	9,390	10,865	12,857	17,338	22,760	25,989	28,869	32,346	34,805	42,312
19	7,633	8,567	10,117	11,651	13,716	18,338	23,900	27,204	30,144	33,687	36,191	43,820
20	8,260	9,237	10,851	12,443	14,578	19,337	25,038	28,412	31,410	35,020	37,566	45,315
21	8,897	9,915	11,591	13,240	15,445	20,337	26,171	29,615	32,671	36,343	38,932	46,797
22	9,542	10,600	12,338	14,041	16,314	21,337	27,301	30,813	33,924	37,659	40,289	48,268
23	10,196	11,293	13,091	14,848	17,187	22,337	28,429	32,007	35,172	38,968	41,638	49,728
24	10,856	11,992	13,848	15,659	18,062	23,337	29,553	33,196	36,415	40,270	42,980	51,179
25	11,524	12,697	14,611	16,473	18,940	24,337	30,675	34,382	37,652	41,566	44,314	52,620
26	12,198	13,409	15,379	17,292	19,820	25,336	31,795	35,563	38,885	42,856	45,642	54,052
27	12,879	14,125	16,151	18,114	20,703	26,336	32,912	36,741	40,113	44,140	46,963	55,476
28	13,565	14,847	16,928	18,939	21,588	27,336	34,027	37,916	41,337	45,419	48,278	56,892
29	14,256	15,574	17,708	19,768	22,475	28,336	35,139	39,087	42,557	46,693	49,588	58,301
30	14,953	16,306	18,493	20,599	23,364	29,336	36,250	40,256	43,773	47,962	50,892	59,703
35	18,509	20,027	22,465	24,797	27,836	34,336	41,778	46,059	49,802	54,244	57,342	66,619
40	22,164	23,838	26,509	29,051	32,345	39,335	47,269	51,805	55,758	60,436	63,691	73,402
45	25,901	27,720	30,612	33,350	36,884	44,335	52,729	57,505	61,656	66,555	69,957	80,077
50	29,707	31,664	34,764	37,689	41,449	49,335	58,164	63,167	67,505	72,613	76,154	86,661
60	37,485	39,699	43,188	46,459	50,641	59,335	68,972	74,397	79,082	84,580	88,379	99,607
70	45,442	47,893	51,739	55,329	59,898	69,334	79,715	85,527	90,531	96,388	100,425	112,317
80	53,540	56,213	60,391	64,278	69,207	79,334	90,405	96,578	101,879	108,069	112,329	124,839
90	61,754	64,635	69,126	73,291	78,558	89,334	101,054	107,565	113,145	119,648	124,116	137,204
100	70,065	73,142	77,929	82,358	87,945	99,334	111,667	118,498	124,342	131,142	135,807	149,441
500	429,388	437,219	449,147	459,926	473,210	499,334	526,401	540,930	553,127	567,070	576,493	603,441



**Slika 15.** Primjer baždarne krivulje koja je korištena za određivanje koncentracije trombocitnog 5-HT u pojedinim uzorcima.

Na slici je prikazan intenzitet fluorescencije za slijepu probu i tri standarda koncentracije 250 ng ml<sup>-1</sup>, 125 ng ml<sup>-1</sup> i 63 ng ml<sup>-1</sup>.



**Slika 16.** Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam *MAOA-uVNTR*: primjer razdvajanja fragmenata DNA, umnoženih metodom PCR, elektroforezom na gelu od agaroze.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 02. studenog 1990. godine u Karlovcu. U Dugoj Resi sam završila Osnovnu školu "Vladimir Nazor", a potom upisala i opću gimnaziju u Srednjoj školi "Duga Resa".

Godine 2009. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te sam 2013.godine stekla zvanje *Sveučilišna prvostupnica kemije ( baccalaurea chemiae )*. Završni rad *Funkcionalna hrana* napravljen je pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ive Juranović Cindrić.

Godine 2013. upisala sam diplomski studij kemije, istraživački smjer analitičke kemije i biokemije.

Diplomsku radnju izradila sam u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, pod vodstvom prof. dr. sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice.

Dio tih rezultata objavljen je u znanstvenom radu: D. Svob Strac, Z. Kovacic Petrovic, M. Nikolac Perkovic, D. Umolac, G. Nedic Erjavec, N. Pivac, *Stress* **26** (2016) 1-12.