

Povezanost polimorfizma gena za katehol-O-metiltransferazu s depresivnim simptomima u shizofreniji

Horvatinec, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:380952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Horvatinec

**Povezanost polimorfizama gena za katehol-O-metiltransferazu s
depresivnim simptomima u shizofreniji**

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

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

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dubravki Švob Štrac na vodstvu, strpljenju i pomoći u izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na trudu i uloženom vremenu. Velika hvala svim profesorima, djelatnicima Biološkog odsjeka, kao i kolegama koji su mi uljepšali fakultetsko doba.

Zahvaljujem svojim prijateljima, mojoj drugoj obitelji, što su me pratili i podupirali tijekom svih uspona i padova. Posebno tebi Barbara, jer smo djelile osmijehe, suze i laboratorije. Hvala ti što si sa mnom provela svoje studentsko doba te time zauvijek obilježila moje.

Naposljetku, najveće hvala mojim roditeljima na ljubavi i razumijevanju tijekom cijelog školovanja, a posebno mojoj sestri na anđeoskoj podršci i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost polimorfizama gena za katehol-O-metiltransferazu s depresivnim simptomima u shizofreniji

Lucija Horvatinec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Katehol-O-metiltransferaza (COMT) je enzim odgovoran za metabolizam različitih kateholamina, poput neurotransmitora dopamina. Kodiran je genom *COMT* koji sadrži brojne polimorfizme, a neki od njih utječu na ekspresiju i aktivnost enzima te tako moduliraju koncentraciju kateholaminskih neurotransmitora u sinapsi. Brojne studije upućuju na ulogu dopaminske neurotransmisije u patogenezi depresije i shizofrenije. Depresivni simptomi, iako rijetko istraživani i nejasne biološke podloge, vrlo su učestali u shizofreniji, a povezuju se sa slabijim terapijskim ishodom i nižom kvalitetom života, većom komorbidnošću, lošim radnim i psihosocijalnim funkcioniranjem te povećanim rizikom relapsa i suicida. Pojedina istraživanja sugerirala su povezanost *COMT* genskih polimorfizama i pojedinih simptoma shizofrenije, međutim određene studije nisu potvrdile ove rezultate. Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi postoji li povezanost polimorfizama rs4680 i rs4818 gena *COMT* sa depresivnim simptomima u bolesnika sa shizofrenijom. Nakon provedene genotipizacije uzoraka s obzirom na *COMT* polimorfizme rs4680 i rs4818 i procjene shizofrenih ispitanika prema PANSS-D i CDSS ljestvici, u ispitanika sa shizofrenijom pronađena je povezanost depresivnog simptoma Rano buđenje sa genotipom AA rs4680 polimorfizma te depresivnog simptoma Osjećaj krivnje sa genotipom CG rs4818 polimorfizma. Haplotipska analiza utvrdila je neravnotežu udruživanja rs4680 i rs4818 polimorfizama, što upućuje da se nasljeđuju zajedno u bloku. Haplotip CG značajno se češće pojavljuje u shizofrenih, nego u kontrolnih ispitanika.

(57 stranica, 16 slika, 15 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dopamin, COMT, shizofrenija, polimorfizam, depresivni simptomi

Voditelj: doc. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer
Bošković, Zagreb

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište
u Zagrebu

Ocjenitelji

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The association of catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms with depressive symptoms in schizophrenia

Lucija Horvatinec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Catechol-O-methyltransferase (COMT) is an enzyme responsible for the metabolism of various catecholamines, such as neurotransmitter dopamine. It is encoded by the *COMT* gene, that contains numerous polymorphisms, some of which affect expression and activity of the enzyme, thereby modulating the concentration of catecholamine neurotransmitters in the synapse. Numerous studies have suggested the role of dopamine neurotransmission in the pathogenesis of depression and schizophrenia. Depressive symptoms, although rarely explored and with undetermined biological background, are very common in schizophrenia and are associated with poorer therapeutic outcomes and lower quality of life, higher comorbidity, poor work and psychosocial functioning, and an increased risk of relapse and suicide. Due to the lack of data in previous studies, the aim of this study was to determine whether there is an association between rs4680 and rs4818 *COMT* polymorphisms and depressive symptoms in patients with schizophrenia. Genotyping of researched polymorphisms and the PANSS-D and CDSS scales were used to assess depressive symptoms in patients with schizophrenia. Results demonstrated that the depressive symptom Early awakening was associated with rs4680 AA genotype, whereas depressive symptom Feeling of guilt was associated with rs4818 genotype CG in subjects with schizophrenia. The haplotype analysis revealed that rs4680 and rs4818 polymorphisms are in linkage disequilibrium and therefore probably inherited in the haploblock. The CG haplotype was significantly more frequent in schizophrenia patients than in control subjects.

(57 pages, 16 figures, 15 tables, 85 references, original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: dopamine, COMT, schizophrenia, polymorphism, depressive symptoms

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, Senior Research Associate, Rudjer Boskovic Institute
Co-supervisor: Prof. Dubravka Hranilović, PhD, Faculty of Science, University of Zagreb

Reviewers:

Thesis accepted:

KRATICE

5-HT- 5-hidroksitriptamin (serotonin)

AACD- aromatske aminokiselinske dekarboksilaze

ADHD- poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (eng. *attention deficit hyperactivity disorder*)

ANOVA- jednosmjerna analiza varijance

CDSS- Calgary ocjenska ljestvica (eng. *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*)

CNS- središnji živčani sustav (eng. *central nervous system*)

COMT- katehol-O-metiltransferaza

DA- dopamin

DAT- dopaminski prijenosnik

DNC- 3,5-dinitrokatehol

DSM-5- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Version 5

EDTA- etilen-diamin-tetraoctena kiselina

EPS- ekstrapiramidalne nuspojave (eng. *extrapyramidal side effects*)

FGA- antipsihotici prve generacije (eng. *first-generation antipsychotics*)

GABA- γ -amino-maslačna kiselina

HVA- homovanilna kiselina (eng. *homovanillic acid*)

HWE- Hardy-Weinbergova ravnoteža

ICD-10- International Statistical Classification of Diseases and Related Health

LD- neravnoteža udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*)

L-DOPA- dihidroksifenilalanin

MAO- monoamino oksidaza

MAO-B- monoamino oksidaza tipa B

MARTA- multi-aktivni receptor ciljajući antipsihotici (eng. *multi-acting receptor-targeted antipsychotics*)

MB-COMT- COMT vezan za membranu (eng. *membrane-bound COMT*)

Met- metionin

mRNA- glasnička RNA (eng. *messenger RNA*)

OCD- opsesivno-kompulzivni poremećaj (eng. *obsessive compulsive disorder*)

PANSS- Ljestvica težine pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije (eng. *Positive and Negative Symptom Scale*)

PANSS-D- podljestvica za depresiju unutar Ljestvice težine pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije

PCR- lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

PFC- prefrontalni korteks (eng. *prefrontal cortex*)

PIF- prolaktin-inhibicijski čimbenik

PIH- prolaktin-inhibicijski hormon

RCLB- pufer za lizu eritrocita (eng. *red cell lysis buffer*)

RPM- okretaj u minuti (eng. *rotation per minute*)

SAM- S-adenozil-L-metionin

S-COMT- slobodni citolazmatski COMT (eng. *soluble COMT*)

SDA- serotonin-dopaminski antagonisti (eng. *serotonin-dopamine antagonists*)

SDS- natrij-dodecil sulfat

SE pufer- natrij-EDTA pufer

SGA- antipsihotici druge generacije (eng. *second-generation antipsychotics*)

SN- lat. *substantia nigra*

SNC- lat. *pars compacta*

SNP- polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*)

SNr- lat. *pars reticulata*

TE pufer- tris-EDTA pufer

TH- tirozin hidroksilaza

Val- valin

VMAT- vezikularni monoaminski prijenosnik

VTA- ventralno tegmentalno područje (lat. *area tegmentalis ventralis*)

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*)

SADRŽAJ

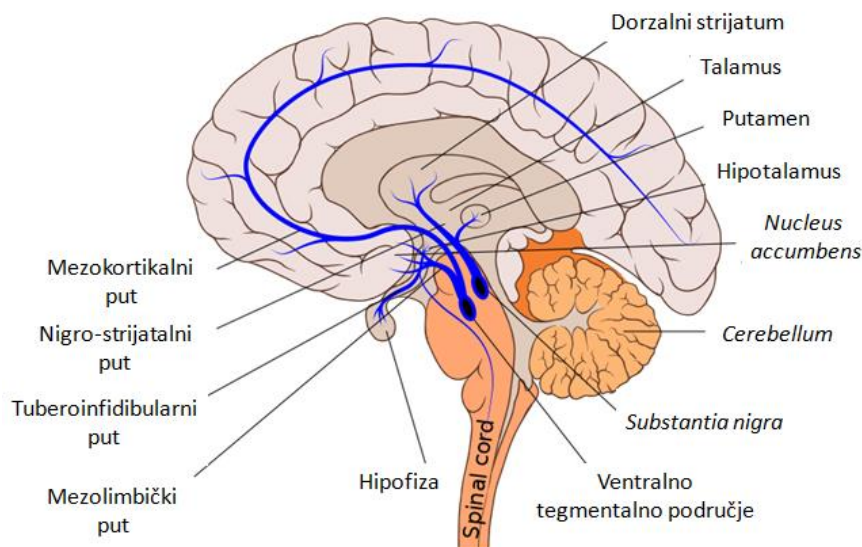
1. UVOD.....	1
1.1. Dopaminergički sustav.....	1
1.1.1. Dopaminergični putevi.....	1
1.1.1.1. Nigro-strijatalni put.....	1
1.1.1.2. Mezolimbčki put.....	2
1.1.1.3. Mezkortikalni put.....	2
1.1.1.4. Tuberoinfidibularni put.....	2
1.1.2. Dopamin i njegova sinteza.....	3
1.2. Katehol-O-metiltransferaza (COMT).....	6
1.2.1. Gen <i>COMT</i>	6
1.2.2. Trodiomenzionalna struktura enzima COMT.....	8
1.2.3. Polimorfizmi enzima COMT.....	8
1.3. Shizofrenija.....	10
1.3.1. Uzroci shizofrenije.....	10
1.3.1.1. Genetički uzroci.....	10
1.3.1.2. Čimbenici okoline.....	11
1.3.1.3. Neurotransmitske teorije.....	11
1.3.1.4. Neurorazvojne teorije.....	12
1.3.1.5. Morfološke promjene.....	12
1.3.2. Simptomi.....	12
1.3.2.1. Depresivni simptomi u shizofreniji.....	14
1.3.3. Uloga dopamina i enzima COMT u shizofreniji.....	15
1.3.4. Terapija.....	16
1.3.3.1. Terapija za liječenje depresivnih simptoma u shizofreniji.....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21

3.1. Ispitanici.....	21
3.2. Izolacija DNA iz krvi metodom izoljavanja.....	22
3.3. Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam gena <i>COMT</i>	23
3.4. Statistička obrada podataka.....	26
4. REZULTATI.....	27
5. RASPRAVA	39
5.1. Demografski i klinički podaci	39
5.2. Polimorfizam rs4680.....	39
5.3. Polimorfizam rs4818.....	41
5.4. Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena <i>COMT</i>	42
6. ZAKLJUČAK	43
7. LITERATURA.....	44
8. ŽIVOTOPIS.....	52
9. PRILOZI.....	53

1. UVOD

1.1. Dopaminergički sustav

Sustavi neurona u mozgu koji sintetiziraju te zatim otpuštaju dopamin nazivaju se dopaminergičkim sustavom (Björklund i Dunnett, 2017). Dopaminergični neuroni heterogena su grupa stanica smještenih u diencefalonu, mezencefalonu i olfaktornim bulbusima, no većina njih nalazi se u ventralnom dijelu mezencefalona. Mezodiencefalički dopaminergički neuroni formiraju *substantiu nigru* (lat., SN), ventralno tegmentalno područje (lat. *area tegmentalis ventralis*, VTA) i retrorubralno područje (Arias-Carrión i sur., 2010). Prikaz dopaminergičkog sustava u ljudskom mozgu nalazi se na Slici 1. Postoje 4 glavna puta za dopaminergički sustav u mozgu: nigro-strijatalni, mezolimbčki, mezokortikalni i tuberoinfidibularni put (Ayano, 2016).



Slika 1. Putevi dopaminergičkog sustava i osnovni dijelovi mozga koji sudjeluju u njima. Preuzeto i prilagođeno iz https://en.wikipedia.org/wiki/Dopaminergic_pathways#/media/File:Dopaminergic_pathways.svg.

1.1.1. Dopaminergični putevi

1.1.1.1. Nigro-strijatalni put

U nigro-strijatalnom putu vlakna potječu od *substantiae nigrae* i rostralno se projiciraju po bazalnom gangliju, specifičnije do dorzalnog strijatuma odnosno *nucleusa caudatusa* i putamena (Slika 1.) (Ayano, 2016). *Substantia nigra* sastoji se od 2 anatomski i funkcionalno različita dijela: inferiorni i posteriorni *pars compacta* (SNc) i superiorni i anteriorni *pars*

reticulata (SNr). Dopaminergični neuroni smješteni su primarno u *pars compacta* (Massey i sur., 2016). Značajna uloga ovog dopaminskog puta je u kretanju odnosno kontroli motorne funkcije i učenju novih motoričkih sposobnosti. Degeneracija nigro-strijatalnog sustava uzrokuje Parkinsonovu bolest, a također smatra se da su ekstrapiramidalni učinci antipsihotika rezultat blokade strijatalnih dopaminskih receptora (Ayano, 2016).

1.1.1.2. Mezolimbčki put

U mezolimbickom putu dopaminergičke projekcije potječu iz ventralnog tegmentalnog područja (Slika 1.) i šire se do amigdale kroz *cortex praepyramidalis*, *lateral septal nuclei* i *nucleus accumbens*. Ventralno tegmentalno područje je evolucijski konzervirana struktura srednjeg mozga koja ima ulogu u traženju nagrada i sigurnosti, učenju, motivaciji, ali i neuropsihijatrijskim poremećajima poput ovisnosti i depresije (Barker i sur., 2016). Uloga mezolimbickog puta veže se uz sustav nagrade i emocija. Mezolimbčki dopamin otpušta se tijekom ugodnih situacija i stimulira osobu za traženjem ugodnih aktivnosti i okupacije kao što su spolni odnosi, hrana i konzumiranje droge. Kod bolesnika koji boluju od shizofrenije koriste se antipsihotici koji blokiraju dopaminske receptore mezolimbickog puta te na taj način smanjuju pozitivne simptome shizofrenije (Ayano, 2016).

1.1.1.3. Mezoekortikalni put

U mezoekortikalnom putu dopaminergička vlakna, kao i kod mezolimbickog puta, izlaze iz ventralnog tegmentalnog područja i projiciraju se u frontalni korteks i septohipokampalne regije (Slika 1.). Mezoekortikalni dopamin posreduje u emocionalnom i kognitivnom ponašanju. Razine dopamina u mozgu, pogotovo u prefrontalnom korteksu, pomažu poboljšanju radne memorije i pažnje. Međutim, ravnoteža tih razina je delikatna i memorija pati njihovim povećanjem ili smanjenjem. Antipsihotični lijekovi pogoršavaju negativne simptome shizofrenije blokirajući dopaminske receptore mezoekortikalnog puta (Ayano, 2016). Između mezolimbickog i mezoekortikalnog puta postoji preklapanje stoga se često nazivaju zajedničkim nazivom, mezoekortikolimbčki sustav (Arias-Carrión i sur., 2010).

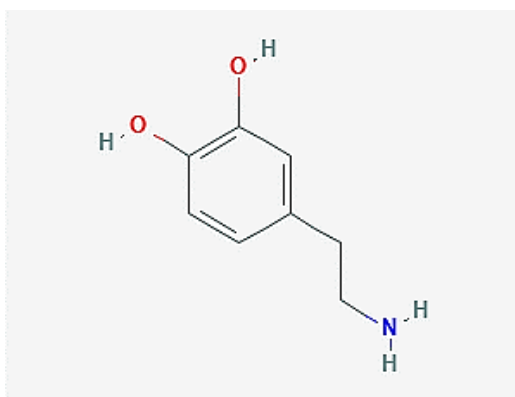
1.1.1.4. Tuberoinfidibularni put

Tuberoinfidibularni put započinje u *arcuatus nucleus* hipotalamusa i završava u hipofizi (Slika 1.). Dopamin sintetiziran u neuronima u *arcuatus nucleus* oslobađa se u hipotalamo-hipofizne krvne žile koje opskrbljuju hipofizu što pak utječe na laktotropinske stanice, koje proizvode prolaktin, tako što inhibira njegovu proizvodnju. Naime, dopamin je glavni neuroendokrini inhibitor sekrecije prolaktina anteriornog dijela hipofize. Antipsihotici koji blokiraju

dopaminske receptore u hipofizi mogu prekinuti inhibiciju prolaktina dopaminom i time dovesti do otpuštanja prolaktina i uzrokovanja galaktoreje (lučenje mlijeka u muškaraca i u žena koje ne doje). Upravo zbog tog djelovanja dopamin se još naziva i prolaktin-inhibicijski čimbenik (PIF) ili hormon (PIH) (Ayano, 2016).

1.1.2. Dopamin i njegova sinteza

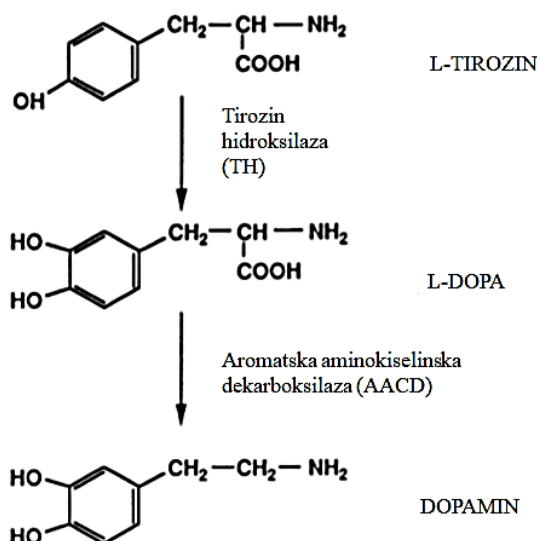
Dopamin (DA) je dominantan kateholaminski neurotransmiter u mozgu sisavaca (Missale i sur., 1998). Uključen je u razne procese središnjeg živčanog sustava (eng. *central nervous system*, CNS), uključujući kogniciju, motoričku aktivnost, motivaciju i nagradu, raspoloženje, pažnju i učenje (Jones i Miller, 2008). Dopamin ima brojne uloge i na periferiji gdje je modulator kardiovaskularne funkcije, zatim utječe na hormonsku sekreciju i otpuštanje kateholamina, vaskularni tonus, funkciju bubrega i na gastrointestinalni motilitet (Missale i sur., 1998). Poznato je da je dopamin uključen u neurobiologiju i simptome mnoštva neuroloških i psihijatrijskih bolesti, uključujući shizofreniju i poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (eng. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) (Arias-Carrión i sur., 2010), opsesivno-kompulzivni poremećaj (eng. *obsessive compulsive disorder*, OCD), autizam, Touretteov sindrom, Parkinsonovu bolest i ovisnost o drogama (Ayano, 2016).



Slika 2. Struktura molekule dopamina. Preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dopamine#section=2D-Structure>.

Dopamin ($C_8H_{11}NO_3$, 4-(2-aminoetil)benzen-1,2-diol) je monoamin koji spada u kateholamine. Sastoji se od kateholne skupine, koju čine benzenski prsten (Slika 2.), na koji su vezane 2 hidroksilne skupine te od amino skupine spojene etilnim lancem na benzenski prsten. Dopamin nastaje dekarboksilacijom dehidroksifenilalanina i prekursor je adrenalina i noradrenalina (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dopamine>).

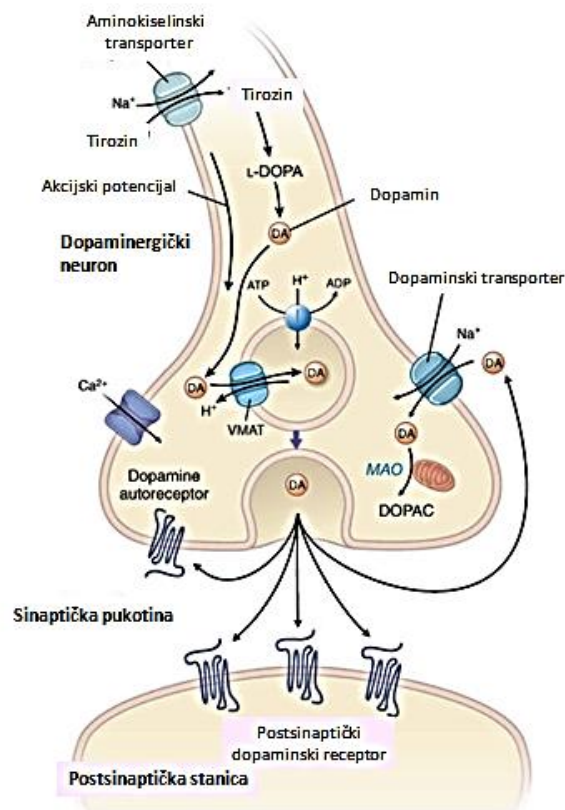
Sinteza dopamina, kao i kod svih kateholamina, započinje aminokiselinom tirozin (Slika 3.) (Fernstorm i Fernstorm, 2007), koji mehanizmima aktivnog prijenosa dolazi u mozak. Tirozin, nastaje u jetri iz fenilalanina pomoću fenilalaninske hidroksilaze (Ayano, 2016). Osim jetre, tirozin nastaje i u dopaminskim neuronima pomoću tirozin hidroksilaze (TH). Tirozin nastao u jetri krvlju dolazi do mozga gdje aminokiselinim prijenosnicima i aktivnim prijenosom prelazi iz ekstracelularne tekućine u dopaminergičke neurone. Kada tirozin uđe u neuron dolazi do njegove konverzije enzimom tirozin hidroksilaza i on prelazi u dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (Slika 3.), što je limitirajući korak biosinteze jer je pri normalnim uvjetima tiroksin hidroksilaza zasićena supstratom, pa povećanje količine tirozina ne utječe na dopaminsku sintezu (Elsworth i Roth, 1997). L-DOPA se zatim konvertira u dopamin (Slika 3.) pomoću citoplazmatskog enzima aromatske aminokiselinske dekarboksilaze (AACD) (Ayano, 2016).



Slika 3. Biosinteza dopamina i enzimi uključeni u njegovu sintezu. Preuzeto i prilagođeno iz rada Elsworth i Roth (1997).

Sinteza dopamina, njegova pohrana i signalizacija te naposljetku inaktivacija prikazana je na Slici 4. Dopaminergička neurotransmisija događa se preko različitih povezanih procesa, uključujući sintezu, otpuštanje, uzimanje, pohranjivanje, katabolizam i aktivaciju receptora. TH konvertira L-tirozin u L-DOPA kojeg AACD dekarboksilira u dopamin. Sintetizirani DA pakira se u sinaptičke vezikule prijenosom pomoću vezikularnog monoaminskog prijenosnika (VMAT) te se otpušta u sinaptičku pukotinu kao odgovor na presinaptički akcijski potencijal. Jednom kada je dopamin otpušten, on aktivira razne postsinaptičke receptore koji su povezani s različitim mehanizmima staničnog signaliziranja. Dopaminska transmisija inaktivira se ponovnim uzimanjem dopamina preko dopaminskog prijenosnika (DAT) u presinaptički

neuron gdje dopamin biva metaboliziran katehol-O-metiltransferazom (COMT) ili monoamino oksidazom (MAO). Preostali nemetabolizirani DA ponovno se pakira u spremišne vezikule za kasniju upotrebu (Jones i Miller, 2008). Glavni produkt metabolizma dopamina je homovanilna kiselina (eng. *homovanillic acid* (HVA)) koja se formira izvan neurona (Elsworth i Roth, 1997).



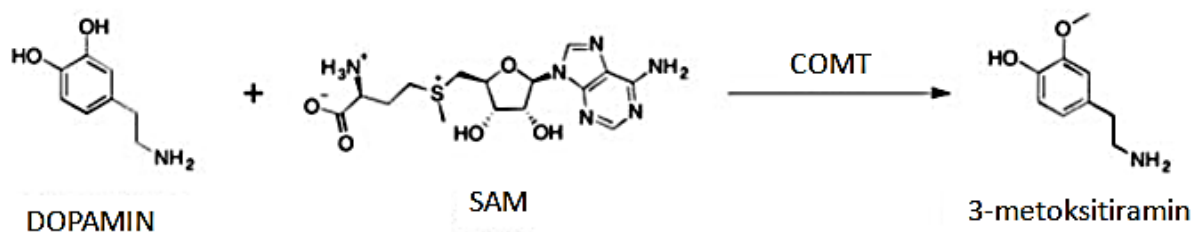
Slika 4. Dopaminergička neurotransmisija. Dopamin (DA) se sintetizira u citoplazmi i prenosi se u sekretorne vezikule pomoću neselektivnog vezikularnog monoaminskog prijenosnika (VMAT) koji koristi energiju elektrokemijskog gradijenta stvorenog od strane protonske ATPaze. Stimulacijom neurona, dopamin se otpušta u sinaptičku pukotinu, gdje neurotransmitor može stimulirati postsinaptičke DA receptore i presinaptičke DA autoreceptore. Citoplazmatski dopamin je ponovno unesen u sekretorne vezikule pomoću VMAT-a ili biva degradiran enzimom monoamino oksidazom (MAO). Preuzeto i prilagođeno s <https://basicmedicalkey.com/pharmacology-of-dopaminergic-neurotransmission/>.

Postsinaptički neuron aktivira se vezanjem dopamina na jedan od pet različitih tipova dopaminskih receptora koji vežu G-protein (D₁-D₅) (Missale i sur., 1998). Postoji dakle pet podtipova dopaminskih receptora, D₁, D₂, D₃, D₄ i D₅. Oni su podijeljeni u dvije velike skupine: tipovi 1 i 5 slične su strukture i osjetljivosti na lijekove pa ih se zajednički naziva skupinom D₁-sličnih receptora. Dopaminski receptori 2,3 i 4 nazivaju se D₂-sličnim receptorima. D₁ i D₅

najviše su uključeni u postsinaptičku inhibiciju, dok su D₂, D₃, D₄ uključeni u pred- i postsinaptičku inhibiciju. D₂ receptori u limbičkom sustavu reguliraju raspoloženje, emocionalnu stabilnost, a D₂ receptori u bazalnom gangliju kontrolu kretanja (Ayano, 2016).

1.2. Katehol-O-metiltransferaza (COMT)

Enzim COMT prebacuje metilnu grupu na kateholamine, kao što su dopamin, adrenalin i noradrenalin, te je odgovoran za njihovu degradaciju (Weinshilboum i sur., 1999). Specifičnije, enzim katalizira transfer metilne skupine od S-adenozil-L-metionina (SAM) do hidroksilne skupine kateholne jezgre kateholamina (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>) pri čemu nastaje spoj 3-metoksitiramin (Slika 5.) (Chen i sur., 2019). Cijeli proces metilacije odvija se u prisutnosti iona magnezija (Mg²⁺) te je metilacija 3'-hidroksilne skupine puno češća, nego metilacija 4'-hidroksilne skupine (Mannisto i Kaakkola, 1999). Osim navedene uloge u metabolizmu endogenih supstanci, COMT je važan i u metabolizmu kateholnih lijekova koji se koriste u liječenju hipertenzije, astme i Parkinsonove bolesti (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>). Katehol-O-metiltransferaza kao enzim prvi puta je opisan 1957. godine, a opisao ga je Julius Axelrod (Mannisto i Kaakkola, 1999).

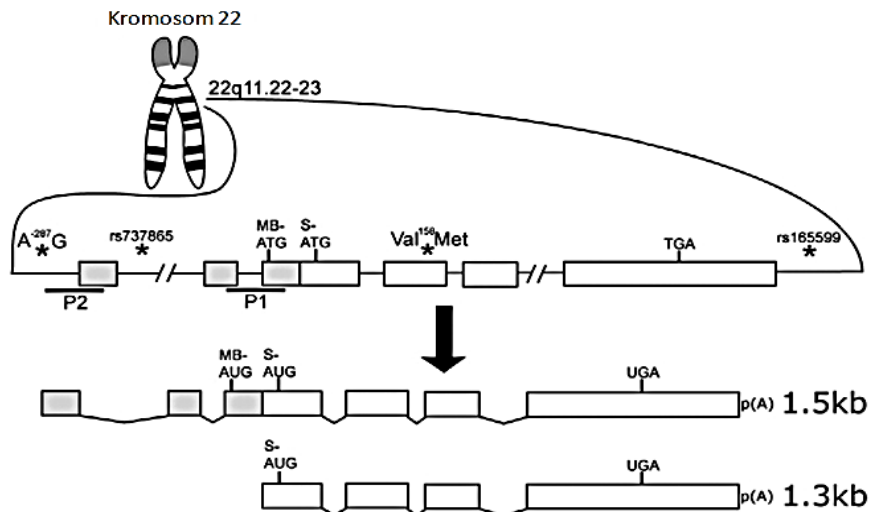


Slika 5. Shematski prikaz razgradnje dopamina enzimom COMT. Preuzeto i prilagođeno iz rada Chen i suradnika (2019).

1.2.1. Gen *COMT*

Kod ljudi gen *COMT* smješten je na 22. kromosomu u regiji 22q11.1-q11.2. Sastoji se od 6 eksona koji pomoću dva promotora kodiraju dva poznata transkripta u ljudi. *COMT* gen kodira dvije različite *COMT* izoforme, regulirane promotorom koji se nalazi u eksonu 3: MB-*COMT* (eng. *membrane-bound*) i S-*COMT* (eng. *soluble*) (Slika 6.). Većina ljudskih tkiva ekspirira oba *COMT* mRNA transkripta, ali u mozgu se može detektirati samo duži transkript (*MB-COMT*) (Nikolac Perkovic i sur., 2017). *COMT* izoforme razlikuju se u duljini, tako je S-*COMT* kraći (1.3 kb) u odnosu na MB-*COMT* (1.5 kb). Gen *COMT* neobičan je jer kodira dvije različite *COMT* izoforme od dva AUG start kodona eksona 3. Promotor P1 kontrolira ekspresiju kraćeg

S-COMT transkripta, dok promotor P2 kontrolira ekspresiju dužeg *MB-COMT* transkripta (Tunbridge, 2010). Iz kraćeg transkripta (1.3 kb) nastaje *S-COMT*, no iz duljeg transkripta (1.5 kb) mogu nastati oba oblika proteina. To je moguće zbog smještaja P1 promotora koji se nalazi između startnih kodona za *S-COMT* i *MB-COMT* i njegovog djelomičnog preklapanja sa sekvencom za *MB-COMT* (Mannisto i Kaakkola, 1999).



Slika 6. Gen *COMT* i njegovi transkripti *MB-COMT* (1.5 kb) i *S-COMT* (1.3 kb). Preuzeto i prilagođeno iz rada Tunbridge i suradnika (2006).

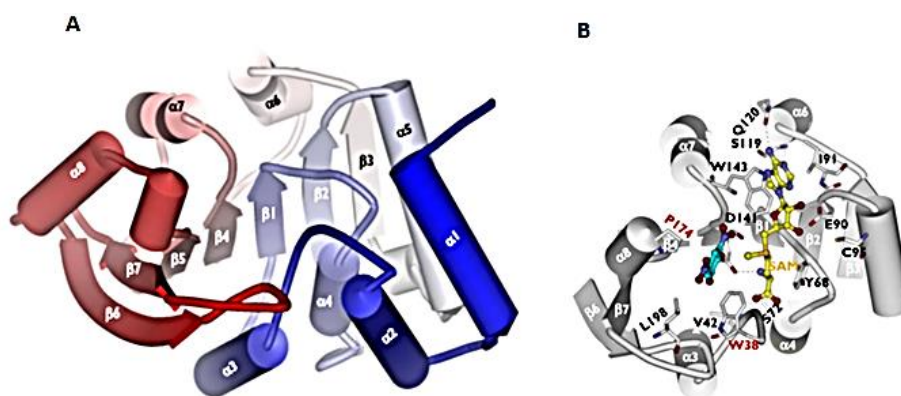
COMT je kod sisavaca široko rasprostranjen u raznim organima. *COMT* protein, kod kralješnjaka, većinski se pojavljuje u slobodnoj citoplazmatskoj formi, odnosno kao *S-COMT*. U mozgu *COMT* nema značajnu ulogu u presinaptičkim neuronima, no pronađena je njegova aktivnost u postsinaptičkim stanicama i u glija stanicama (Mannisto i Kaakkola, 1999). Duža izoforma mRNA *COMT-a* (1.5kb) pronađena je u svim regijama ljudskog središnjeg živčanog sustava (CNS), uključujući frontalni, temporalni i parijetalni režanj moždane kore, mali mozak, amigdal, putamen, talamus i koštano srž. Ekspresija mRNA *COMT-a* najveća je u slojevima prefrontalne kore (pogotovo slojevi II, III i VI). Niska ekspresija zabilježena je u strijatumu, VTA-u i SN-i (Tunbridge i sur., 2006). Najveća aktivnost *COMT-a* izvan mozga pronađena je u jetri, bubrezima, gastrointestinalnom traktu, slezeni i submaksilarnim žlijezdama. Aktivnost je zabilježena i u plućima, očima i koži (naročito epidermis). Generalna funkcija *COMT-a* je eliminacija biološki aktivnih i toksičnih katehola kao i drugih hidroksiliranih metabolita. *COMT* tijekom prvog tromjesečja trudnoće štiti posteljicu i razvoj embrija od aktiviranih hidroksiliranih spojeva. Također, *COMT* se ponaša kao enzimatska detoksirajuća barijera između krvi i drugih tkiva i time štiti od štetnog učinka ksenobiota (Mannisto i Kaakkola, 1999).

1.2.2. Trodiomenzionalna struktura enzima COMT

Enzim COMT sastoji se od β -ploče, sačinjene od sedam niti (posloženi u redu 3214576), koja je smještena između dva seta α -zavojnica (zavodnice $\alpha 1$ – $\alpha 5$ na jednoj strani i zavojnice $\alpha 6$ – $\alpha 8$ na drugoj strani) (Slika 7. A). Aktivno mjesto enzima plitki je utor definiran s M40, L198, W143, W38 i P174 (Slika 7. B) (Ma i sur., 2014). Aktivna mjesta ista su kod S-COMT i MB-COMT, točnije, imaju ista katalitička mjesta, no MB-COMT ostvaruje povoljnije interakcije sa supstratom, bilo zbog dijela koji se veže za membranu ili same membrane (Mannisto i Kaakola, 1999). U aktivno mjesto prvo se veže S-adenozil-L-metionin (SAM). SAM uspostavlja interakciju s prvom polovicom β -ploče ($\beta 1$ – $\beta 4$) (Slika 7. B). Metilna skupina vezana na metioninski sumporni atom u SAM-u orijentirana je prema aktivnom mjestu, specifično prema katehol oksidirajućem atomu, kako bi bila metilirana (Slika 7. B). Nakon vezanja SAM-a dolazi do vezanja iona magnezija (Mg^{2+}), kao nužnog ko-čimbenika metilacije. Mg^{2+} snizuje pK_a kateholnih hidroksila kako bi bili lakše ionizirani. Naposljetku dolazi do vezanja supstrata u aktivno mjesto (Ma i sur., 2014).

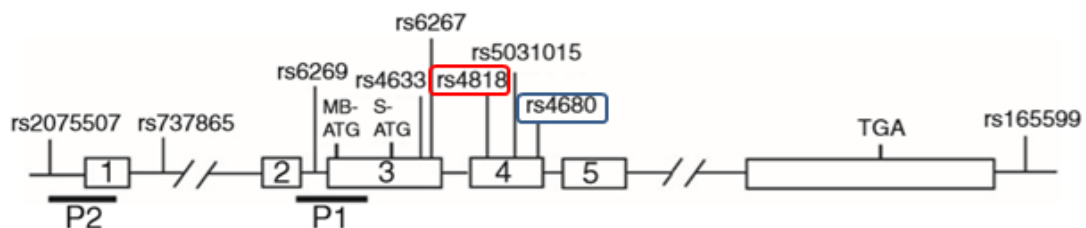
1.2.3. Polimorfizmi enzima COMT

Za gen *COMT* (ljudski) poznato je oko 300 polimorfizama, no mnogi od njih nisu potvrđeni i većina ih ima izrazito malu učestalost. Puno polimorfizama smješteno je izvan kodirajuće sekvence i funkcija im nije poznata. Najpoznatiji i najistraženiji je polimorfizam Val^{108/158}Met (rs4680) (Slika 8.) (Tunbridge, 2010). Polimorfizam Val^{108/158}Met (rs4680) klasificiran je kao polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) gdje dolazi do zamjene gvanina (G) adeninom (A). To rezultira zamjenom aminokiseline valina (Val)



Slika 7. A) Tercijarna struktura enzima COMT. **B)** Prikaz aktivnog mjesta i SAM vezujućeg mjesta u COMT proteinu. Molekularne interakcije SAM i DNC (3,5-dinitrokatehol) sa preostalim dijelovima aktivnog mjesta. Isprekidane linije prikazuju vodikove veze. Preuzeto i prilagođeno iz rada Ma i suradnika (2014).

aminokiselinom metionin (Met) na poziciji 158 (Val¹⁵⁸Met) u dužoj formi enzima (MB-COMT), i na poziciji 108 (Val¹⁰⁸Met) u kraćoj formi enzima (S-COMT) (Nedić i sur., 2011). Navedeni polimorfizam smješten je u eksonu 4 *COMT* gena (Nedic Erjavec i sur., 2014). Ovaj polimorfizam značajno mijenja aktivnost enzima. Naime, Val alel je stabilniji u donosu na Met alel, dok je Met alel termolabilniji i ima nižu aktivnost pri fiziološkoj temperaturi (Nikolac Perkovic i sur., 2017). Pri normalnoj tjelesnoj temperaturi varijanta alela Met ima jednu četvrtinu enzimatske aktivnosti alela Val (Matsumoto i sur., 2003). Met varijanta alela također se povezuje i sa manjom ekspresijom proteina i većom dopaminskom aktivnosti u usporedbi s Val varijantom alela (Sagud i sur., 2018). Val¹⁵⁸ homozigoti imaju veću aktivnost COMT-a u krvi u odnosu na Met¹⁵⁸ homozigote (Tunbridge i sur., 2006). Aktivnost COMT-a u ljudskoj populaciji ima trimodalnu raspodjelu, odnosno aktivnost može biti niska, srednja i visoka (Tunbridge, 2010). Obzirom da su aleli (Met i Val) kodominantni (Pivac i sur., 2011), heterozigoti pokazuju srednju razinu aktivnosti COMT-a (Tunbridge, 2010). Funkcionalni Val^{108/158}Met polimorfizam u *COMT* genu potiče agresivne i s ljutnjom povezane karakteristike u različitim kliničkim populacijama. Kako depresija i impulzivno-agresivno ponašanje mogu doprinijeti suicidalnom ponašanju, pretpostavlja se da polimorfizam Val^{108/158}Met može predstavljati rizični čimbenik za suicidalno ponašanje (Nedić i sur., 2011). Taj se polimorfizam dovodi u vezu i sa shizofrenijom (Pivac i sur., 2011), no točna veza nije otkrivena te također postoje i brojni kontradiktorni rezultati drugih istraživanja koji prikazuju da nema povezanosti (Šagud i sur., 2018).



Slika 8. Prikaz smještaja funkcionalnih polimorfizama gena *COMT*. Polimorfizam Val^{108/158}Met (rs4680) označen je plavom, a polimorfizam rs4818 crvenom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz rada Tunbridge (2010).

Polimorfizam rs4818 (Slika 8.) je još jedan od polimorfizama koji se često istražuje. Kod tog polimorfizma dolazi do supstitucije citozina i gvanina (Leu/Leu) na kodonu 86 u *S-COMT*-u i na kodonu 136 u *MB-COMT*-u. G varijanta *COMT*-a rs4818 polimorfizma povezuje se sa većom aktivnosti COMT-a i shodno tome manjom koncentracijom prefrontalnog dopamina.

Smatra se da je polimorfizam *COMT* rs4818 odgovoran za veću varijaciju aktivnosti *COMT*-a, nego *COMT* rs4680 polimorfizam. Neke studije ne povezuju *COMT* rs4818 polimorfizam sa shizofrenijom, međutim *COMT* rs4818 i rs4680 polimorfizmi nasljeđuju se zajedno u haplobloku i haplotip koji uključuje *COMT* rs4818 G alel (sa rs740603/G alel) povezuje se sa negativnim simptomima shizofrenije (Šagud i sur., 2018).

1.3. Shizofrenija

Shizofrenija je kroničan, težak neuropsihijatrijski poremećaj kojeg karakteriziraju halucinacije, deluzije, neorganizirane misli i bizarno ponašanje (Nasrallah i sur., 2014). Opisuje se kao heterogeni klinički sindrom koji uključuje kognitivne, emocionalne i bihevioralne disfunkcije. Incidencija shizofrenije relativno je jednaka u različitim dijelovima svijeta i iznosi 1%. Bolest započinje najčešće u mlađe odraslo doba, vrlo rijetko prije puberteta i pojavljuje se nešto ranije kod muškaraca, nego kod žena (Begić i sur., 2015). Kod muškaraca se tako pojavljuje između 15 i 25 godina, dok se kod žena javlja u prosjeku 3 do 5 godina kasnije, odnosno između 18 i 28 godina. Incidencija samoubojstva je 8 puta češća kod oboljelih od shizofrenije u odnosu na opću populaciju (Krupchanka i Katliar, 2016), tako čak oko 50% pacijenata pokuša samoubojstvo te 10% njih u tome i uspije (Pearlson, 2000).

1.3.1. Uzroci shizofrenije

1.3.1.1. Genetički uzroci

Kao što je slučaj kod brojnih drugih bolesti i shizofrenija nastaje kompleksnom interakcijom genetičkih i okolišnih čimbenika (Begić i sur., 2015). Studije provedene na obitelji, blizancima i posvojenoj djeci te njihovim posvojiteljima i biološkim roditeljima pokazuju da srodnici pacijenata oboljelih od shizofrenije imaju veći rizik od razvoja shizofrenije u usporedbi sa 1% pojavnosti u populaciji. Stupanj rizika korelira sa stupnjem genetičke povezanosti među pojedincima (Pearlson, 2000). Tako kod jednojajčanih blizanaca koji imaju jednaku genetičku podlogu ukoliko jedan bliznac boluje od shizofrenije drugi ima oko 50% izgleda da će razviti shizofreniju. Kod dvojajčanih blizanaca rizik od pojave shizofrenije je niži i iznosi 15%. Vjerojatnost da će se bolest pojaviti kod osobe koja je u prvom koljenu srodna s oboljelim je 3 do 7% što je 5 do 10 puta češće, nego u općoj populaciji. Djeca čiji su biološki roditelji oboljeli od shizofrenije, a posvojena su u zdrave obitelji, pokazuju pojavnost shizofrenije s istom učestalošću kao i djeca koja žive sa svojim biološkim roditeljima (Begić i sur., 2015). Pronalazak bioloških i neuropsiholoških abnormalnosti i kod daljnjih zdravih rođaka upućuje na obiteljsku genetičku sklonost, kao i na potrebu dodatnog jedinstvenog izlaganja okolišnim

uvjetima kako bi objasnili shizofreni fenotip. Mnoge anatomske i psihološke abnormalnosti koje se pojavljuju kod rođaka, koji nemaju shizofreniju, mogle bi biti korisne kao genetički biljezi u studijama povezanosti, kako bi se identificirali nositelji navodnih shizofrenih gena (Tsuang, 2000). Model nasljeđivanja shizofrenije koji se zasniva na jednom lokusu nije otkriven. Kompleksna analiza segregacije, analiza pedigrea i analitički pristupi još uvijek nisu razriješili taj problem. Unatoč nekolicini obećavajućih tragova, zasada nije pronađena definitivna povezanost pojedine varijante gena i shizofrenije (Pearlson, 2000).

1.3.1.2. Čimbenici okoline

Procjenjuje se da u otprilike 20 do 30% slučajeva čimbenici okoline utječu na pojavu shizofrenije. Čimbenik čiji se utjecaj najviše istražuje jest sociodemografski status. Naime, shizofrenija je u većem stupnju zabilježena kod ljudi nižeg socioekonomskog statusa, no nije jasno je li to uzrok ili posljedica bolesti. Osim sociodemografskog statusa proučavaju se i ostali čimbenici okoline kao što su prenatalni i perinatalni čimbenici u koje se ubrajaju neželjena trudnoća, influenza i druge infekcije trudnice, Rh inkompatibilnost, malnutricija trudnice tijekom prvoga tromjesečja, rođenje tijekom zime/proljeća, perinatalno oštećenje mozga i komplikacije prilikom poroda. Postoje dokazi o povezanosti korištenja kanabisa i pojave shizofrenije, ali nije jasno uzrokuje li kanabis *de novo* shizofreniju ili je njegovo korištenje jedna od kompleksnih interakcija potrebnih da se pojavi shizofrenija. Također neki lijekovi, poput amfetamina mogu izazvati psihotičnu reakciju sličnu shizofreniji (Begić i sur., 2015).

1.3.1.3. Neurotransmitske teorije

Shizofrenija se manifestira kao bolest suptilnih strukturalnih i funkcionalnih abnormalnosti različitih moždanih struktura, kao što su striatum, hipokampus i prefrontalni korteks. Na molekularnoj razini, mnogi neurotransmitski sustavi pokazuju abnormalnosti (Hirvonen i Hietala, 2011). Razlikuju se teorije koje postuliraju ulogu dopamina, serotonina, glutamata i GABA-e u shizofreniji (Begić i sur., 2015).

Dopaminska hipoteza prevladava kao teorija s najviše empirijske potpore. Dopamin se tradicionalno povezuje sa shizofrenijom, zbog sklonosti antagonista dopaminskih D2 receptora da ublaže i lijekova koji oslobađaju dopamin da pogoršaju pozitivne simptome shizofrenije. Dopaminska hipoteza shizofrenije sugerira da je prekomjerna subkortikalna dopaminska aktivnost značajka koju uzrokuju mnogi čimbenici od gena do okoliša i disfunkcije mnogih moždanih krugova. Hipoteza također pretpostavlja disfunkcionalnost kortikalne dopaminske neurotransmisije. Dopaminske abnormalnosti usko su povezane s deficitom glutamata i GABA-

e za koje se također smatra da imaju ulogu u shizofreniji (Hirvonen i Hietala, 2011). Naime, glutamat stimulira lučenje GABA-e, koja je glavni inhibicijski neurotransmitor u mozgu, a posljedično dolazi do pojačanog otpuštanja dopamina (Begić i sur., 2015).

Uloga disfunkcije serotonina (5-hidroksitriptamin, 5-HT) u patologiji shizofrenije fokus je mnogih istraživanja prošlog desetljeća, pogotovo zbog toga što su atipični neuroleptički lijekovi visokoafinitetni antagonisti za serotoninski 5-HT_{2A} receptor. Serotonin inhibira dopaminsku funkciju u jezgri srednjeg mozga i na terminalnim dopaminergičkim poljima, tako da serotonergički aktivni lijekovi mogu djelovati sekundarno modulacijom dopaminergičke aktivnosti (Pearlson, 2000).

1.3.1.4. Neurorazvojne teorije

Razvojni neurobiolozi smatraju da bolest nastaje kao posljedica pogrešne proliferacije i migracije stanica mozga tijekom intrauterinog razvoja (Begić i sur., 2015). Smatra se da neurološke abnormalnosti nastaju rano u razvoju mozga zbog sljedećih dokaza: epidemiološki dokazi o povezanosti s trudnoćom, porodom i prenatalnim abnormalnostima; dokazi bihevioroloških i neuroloških abnormalnosti tijekom djetinjstva prije pojave poremećaja u odrasloj dobi; patološki i neuro-slikovni dokazi konzistentni sa moždanim oštećenjima u ranom razvoju (poremećene moždane asimetrije i abnormalnosti sulkogiranih obrazaca); i razvojni defekti u povezanim strukturama (npr. kraniofacijalne) ektodermalnog porijekla. Neurorazvojni procesi, kao što su neurološka formacija i migracija, formacija aksona, dendritička proliferacija, formacija sinapse i mijelinizacija, mogli bi biti odgovorni procesi za razvoj shizofrenije, no relevantan proces za njen razvoj ipak ostaje nejasan (Pearlson, 2000).

1.3.1.5. Morfološke promjene

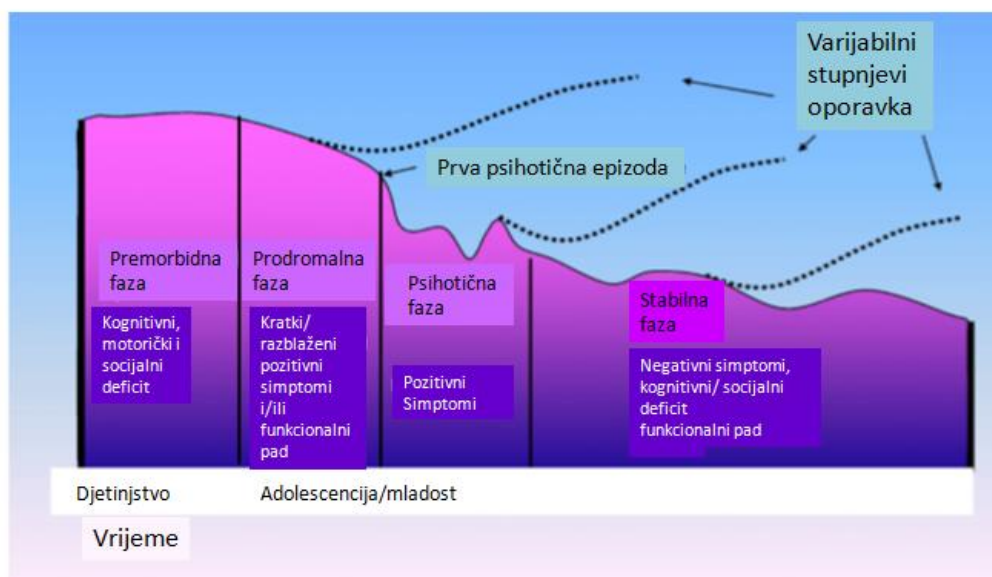
Kod shizofrenih bolesnika primjećuju se promjene kao što su povećanje lateralnih moždanih kora i sulkusa, zatim hipofrontalnost, odnosno smanjenje metaboličke aktivnosti u prednjim regijama mozga u odnosu na stražnje. Za vrijeme aktivnih halucitornih doživljaja prikazuje se aktivacija gornjeg temporalnog girusa. Mjerenjem metaboličke aktivnosti tijekom kognitivnih zadataka primjećeno je da se kognitivno procesiranje kod shizofrenih bolesnika, za razliku od zdravih osoba, odvija u filogenetski starijim dijelovima mozga. Neuroslikovne studije pronašle su smanjenje moždanog volumena već nakon prve psihotične epizode (Begić i sur., 2015).

1.3.2. Simptomi

Shizofreni poremećaji opisuju se raznolikim setom znakova i simptoma, koji uključuju karakteristične distorzije razmišljanja i percepcije, kognitivne nedostatke, motoričke

abnormalnosti, avoliciju (manjak inicijative) i apatiju, poteškoće u komunikaciji i ograničeno afektivno izražavanje (Tandon i sur., 2009). Shizofrenija je, dakle, okarakterizirana simptomima koji iskrivljuju ili djelomično blokiraju neke od osnovnih funkcija ljudskog uma, poput vanjske i unutarnje percepcije i sjećanja. U tom pogledu shizofrenija je poremećaj koji koči ili narušava kontrolu stvarnosti tijekom epizoda akutne simptomatologije i u nekim slučajevima čak i trajno (Häfner, 2019). Svaki od simptoma shizofrenije može se pojaviti u okviru nekog drugog duševnog ili tjelesnog poremećaja. Ne postoji jednoznačno mišljenje o prisutnosti i odsutnosti pojedinih simptoma (Begić i sur., 2015). Svjetska zdravstvena organizacija utvrdila je najčešće simptome u shizofreniji te ih svrstala u pet skupina. Prva skupina obuhvaća halucinacije, odnosno osluškivanje, viđenje i osjećanje stvari koje ne postoje. U drugu skupinu spadaju deluzije, odnosno fiksirana lažna vjerovanja ili sumnje, koje oboljela osoba ne dijeli sa drugim ljudima svoje kulture te ih se čvrsto pridržava usprkos dokazima koji tvrde suprotno. Abnormalno ponašanje spada u treću skupinu, a ono se opisuje kao neorganizirano ponašanje poput lutanja bez cilja, mrmljanja ili smijanja samom sebi, neobičnog i zapuštenog izgleda te samozanemarivanja. Četvrtu skupinu obilježava neorganiziran govor koji je inkoherentan i nepovezan. Naposljetku, poremećaji emocija spadaju u petu skupinu. Tu se ubraja izražena apatija i razlika između emocija koje je bolesnik izrazio te onih koje su uočene na temelju ekspresija lica i govora tijela (WHO, 2014). Osim te podjele simptoma postoji još jedna koja simptome grupira u tri klastera: pozitivne, negativne i kognitivne. U pozitivne simptome ubrajaju se halucinacije i deluzije, psihotične abnormalnosti u percepciji i shvaćanju stvarnosti (Simpson i sur., 2010), bizarna ponašanja (Pearlson, 2000) i poremećaji govora (Begić i sur., 2015). U negativne simptome spadaju socijalna povučенost, manjak motivacije i abnormalnost u socijalnoj interakciji (Simpson i sur., 2010), apatija, loše prosuđivanje, poteškoće u planiranju i rješavanju problema, manjak brige za osobnu higijenu (Pearlson, 2000), avolicija, anhedonija (nemogućnost osjećaja ugone), alogija (poteškoće u govoru), abulija (manjak motivacije) (Tandon i sur., 2009), afektivna nivelacija, autizam (Begić i sur., 2015). Negativni simptomi dijele se na primarne i sekundarne. Važno ih je razlikovati jer su primarni negativni simptomi fundamentalni i intrinzični za shizofreniju, dok su sekundarni negativni simptomi uzrokovani ekstrinzičnim čimbenicima povezanim sa shizofrenijom, kao što su neuroleptičko liječenje, depresija i siromašniji životni uvjeti (Tandon i sur., 2009). Kognitivni simptomi obuhvaćaju nemogućnost organizacije života i nemogućnost obavljanja sekvencijalnog i efektivnog rada (Simpson i sur., 2010), kao i poremećaje pamćenja, misli, percepcije i pažnje (Godar i Bortolato, 2014).

Shizofreniju karakterizira sekvencijalna putanja razvoja bolesti (Slika 9.). Ona uključuje premorbidnu fazu sa suptilnom i nespecifičnom kognitivnom, motoričkom i/ili socijalnom disfunkcijom, a zatim prodromalnu fazu koju obilježavaju pozitivni simptomi ili bazični simptomi i smanjeno funkcioniranje u društvu. Nakon nje slijedi prva psihotična epizoda koja nagovještava formalni početak shizofrenije. S prvom psihotičnom epizodom započinje i period ponavljajućih epizoda psihoze, odnosno psihotična faza, sa parcijalnim i varijabilnim stupnjevima i trajanjem međuepizodne remisije. Naposljetku nastupa stabilna faza ili plato kada su psihotični simptomi manje, a negativni i stabilni kognitivni simptomi više istaknuti (Tandon i sur., 2009).



Slika 9. Evolucija shizofrenije s fazama bolesti. Preuzeto i prilagođeno iz rada Tandon i suradnika (2009).

1.3.2.1. Depresivni simptomi u shizofreniji

Depresija je učestala bolest diljem svijeta, sa čak više od 300 milijuna oboljelih. Ona se razlikuje od uobičajenih promjena raspoloženja i kratkotrajnih emocionalnih odgovora na svakodnevne izazove života. Ovisno o broju i težini simptoma, depresivna epizoda može se kategorizirati kao blaga, umjerena ili teška. Depresiju karakterizira ustrajan osjećaj tuge i manjak interesa za aktivnosti u kojima oboljela osoba normalno uživa. Također obilježava ju i nemogućnost obavljanja svakodnevnih obaveza, manjak energije, promjena apetita, manjak ili višak sna, anksioznost, smanjena koncentracija, neodlučnost, nemir, osjećaj bezvrijednosti, krivnje ili beznađa i misli o samopovredi ili samoubojstvu (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>).

Depresija je česta u bolesnika sa shizofrenijom i može imati značajne učinke na razvoj bolesti (Nasrallah i sur., 2014). Učestalost pojave depresivnih simptoma kod shizofrenih bolesnika varira od 10 do 75%, no u prosjeku iznosi 25%. Raspon učestalosti tako je velik zbog različitih kriterija dijagnoze, metoda istraživanja, faza psihoze, intervala konzumiranja lijekova i drugih čimbenika (Mao i Zhang, 2015). Depresivni simptomi mogu biti sekundarni simptomi drugim komorbidnim medicinskim poremećajima ili njihovim liječenjima. Mogu biti i posljedica liječenja neurolepticima ili njihovih nuspojava, ili psihološka reakcija na razočarenje i stres uzrokovan bolešću (Majdas i sur., 2012). Simptomi depresije učestalo se pronalaze tijekom akutnih psihotičnih epizoda. Mogu se pronaći i nakon psihotičnih epizoda, ali su češći kod bolesnika s aktivnim psihozama (Mao i Zhang, 2015). Međutim, kod pacijenata koji boluju od depresije povećan je rizik od nastanka psihoza i isto tako kod ljudi koji imaju velik rizik za razvoj shizofrenije primijećena je depresija prije pojave psihotičnih simptoma. Povezanost shizofrenije i depresije sugerira potencijalno preklapanje u patofiziologiji i/ili etiologiji ovih dvaju poremećaja. Tako postoji preklapanje negativnih simptoma shizofrenije i simptoma depresije, kao što su anhedonija, abulija, alogija, manjak motivacije, avolicija i socijalna povučanost (Samsom i Wong, 2015). Prisutnost depresivnih simptoma kod bolesnika koji boluju od shizofrenije povezuje se sa smanjenom radnom učinkovitošću i povećanim rizikom od nezaposlenosti, smanjenim zadovoljstvom aktivnostima koje se provode u slobodno vrijeme, smanjenim socijalnim funkcioniranjem, smanjenom kvalitetom života i povećanim korištenjem psihijatrijskih usluga. Postojano pogoršanje depresivnih simptoma također se povezuje sa značajno većim rizikom od psihotičnih relapsova kod pacijenata sa shizofrenijom. Stupanj suicida povećan je kod shizofrenih bolesnika u odnosu na opću populaciju te se smatra da prisutnost depresivnih simptoma pridonosi povećanju učestalosti samoubojstava (Nasrallah i sur., 2014).

1.3.3. Uloga dopamina i enzima COMT u shizofreniji

Klasična dopaminska hipoteza predlaže hiperaktivnost dopaminske transmisije kao odgovornu za pozitivne simptome shizofrenije (Laruelle i sur., 1999). Hipoteza je bazirana na korelaciji kliničke doze antipsihotika i njihovog blokiranja dopaminskih D₂ receptora (Laruelle i sur., 2003). Naime, otkrićem antagonističkog djelovanja antipsihotika na dopaminske D₂ receptore, povezana je uloga dopamina s patogenezom shizofrenije. Usprkos novijim istraživanjima i otkrića mnogih antipsihotika, svi antipsihotici primarno funkcioniraju na istom principu odnosno blokiranju D₂ receptora (Godar i Bortolato, 2014). Antipsihotici uspješno djeluju na pozitivne simptome, no na negativne i kognitivne simptome nemaju takav učinak. Pretpostavlja

se da kognitivni i negativni simptomi nastaju uslijed promjene funkcije prefrontalnog korteksa (PFC), gdje dolazi do smanjene transmisije dopamina preko receptora D₁ (Laruelle i sur., 2003). Na osnovi tih podataka, smatra se da bi shizofrenija mogla biti poduprta mezolimbikom hiperaktivnosti i mezokortikalnom hipoaktivnosti (Godar i Bortolato, 2014), odnosno da se u strijatumu događa hiperfunkcija, a u PFC-u hipofunkcija dopamina (Simpson i sur., 2010).

Bioraspoloživost dopamina u središnjem živčanom sustavu povezana je s aktivnošću 2 enzima: monoamino oksidazom tipa B (MAO-B) i katehol-O-metiltransferazom (COMT), koji su uključeni u put inaktivacije dopamina (Sampaio i sur., 2018). U prefrontalnom korteksu dopaminski prijenosnik (DAT) eksprimiran je u malim količinama pa se dopamin primarno razgrađuje putem COMT-a. Kako DAT nije prisutan ni u sinaptičkoj pukotini moguća je difundacija dopamina izvan sinapse, što povećava vjerojatnost razgradnje COMT-om (Tunbridge i sur., 2006). U strijatumu je situacija drugačija, DAT je odgovoran za prijenos dopamina kroz sinaptičku pukotinu, što upućuje na važnost COMT-a u PFC-u (Egan i sur., 2001). Stoga, različiti polimorfizmi gena *COMT* mogli bi imati utjecaja na dopaminsku aktivnost PFC-a. Polimorfizam Val^{108/158}Met povezuje se sa povećanim rizikom od razvoja shizofrenije tako što osobe s Val¹⁰⁸ pokazuju povećanu sintezu dopamina u srednjem mozgu što utječe na funkciju PFC-a koja se dovodi u vezu sa shizofrenijom (Tunbridge i sur., 2006).

1.3.4. Terapija

Antipsihotični lijekovi predstavljeni su javnosti sredinom prošlog stoljeća, kako bi smanjili ili ublažili simptome shizofrenije, kao što su vizualne i slušne halucinacije i neobične misli poput paranoje. Dostupnost antipsihotika je široka i njihova učinkovitost varira od čovjeka do čovjeka (Ortiz-Orendain i sur., 2017). Tradicionalni tipični i atipični antipsihotici pokazuju kliničku uspješnost u liječenju pozitivnih simptoma shizofrenije, kao što su deluzije i halucinacije, no u liječenju negativnih simptoma, kao što je socijalna povučenost, pokazuju se neuspješnima te ih čak mogu i pogoršati. Jednak negativni učinak imaju i na kognitivne simptome. Disfunkcija mnogobrojnih neurotransmitorskih sustava u shizofreniji sugerira da lijekovi koji selektivno ciljaju jedan neurotransmitorski put nisu u mogućnosti terapijski u potpunosti pomoći i djelovati na tako heterogeni poremećaj poput shizofrenije (Li i sur., 2016). Shodno tome, ne reagiraju svi pacijenti na liječenje jednim antipsihotikom, pa se u takvim situacijama uzimaju kombinacije antipsihotika (Ortiz-Orendain i sur., 2017). Optimalno zauzimanje dopaminskih D₂ receptora ključno je za učinkovitost nekog antipsihotika, no važno je i otpuštanje s istih D₂ receptora nakon što lijek počne djelovati. Stoga, najbolje je privremeno vezanje antipsihotika

na receptor jer trajno vezanje za D₂ receptor povećava rizik stvaranja nuspojava (Horacek i sur., 2006).

Nakon uvođenja prvog antipsihotika, klorpromazina, otkiveno je i u uporabu stavljeno još mnogo drugih antipsihotika. Iako je kemijska struktura tih antipsihotika relativno različita, svi imaju sličan način djelovanja, odnosno djeluju kao blokatori dopaminskog D₂ receptora. Ovisno o uzorku kliničkih učinaka i mehanizama funkcioniranja, antipsihotici se dijele na tipične i atipične (Li i sur., 2016).

Tipični antipsihotici, kao što su haloperidol i klorpromazin, nazivaju se antipsihotici prve generacije (eng. *first-generation antipsychotics*, FGA) ili neuroleptici i učinkoviti su u smanjenju pozitivnih simptoma shizofrenije (Li i sur., 2016). Oni najčešće blokiraju dopaminske D₂ receptore. Da bi djelovanje antipsihotika bilo uspješno, potrebna zasićenost D₂ receptora antipsihoticima iznosi oko 75%. Pri većim dozama lijeka (preko 83%) pacijenti generalno pokazuju znakove ekstrapiramidalnih nuspojava (eng. *extrapyramidal side effects*, EPS), uključujući parkinsonizam. Osim toga kao nuspojava pojavljuje se i hiperprolaktinemija odnosno povećana razina prolaktina koja može uzrokovati tardivnu diskineziju. Ona se opisuje kao kasni, ponekad ireverzibilni poremećaj kretanja koji nastaje vjerojatno zbog preosjetljivosti na kroničnu blokadu dopaminskog receptora (Pearlson, 2000).

Atipični antipsihotici, poput klozapina i risperidona, definirali su novu generaciju antipsihotičnih lijekova koja se naziva i drugom generacijom antipsihotika (eng. *second-generation antipsychotics*, SGA). Oni djeluju tako što su antagonisti serotoniniskog 5-HT_{2A} receptora i dopaminskog D₂ receptora. Prednost atipičnih antipsihotika u odnosu na tipične je što umanjuju pojavu EPS-a (Li i sur., 2016). Također, brojne studije dokazuju njihove pozitivne učinke na pozitivne, negativne i afektivne simptome, kao i kognitivnu disfunkciju i agresiju. Tako se antipsihotici druge generacije povezuju sa boljim funkcijskim kapacitetom, nižim stupnjem samoubojstva, uspješnim učinkom kod pacijenata s refraktornim bolestima, poboljšanom kvalitetom života i povoljnim farmakoekonomskim profilom (Horacek i sur., 2006). Međutim, uz atipične antipsihotike vezuje se povećanje tjelesne mase pacijenta i metabolički teret uzrokovan nepoželjnim farmakološkim interakcijama lijeka (Li i sur., 2016). Tipični predstavnik atipičnih antipsihotika je klozapin. Čak i pri visokim dozama klozapina, maksimalna zasićenost dopaminskog D₂ receptora iznosi otprilike 35% (Pearlson, 2000). Atipični antipsihotici klasificiraju se ovisno o njihovim farmakodinamičnim svojstvima na serotonin-dopaminske antagoniste (eng. *serotonin-dopamine antagonists*, SDA), multi-aktivne

receptor ciljajuće antipsihotike (eng. *multi-acting receptor-targeted antipsychotics*, MARTA), kombinirane antagoniste D₂/D₃ receptora i parcijalne antagoniste dopaminskih receptora. Serotoninsko-dopaminski antagonisti visoko su selektivni za serotoninske 5-HT_{2A} i dopaminske D₂ receptore te α₁-adrenoceptore. MARTA imaju afinitet za 5-HT_{2A}, D₂ i receptore drugih sustava poput histaminergičnog, kolinergičnog, HT_{2C}, 5-HT_{1A} i drugih. Lijekovi koji preferencijalno blokiraju D₂ i D₃ subtipove D₂ sličnih receptora nazivaju se kombinirani antagonisti D₂/D₃ receptora (Horacek i sur., 2006).

U posljednje vrijeme na tržištu se mogu pronaći i aripiprazol i brexpiprazol koji spadaju u antipsihotike s parcijalnim agonističkim učinkom na D₂ receptore umjesto antagonističkog učinka. Iako ti lijekovi spadaju u atipične antipsihotike, na tržištu su prezentirani kao treća generacija antipsihotika. Presinaptički parcijalni agonizam na D₂ receptore dodatno je smanjio stvaranje EPS-a i hiperprolaktinemije, dok je postsinaptički parcijalni agonizam povezan sa relativno velikim rizikom akatizije i sa nekontroliranim patološkim potrebama za kockanjem, prejedanjem, kupovinom i spolnim odnosima. Osim treće generacije antipsihotika, svakodnevno se otkrivaju novi terapijski lijekovi, kao što je ITI-007, prvi u klasi malih molekula koje imaju terapijsko djelovanje tako što jedinstveno i regionalno-selektivno ulaze u interakcije sa serotonergičnim, dopaminergičnim i glutaminergičnim neurotransmitorskim ciljnim molekulama koje su u kompleksu (Li i sur., 2016).

COMT, kao enzim koji ima ulogu u kogniciji, dopaminskoj regulaciji i možda shizofreniji te čiji su inhibitori poznati, mogao bi imati ulogu u terapiji shizofrenih bolesnika. Naime, COMT bi mogao biti relevantan u liječenju shizofrenije zbog svoje farmakogenetičke pozadine (jer nositelji Val¹⁵⁸ ili Met¹⁵⁸ alela mogu odgovoriti drugačije na liječenje antipsihoticima), ali i kao izravna meta za liječenje kognitivne disfunkcije kao jednog od simptoma shizofrenije (Tunbridge i sur., 2006).

1.3.3.1. Terapija za liječenje depresivnih simptoma u shizofreniji

Liječenje depresije u shizofreniji uglavnom je fokusirano na osnovne depresivne simptome koje pacijent ima, kao i na lijekove i psihološke terapije koje prima. Važno je obratiti pažnju na nuspojave uzimanja lijeka ili pak njegovog pretjeranog uzimanja. Lijekovi mogu biti prilagođeni različitim dijagnozama pa se tako može smanjiti doza antipsihotika ukoliko potiče depresiju, zatim, mogu se dodatno uzimati antikolinergični lijekovi kako bi se spriječila akinezija. Ako su depresivni simptomi intrinzični akutnoj psihotičnoj epizodi, pravilan antipsihotik koji rješava simptome psihoze mogao bi utjecati i na depresiju bez uzimanja

antidepresiva (Mao i Zhang, 2015). Primjer toga jest lurasidone, atipični antipsihotik, koji se pokazao uspješnim u liječenju depresivnih simptoma shizofrenih bolesnika nevezano za početni stupanj ozbiljnosti simptoma (Nasrallah i sur., 2014). Međutim, u slučaju akutnog shizofrenog poremećaja, kombinacija antidepresiva ili litija ili elektrokonvulzivne terapije, mogla bi biti od pomoći. Osim lijekova, za perzistentne depresivne simptome i održavanje kontrole stalnog uzimanja lijeka, važna je i psihoterapija te obiteljska i društvena podrška. Psihoedukativne terapije tako pokazuju uspješnost u poboljšanju kliničkog tijeka bolesti, pridržavanja liječenja i psihosocijalnog funkcioniranja (Mao i Zhang, 2015).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada utvrditi je postoji li povezanost polimorfizama rs4680 i rs4818 gena *COMT* sa shizofrenijom, a posebice sa depresivnim simptomima u bolesnika sa shizofrenijom. U tu svrhu napraviti će se genotipska i haplotipska analiza *COMT* polimorfizama u kontrolnih ispitanika i pacijenata sa shizofrenijom, a depresivni simptomi u shizofrenih bolesnika evaluirati će se pomoću podljestvice za depresiju unutar Ljestvice težine pozitivnih i negativnih simptoma i Calgary ocjenskom ljestvicom težine depresije u shizofreniji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje obuhvaća 204 ispitanika, njih 108 sa dijagnozom shizofrenije, liječenih u Neuropsihijatrijskoj bolnici "Dr. Ivan Barbot" u Popovači ili u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, te 96 zdravih ispitanika. Za provedbu istraživanja dobivene su dopusnice Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Neuropsihijatrijske bolnice „Dr. Ivan Barbot“ u Popovači. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim smjernicama: Osnovama dobre kliničke prakse, Helsinškom deklaracijom (1964), Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

Dijagnoza shizofrenije utvrđena je od strane psihijatra nakon dijagnostičkog kliničkog intervjua prema ICD-10 (eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health*, WHO, 2010) i DSM-5 kriterijima (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fifth Edition, APA, 2013). PANSS je ocjenska ljestvica za procjenu težine psihopatologije u oboljelih od shizofrenije. Sastoji se od 30 osnovnih čestica kojima se procjenjuju tri glavne skupine simptoma: pozitivni simptomi (P1-P7, podljestvica pozitivnih simptoma), negativni simptomi (N1-N7, podljestvica negativnih simptoma) i opća psihopatološka podljestvica (G1-G16) (Kay i sur., 1987). Kod shizofrenih bolesnika evaluirani su i depresivni simptomi u shizofreniji pomoću podljestvice za depresiju (PANSS-D). PANSS-D podljestvica sastoji se od 4 točke: G1-zabrinutost o fizičkom zdravlju; G2- anksioznost; G3-osjećaj krivnje i G6-depresija (Kjelby i sur., 2011). Osim, PANSS-D podljestvice korištena je i Calgary ocjenska ljestvica težine depresije u shizofreniji (eng. *Calgary Depression Scale for Schizophrenia - CDSS*) (Addington i sur., 1990). CDSS je skala specijalno dizajnirana za procjenu razine depresivnih simptoma u shizofreniji. Sastoji se od 9 pitanja koja se boduju od 0-3. Prvih 8 pitanja postavljaju se ispitaniku, a deveto pitanje temelji se na zapažanjima i mišljenju ispitivača tijekom cjelokupnog razgovora (Addington i sur., 1990). Ako je potrebno tijekom ispitivanja postavljaju se potpitanja ili se daju dodatna objašnjenja. Pitanja se odnose na osjećaj depresivnog raspoloženja, beznadnosti, samoomalovažavanja, na osjećaj krivnje i patološke krivnje, na jutarnje depresivno raspoloženje, učestalost ranog buđenja i na razmišljanje o samoubojstvu. Devetim pitanjem procjenjuje se uočeno depresivno raspoloženje i cjelokupni depresivni aspekt ispitanika.

Tijekom kliničkog intervjua rađen je probir potencijalnih ispitanika u svrhu neključivanja osoba koje imaju od ranije ili aktualno dijagnosticiranu somatsku bolest u akutnoj fazi ili

somatsku bolest tipa maligne, autoimune ili upalne bolesti, te osobe koje su unatrag 3 mjeseca ili aktualno uzimale antidepresive. Svim potencijalnim kandidatima ukratko je objašnjena svrha i ciljevi istraživanja i njihov doprinos u istraživanju, nakon čega su pročitani informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Samo osobe koje su potpisale informirani pristanak uključene su u istraživanje. Uzorci krvi (8 ml) sakupljeni su u plastične epruvete s 2 ml antikoagulansa ACD (engl. Acid Citrate Dextrose - ACD) u 8 sati ujutro nakon noćnog posta, te pohranjeni na -20°C.

3.2. Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja

Tablica 1. Kemikalije potrebne za izolaciju DNA metodom isoljavanja

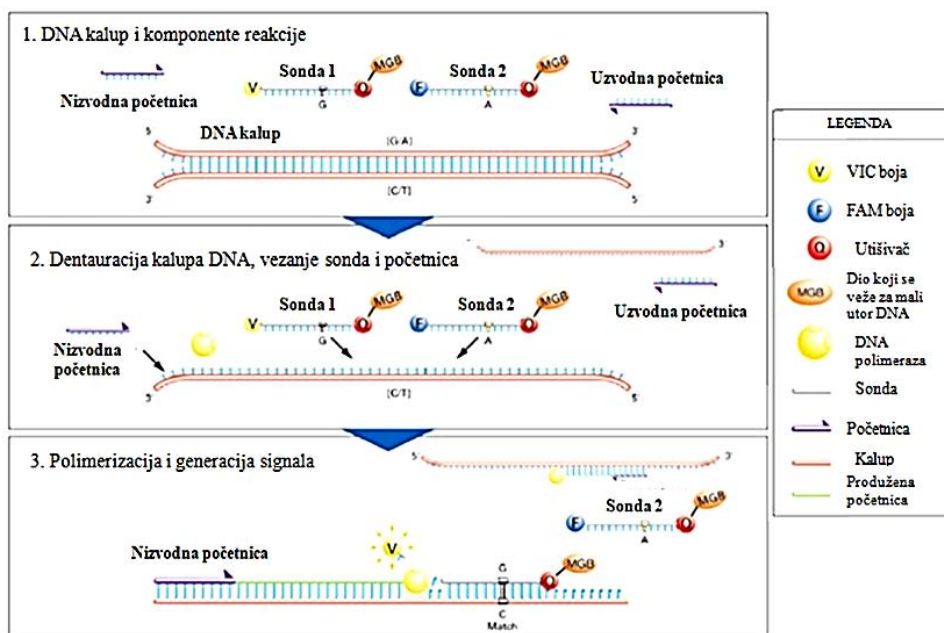
K	Pufer za lizu eritrocita (eng. <i>red cell lysis buffer</i> , RCLB pufer): 10 mM
E	Tris, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl (pH 7.6)
M	SE pufer (sodium EDTA): 75 mM NaCl, 25 mM Na ₂ EDTA (pH 8)
I	5 M NaCl
K	Proteinaza K (TaKaRa, 20 mg/ml)
A	SDS 10% (sodium dodecil sulfat)
L	Etanol 70%
I	Izopropanol
J	
E	1xTE pufer (Tris-EDTA): 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7,6)

Nakon odmrzavanja uzoraka krvi, stavlja ih se 15 min na valjkastu mješalicu odnosno roler kako bi se homogenizirali. U Eppendorf epruvete (1,5 ml) pipetom se stavlja 300 µl krvi i 900 µl ohlađenog RCLB pufera. Na vorteks miješalici uzorci se dobro promiješaju (12-20 s) te ih se ostavlja na ledu (10 min) kako bi se eritrociti lizirali. Zatim slijedi centrifugiranje uzoraka (13400 x g, 2 min, 4 °C). Lizirani eritrociti zaostaju u supernatantu, a leukociti se istalože. Pipetom se izvuče supernatant koji se baci, a talog se sačuva. Talogu se 3 puta dodaje 900 µl RCLB pufera kako bi se pročistio. Nakon pročišćavanja, na čisti talog dodaje se 1,5 µl proteinaze K, 300 µl SE pufera i 30 µl 10%-tnog SDS-a. Laganim pokretima ruke okrenu se Eppendorf epruvete kako bi se sadržaj izmiješao, te se stavlja u inkubaciju u termoblok (56 °C, 1,5-2 h uz miješanje (500 rpm)). Nakon inkubacije, uzorci se ohlade na sobnu temperaturu i dodaje se 250 µl 5M NaCl-a te ih se kratko izmješa na vorteks miješalicu. Zatim slijedi centrifugiranje (13 400 x g, 5 min, 4 °C). DNA zaostaje u supernatantu, a preostali stanični dijelovi u talogu. Talog se baca, a supernatant prelijeva u nove označene Eppendorf epruvete i dodaje mu se 800 µl hladnog izopropanola. Eppendorf epruvete se zatvore i okrenu nekoliko puta, dok se ne primjeti precipitat DNA. Kako bi se DNA istaložila, slijedi centrifugiranje (12 000 x g, 2 min, 4 °C). Supernatant se odlije i baca, a na talog se doda 250 µl 75%-tnog etanola.

Ponovno slijedi centrifugiranje (12 000 x g, 2 min), te se odlijeva supernatant, a Eppendorf epruvete se polože na papir kako bi se ocijedile te ih se zatim otvorene stavlja u termoblok na 15-30 min i pri 37 °C. Na talog se dodaje 100 µl TE pufera (pH 8,0) te se ostavi na sobnoj temperaturi preko noći ili sat vremena pri 37 °C kako bi se DNA otopila. Izolirana DNA pohrani se pri 4 °C.

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

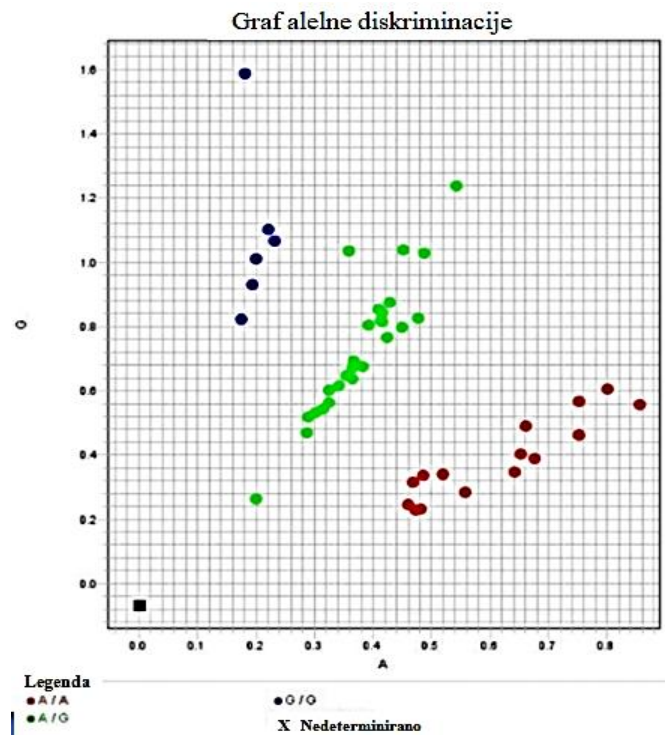
Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) u stvarnom vremenu (Real-time PCR) korištena je za određivanje genotipova ispitanika s obzirom na polimorfizme gena *COMT* (rs4680, rs4818). Za određivanje SNP-ova korišteni su komercijalno dostupni kompleti te uređaj „ABI Prism 7300 Sequence Detection System“ tvrtke Applied Biosystems (SAD). Real-time PCR ili Quantitative PCR kombinira PCR amplifikaciju i detekciju u jednom koraku. Uređaj koristi fluorescentne boje kako bi označio PCR produkte, a zatim mjeri akumulaciju fluorescentnog signala te uspostavlja brzu i preciznu kvantifikaciju PCR produkata i objektivnu analizu dobivenih podataka (Slika 10.) (<https://www.thermo fisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics.html>).



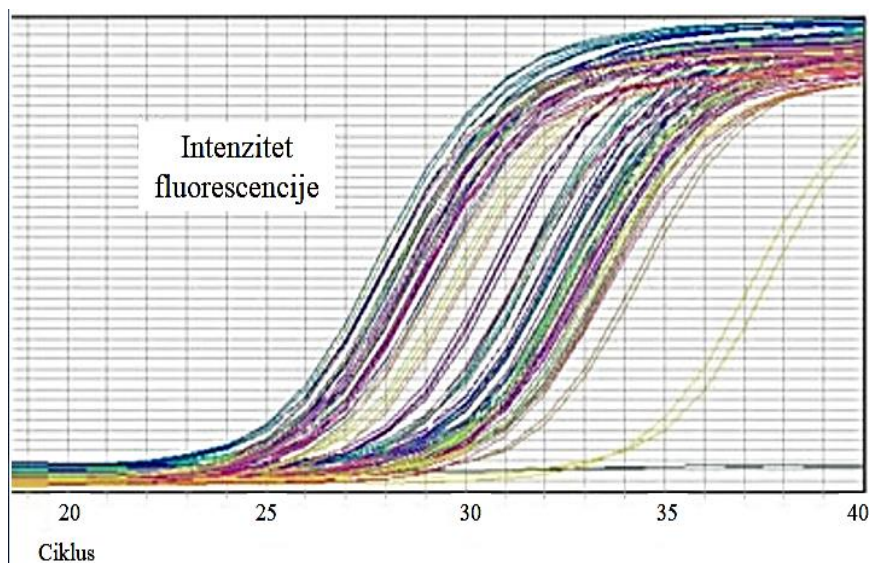
Slika 10. Shematski prikaz koraka metode Real-time PCR. Nakon denaturacije DNA, vežu se fluorescentno obilježene sonde i početnice. Slijedi umnažanje ciljanog odsječka DNA djelovanjem DNA polimeraze, te generacija fluorescentnog signala. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.

Uređaj fluorescenciju zabilježi kao signal, a ovisno o njegovoj jačini i vrsti određuje se genotip pojedinog uzorka. Ukoliko uređaj zabilježi fluorescenciju obje boje, riječ je o heterozigotnom genotipu. No, ukoliko je prisutna fluorescencija jedne od dviju boja onda to upućuje na homozigotnost jednog alela. Računalni program daje ispis razine fluorescenije za svaku boju, kao i konačni prikaz rezultata u obliku grafičkog prikaza (Slika 11.).

A)



B)



Slika 11. Prikaz rezultata genotipizacije ispitanika rs4680 gena *COMT* metodom Real-time PCR. **A)** Graf alelne diskriminacije **B)** Prikaz amplifikacijskih krivulja.

U ovome su radu, za određivanje genotipizacije polimorfizma jedne baze gena *COMT* metodom Real-time PCR, reakcije postavljene prema uvjetima navedenim u Tablici 2, dok su reakcijske smjese napravljene prema Tablici 3.

Tablica 2. Uvjeti reakcije za genotipizaciju polimorfizama gena *COMT* metodom Real-time PCR

KORAK	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
Početni korak	95°C	10 min	
Denaturacija	92°C	15 s	50
Vežanje i produljenje početnica	60°C	90 s	

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju polimorfizama gena *COMT* metodom Real-time PCR

SASTOJAK	VOLUMEN
Genomska DNA (1-20 ng) otopljena u vodi	4.5 µl
20 X TaqMan mješavina neoznačenih početnica i bojom označenih proba (VIC i FAM)	0.5 µl
TaqMan univerzalna matična mješavina	5 µl
Ukupni volumen	10 µl

3.4. Statistička obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni primjenom računalnog programa „GraphPad Prism“. Rezultati su prikazani kao brojevi i postotci, te kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Normalnost razdiobe podataka analizirana je primjenom D'Agostino-Pearson testa. Razlike između dvije skupine analizirane su Student t-testom u slučaju normalne raspodjele podataka ili primjenom Mann-Whitney U testa u slučaju kada podaci nisu bili normalno raspoređeni. Tri ili više skupina analizirano je jednostrukom analizom varijance (ANOVA) za normalnu razdiobu podataka ili Kruskal-Wallis testom kada nije bilo normalne raspodjele podataka. Ukoliko su ANOVA ili Kruskal-Wallis utvrdili značajne razlike između skupina, provodili su se post-hoc Tukey-ev test, odnosno Dunn-ov test, za usporedbu svake pojedine skupine sa svakom. Učestalost pojedinih genotipova, alela i haplotipova polimorfizama gena *COMT* između različitih skupina uspoređena je pomoću Fisherovog testa odnosno χ^2 -testa. χ^2 -test koristio se i za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Razina značajnosti α za sve analize postavljena je na 0,05. Istraživani polimorfizmi nalaze se unutar istog gena i u literaturi postoje mnoga istraživanja koja iznose podatke koji povezuju polimorfizme u zavisian odnos odnosno tvrde da između njih postoji neravnoteža udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD). Stoga je korišten program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) koji za određivanje neravnoteže udruživanja koristi koeficijent D'. Haplotipska analiza poslužila je za utvrđivanje najučestalih haplotipova u uzroku te za usporedbu učestalosti pojedinih haplotipova između kontrolne skupine i pacijenata sa shizofrenijom.

4. REZULTATI

Ukupno 204 ispitanika, od čega 173 muškaraca i 31 žena uključeno je u istraživanje. Od toga, 108 ispitanika bili su pacijenti sa dijagnozom shizofrenije (78 muškaraca i 30 žena), a njih 96 bili su kontrolni ispitanici (95 muškaraca i 1 žena). Kao što je prikazano u Tablici 4., raspodjela osoba po spolu značajno se razlikovala između kontrolnih i shizofrenih ispitanika ($P < 0,0001$; Fisher's exact test), jer je u skupini pacijenata sa shizofrenijom bilo značajno više žena, dok su u kontrolnoj skupini prevladavali muškarci. Prosječna dob ispitanika sa shizofrenijom bila je $45,69 \pm 9,556$, dok je prosječna dob kontrolnih ispitanika bila $52,58 \pm 11,96$ (srednja vrijednost \pm standardna devijacija). Podaci o dobi između kontrolnih i shizofrenih ispitanika uspoređeni su Student t-testom, koji je utvrdio da su se ove dvije skupine značajno razlikovale po dobi ($P < 0,0001$, Student t-test), odnosno da je skupina bolesnika sa shizofrenijom bila značajno mlađa od kontrolne skupine (Tablica 4.). S obzirom na pušački status, 57 (59,37%) kontrolnih ispitanika bili su nepušači, dok ih je 39 (40,63%) pušilo. U skupini pacijenata sa shizofrenijom 53 (49,07%) ispitanika bili su nepušači, a 55 (50,93%) osoba je pušilo. Fisher's exact test nije utvrdio značajne razlike ($P=0,1604$; Fisher's exact test) između pacijenata sa shizofrenijom i kontrolne skupine u raspodjeli prema pušačkom statusu na pušače i nepušače (Tablica 4.). Kao što se može vidjeti u Tablici 4., prosječni indeks tjelesne mase (BMI) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) kontrolnih osoba bio je $31,13 \pm 25,21$, dok je BMI pacijenata sa shizofrenijom bio $28,38 \pm 4,68$, te nisu utvrđene statistički značajne razlike između njih ($P=0,4771$; Mann Whitney test).

Tablica 4. Demografski podaci ispitanika.

	Kontrolni ispitanici	Pacijenti s shizofrenijom	
Ukupan broj N	96	108	/
Muškarci N (%)	95 (98,96%)	78 (72,22%)	P < 0,0001; Fisher's exact test
Žene N (%)	1 (1,04%)	30 (27,78%)	
Dob (godine)	$52,58 \pm 11,96$	$45,69 \pm 9,556$	P < 0,0001 , Student t-test
Pušači N (%)	39 (40,63%)	55 (50,93%)	P=0,1604; Fisher's exact test
Nepušači N (%)	57 (59,37%)	53 (49,07%)	
BMI	$31,13 \pm 25,21$	$28,38 \pm 4,68$	P=0,4771 Mann Whitney test

Od svih ispitanika prikupljeni su uzorci krvi te izolirana DNA, koja je poslužila za genotipizaciju polimorfizama rs4818 i rs4680 gena *COMT*. Učestalosti opaženih genotipova polimorfizama rs4818 i rs4680 bile su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom u kontrolnoj skupini, kao i skupini shizofrenih pacijenata (Tablica 5.).

Tablica 5. Dobivene i očekivane vrijednosti za genotipove polimorfizma rs4818 i rs4680.

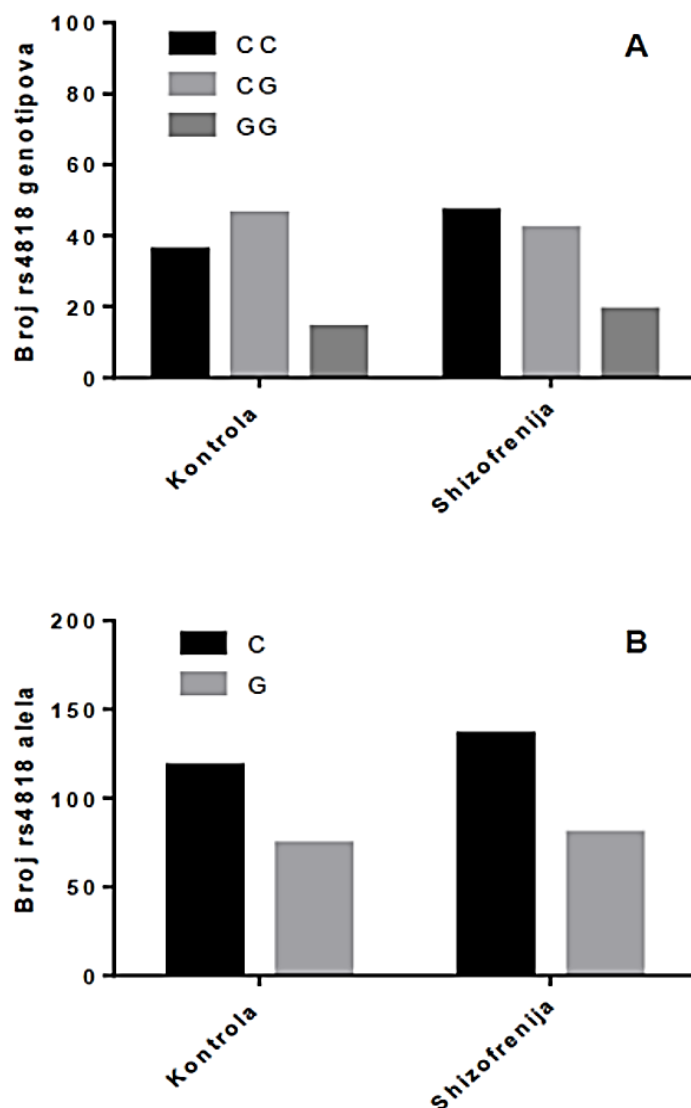
Genotipovi rs4818		CC	CG	GG	
Kontrola	Dobiveno	36	46	14	P=0,9107; χ^2 -test
	Očekivano	36,3	45,5	14,3	
Shizofrenija	Dobiveno	47	42	19	P=0,0842; χ^2 -test
	Očekivano	42,8	50,4	14,8	
Genotipovi rs4680		AA	AG	GG	
Kontrola	Dobiveno	28	43	25	P=0,3115; χ^2 -test
	Očekivano	25,5	48	22,5	
Shizofrenija	Dobiveno	29	47	32	P=0,1802; χ^2 -test
	Očekivano	25,5	54	28,5	

Ukoliko je $p < 0,05$ rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom.

Kao što se može vidjeti u Tablici 6. i na Slici 12., raspodjela genotipova polimorfizma rs4818 ($P=0,4280$; χ^2 -test) nije se značajno razlikovala između kontrolnih i shizofrenih ispitanika. Nadalje, u raspodjeli pojedinih alela polimorfizama rs4818 ($P=0,7600$; Fisher's exact test) također nisu utvrđene značajne razlike između kontrolne skupine i skupine ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 6. Brojnost i frekvencije genotipova i alela za polimorfizam rs4818 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

N(%)	CC	CG	GG	C	G
Kontrola	36 (37,50)	46 (47,92)	14 (14,58)	118 (61,46)	74 (38,54)
Shizofrenija	47 (43,52)	42 (38,89)	19 (17,59)	136 (62,96)	80 (37,04)
	P=0,4280; χ^2 -test			P=0,7600; Fisher's exact test	



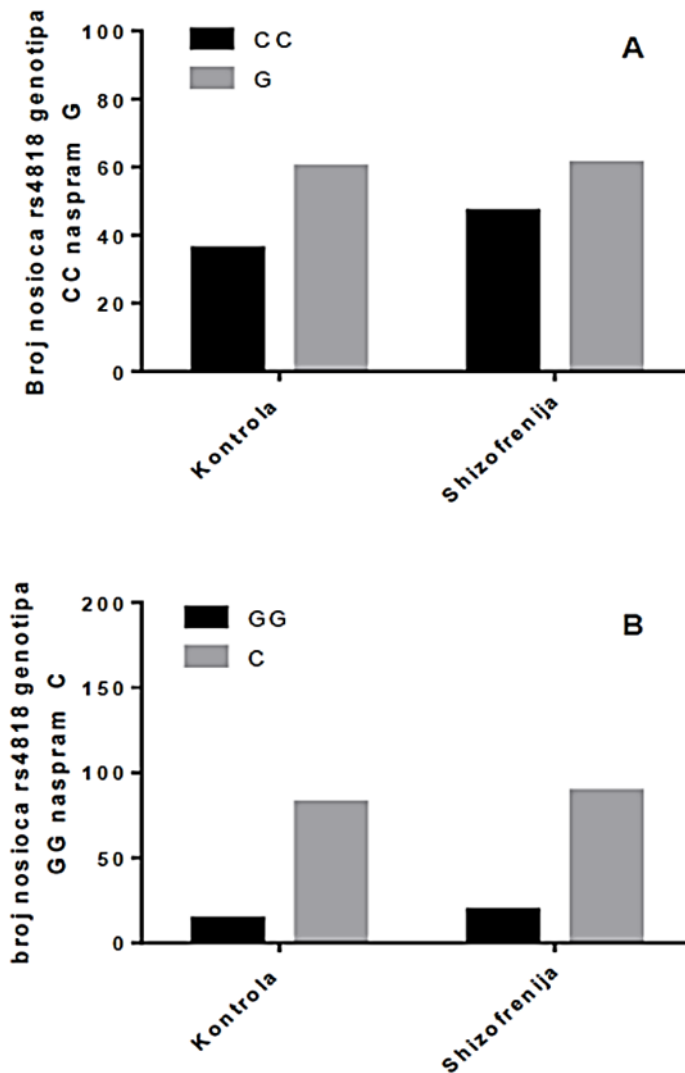
Slika 12. Raspodjela genotipova (A) i alela (B) za *COMT* polimorfizam rs4818 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

Kada su ispitanici podijeljeni na nosioce genotipa CC i alela G ($P=0,3955$; Fisher's exact test) ili na nosioce genotipa GG i alela C ($P=0,5748$; Fisher's exact test) polimorfizma rs4818 nisu utvrđene značajne razlike između kontrolnih i shizofrenih ispitanika (Tablica 7., Slika 13.).

Kao što se može vidjeti u Tablici 8. i Slici 14., raspodjela genotipova polimorfizma rs4680 ($P=0,8393$; χ^2 -test) nije se značajno razlikovala između kontrolnih i shizofrenih ispitanika. U raspodjeli pojedinih alela polimorfizma rs4680 ($P=0,6200$; Fisher's exact test) nisu utvrđene značajne razlike između kontrolne skupine i ispitanika sa shizofrenijom (Tablica 8., Slika 14.).

Tablica 7. Brojnost i frekvencije nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela G i nosioca genotipa GG u odnosu na nosioce alela C za polimorfizam rs4818 u grupi kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

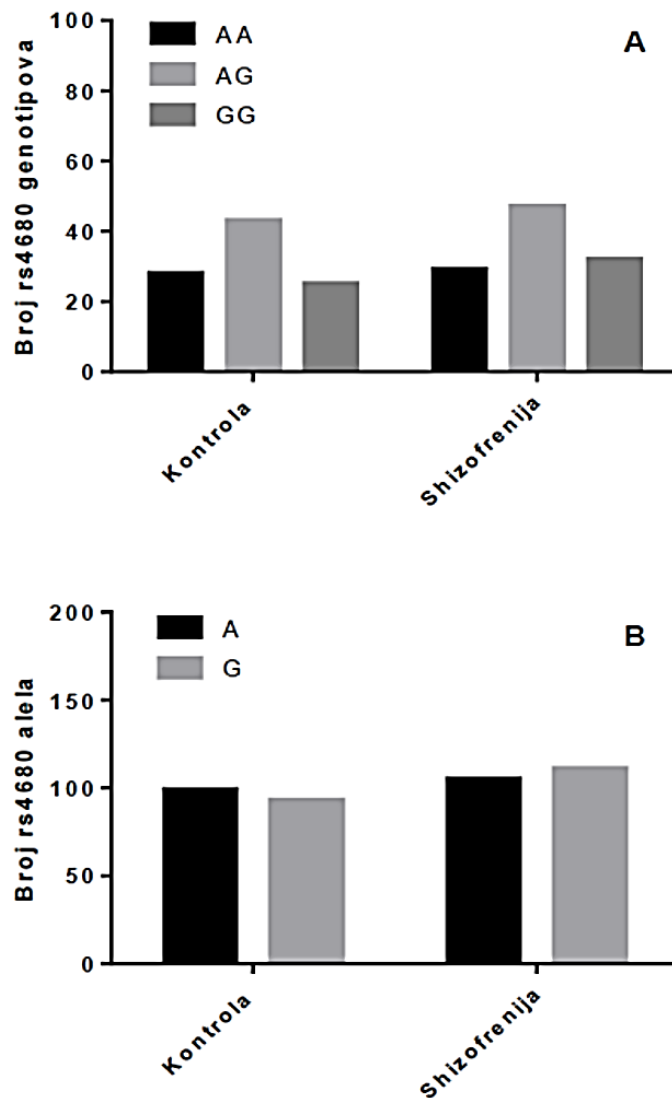
N (%)	Nosioci CC	Nosioci G	Nosioci GG	Nosioci C
Kontrola	36 (37,50)	60 (62,50)	14 (14,58)	82 (85,42)
Shizofrenija	47 (43,52)	61 (56,48)	19 (17,59)	89 (82,41)
	P=0,3955; Fisher's exact test		P=0,5748; Fisher's exact test	



Slika 13. Raspodjela nosioca CC naspram G (A) i nosioca GG naspram C (B) za *COMT* polimorfizam rs4818 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

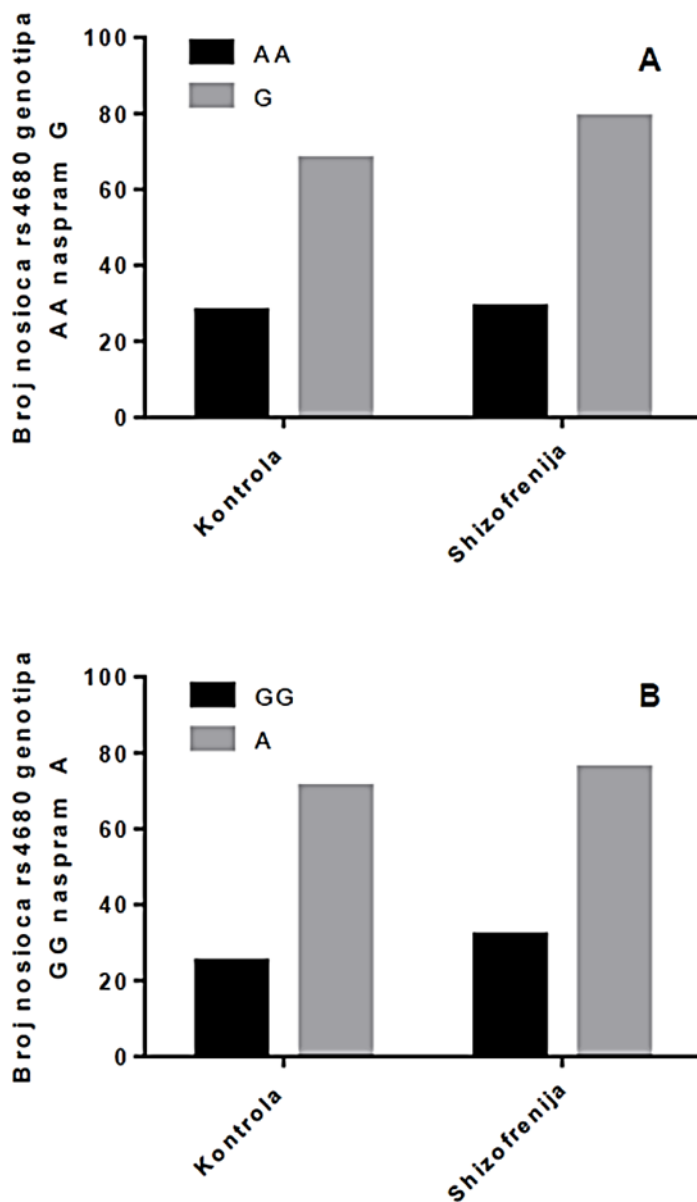
Tablica 8. Brojnost i frekvencije genotipova i alela za polimorfizam rs4680 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

N(%)	AA	AG	GG	A	G
Kontrola	28 (29,17)	43 (44,79)	25 (26,04)	99 (51,56)	93 (48,44)
Shizofrenija	29 (26,85)	47 (43,25)	32 (29,63)	105 (48,61)	111 (51,39)
	P=0,8393; χ^2 -test			P=0,6200; Fisher's exact test	



Slika 14. Raspodjela genotipova (A) i alela (B) za *COMT* polimorfizam rs4680 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

Kao što je prikazano u Tablici 9. i Slici 15., u slučaju kada su ispitanici podijeljeni na nosioce genotipa AA i nosioce alela G ($P=0,7559$; Fisher's exact test) ili na nosioce genotipa GG i nosioce alela A ($P=0,6399$; Fisher's exact test) polimorfizma rs4680 nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolne skupine i pacijenata sa shizofrenijom.

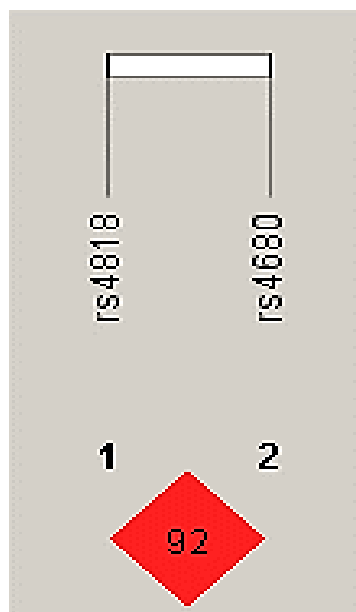


Slika 15. Raspodjela nosioca AA naspram G (A) i nosioca GG naspram A (B) za *COMT* polimorfizam rs4680 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 9. Brojnost i frekvencije nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela G i nosioca genotipa GG u odnosu na nosioce alela A za polimorfizam rs4680 u grupi kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.

N (%)	Nosioci AA	Nosioci G	Nosioci GG	Nosioci A
Kontrola	28 (29,17)	68 (70,83)	25 (26,04)	71 (73,96)
Shizofrenija	29 (26,85)	79 (73,15)	32 (29,63)	76 (70,37)
	P=0,7559; Fisher's exact test		P=0,6399; Fisher's exact test	

Programom „Haploview version 4.2“ utvrdili smo haplotipski blok polimorfizama rs4818 i rs4680 gena COMT u svih ispitanika. Za navedene polimorfizme utvrđen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD) (Slika 16.), gdje LD vrijednost iznosi 92, što upućuje da se ova dva polimorfizma vrlo vjerojatno nasljeđuju zajedno u bloku.



Slika 16. Prikaz LD vrijednosti (LD=92) između polimorfizama rs4818 i rs4680 gena *COMT* dobiven pomoću programa Haploview u svih ispitanika (izvorna slika).

Haplotipskom analizom utvrđena su 4 najčešća haplotipa u ispitivanom uzorku (CA, GG, CG i GA), i kao što je prikazano u Tablici 10. utvrđena je značajna razlika u učestalosti haplotipa CG ($P=0.0436$, χ^2 -test) između kontrolne skupine i skupine ispitanika sa shizofrenijom.

Tablica 10. Učestalost haplotipova za polimorfizme rs4818 i rs4680 gena *COMT* u skupini kontrolnih ispitanika i bolesnika sa shizofrenijom.

Haplotip	Kontrolni ispitanici	Bolesnici sa shizofrenijom	
CA	0,514	0,466	$\chi^2=0,913$; $P=0,3392$
GG	0,389	0,346	$\chi^2=0,801$; $P=0,3708$
CG	0,096	0,163	$\chi^2=4,07$; $P=0,0436$
GA	0,002	0,025	$\chi^2=3,75$; $P=0,0528$

Vrijednosti su prikazane kao učestalost (frekvencija) pojavljivanja i uspoređene χ^2 -testom.

Tablica 11. Kliničke osobine pacijenata sa shizofrenijom.

Dob početka bolesti (godine)	24,66 ± 8,65
Broj hospitalizacija	7,39 ± 8,48
PANSS ljestvica (ukupni broj bodova)	66,84 ± 15,80
PANSS pozitivna podljestvica (broj bodova)	12,43 ± 4,35
PANSS negativna podljestvica (broj bodova)	20,84 ± 5,75
PANSSS ljestvica opće psihopatologije (broj bodova)	33,57 ± 7,77
PANSS-D podljestvica (broj bodova)	7,52 ± 2,84
CDSS ljestvica (broj bodova)	2,42 ± 3,06
Refrakterni na terapiju N(%)	19 (17,59)
Pokušaj suicida N(%)	28 (25,93)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili kao broj i postotak.

U Tablici 11. prikazane su kliničke osobine pacijenata sa shizofrenijom, kao što su prosječna dob početka bolesti (24,66 ± 8,65), prosječan broj hospitalizacija (7,39 ± 8,48), prosječan ukupan broj bodova na PANSS ljestvici (66,84 ± 15,80), prosječan broj bodova na PANSS pozitivnoj podljestvici (12,43 ± 4,35), PANSS negativnoj podljestvici (20,84 ± 5,75), PANSS

ljestvici opće psihopatologije ($33,57 \pm 7,77$), PANSS–D podljestvici ($7,52 \pm 2,84$), CDSS ljestvici ($2,42 \pm 3,06$), kao i broj pacijenata refrakternih na terapiju (19, 17,59%) i broj pacijanata koji su pokušali suicid (28, 25,93%).

Kada su ispitanici sa shizofrenijom podijeljeni prema genotipu rs4818 polimorfizma nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom broju bodova na PANSS–D ljestvici, ali je utvrđena statistički značajna razlika ($P=0,0188$; Kruskal-Wallis test) u simptomu Osjećaj krivnje na PANSS–D ljestvici (Tablica 12.). Naime, nosioci CG imali su značajno manji broj bodova ($P=0,0152$; Dunn's multiple comparisons test) za taj simptom u odnosu na nosioce GG genotipa.

Tablica 12. Ukupan broj bodova na PANSS–D ljestvici i na pojedinim simptomima PANSS–D ljestvice u ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih prema genotipu *COMT* rs4818 polimorfizma.

Bodovi na PANSS–D podljestvici	CC	CG	GG	
Ukupan broj	$7,787 \pm 3,071$	$6,929 \pm 2,645$	$8,158 \pm 2,522$	$P=0,1252$; Kruskal-Wallis test
Zabrinutost o fizičkom zdravlju	$2,021 \pm 1,189$	$1,619 \pm 0,936$	$2,053 \pm 0,911$	$P=0,0861$; Kruskal-Wallis test
Anksioznost	$2,213 \pm 0,883$	$2,214 \pm 1,001$	$2,421 \pm 0,838$	$P=0,4546$; Kruskal-Wallis test
Osjećaj krivnje	$1,532 \pm 0,997$	$1,310 \pm 0,8968$	$1,737 \pm 0,806$	$P=0,0188$; Kruskal-Wallis test $P=0,0152$; CG vs. GG; Dunn-ov test multiple komparacije
Depresija	$2,021 \pm 1,151$	$1,786 \pm 1,025$	$1,947 \pm 0,970$	$P=0,5480$; Kruskal-Wallis test

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Vezano za polimorfizam rs4680, nije bilo značajnih razlika u ukupnim bodovima na PANSS–D ljestvici, kao niti u bodovima za pojedine simptome na PANSS–D ljestvici između ispitanika sa shizofrenijom koji su nosili AA, AG i GG genotipove (Tablica 13.).

Tablica 13. Ukupan broj bodova na PANSS–D ljestvici i na pojedinim simptomima PANSS–D ljestvice u ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih prema genotipu *COMT* rs4680 polimorfizma.

Bodovi na PANSS-D podljestvici	AA	AG	GG	
Ukupan broj	7,862 ± 3,009	7,383 ± 2,817	7,406 ± 2,769	P=0,7281; Kruskal-Wallis test
Zabrinutost o fizičkom zdravlju	1,931 ± 1,280	1,830 ± 1,049	1,875 ± 0,871	P=0,8404; Kruskal-Wallis test
Anksioznost	2,310 ± 0,891	2,319 ± 0,980	2,094 ± 0,856	P=0,598; Kruskal-Wallis test
Osjećaj krivnje	1,586 ± 1,119	1,362 ± 0,819	1,563 ± 0,914	P=0,4516; Kruskal-Wallis test
Depresija	2,034 ± 1,210	1,872 ± 1,055	1,875 ± 0,975	P=0,9115; Kruskal-Wallis test

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Za rs4818 polimorfizam nije bilo značajnih razlika u ukupnom broju bodova na CDSS ljestvici, kao niti u broju bodova za pojedine simptome na CDSS ljestvici u ispitanika sa shizofrenijom sa CC, CG i GG genotipom (Tablica 14.).

Tablica 14. Broj bodova na CDSS ljestvici (ukupan i po pojedinim simptomima) u ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih prema genotipu *COMT* rs4818 polimorfizma.

CDSS bodovi	CC	CG	GG	
Ukupan broj	2,426 ± 3,174	2,214 ± 2,728	2,842 ± 3,563	P=0,8244; Kruskal-Wallis test
Depresija	0,468 ± 0,687	0,452 ± 0,593	0,474 ± 0,772	P=0,9763; Kruskal-Wallis test
Beznadnost	0,362 ± 0,605	0,357 ± 0,759	0,316 ± 0,582	P=0,8114; Kruskal-Wallis test
Samoomalovažavanje	0,362 ± 0,764	0,309 ± 0,563	0,474 ± 1,020	P=0,9851; Kruskal-Wallis test
Osjećaj krivnje	0,064 ± 0,323	0,048 ± 0,215	0,263 ± 0,806	P=0,5396; Kruskal-Wallis test
Patološka krivnja	0,213 ± 0,463	0,190 ± 0,505	0,316 ± 0,478	P=0,3525; Kruskal-Wallis test
Jutarnja depresija	0,425 ± 0,744	0,309 ± 0,643	0,368 ± 0,684	P=0,7627; Kruskal-Wallis test
Rano buđenje	0,106 ± 0,477	0,214 ± 0,565	0,158 ± 0,375	P=0,3042; Kruskal-Wallis test
Samoubojstvo	0,064 ± 0,247	0,072 ± 0,261	0,000 ± 0,000	P=0,5046; Kruskal-Wallis test
Uočena depresija	0,362 ± 0,529	0,262 ± 0,445	0,474 ± 0,612	P=0,3929; Kruskal-Wallis test

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Kada su ispitanici sa shizofrenijom podijeljeni prema genotipu rs4680 polimorfizma nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom broju bodova na CDSS ljestvici, no utvrđena je statistički značajna razlika (P=0,0475; Kruskal-Wallis test) u simptomu Rano buđenje na CDSS ljestvici (Tablica 15.). Naime, nosioci AA imali su značajno manji broj bodova (P=0,0412; Dunn's multiple comparisons test) za taj simptom u odnosu na nosioce AG genotipa.

Tablica 15. Broj bodova na CDSS ljestvici (ukupan i po pojedinim simptomima) u ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih prema genotipu *COMT* rs4680 polimorfizma.

CDSS bodovi	AA	AG	GG	
Ukupan broj	2,517 ± 3,377	2,340 ± 2,823	2,438 ± 3,192	P=0,9952; Kruskal-Wallis test
Depresija	0,448 ± 0,736	0,447 ± 0,619	0,500 ± 0,672	P=0,8455; Kruskal-Wallis test
Beznadnost	0,414 ± 0,682	0,383 ± 0,709	0,250 ± 0,568	P=0,5253; Kruskal-Wallis test
Samoomalovažavanje	0,517 ± 0,911	0,277 ± 0,540	0,344 ± 0,827	P=0,5105; Kruskal-Wallis test
Osjećaj krivnje	0,069 ± 0,258	0,042 ± 0,292	0,187 ± 0,644	P=0,3633; Kruskal-Wallis test
Patološka krivnja	0,241 ± 0,577	0,191 ± 0,449	0,250 ± 0,440	P=0,7081; Kruskal-Wallis test
Jutarnja depresija	0,414 ± 0,733	0,362 ± 0,705	0,344 ± 0,653	P=0,9258; Kruskal-Wallis test
Rano buđenje	0,000 ± 0,000	0,234 ± 0,560	0,187 ± 0,592	P=0,0475 ; Kruskal-Wallis test P=0,0412 ; AA vs. AG Dunn's multiple comparisons test
Samoubojstvo	0,034 ± 0,186	0,064 ± 0,247	0,062 ± 0,246	P=0,8466; Kruskal-Wallis test
Uočena depresija	0,379 ± 0,561	0,340 ± 0,479	0,312 ± 0,535	P=0,8554; Kruskal-Wallis test

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

5. RASPRAVA

5.1. Demografski i klinički podaci

U istraživanje je uključeno 204 ispitanika, od toga 173 muškarca i 31 žena. Ovaj relativno mali broj uključenih ispitanika, posebice za genetske studije, predstavlja nedostatak ovog istraživanja. Primjećena je značajna razlika raspodjele osoba po dobi i spolu između kontrolne skupine i shizofrenih ispitanika, što je potencijalno moglo utjecati na rezultate. Naime, u skupini pacijenata sa shizofrenijom bilo je značajno više žena, dok su u kontrolnoj skupini prevladavali muškarci. Također kontrolna skupina bila je značajno starija od skupine bolesnika sa shizofrenijom. S obzirom na ove nedostatke našeg istraživanja, u budućim studijama treba bolje uskladiti istraživane skupine. U ostalim istraženim parametrima (pušenje i BMI) nije uočena značajna razlika između pacijenata sa shizofrenijom i kontrolne skupine. Nadalje, analizom kliničkih osobina ispitanika sa shizofrenijom možemo zaključiti da su relativno mladi, ali da već imaju značajan broj hospitalizacija. Također, iako imaju relativno velik broj ukupnih bodova na PANSS ljestvici kao i na PANSS pozitivnoj i negativnoj te podljestvici za opću psihopatologiju, uključeni shizofreni bolesnici imaju relativno mali ukupan broj bodova na PANSS-D i CDSS ljestvicama za depresiju kao i nevelik broj pokušaja suicida. Relativno niska razina depresivnih simptoma u uključenih shizofrenih bolesnika možda se može objasniti njihovom mladom dobi i činjenicom da ih većina dobro odgovara na terapiju.

Za svaki od istraženih polimorfizama (rs4818 i rs4680) provjerena je učestalost genotipova u kontrolnoj i skupini shizofrenih pacijenata te je uočeno da su učestalosti opaženih genotipova polimorfizama bile su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (HWE). Testiranje skladnosti uzoraka s HWE obično se koristi kako bi se kontrolirala kvaliteta genotipizacije velikih uzoraka, odnosno ona tvrdi da su frekvencije gena i genotipova u velikoj populaciji u kojoj dolazi do slučajnog parenja, stalne. Glavni razlozi zbog kojih bi moglo doći do odstupanja od HWE-e jesu stratifikacija populacije (Wang i Shete., 2017), genetički drift (Freedman i sur., 2004), pogreška u genotipizaciji (Chen i sur., 2017) i prirodna selekcija (Lachance, 2009). Kada bi došlo do takvog odstupanja, ono bi moglo biti posljedica bolesti u cijeloj populaciji, te bi ukazivalo na heterogenu genetičku osnovu bolesti (Nielsen i sur., 1999).

5.2. Polimorfizam rs4680

U područjima mozga gdje je količina dopaminskog prijenosnika niska (npr. prefrontalna kora), COMT razgrađuje dopamin i time ima glavnu ulogu u njegovoj regulaciji (Bhakta i sur., 2012). U eksonu 4 gena *COMT*, nalazi se visoko funkcionalni polimorfizam rs4680 (Weinshilboum i sur., 1999) u kojem dolazi do zamjene adenina gvaninom, što rezultira u zamjeni aminokiseline

Val, aminokiselinom Met (Val^{108/158}Met) (Zivkovic i sur., 2013). Ovaj polimorfizam mijenja aktivnost enzima tako što je Met alel termolabilan i puno nestabilniji od Val alela (Nikolac Perkovic i sur., 2017). Neke studije povezuju rs4680 polimorfizam sa shizofrenijom (González-Castro i sur., 2016; Egan i sur., 2001; Voisey i sur., 2012; Wonodi i sur., 2003), dok neke druge ne potvrđuju tu asocijaciju (Munafò i sur., 2005; Nikolac i sur., 2013; Chen i sur. 2004; Fan i sur., 2005; Galderisi i sur. 2005; Park i sur., 2002; Martorell i sur., 2008). U skladu sa studijama koje nisu utvrdile povezanost rs4680 polimorfizma sa shizofrenijom su i rezultati ovog rada koji pokazuju da se raspodjela genotipova kao i raspodjela pojedinih alela polimorfizma rs4680 nije značajno razlikovala između ispitanika sa shizofrenijom i kontrolne skupine. Kada su ispitanici sa shizofrenijom podijeljeni prema genotipu rs4680 polimorfizma nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom broju bodova na PANSS–D ljestvici, kao ni u bodovima za pojedine simptome na istoj ljestvici. No, testiranjem primjenom CDSS ljestvice utvrđena je statistički značajna razlika između nosioca različitih genotipova rs4680 polimorfizma u broju bodova za depresivni simptom Rano buđenje, što dovodi polimorfizam rs4680 (genotip AA) u povezanost sa simptomom depresije kod shizofrenih bolesnika. Iako pretraživanjem nisu pronađene studije koje bi istraživale povezanost polimorfizama rs4680 i depresivnih simptoma u shizofreniji, nekoliko autora provelo je istraživanja koja dovode u korelaciju negativne simptome shizofrenije s polimorfizmom rs4680. Negativni simptomi se u određenoj mjeri poklapaju sa depresivnim simptomima (npr. anhedonija, abulija, alogija, manjak motivacije, avolicija i socijalna povučенost) (Samsom i Wong 2015), stoga se između njih može povući paralela. Pelayo-Teran i suradnici (2008) su na uzorku od 169 oboljelih od shizofrenije proučavali odnos Val¹⁵⁸Met polimorfizma i kliničkih karakteristika u prvoj psihotičnoj epizodi te su pronašli korelaciju kod pacijenata s Val¹⁵⁸ homozigotnim genotipom i višim stupnjem ozbiljnosti negativnih simptoma na početku bolesti. Također, Stefanis i suradnici (2004) pronašli su povezanost Val¹⁵⁸ alela i negativnog shizotipa u velikom uzorku (543 mlada muškarca) nepsihotičnih pacijenata. Oprečno tim istraživanjima, Chen i suradnici (2011) istraživali su asocijaciju rs4680 te nekih drugih polimorfizama i psihopatoloških simptoma kod 224 Kineza. Koristili su PANSS ljesticu u svom istraživanju te nisu pronašli značajnu razliku u učestalosti alela ili genotipa između shizofrenih pacijenata i kontrolnih ispitanika. Razlog tome može biti što su Chen i suradnici (2011) istraživanje provodili na ljudima žute rase, dok su Pelayo-Teran i suradnici (2008) te Stefanis i suradnici (2004) svoje istraživanje bazirali na bijeloj populaciji.

5.3. Polimorfizam rs4818

Polimorfizam rs4188 gena *COMT* je polimorfizam u kojem dolazi do supstitucije citozina i gvanina na kodonu 86 *S-COMT*-a ili kodonu 136 *MB-COMT*-a, što rezultira zadržavanjem leucina u proteinskoj sekvenci. Varijanta G alela *COMT* rs4818 polimorfizma povezuje se sa većom aktivnosti *COMT*-a, a posljedično time manjom prefrontalnom koncentracijom dopamina (Roussos i sur., 2008). Polimorfizam rs4818 odgovoran je za veću varijaciju aktivnosti *COMT*-a, nego *COMT* rs4860 polimorfizam (Nackley i sur., 2006). Neke studije ne povezuju rs4818 polimorfizam sa shizofrenijom (Chen i sur., 2011; Li i sur., 2012), dok neke pronalaze asocijaciju s negativnim simptomima shizofrenije ukoliko se rs4818 nalazi u haplotipu s polimorfizmom rs740603/G alel (Li i sur., 2012.). U skladu sa ranijim istraživanjima koja nisu utvrdila povezanost rs4818 polimorfizma sa shizofrenijom, rezultati ovog rada pokazuju da se raspodjela pojedinih alela i genotipova polimorfizma rs4818 ne razlikuju značajno između ispitanika sa shizofrenijom i kontrolne skupine. Testiranjem ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih prema genotipu rs4818 polimorfizma nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom broju bodova na PANSS–D ljestvici. Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika između shizofrenih bolesnika koji su nosili različite genotipove rs4818 polimorfizma u broju bodova za depresivni simptom Osjećaj krivnje na istoj ljestvici. Polimorfizam rs4818 (genotip CG) može se stoga povezati sa jednim od depresivnih simptoma shizofrenije (Osjećaj krivnje). Testiranjem shizofrenih pacijenata primjenom CDSS ljestvice nije pronađena značajna razlika u broju bodova za pojedine depresivne simptome ili sveukupnom broju bodova na CDSS ljestvici. Premda izravna povezanost polimorfizma rs4818 i depresivnih simptoma u shizofreniji dosad nije istražena, neke studije obuhvatile su povezanost rs4818 polimorfizma i negativnih simptoma shizofrenije, koji se dovode u vezu sa depresivnim simptomima. Li i suradnici (2012) istraživali su asocijaciju polimorfizama gena *COMT* i negativnih simptoma u shizofreniji na uzorku od 284 pripadnika žute rase. Za određivanje psihopatologije pacijenata koristili su PANSS ljestvicu. Polimorfizam rs4818 povezali su u slabu asocijaciju s negativnim simptomima shizofrenije ($p=0.054$), no nije otkriven značajan doprinos polimorfizma rs4818 za razvitak shizofrenije. Slične rezultate dobile su i neke druge studije koje su uključivale ispitanike žute rasi prilikom istraživanja asocijacije *COMT* gena i shizofrenije (Tsai i sur., 2004; Yu i sur., 2007; Chen i sur., 2011). Sagud i suradnici (2018) istraživali su genotipsku i haplotipsku povezanost rs4680 i rs4818 polimorfizama gena *COMT* u shizofreniji otpornoj na terapiju. Na uzorku od 270 shizofrenih pacijenata, bijele rase i Europskog podrijetla, nisu pronašli značajnu genotipsku asocijaciju polimorfizma rs4818 i shizofrenije.

5.4. Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena *COMT*

U istraživanjima Hoenicke i suradnika (2010) i Sagud i suradnika (2018) pokazano je da su polimorfizmi rs4680 i rs4818 u neravnoteži udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD). Naime, za neke lokuse smatra se da su u LD-u kada je frekvencija asocijacije njihovih različitih alela veća ili manja u odnosu na očekivano kada bi lokusi bili nezavisni i povezani nasumično. Rezultati ovog istraživanja utvrđuju visok stupanj neravnoteže udruživanja polimorfizama rs4680 i rs4818, što upućuje da se ova dva *COMT* polimorfizma vrlo vjerojatno nasljeđuju zajedno u haplobloku. Iste rezultate dobili su i Hirasawa-Fujita i suradnici (2018), odnosno utvrdili su da se polimorfizmi rs4680 i rs4818 nasljeđuju u istom haplobloku. Haplotipskom analizom u ovom istraživanju utvrđena su 4 najčešća haplotipa u ispitivanom uzorku te je utvrđena značajna razlika u učestalosti haplotipa CG između shizofrenih pacijenata i kontrolnih ispitanika odnosno utvrđena je povezanost haplotipa CG sa shizofrenijom. Wang i suradnici (2010) istraživali su asocijaciju *COMT* gena i negativnih simptoma u kroničnoj shizofreniji. Na uzorku od 290 nesrodnih shizofrenih pacijenata proveli su testiranje PANSS ljestvicom. U skladu s našim rezultatima, istraživanjem različitih haplotipova pronašli su značajnu asocijaciju haplotipa rs4633-rs4680 i negativnih simptoma shizofrenije. Slično istraživanje proveli su i Li i suradnici (2012) gdje su testirali povezanost haplotipa i negativnih simptoma kod 284 shizofrenih pacijenata te su otkrili asocijaciju haplotipa rs740603(G)-rs4818(G) i negativnih simptoma shizofrenije, pogotovo u ženskih pacijentica. U navedenim studijama, koje su u istraživanju haplotipova uključile i neki od polimorfizama rs4680 i rs4818 istraživanih u ovome radu, primjećena je povezanost sa negativnim simptomima shizofrenije, a onda korelacijski i sa depresivnim simptomima shizofrenih bolesnika.

Kako je shizofrenija kao i mnogi drugi neuropsihijatrijski poremećaji vrlo kompleksna, smatra se da bi se više trebali istraživati pojedini endofenotipovi poput specifičnih kognitivnih, neuropsiholoških, neurofizioloških ili biokemijskih pokazatelja (Gottesman i Gould, 2003). Utjecaj određenih gena na endofenotipove mogao bi se lakše utvrditi od učinaka gena na kompleksne fenotipove poput shizofrenije i takvi endofenotipovi mogli bi se utvrditi čak i ako nosioci rizičnih alela ne pokazuju sve ili uopće ne pokazuju kliničke dijagnostičke simptome (Meyer-Lindenberg i Weinberger, 2006). Depresivni simptomi kao što su Rano buđenje i Osjećaj krivnje mogli bi predstavljati upravo takve endofenotipove shizofrenije. Naravno, rezultati ovog istraživanja moraju se potvrditi u daljnim studijama s većim brojem ispitanika, bolje usklađenim skupinama vezano uz spol i dob te dodatnim kliničkim skalama koje se koriste za evaluaciju depresivnih simptoma u pacijenata sa shizofrenijom.

6. ZAKLJUČAK

1. Istraživane skupine kontrolnih ispitanika i ispitanika oboljenih od shizofrenije značajno su se razlikovale u raspodjeli po dobi i spolu. Skupina bolesnika sa shizofrenijom bila je značajno mlađa i imala je značajno više žena, nego muškaraca, u odnosu na kontrolne ispitanike, što može utjecati na rezultate.
2. Raspodjela genotipova za *COMT* rs4818 i rs4680 polimorfizme bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom u kontrolnoj skupini i u skupini shizofrenih ispitanika.
3. Raspodjela pojedinih genotipova i alela *COMT* varijanti rs4818 i rs4680 nije se značajno razlikovala između kontrolnih ispitanika i ispitanika s shizofrenijom.
4. Kada su ispitanici podijeljeni na nosioce genotipa CC i alela G ili na nosioce genotipa GG i alela C varijante rs4818 te nosioce genotipa AA i alela G ili na nosioce genotipa GG i alela A varijante rs4680, nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli između kontrolnih ispitanika i ispitanika sa shizofrenijom.
5. Analiza programom Haploview otkrila je da se oba polimorfizma (rs4680 i rs4818) nalaze u neravnoteži udruživanja te je identificirala 4 najčešća haplotipa u uzorku. Haplotipskom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti haplotipa CG između kontrolnih ispitanika i bolesnika sa shizofrenijom, pri čemu se navedeni haplotip značajno češće pojavljuje kod shizofrenih osoba.
6. Testiranjem shizofrenih pacijenata primjenom PANSS-D i CDSS ljestvica utvrđeno je da se ukupan broj bodova depresivnih simptoma značajno ne razlikuje između ispitanika sa shizofrenijom podjeljenih na nosioce različitih genotipova s obzirom na *COMT* polimorfizme rs4680 i rs4818.
7. Prilikom podjele ispitanika sa shizofrenijom prema genotipu rs4680 polimorfizma primjenom PANSS-D ljestvice nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova za pojedine depresivne simptome, dok se primjenom CDSS ljestvice utvrdila značajna povezanost genotipa AA sa brojem bodova za depresivni simptom Rano buđenje.
8. Prilikom podjele ispitanika sa shizofrenijom prema genotipu rs4818 polimorfizma primjenom PANSS-D ljestvice utvrđena je statistički značajna povezanost genotipa CG sa brojem bodova za depresivni simptom Osjećaj krivnje, dok primjenom CDSS ljestvice nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova za pojedine depresivne simptome između shizofrenih nosioca različitih genotipova rs4818 polimorfizma.
9. Rezultati istraživanja moraju se potvrditi u brojnijim studijama, s usklađenijim skupinama prema spolu i dobi te dodatnim kliničkim skalama za depresive simptome.

7. LITERATURA

- Addington, D., Addington, J., Schissel, B. (1990): A depression rating scale for schizophrenics. *Schizophrenia Research*, 3: 247-51.
- American Psychiatric Association (2013): Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders, Temporary Revised V.ed., Washington, DC: *American Psychiatric Association Press, APA*.
- Arias-Carrion, O., Stamelou, M., Murillo-Rodriguez, E., Menedez-Gonzalez, M., Poppel, E. (2010): Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine* 3:24.
- Ayano, G. (2016): Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*, 2: 2–5.
- Barker, D. J., Root, D. H., Zhang, S., Morales, M. (2016): Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area. *Journal of chemical neuroanatomy*, 73: 33–42.
- Begic, D., Jukic, V., Medved, V. (2015): Psihijatrija. *Medicinska naklada*, 142–155.
- Bhakta, S. G., Zhang, J. P., Malhotra, A. K. (2012): The COMT Met158 allele and violence in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia research*, 140(1-3): 192–197.
- Björklund, A., Dunnett, S. B. (2017): Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences. Elsevier*, 30(5): 194–202.
- Chen, A. Y., Adamek, R. N., Dick, B. L., Credille, C. V., Morrison, C. N., Cohen, S. M. (2019): Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. *Chemical reviews*, 119(2): 1323–1455.
- Chen, B., Cole, J. W., Grond-Ginsbach, C. (2017): Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Frontiers in Genetics*, 8: 167.
- Chen, C.-Y., Lu, R.-B., Yeh, Y.-W., Shih, M.-C., Huang, S.-Y. (2011): Association study of catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms with schizophrenia and psychopathological symptoms in Han Chinese. *Genes, Brain and Behavior*, 10(3): 316–324.
- Chen, X., Wang, X., O'Neill, A.F., Walsh, D., Kendler, K.S. (2004): Variants in the catechol-omethyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. *Molecular Psychiatry* 9(10): 962-967.

- Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti, C.M., Straub, R.E., Goldman, D., Weinberger, D.R. (2001): Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98: 6917–6922.
- Elsworth, J.D., Roth, R.H. (1997): Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental neurology*. Academic Press, 144(1): 4–9.
- Fan, J.B., Zhang, C.S., Gu, N.F., Li, X.W., Sun, W.W., Wang, H.Y., Feng, G.Y., St Clair, D., He, L. (2005): Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. *Biological Psychiatry*. 57(2): 139- 44.
- Fernstrom, J.D., Fernstrom, M.H. (2007): Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *The Journal of Nutrition*, 137: 1539-1547.
- Freedman M.L., Reich D., Penney K.L., McDonald G.J., Mignault A.A., Patterson N., Gabriel S.B., Topol E.J., Smoller J.W., Pato C.N. (2004): Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nature Genetics*, 36: 388–393.
- Galderisi, S., Maj, M., Kirkpatrick, B., Piccardi, P., Mucci, A., Invernizzi, G., Rossi, A., Pini, S., Vita, A., Cassano, P., Stratta, P., Severino, G., Del Zompo, M. (2005): COMT Val(158)Met and BDNF C(270)T polymorphisms in schizophrenia: a casecontrol study. *Schizophrenia Research*, 73 (1), 27-30.
- Glatt, S.J., Faraone, S.V., Tsuang, M.T. (2003): Association Between a Functional Catechol O-Methyltransferase Gene Polymorphism and Schizophrenia: Meta-Analysis of Case-Control and Family-Based Studies. *The American Journal of Psychiatry*, 160: 469–476.
- Godar, S.C., Bortolato, M. (2014): Gene sex interactions in schizophrenia: focus on dopamine neurotransmission. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8:1-16.
- González-Castro, T. B., Hernández-Díaz, Y., Juárez-Rojop, I. E., López-Narváez, M. L., Tovilla-Zárate, C. A., Fresan, A. (2016): The Role of a Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Val158Met Genetic Polymorphism in Schizophrenia: A Systematic Review and Updated Meta-analysis on 32,816 Subjects. *NeuroMolecular Medicine*, 18(2): 216–231.
- Gottesman I.I., Gould T.D. (2003): The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American Journal of Psychiatry*, 160:636–645.

- Häfner, H. (2019): From Onset and Prodromal Stage to a Life-Long Course of Schizophrenia and Its Symptom Dimensions: How Sex, Age, and Other Risk Factors Influence Incidence and Course of Illness, *Psychiatry Journal*, 15 pages,
- Hirasawa-Fujita, M., Tudor, L., Nikolac Perkovic, M., Kozumplik, O., Nedic Erjavec, G., Uzun, S., et al. (2018): Genotypic and haplotypic associations of catechol-O-methyltransferase (COMT) rs4680 and rs4818 with salivary cortisol in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 259: 262–264.
- Hirvonen, J., Hietala, J. (2011): Dysfunctional brain networks and genetic risk for schizophrenia: specific neurotransmitter systems. *CNS neuroscience & therapeutics*, 17(2): 89–96.
- Hoenicka J., Garrido E., Martinez I., Ponce G., Aragues M., Rodriguez-Jimenez R., et al. (2009): Gender-Specific COMT Val158Met Polymorphism Association in Spanish Schizophrenic Patients. *The American Journal of Medicine Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153B: 79-85.
- Horacek, J., Bubenikova-Valesova, V., Kopecek, M., Palenicek, T., Dockery, C., Mohr, P., Hösch, C. (2006): Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia. *CNS Drugs*, 20: 389-409.
- Jones, D.C., Miller, G. (2008): The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochemical Pharmacology*, 76: 569-581.
- Kay, S.R., Fiszbein, A., Opler, L.A. (1987): The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 13: 261-276.
- Kjelby, E., Jørgensen, H. A., Kroken, R. A., Løberg, E. M., & Johnsen, E. (2011): Anti-depressive effectiveness of olanzapine, quetiapine, risperidone and ziprasidone: a pragmatic, randomized trial. *BMC psychiatry*, 11: 145.
- Krupchanka, D., Katliar, M. (2016): The Role of Insight in Moderating the Association Between Depressive Symptoms in People With Schizophrenia and Stigma Among Their Nearest Relatives: A Pilot Study. *Schizophrenia bulletin*, 42(3): 600–607.
- Lachance, J. (2009): Detecting selection-induced departures from Hardy-Weinberg proportions. *Genetics Selection Evolution*, 41(1): 15.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., Innis, R. (1999): Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biological Psychiatry*, 46(1), 56–72.

- Laruelle, M., Kegeles, L. S., Abi-Dargham, A. (2003): Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003(1): 138–158.
- Li W. J., Kou C. G., Yu Y., Sun S., Zhang X., Kosten T. R., et al. (2012): Association of catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms with schizophrenia and negative symptoms in a Chinese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, B159: 370–375.
- Li, P., Snyder, G. L., Vanover, K. E. (2016): Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(29): 3385–3403.
- Ma, Z., Liu, H., Wu, B. (2014): Structure-based drug design of catechol-O-methyltransferase inhibitors for CNS disorders. *British journal of clinical pharmacology*, 77(3): 410–420.
- Majadas, S., Olivares, J., Galan, J., Diez, T. (2012): Prevalence of depression and its relationship with other clinical characteristics in a sample of patients with stable schizophrenia. *Comprehensive Psychiatry*, 53: 145–151.
- Mannisto, P.T., Kaakkola, S. (1999): Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 51: 523-628.
- Mao, Y. M., Zhang, M. D. (2015): Augmentation with antidepressants in schizophrenia treatment: benefit or risk. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11: 701–713.
- Martorell, L., Costas, J., Valero, J., Gutierrez-Zotes, A., Phillips, C., Torres, M., Brunet, A., Garrido, G., Carracedo, A., Guillamat, R., Valles, V., Guitart, M., Labad, A., Vilella, E. (2008): Analyses of variants located in estrogen metabolism genes (ESR1, ESR2, COMT and APOE) and schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 100: 308–315.
- Massey, L. A., Miranda, M. A., Al-Helli, O., Parkes, H. G., Thornton, J. S., So, P. W., Yousry, T. A. (2016): 9.4 T MR microscopy of the substantia nigra with pathological validation in controls and disease. *NeuroImage: Clinical*, 13: 154–163.
- Matsumoto M., Weickert S.C., Akil M., Lipska B.K., Hyde T.M., Herman M.M., Kleinman B.K., Weinberger D.R. (2003): Catechol o-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience*, 116: 127-137.
- Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R. (2006): Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 818–827.

- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G., (1998): Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Review*, 78: 189-225.
- Munafò, M. R., Bowes, L., Clark, T. G., Flint, J. (2005): Lack of association of the COMT (Val158/108 Met) gene and schizophrenia: a meta-analysis of case-control studies. *Molecular Psychiatry*, 10(8): 765–770.
- Nackley A. G., Shabalina S. A., Tchivileva I. E., Satterfield K., Korchynskiy O., Makarov S. S., et al. (2006): Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*, 314: 1930–1933.
- Nasrallah, H. A., Cucchiaro, J. B., Mao, Y., Pikalov, A. A., Loebel, A. D. (2015): Lurasidone for the treatment of depressive symptoms in schizophrenia: analysis of 4 pooled, 6-week, placebo-controlled studies. *CNS spectrums*, 20(2): 140–147.
- Nedic Erjavec, G., Nenadic Sviglin, K., Nikolac Perkovic, M., Muck-Seler, D., Jovanovic, T., Pivac, N. (2014): Association of gene polymorphisms encoding dopaminergic system components and platelet MAO-B activity with alcohol dependence and alcohol dependence-related phenotypes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 54, 321–327.
- Nedic, G., Nikolac, M., Nenadic Sviglin, K., Muck-Seler, D., Borovecki, F., Pivac, N. (2011): Association study of a functional catechol-O-methyltransferase (COMT) Val^{108/158}Met polymorphism and suicide attempts in patients with alcohol dependence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(3): 377–388.
- Nielsen, D. M., Ehm, M. G., Weir, B. S. (1998): Detecting Marker-Disease Association by Testing for Hardy-Weinberg Disequilibrium at a Marker Locus. *The American Journal of Human Genetics*, 63(5): 1531–1540.
- Nikolac, M., Sagud, M., Nedic, G., Nenadic Sviglin, K., Mihaljevic Peles, A., Uzun, S., Vuskan Cusa, B., Kozumplik, O., Zivkovic, M., Mustapic M., Jakovljevic M., Pavlovic, M., Muck-Seler, D., Borovecki, F., Pivac, N. (2013): The lack of association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and smoking in schizophrenia and alcohol dependence. *Psychiatry Research*, 205(1-2): 179–180.
- Ortiz-Orendain, J., Castiello-de Obeso, S., Colunga-Lozano, L., Hu, Y., Maayan, N., & Adams, C. (2018). Antipsychotic Combinations for Schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 44(1): 15–17.

- Park, T.W., Yoon, K.S., Kim, J.H., Park, W.Y., Hirvonen, A., Kang, D. (2002): Functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and susceptibility to schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 12: 299-303.
- Pearlson, G.D. (2000): Neurobiology of schizophrenia. *Annals of Neurology*, 48: 556-566.
- Pelayo-Terán, J. M., Crespo-Facorro, B., Carrasco-Marín, E., Pérez-Iglesias, R., Mata, I., Arranz, M. J., Leyva-Cobián, F., Vázquez-Barquero, J. L. (2008): Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical characteristics in first episode non-affective psychosis. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147B(5): 550–556.
- Perkovic, M., Svob, D., Tudor, L., Konjevod, M., Nedic, G., Pivac, N. (2017): Catechol-O-methyltransferase, Cognition and Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 15: 408-419.
- Pivac, N., Pregelj, P., Nikolac, M., Zupanc, T., Nedic, G., Muck Seler, D., Videtic Paska, A. (2011): The association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and suicide. *Genes, Brain and Behavior*, 10: 565-569.
- Roussos P., Giakoumaki S. G., Pavlakis S., Bitsios P. (2008): Planning, decision-making and the COMT rs4818 polymorphism in healthy males. *Neuropsychologia*, 46: 757–763.
- Sagud, M., Tudor, L., Uzun, S., Nikolac Perkovic, M., Zivkovic, M., Konjevod, M., Kozumplik, O., Vuksan Cusa, B., Svob Strac, D., Rados, I., Mimica, N., Mihaljevic Peles, A., Nedic Erjavec, G., Pivac, N. (2018): Haplotypic and Genotypic Association of Catechol-O-Methyltransferase rs4680 and rs4818 Polymorphisms and Treatment Resistance in Schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, 9:705-713.
- Sampaio, T. F., dos Santos, E. U. D., de Lima, G. D. C., dos Anjos, R. S. G., da Silva, R. C., Asano, A. G. C., Crovella, S., de Souza, P. R. E. (2018): MAO-B and COMT Genetic Variations Associated With Levodopa Treatment Response in Patients With Parkinson's Disease. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 58(7): 920–926.
- Samsom, J. N., Wong, A. H. (2015): Schizophrenia and Depression Co-Morbidity: What We have Learned from Animal Models. *Frontiers in Psychiatry*, 6: 13.
- Simpson, E.H., Kellendonk, C., Kandel, E. (2010): A Possible Role for the Striatum in the Pathogenesis of the Cognitive Symptoms of Schizophrenia. *Neuron*, 65: 585-596.

- Stefanis, N. C., Os, J. V., Avramopoulos, D., Smyrnis, N., Evdokimidis, I., Hantoumi, I., Stefanis, C. N. (2004): Variation in catechol-o-methyltransferase val158 met genotype associated with schizotypy but not cognition: A population study in 543 young men. *Biological Psychiatry*, 56(7): 510–515.
- Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S. (2009): Schizophrenia, „just the facts“ 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research*, 110: 1-23.
- Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Liao, D.-L., Lai, I.-C., Liou, Y.-J. (2004): Association Study of a Functional Catechol-O-Methyltransferase Genetic Polymorphism with Age of Onset, Cognitive Function, Symptomatology and Prognosis in Chronic Schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 49(4), 196–200.
- Tsuang, M. (2000): Schizophrenia: genes and environment. *Biological Psychiatry*, 47(3): 210-220.
- Tunbridge, E.M. (2010): The catechol-o-methyltransferase gene: its regulation and polymorphisms. *International Review of Neurobiology*, 95: 7-27.
- Tunbridge, E.M., Harrison, P.J., Weinberger, D.R. (2006): Catechol-o-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val158Met and Beyond. *Biological Psychiatry*, 60(2): 141-151.
- Voisey, J., Swagell, C.D., Hughes, I.P., Lawford, B.R., Young, R.M., Morris, C.P. (2012): HapMap tag-SNP analysis confirms a role for COMT in schizophrenia risk and reveals a novel association. *European Psychiatry*, 27: 372–376.
- Wang, J., Shete, S. (2017): Testing Departure from Hardy-Weinberg Proportions. *Statistical Human Genetics*, 850: 83–115.
- Wang, Y., Fang, Y., Shen, Y., Xu, Q. (2010): Analysis of association between the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and negative symptoms in chronic schizophrenia. *Psychiatry Research*, 179(2): 147–150.
- Weinshilboum, R. M., Otterness, D. M., Szumlanski, C. L. (1999): Methylation pharmacogenetics: Catechol O-Methyltransferase, Thiopurine Methyltransferase, and Histamine N-Methyltransferase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1): 19–52.
- Wonodi, I., Stine, O.C., Mitchell, B.D., Buchanan, R.W., Thaker, G.K. (2003): Association Between Val108/158 Met Polymorphism of the COMT Gene and Schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 120B: 47–50.

- World Health Organization (2010): International Classification of Diseases 10th Revision. 13. World Health Organization
- Yu, R., Zhang, X.-N., Huang, X.-X., Ding, S.-P., Li, J.-C. (2007): Association analysis of COMT polymorphisms and schizophrenia in a Chinese Han population: A case-control study. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144B(4): 570–573.
- Zivkovic, M., Mihaljevic-Peles, A., Bozina, N., Sagud, M., Nikolac-Perkovic, M., Vuksan-Cusa, B., Muck-Seler, D. (2013): The Association Study of Polymorphisms in DAT, DRD2, and COMT Genes and Acute Extrapyramidal Adverse Effects in Male Schizophrenic Patients Treated With Haloperidol. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 33(5): 593–599.
- www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/en/
- https://en.wikipedia.org/wiki/Dopaminergic_pathways#/media/File:Dopaminergic_pathways.svg
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dopamine>
- <https://basicmedicalkey.com/pharmacology-of-dopaminergic-neurotransmission/>
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>
- <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics.html>
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu u Republici Hrvatskoj. Školovanje sam započela 2002. godine u osnovnoj školi „Ivan Cankar“ u Zagrebu. Kroz sve razrede osnovne škole bila sam odlična učenica i to me dovelo do upisivanja 11. gimnazije 2010. godine u Zagrebu, gdje sam provela svoje srednjoškolsko doba. Tijekom srednje škole sudjelovala sam na brojnim županijskim natjecanjima iz matematike, biologije i geografije. Tamo sam razvila interes za znanost, posebice za biologiju. Nakon položene mature, 2014. godine upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer biologija. U rujnu, 2017. godine završila sam Sveučilišni preddiplomski studij biologije i stekla akademski naziv Sveučilišna prvostupnica biologije. Studiranje sam nastavila 2017. godine na diplomskom studiju Eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U sklopu studiranja slušala sam kolegije i pohađala vježbe u mnogim ustanovama, poput Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kliničke bolnice „Sveti Duh“, Filozofskog fakulteta u Zagrebu, Instituta Ruđer Bošković, privatnog DNA laboratorija „Genos“, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, Antropološkog centra i Zavoda za paleontologiju i geologiju kvartara Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Laboratorijsku stručnu praksu položila sam na Zavodu za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku. Uspješno sam položila Tečaj A kategorije za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama. Članica sam sekcije za fotografiju „Udruga studenata biologije“. Sudjelovala sam kao pasivni član na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja 2018. i 2019. godine te na 4. Simbiotskom tjednu na Biologiji: Simbioza i Evolucija. Aktivno sam sudjelovala na 9. Hrvatskom kongresu farmakologije 2019. godine, gdje sam sa kolegicom Barbarom Vuić prezentirala naše istraživanje na temu „Jesu li digitalni lijekovi zaista lijekovi?“. Tijekom svih godina studiranja sudjelovala sam na manifestaciji „Noć biologije“ gdje sam učenicima i posjetiteljima kroz radionice pokušala približiti razna područja biologije kao što su forenzička biologija, razvojna biologija čovjeka i animalna fiziologija. Volontirala sam kao asistentica u medicinskoj službi na muškom Europskom prvenstvu u rukometu 2018. godine u Zagrebu.

9. PRILOZI

PRILOG A - Skala pozitivnih i negativnih simptoma i opće psihopatologije (PANSS)

Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)							
1=odsutno 2=minimalno 3=slabo 4=umjereno 5=umjereno jako 6=jako 7=ekstremno							
POZITIVNA PODLJESTVICA (P)							
1. Sumanutosti	1	2	3	4	5	6	7
2. Konceptualna dezorganizacija	1	2	3	4	5	6	7
3. Halucinatorno ponašanje	1	2	3	4	5	6	7
4. Uzbuđenje	1	2	3	4	5	6	7
5. Grandioznost	1	2	3	4	5	6	7
6. Sumnjičavost/ proganjanje	1	2	3	4	5	6	7
7. Neprijateljstvo	1	2	3	4	5	6	7
NEGATIVNA PODLJESTVICA (N)							
1. Afekt tuposti	1	2	3	4	5	6	7
2. Emocionalno povlačenje	1	2	3	4	5	6	7
3. Siromaštvo odnosa/ loš transfer	1	2	3	4	5	6	7
4. Pasivnost/ apatično socijalno povlačenje	1	2	3	4	5	6	7
5. Teškoće u apstraktnom mišljenju	1	2	3	4	5	6	7
6. Nedostatak spontanosti i nesmetanog odvijanja konverzacije	1	2	3	4	5	6	7
7. Stereotipno mišljenje	1	2	3	4	5	6	7
PODLJESTVICA OPĆE PSIHOLOGIJE (G)							
1. Somatske brige	1	2	3	4	5	6	7
2. Anksioznost	1	2	3	4	5	6	7
3. Osjećaj krivnje	1	2	3	4	5	6	7
4. Tenzija/ napetost	1	2	3	4	5	6	7
5. Manirizmi i stav tijela	1	2	3	4	5	6	7
6. Depresija	1	2	3	4	5	6	7

7. Motorička retardacija	1	2	3	4	5	6	7
8. Nesuradnja	1	2	3	4	5	6	7
9. Neobičan sadržaj misli	1	2	3	4	5	6	7
10. Dezorijentacija	1	2	3	4	5	6	7
11. Slaba pažnja	1	2	3	4	5	6	7
12. Nedostatak procjene i uvida	1	2	3	4	5	6	7
13. Poremećaj volje	1	2	3	4	5	6	7
14. Slaba kontrola impulsa	1	2	3	4	5	6	7
15. Zaokupljenost	1	2	3	4	5	6	7
16. Aktivno socijalno izbjegavanje	1	2	3	4	5	6	7

DOPUNSKE ČESTICE ZA PROFIL RIZIČNE AGESIVNOSTI (S)

1. Bijes/ljutnja	1	2	3	4	5	6	7
2. Teškoće u odgađanju zadovoljenja	1	2	3	4	5	6	7
3. Afektivna labilnost	1	2	3	4	5	6	7

UKUPNI ZBROJ: _____

PRILOG B- Calgary skala za depresivne simptome u shizofreniji (CDSS)

The Scale - Croatian

Ispitivač: Postavite prvo pitanje kao što je napisano. Koristite dodatna potpitanja ili opise prema potrebi. Vremensko razdoblje se odnosi na posljednja dva tjedna, osim ako nije drugačije navedeno. **Napomena:** Posljednje pitanje, pitanje br. 9, temelji se na zapažanjima cjelokupnog razgovora.

1. DEPRESIJA: Kako biste opisali svoje raspoloženje u posljednja dva tjedna? Osjećate li se dovoljno veselo ili ste u posljednje vrijeme vrlo potišteni ili tužni? Koliko ste često u posljednja dva tjedna svaki dan (Vašim vlastitim riječima)? Cijeli dan?

0. ne postoji
1. blaga Pokazuje manju tugu ili malodušnost kod ispitivanja.
2. umjerena Jasno vidljivo depresivno raspoloženje u trajanju do polovice vremena u posljednja 2 tjedna: prisutno svakodnevno.
3. jaka Značajno depresivno raspoloženje svakodnevnog trajanja preko polovice vremena ometajući normalno motoričko i socijalno funkcioniranje.

2. BEZNADNOST: Kako vidite svoju budućnost? Vidite li ikakvu budućnost? – ili Vam se život čini prilično beznadan? Jeste li digli ruke od svega ili još uvijek postoji neki razlog da se i dalje trudite?

0. ne postoji
1. blaga Povremeno se osjećao beznadno u posljednja dva tjedna, ali još uvijek gaji određene nade u budućnost.
2. umjerena Stalan, umjereni osjećaj beznadnosti u posljednja dva tjedna. Može ga se nagovoriti da prizna mogućnost da se stanje može popraviti.
3. jaka Stalan i uznemirujući osjećaj beznadnosti.

3. SAMOOMALOVAŽAVANJE: Što mislite o sebi u odnosu na druge ljude? Osjećate li se bolje, ne tako dobro, ili skoro isto kao i drugi? Osjećate li se manje vrijedni ili čak bezvrijedni?

0. ne postoji
1. blago Malo inferiornosti; ne doseže osjećaj bezvrijednosti.
2. umjereno Pacijent se osjeća bezvrijedno, ali manje od 50% vremena.
3. jako Pacijent se osjeća bezvrijedno više od 50% vremena. Može ga se navesti da prizna drugačije.

4. OSJEĆAJ KRIVNJE: Imate li osjećaj da Vas okrivljuju za nešto ili čak da Vas pogrešno optužuju? Za što? (Ne računajte opravdanu krivnju ili optužbe. Ne računajte deluzije o krivnji.)

0. ne postoji
1. blagi Pacijent osjeća da ga okrivljuju, ali ne i optužuju, manje od 50% vremena.
2. umjereni Stalan osjećaj da ga okrivljuju i/ili povremeni osjećaj da ga optužuju.
3. jaki Stalan osjećaj da ga optužuju. Kad ga se navede, priznaje da nije tako.

5. PATOLOŠKA KRIVNJA: Jeste li skloni kriviti sebe za sitnice koje ste možda napravili u prošlosti? Mislite li da zaslužujete što se toliko brinete o tome?

0. ne postoji
1. blaga Pacijent se ponekad osjeća prekomjerno krivim zbog nekih manjih grešaka, ali manje od 50% vremena.
2. umjerena Pacijent se obično (preko 50% vremena) osjeća krivim zbog svojih postupaka u prošlosti, a njihovo značenje preuveličava.
3. jaka Pacijent obično osjeća da ga se treba okriviti za sve što je pošlo po zlu, čak i onda kada nije za to kriv.

6. JUTARNJA DEPRESIJA: Kad ste se osjećali potišteno u posljednja 2 tjedna, jeste li primijetili da Vam je potištenost jače izražena u neko određeno doba dana?

0. ne postoji Nema depresije.
1. blaga Depresija postoji, ali bez dnevnih varijacija.
2. umjerena Depresija odmah spomenuta kao jače izražena prije podne.
3. jaka Depresija značajno jača prije podne, uz oštećeno funkcioniranje koje se poboljšava poslije podne.

7. RANO BUĐENJE: Budite li se ujutro ranije nego što je uobičajeno za Vas? Koliko puta tjedno se to događa?

0. ne postoji Nema ranog buđenja.
1. blago Povremeno se budi (do dvaput tjedno) 1 sat ili više prije uobičajenog vremena za buđenje ili budilice.
2. umjereno Često se rano budi (do 5 puta tjedno) 1 sat ili više prije uobičajenog vremena za buđenje ili budilice.
3. jako Svakodnevno se budi 1 sat ili više prije uobičajenog vremena.

8. SAMOUBOJSTVO: Osjećate li da život nema smisla? Jeste li ikad poželjeli sve to okončati? Što ste mislili da biste mogli učiniti? Jeste li stvarno i pokušali?

0. ne postoji
1. blago Česta razmišljanja da bi bilo bolje da ga nema, odnosno povremene misli o samoubojstvu.
2. umjereno Temeljito razmišljao i razrađivao plan samoubojstva, ali bez pokušaja samoubojstva.
3. jako Pokušaj samoubojstva očito zamišljen da završi smrću (tj. slučajno otkriven ili sredstva nisu djelovala).

9. UOČENA DEPRESIJA: Temelji se na zapažanjima ispitivača tijekom cjelokupnog razgovora. Pitanje "Da li Vam se plače?", kad se koristi u određenim trenucima tijekom razgovora, može pružiti informacije korisne za ovo zapažanje.

0. ne postoji
1. blaga Pacijent izgleda tužan i žalostan, čak i tijekom nekih dijelova razgovora, uključujući afektivno neutralan razgovor.
2. umjerena Pacijent izgleda tužan i žalostan tijekom cijelog razgovora, s potištenim i monotonim glasom te je povremeno plačljiv ili na rubu plača.
3. jaka Pacijent grca kod uznemirujućih tema, često duboko uzdiše i otvoreno plače, ili je stalno u stanju intenzivne potištenosti ako je ispitivač siguran da je to prisutno.

© 2007 Dr. Donald Addington, MBBS, MRC Psych, FRCP

Translated by: MAPI Research Institute
27 rue de la Villette - 69003 Lyon, France
Tel. +33 (0) 472 13 66 67 Fax +33 (0) 472 13 66 68
E-mail: institut@mapi.fr
Internet: www.mapi-institute.com