# Polimorfizam gena za serotoninski receptor 5-HT1A i motoričke popratne pojave antipsihotika haloperidola

**Varga, Andrea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:886129

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

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prirodoslovno-matematički fakultet**

**Biološki odsjek**

Andrea Varga

# Polimorfizam gena za serotoninski receptor 5-HT1A i motoričke popratne pojave antipsihotika haloperidola

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

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

Ovim putem od srca želim zahvaliti svima koji su mi pružili podršku u izradi ovog rada, a posebno voditeljici Dr.sc. Dubravki Švob Štrac na susretljivosti, ljubaznosti i zalaganju, te suvoditelju Izv.prof.dr.sc. Domagoju Đikiću na pomoći!

Najveće hvala mojim roditeljima, bratu i sestri koji su mi omogućili školovanje i bili bezuvjetna podrška tijekom studiranja.

Zahvaljujem i svojim prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

## POLIMORFIZAM GENA ZA SEROTONINSKI RECEPTOR 5-HT1A I MOTORIČKE POPRATNE POJAVE ANTIPSIHOTIKA HALOPERIDOLA

Andrea Varga

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Antipsihotički lijekovi se koriste u liječenju psihotičnih poremećaja (deluzija, halucinacija, poremećaja razmišljanja) u shizofreniji, ali i psihoza povezanih sa depresijom, bipolarnim poremećajem i Alzheimerovom bolešću. Dvije glavne vrste ovih lijekova su tzv. tipični i atipični antipsihotici. Na žalost, u jednom dijelu bolesnika javljaju se neželjeni popratni učinci liječenja antipsihoticima koji često dovode do prekida terapije i povratka simptoma bolesti. Najpoznatiji popratni učinci tipičnih antipsihotika su motoričke popratne pojave poput distonije, parkinsonizma, akatizije i tardivne diskinezije, koje nastaju primarno zbog blokade dopaminskih receptora u nigrostriatumu i posljedične prekomjerne aktivnosti acetilkolinskog sustava. Međutim, s obzirom da postoje jake neuroanatomske i funkcionalne interakcije serotoninskog i dopaminskog sustava, te da serotoninski sustav u velikoj mjeri regulira i modulira aktivnost dopaminskog sustava, kao i obratno, moguće je da određene varijacije gena serotoninskih receptora mogu utjecati na razvoj motoričkih popratnih pojava tipičnih antipsihotika, koji svoje učinke ostvaruju primarno putem dopaminskih receptora. Stoga, da bi razjasnili ulogu gena serotoninskih receptora u razvoju ovih motoričkih nuspojava, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti moguću povezanost dvaju polimorfizama u genu za serotoninski 5-HT1A receptor s razvojem motoričkih popratnih pojava nakon primjene tipičnog antipsihotika haloperidola u osoba oboljelih od shizofrenije. Dobiveni rezultati nisu uputili na genotipsku i haplotipsku povezanost istraživanih polimorfizama gena *5-HT1A* sa motoričkim popratnim pojavama antipsihotika haloperidola u oboljelih od shizofrenije.

(69 stranica, 23 slike, 15 tablica, 38 literaturnih navoda , jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: shizofrenija, motoričke popratne pojave, haloperidol, 5-HT1A, polimorfizmi, rs878567, rs6295, genotip, haplotip

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

Suvoditelj: Dr.sc. Domagoj Đikić, izv. prof., PMF

Ocjenitelji: Dr.sc. Domagoj Đikić, izv. prof., PMF
Dr.sc. Renata Šoštarić, doc., PMF
Dr.sc. Petar Kružić, izv.prof., PMF

Rad prihvaćen: 4. Srpnja 2016.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## SEROTONIN 5-HT1A RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND MOTORIC SIDE EFFECTS OF TYPICAL ANTIPSYCHOTIC DRUG HALOPERIDOL

Andrea Varga

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Antipsychotic drugs are used in the treatment of psychotic disorders (delusions, hallucinations, thought disorders) in schizophrenia, and psychosis related to depression, bipolar disorder, and Alzheimer's disease. Two main types of these drugs are called typical and atypical antipsychotics. Unfortunately, some patients following antipsychotics treatment develop unwanted side effects, which often lead to treatment discontinuation and symptom relapse. The best-known side effects of typical antipsychotics are motor side effects such as dystonia, Parkinsonism, akathisia, and tardive dyskinesia, primarily due to the blockade of dopamine receptors in nigrostriatum and consequent excessive activity of acetylcholine system. However, given that there are strong neuroanatomical and functional interactions of serotonergic and dopaminergic systems, and that serotonergic system largely regulates and modulates the activity of dopaminergic system, and *vice versa*, it is possible that certain variations in the serotonergic genes may affect the development of motor side effects of typical antipsychotics, which act primarily via dopamine receptors. Therefore, in order to clarify the role of serotonin receptor genes in the development of the motor side effects, the aim of this diploma thesis was to investigate the possible association between two polymorphisms, in the gene coding for the serotonin 5-HT1A receptor, with the development of motor side effects following treatment with a typical antipsychotic haloperidol in patients with schizophrenia. Obtained results suggest no genotypic or haplotypic association of investigated polymorphisms in *5-HT1A* gene with extrapyramidal side effects of haloperidol in schizophrenia patients.

(69 pages, 23 figures, 15 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: schizophrenia,extrapyramidal side effects, haloperidol, 5-HT1A, polymorphisms, rs878567, rs6295, genotype, haplotype

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, Research Assoc., RBI

Cosupervisor: Domagoj Đikić, PhD, Assoc. Prof., Faculty of Science

Reviewers: Domagoj Đikić, PhS, Assoc. Prof., Faculty of Science
Renata Šoštarić, PhD, Asst. Prof., Faculty of Science
Petar Kružić, PhD, Assoc. Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: July 4th, 2016

# SADRŽAJ


**1. UVOD ..... 1**

**1.1. Shizofrenija ..... 2**
1.1.1. Klinički oblici shizofrenije ..... 3

**1.2. Epidemiologija shizofrenije ..... 4**

**1.3. Etiopatogeneza shizofrenije ..... 5**
1.3.1. Neurorazvojna hipoteza ..... 5
1.3.2. Virusna i ostale teorije ..... 6
1.3.3. Genetska podloga shizofrenije ..... 6

**1.4. Uloga dopamina u shizofreniji ..... 7**
1.4.1. Dopaminergička teorija ..... 8

**1.5. Uloga serotonina u shizofreniji ..... 10**
1.5.1. Serotoninski receptor 5-HT1A ..... 12

**1. 6. Liječenje shizofrenije ..... 14**
1.6.1. Antipsihotici prve generacije (tipični) ..... 15
1.6.2. Antipsihotici druge generacije (atipični) ..... 15
1.6.3. Ostale metode liječenja ..... 16

**1.7. Motoričke popratne pojave antipsihotika ..... 17**

**2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 19**

**3. MATERIJALI I METODE ..... 21**

**3.1. MATERIJAL ..... 22**
3.1.1. Ispitanici ..... 22

**3.2. METODE ..... 23**
3.2.1. Izolacija DNA metodom isoljavanja ..... 23
3.2.1.1. Kemikalije potrebne za izolaciju DNA ..... 24
3.2.2.Određivanje genotipa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-Time PCR) ..... 24
3.2.2.2. Kemikalije potrebne zaizvođenje RT-PCR metode ..... 26
3.2.3. Statistička obrada podataka ..... 26

**4. REZULTATI ..... 27**

**4.1. Polimorfizam rs6295 u genu *HTR1A* ..... 28**

**4.2. Polimorfizam rs878567 u genu *5HT1A* ..... 41**

**4.3. Utvrđivanje haplotipova ..... 53**

**5. RASPRAVA ..... 54**

**6.ZAKLJUČAK ..... 60**

**7. LITERATURA ..... 63**

**8. ŽIVOTOPIS ..... 68**

# POPIS KRATICA

5-HT – hidroksitriptamin (engl. *5-hydroxytryptamine*)

8-OH-DPAT - hidroksi-2- (di-N-propilamino) tetralin (engl. *8-hydroxy-2-(di-N-propylamino tetralin*)

AADC – dekarboksilaza L-aromatskih aminokiselina (engl. *Aromatic-L-Amino Acid Decarboxylase*)

ACD – dekstroza citratna kiselina (engl. *Acid Citrate Dextrose*)

BARS – ljestvica očekivanog ponašanja (engl. *Barnes Akathisia Rating Scale*)

COMT - katehol-O- metil transferaza (engl. *Catechol-O-Methyl Transferase*)

DOPA - dihidroksifenilalanin ( engl. *dihydroxyphenylalanine*)

DRD1 – dopaminski receptor D1

DSM-(IV) – Dijagnostički i statistički priručnik za duševne bolesti (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th. Edition)*

DTNBP1 – disbindin (engl. *Dystrobrevin binding protein 1*)

EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina (engl. *Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic Acid*)

EPS – Ekstrapiramidne nuspojave (engl. *Extrapyramidal side effects*)

ESRS - ocjenska ljestvica za ekstrapiramidne simptome (engl. *Extrapyramidal Symptom Rating Scale*)

FRET - energetski transfer Förster-tipa (engl. *Förster-type energy transfer*)

GABA – gama-aminomaslačna kiselina (engl. *Gamma-aminobutyric acid*)

kDa - kilodalton

LSD – dietilamin lizerginske kiseline (engl. *Lysergic acid diethylamide*)

MAO – monoamin oksidaza ( engl. *Monoamine Oxydase*)

METH – metamfetamin (engl. *Methylamphetamin*)

MGB – ligand manjeg utora DNA (engl. *Minor groove binder*)

MKB-10 - deseta revizija Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih zdravstvenih problema (engl. *International Statistical Classification of Diseases)*

NMDA - N-metil-D-aspartat (engl. *N-Methyl-D-aspartate*)

NRG – Neuregulin 1

PANSS - ljestvica pozitivnih i negativnih sindroma (engl. *Positive and Negative Syndrome Scale*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PRODH - prolin dehidrogenazu (engl. *Prolyne Dehydrogenase*)

RCLB - pufer za lizu eritrocita (engl. *Red Cell Lysis Buffer*)

RPM - okretaj u minuti (engl. *Rotation per minute*)

RSG - gen koji regulira G-protein (engl. *regulator of G protein signalling*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

SAS - Simpson-Angus ljestvica ekstrapiramidnih nuspojava(engl. *Simpson-Angus Rating Scale for Extrapyramidal Side Effects*)

SDS – natrijev lauril sulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SE pufer - natrij-EDTA pufer (engl. *Sodium EDTA Buffer*)

SERT (5-HTT) – serotoninski transportet (engl. *Serotonin transporter*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

TE pufer – Tris-EDTA pufer (engl. *TE buffer*)

Tm - temperatura mekšanja (taljenja)

VMAT – vezikularni monoaminski transporter (engl. *Vesicular Monoamin Transporter*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization)*

# 1. UVOD

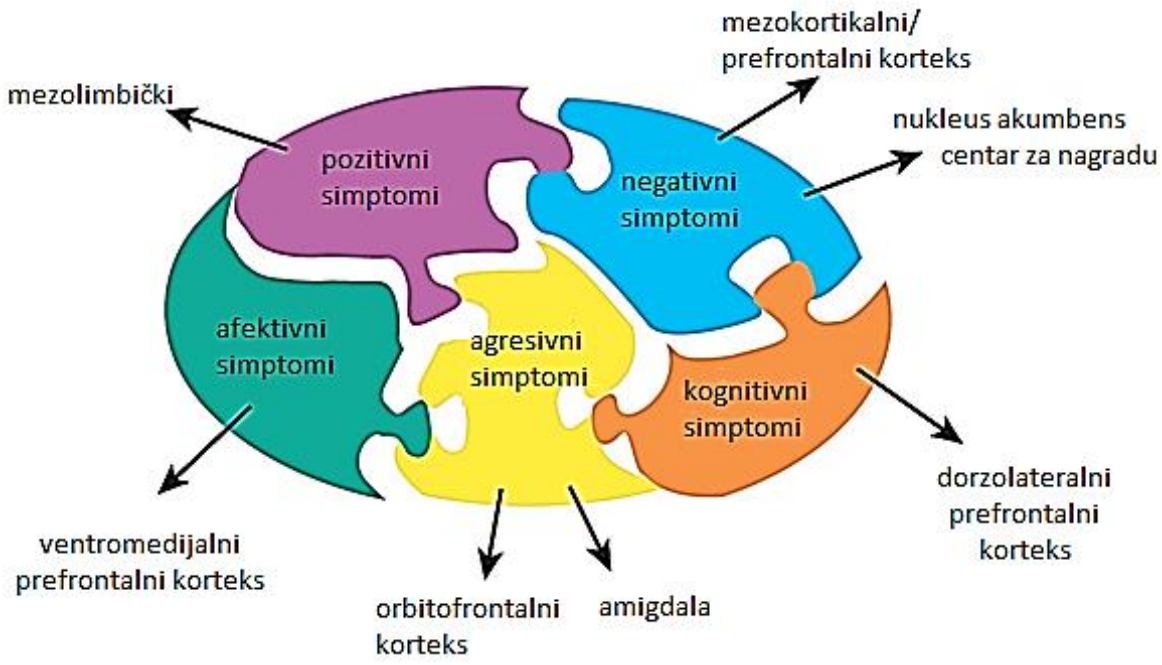
## 1.1. Shizofrenija

Shizofrenija je teški psihijatrijski poremećaj koji oboljeloj osobi onemogućava razlikovanje stvarnih od nestvarnih doživljaja i iskustava, te se pojedinac povlači od drugih osoba i od stvarnosti, u svijet mašte, a misli i osjećaji su često neusklađeni (Begić, 2011; Bray i sur., 2010).

Naziv shizofrenija uvodi Eugen Bleuler 1911. godine, gdje schizo (grč. *schizein*) znači rascjep, a phren (grč. *phrenos*) označava razum, opisujući njime posebnu grupu sindroma psihičkih poremećaja, koja obuhvaća poremećaj afekta, asocijacija, autizam i ambivalenciju, odnosno dvostrukost emocija („Bleulerova 4A"). Raniji naziv je *demence précoce,* kojim francuski liječnik Benedict Morel (1851) sugerira na prijevremeno intelektualno propadanje kao rezultat bolesti. 1896. godine njemački psihijatar Emil Kraepelin predstavlja prijevremenu demenciju ili *dementia praecox* opisujući katatonu, dezorganiziranu i paranoidnu formu ove bolesti, izdvajajući zajedničke elemente u psihopatološkom pojavljivanju i kliničkoj slici (Begić, 2011).

Dijagnostika shizofrenije je temeljena na raznovrsnom i promjenljivom izražavanju simptoma koji uključuju poremećaje mišljenja, sumanute ideje i slušne halucinacije (pozitivni simptomi), kao i emocionalnu ravnodušnost, nedostatak govorne komunikacije i motivacijski deficit (negativni simptomi) (Bray i sur., 2010).

Suvremeni pristup simptomatskoj dimenziji bolesti ukazuje da se simptomi shizofrenije mogu sagledati kroz pet dimenzija. Uz pozitivne i negativne simptome, navode se i kognitivni, depresivni i afektivni simptomi koji se međusobno mogu preklapati.




**Slika 1. Simptomi peterodimenzionalnog modela shizofrenije i uključeni dijelovi mozga (preuzeto i prilagođeno sa www.cambridge.org)**

### 1.1.1. Klinički oblici shizofrenije

- Paranoidna shizofrenija:

  Najčešći je tip shizofrenije, a obično se javlja nakon 30-te godine. Paranoidni simptomi uključuju slušne halucinacije, ideje o proganjanju i uhođenju, a česte su okusne i mirisne halucinacije.

- Katatonička shizofrenija:

  Glavni simptomi ovog oblika shizofrenije su poremećaji motorike. Pacijent zauzima položaje u kojima često ostane nepomičan, to mogu biti veoma neugodni položaji koji zbog odsutnosti mišićnog zamora traju satima, a nazivaju se katatonički stupor. Sa druge strane, njegova sposobnost primanja informacija iz okoline nije poremećena, te on sve vidi i čuje.

- Dezorganizirana shizofrenija:

  Glavno obilježje je dezorganiziranost misaonih procesa. Javlja se rano, a češća je kod dječaka, početak je nespecifičan da bi se nakon toga razvila bogata klinička simptomatologija (česti nastupi bijesa, straha i smijeha, te halucinacije).

- Nediferencirana shizofrenija:
  Simptomi se mijenjaju kroz tijek bolesti, pa ih je teško smjestiti u određeni tip shizofrenije.
- Rezidualna shizofrenija:
  Odgovara kroničnoj fazi shizofrenije, a karakterizirana je dugotrajnim negativnim simptomima, te postoji jasna regresija od ranog do kasnog stadija bolesti.
  (Begić, 2011).

## 1.2. Epidemiologija shizofrenije

Opisi simptoma shizofrenije javljaju se već u najranijim medicinskim zapisima. Bolest se pojavljuje u svim narodima, društvima i civilizacijama, a pogađa pojedince neovisno o spolu, rasi, obrazovanju i socijalnom statusu (Begić, 2011).

Pojavljuje se u svim kulturama, sa prevalencijom od 0.3% u zemljama kao što je Tajvan, do 3% unutar izoliranih populacija na sjevero-istoku Finske (Mowry i Nancarrow, 2001), što ukazuje da postoje i geografske razlike u učestalosti shizofrenije. Takve su razlike uočene i u Hrvatskoj, pa se shizofrenija češće pojavljuje u Istri i Primorju naspram ostalih dijelova zemlje (Begić, 2011). Također učestalost shizofrenije je veća u područjima s većom gustoćom naseljenosti i urbanim sredinama naspram ruralnih (Piper i sur., 2012), što se objašnjava izloženošću većem broju stresora u gradu.

Procjenjuje se da u svijetu ima oko 24 milijuna shizofrenih bolesnika, a incidencija (broj novooboljelih) prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, engl. *World Health Organization* ) iznosi 10 do 40 na 100 000 osoba u jednoj godini i tijekom duljeg razdoblja je nepromjenljiva. Stopa smrtnosti kod shizofrenih bolesnika povećana je za najmanje 50% u usporedbi s općom populacijom, uključujući stopu samoubojstava od približno 5%, što rezultira smanjenim prosječnim životnim vijekom za 10 godina (Zhang i Malhotra, 2011).

Shizofrenija nastupa obično za vrijeme adolescencije, te se u više od 50 % bolesnika javlja između 15-te i 25-te godine, a rizik obolijevanja tijekom života je približno 1% u općoj populaciji (Prasad i sur., 2002). Ranije se javlja kod muškaraca i to između 18-te i 25-te, kod žena mnogo kasnije, od 25-te do 35-te godine, a postoji i razlika u učestalosti shizofrenije kod muškaraca naspram žena, gdje je omjer oboljelih muškaraca za otprilike 0,3 puta veći. Opaženo je također da žene imaju više afektivnih i pozitivnih, a manje negativnih simptoma (Bray i sur., 2010; Mowry i Nancarrow, 2001).

Kako shizofrenija ima genetičku podlogu, vjerojatnost obolijevanja se povećava s brojem srodnika koji imaju shizofreniju, osobito kod blizanaca. Kad jedan roditelj boluje od shizofrenije, rizik za njegovo dijete se povećava na 6 do 8 %. Ako su oba roditelja shizofreni bolesnici, rizik da njihovo dijete oboli iznosi više od 40%. Ukoliko se radi o jednojajčanim blizancima u pravilu, vjerojatnost za obolijevanje drugog je 50%, dok je kod dvojajčanih blizanaca rizik do 25% (Begić, 2011; Mowry i Nancarrow, 2001).

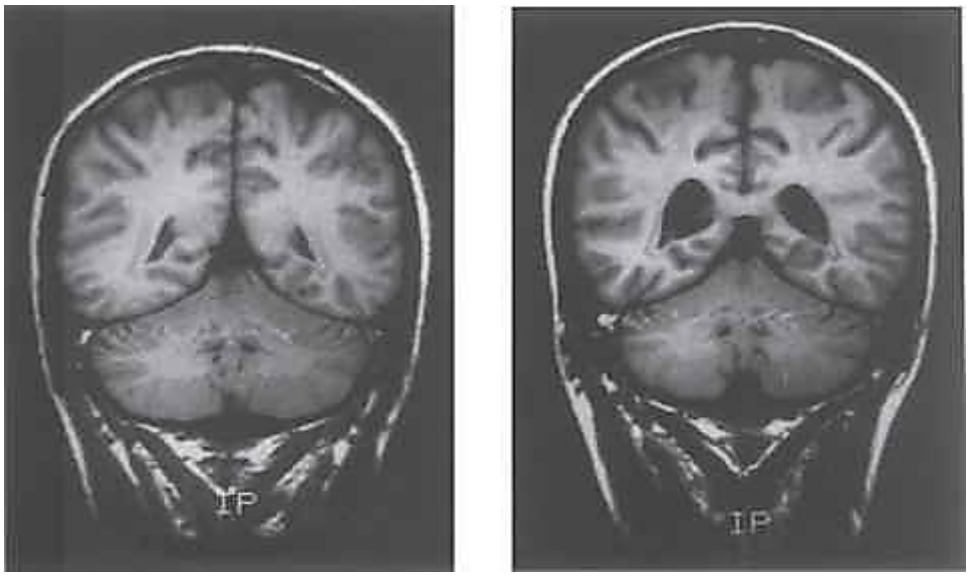
### 1.3. Etiopatogeneza shizofrenije

Istraživanja unutar obitelji, studije na blizancima i usvojenim pojedincima ukazuju na genetsku etiologiju bolesti. Iako, odsutnost pune usuglašenosti među jednojajčanim blizancima ukazuje i na važnu ulogu okolišnih čimbenika uz samu genetičku komponentu.

#### 1.3.1. Neurorazvojna hipoteza

Neurorazvojna hipoteza govori o nastanku shizofrenije, prema kojem genetički i okolišni čimbenici za vrijeme kritičnog, prenatalnog razvoja mozga mogu uzrokovati oštećenja koja utječu na mentalno zdravlje u odrasloj dobi.

Nalazi morfoloških, molekularnih *postmortem* istraživanja podupiru hipotezu prema kojoj je shizofrenija posljedica neurorazvojnih procesa (a ne neurodegenerativnih), koji utječu na poremećaj sinaptičke komunikacije neurona (Piper i sur., 2012). Na staničnoj razini postoje citoarhitektonske anomalije u područjima kao što su hipokampus i prefrontalni korteks, gdje je vidljivo značajno smanjenje volumena staničnih tijela piramidalnih neurona (Bray i sur., 2010). Neuroanatomske anomalije mozga ukazuju na povećanje lateralnih i treće ventrikule, kao i malo, ali značajno ukupno smanjenje u volumenu mozga (Piper i sur.,2012).



**Slika 2. Razlika u veličini ventrikula zdravog (lijevo) i shizofrenog (desno) jednojajčanog blizanca (slika preuzeta sa www.europeanmedical.info)**

### 1.3.2. Virusna i ostale teorije

Neke studije ukazuju na veću učestalost pojave shizofrenije kod osoba rođenih u zimskim mjesecima, što je osnova za hipotezu o virusnoj etiologiji bolesti.

Mnogo je dokaza o povezanosti prenatalnih infekcija sa povećanim rizikom za pojavu shizofrenije, tako virusne infekcije majke tijekom drugog tromjesečja trudnoće mogu uzrokovati poremećaje u neuralnom razvoju djeteta. Do poremećaja u neuralnom razvoju dolazi izravnim utjecajem infekcije ili aktivacijom citokina uključenih u razvoj mozga. Tako povećani rizik obolijevanja od shizofrenije imaju pojedinci prenatalno izloženi virusu gripe, rubele ili pak parazitu *Toxoplasmi gondii* (Piper i sur., 2012; Prasad i sur., 2002).

Također neodgovarajuća prehrana u trudnoći, te komplikacije tijekom poroda mogu povećati rizik da dijete oboli od shizofrenije, kao i niska prenatalna razina vitamina D (Begić, 2011; Piper i sur., 2012).

### 1.3.3. Genetska podloga shizofrenije

Shizofrenija ne slijedi Mendelov način nasljeđivanja, već je složena, multifaktorijalna bolest. Još uvijek nije pronađen jedinstven gen podložnosti za pojavu shizofrenije, ali postoji veliki broj gena koji ukazuju na povezanost s poremećajem. Smatra se da umjereni učinak velikog

broja gena uzrokuje podložnost pojavi bolesti, međutim nije poznato koliki broj gena bi mogao biti uključen, ni stupanj interakcije između njih, kao ni doprinos pojedinog gena na ukupnu sklonost pojavi ovoj složenoj bolesti (Morwy i Nancarrow, 2001; Murphy i McGuffin, 1996; Prasad i sur., 2002).

Genetička istraživanja obuhvaćaju studije o određenoj populaciji, obiteljske, studije blizanaca i usvojenika, te studije genske povezanosti. Studije genske povezanosti (engl. *linkage studies*) istražuju udruženost pojedinih varijanti gena (alela) s pojavom određene bolesti u nekoj obitelji. Nasljeđivanje psihičkih bolesti i poremećaja može biti posljedica različitih kromosomskih aberacija. Strukturalne abnormalnosti kromosoma uključuju insercije, delecije, duplikacije, translokacije i polimorfizme pojedinog nukleotida.

Ovakve studije genske povezanosti najviše su rađene u shizofreniji. Tako su s ovom bolešću povezana područja genskih lokusa 1q21, 22q11, 6p22, 8p12. Ti se lokusi nasljeđuju kao i shizofrenija. U tim su područjima smješteni gen koji regulira G-protein (RSG engl. *regulator of G protein signalling*), gen za katehol-O- metil transferazu (COMT), gen za prolin dehidrogenazu (PRODH), gen za disbindin (DTNBP1) i gen za neuregulin 1 (NRG). Oni se smatraju genima kandidatima ili genima predispozicije za shizofreniju (Bondy i Spellman, 2007; Mowry i Nancarrow, 2001), također dokazana je povezanost -67T varijante promotorske regije gena DAT i shizofrenije.

### 1.4. Uloga dopamina u shizofreniji

Dopamin je najvažniji neurotransmiter u objašnjavanju patofiziologije shizofrenije. Pripada kateholaminima, a nastaje iz aminokiseline tirozina. Hidroksilacijom tirozina pomoću tirozin hidroksilaze nastaje dihidroksifenilalanin ili DOPA, čija dekarboksilacija daje dopamin koji se sprema u presinaptičke mjehuriće.

Enzimi uključeni u dopaminsku razgradnju su monoamin oksidaza (MAO) i COMT (katehol-O-metiltransferaza). Gen koji kodira za COMT predložen je kao mogući rizični čimbenik podložnosti shizofreniji. Istraživanja pokazuju da je aktivnost COMT-a značajno veća u shizofrenih pacijenata, nego u kontrolnih ispitanika (Murphy i McGuffin, 1996; Prasad i sur., 2002).

Dopamin djeluje u sinapsi na različite dopaminske receptore vezane uz G proteine, te ovisno o receptoru dolazi do inhibicije ili aktivacije adenil ciklaze, čime se izazivaju različiti učinci na neuralnu aktivnost.

Pet je središnjih dopaminskih receptora do sada nađeno u ljudi i svrstavamo ih u dvije skupine: D1 i D2. D1 skupina se sastoji od dvaju receptora, dopaminskog receptora D1 (DRD1) i DRD5, a D2 skupina od tri receptora: DRD2, DRD3 i DRD4.

### 1.4.1. Dopaminergička teorija

Najznačajnija hipoteza koja pokušava objasniti razvoj shizofrenije je dopaminergička hipoteza, koja ukazuje na povećanu aktivnost dopaminergičkog sustava.

Odstupanja u dopaminergičkoj neurotransmisiji smatraju se uključenim u patogenezu shizofrenije prvenstveno zbog dvaju opažanja. Prvo, dopaminergički agonisti, kao što je amfetamin i prekursor dopamina L-DOPA (koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti) mogu izazvati psihotične simptome koji oponašaju shizofreniju. Nadalje, učinkovitost antipsihotika u liječenju shizofrenije zasniva se na principu blokade dopaminergičkog sustava, čime se smanjuju simptomi shizofrenije (Begić, 2011).

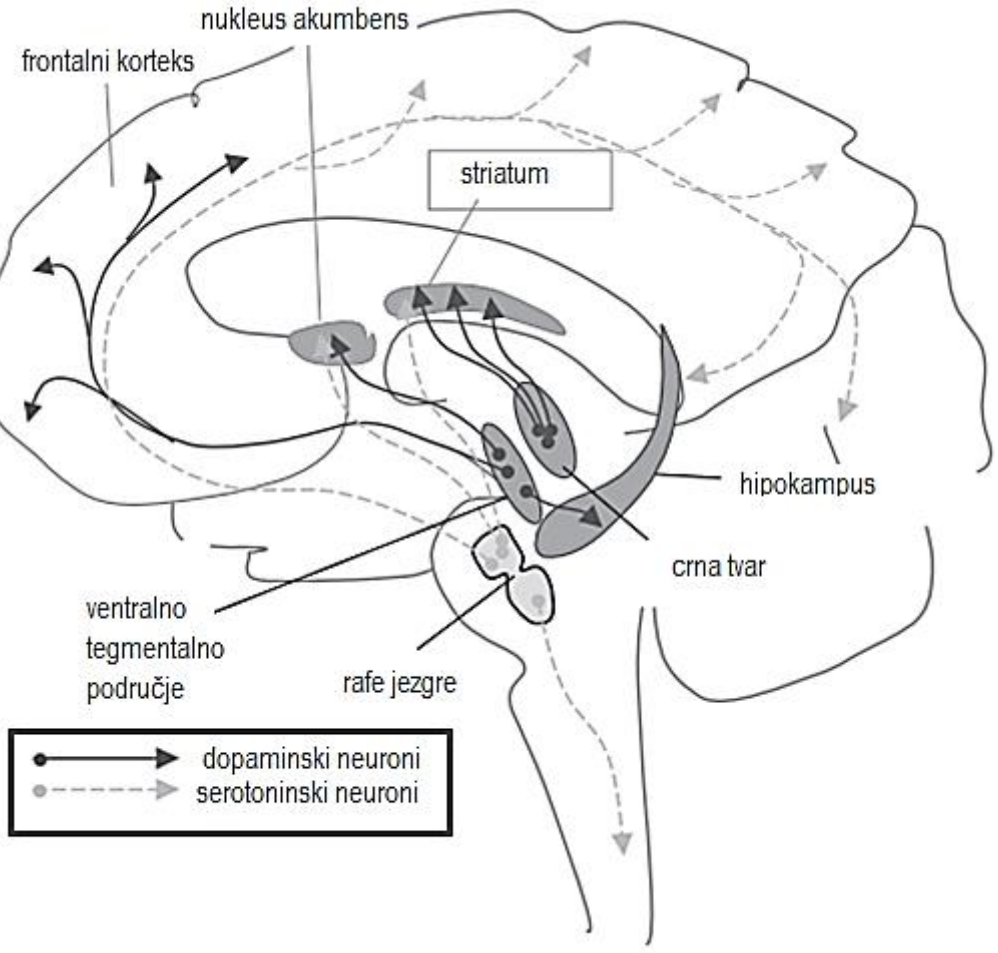
Povećana aktivnost dopaminergičkog sustava u mezolimbičkom području (pretjerano otpuštanje dopamina i povećana aktivnost D2 receptora) povezuje se sa pojavom pozitivnih simptoma, dok se smanjena dopaminergička aktivnost u prefrontalnim dijelovima mozga veže uz negativne simptome shizofrenije.

Koncept koji smatra da su upravo promjene u frontalnim područjima mozga specifične za shizofreniju uvode Weinberger i Berman (1988) i nazivaju ga hipofrontalitetom. Teza o hipofrontalitetu potvrđena je nalazima o slabijoj prokrvljenosti i sporijem metabolizmu u frontalnom režnju u oboljelih od shizofrenije. Frontalni režanj, osobito prefrontalni korteks prima projekcije iz različitih dijelova mozga. Te projekcije čine zasebne anatomske i funkcionalne krugove (okulomotorni, dorzolateralni, orbitofrontalni). Oštećenja tih sustava pokazuju simptome koji su slični onima u shizofreniji. Na primjer abnormalni očni pokreti, uzrokovani oštećenjem okulomotornog sustava i povećani broj treptaja u shizofreniji (Prasad i sur., 2002).

Gen za dopaminski D3 receptor (DRD3) također je od osobitog interesa u shizofreniji, zato što je D3 receptor jedan od ciljeva djelovanja tipičnih, kao i atipičnih antipsihoticima, a

također je pronađen u limbičkim strukturama mozga koje se vežu uz patogenezu shizofrenije (Murphy i McGuffin, 1996).

Uočeno je da lijekovi koji primarno blokiraju dopaminske receptore nisu učinkoviti kod svih pacijenata. Postupna pojava novih podataka ukazuje na bliski međuodnos dopaminergičkog i serotonergičkog sustava u mozgu. Pokazano je da aktivacija serotoninskih 5-HT1A receptora inhibira dopaminergičku neuralnu aktivnost, a samim time antagonisti 5-HT1A receptora uzrokuju pojačano otpuštanje dopamina u striatumu (Bondy i Spellman, 2007; Güzey i sur., 2007).

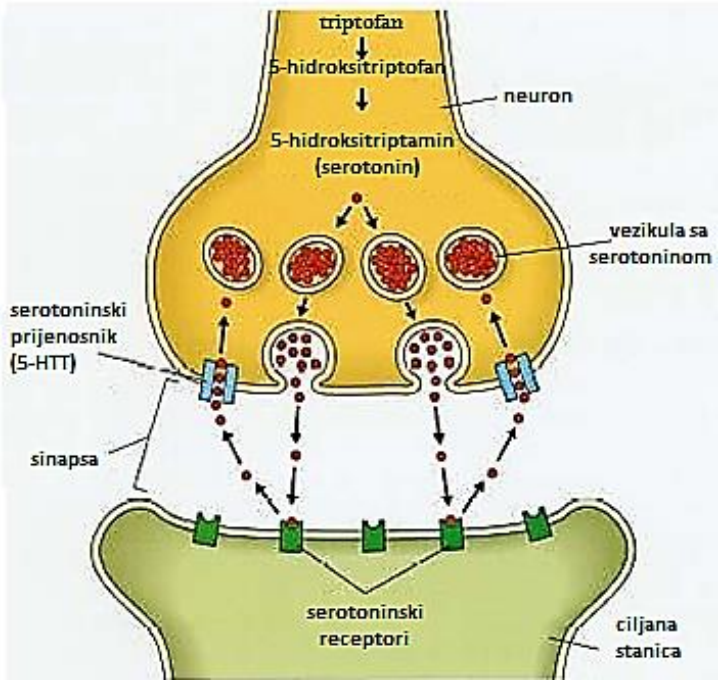



**Slika 3. Putevi dopamina i serotonina u mozgu (preuzeto i prilagođeno iz Haleem, 2015)**

### 1.5. Uloga serotonina u shizofreniji

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) je važan neurotransmiter koji upravlja određenim ponašanjima kao što su spavanje, raspoloženje, halucinacije i depresija. U središnjem živčanom sustavu nastaje u neuronima medijalnih i dorzalnih jezgara rafe koji svojim projekcijama inerviraju prednji mozak. Osim u mozgu serotonin je prisutan i u drugim dijelovima tijela kao što su crijevo, glatki mišići, trombociti (Prasad i sur., 2002).

Sinteza serotonina započinje potpomognutim prijenosom L-triptofana iz krvi u mozak, a uključuje sudjelovanje dvaju enzima. Najprije dolazi do hidroksilacije esencijalne aminokiseline triptofana pomoću enzima triptofan hidroksilaze, čime nastaje 5-hidroksitriptofan, a slijedeći korak je dekarboksilacija 5-hidroksitriptofana do serotonina pomoću AADC-a (engl. *Aromatic-L-Amino Acid Decarboxylase*), odnosno dekarboksilaze L-aromatskih aminokiselina koja također katalizira pretvorbu L-DOPA u dopamin. Spremanje serotonina, kao i dopamina, u sinaptičke mjehuriće obavlja vezikularni monoaminski prijenosnik (VMAT, engl. *Vesicular Monoamine Transporter* ), dok prijenos serotonina iz sinaptičke pukotine natrag u neuron vrši specifični serotoninski prijenosnik SERT (5-HTT). U trenutku kad akcijski potencijal u presinaptičkom neuronu doputuje do aksonskog završetka, otvaraju se naponom regulirani kalcijevi kanali, kalcij ulazi u neuron, te potiče egzocitozu serotonina u sinaptičku pukotinu. Oslobođeni serotonin difundira preko sinaptičke pukotine i veže se na serotoninske receptore koji se nalaze na membrani postsinaptičkog neurona.




**Slika 4. Mehanizam djelovanja serotonina u živčanoj sinapsi (preuzeto i prilagođeno sa vizual-science.com)**

Prema farmakološkim svojstvima, aminokiselinskom slijedu, mehanizmima prijenosa signala i genskoj strukturi, serotoninske receptore dijelimo u 7 skupina, od 5-HT1 do 5-HT7. Osim receptora 5-HT3 koji je ionotropan, svi ostali su metabotropni, te djeluju putem gvanin-nukleotid vezujućeg proteina (G-proteina) na inhibiciju ili aktivaciju adenilat ciklaze, odnosno protein kinaze A, te stimulaciju fosfolipaze C ili protein kinaze C. Napretkom molekularne biologije pronađeno je još najmanje 15 podtipova serotoninskih receptora u glodavaca i ljudi (Kawanishi i sur., 1998; Murphy i McGuffin, 1996).

Uz utvrđenu hiperaktivnost dopaminskih neurona (Brisch i sur., 2014), brojni dokazi upućuju i na poremećenu funkciju serotoninskog sustava u shizofreniji. Naime, prekomjerna serotoninska stimulacija u moždanoj kori osoba s shizofrenijom, osobito u anteriornom cingulatnom korteksu (ACC) i dorzolateralnom frontalnom režnju dovodi do poremećaja glutamatne signalizacije i posljedično do smanjenog metabolizma neurona, sinaptičke atrofije i gubitka sive tvari, u skladu s načelima plastičnosti mozga (Eggers, 2013).

Geni uključeni u serotonergičku neurotransmisiju iz nekoliko su razloga u fokusu pažnje. LSD, koji ima sličnu molekularnu strukturu kao serotonin uzrokuje halucinacije u zdravih jedinki (Begić, 2011). Također istraživanja ukazuju na promijenjenu gustoću 5-HT2A receptora (Murphy i McGuffin, 1996) i metabolizam serotonina u mozgu, gdje je uočeno da

na primjer kod terapije reserpinom, učinkovitim u liječenju shizofrenije, dolazi do smanjenja koncentracije serotonina u mozgu (Prasad i sur., 2002).

Polimorfizmi nekoliko serotonergičkih puteva opisani su i istraživani u povezanosti sa shizofrenijom, uključujući serotoninske prijenosnike (transportere, 5-HTT) i serotoninske receptore: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT6 i 5-HT7.

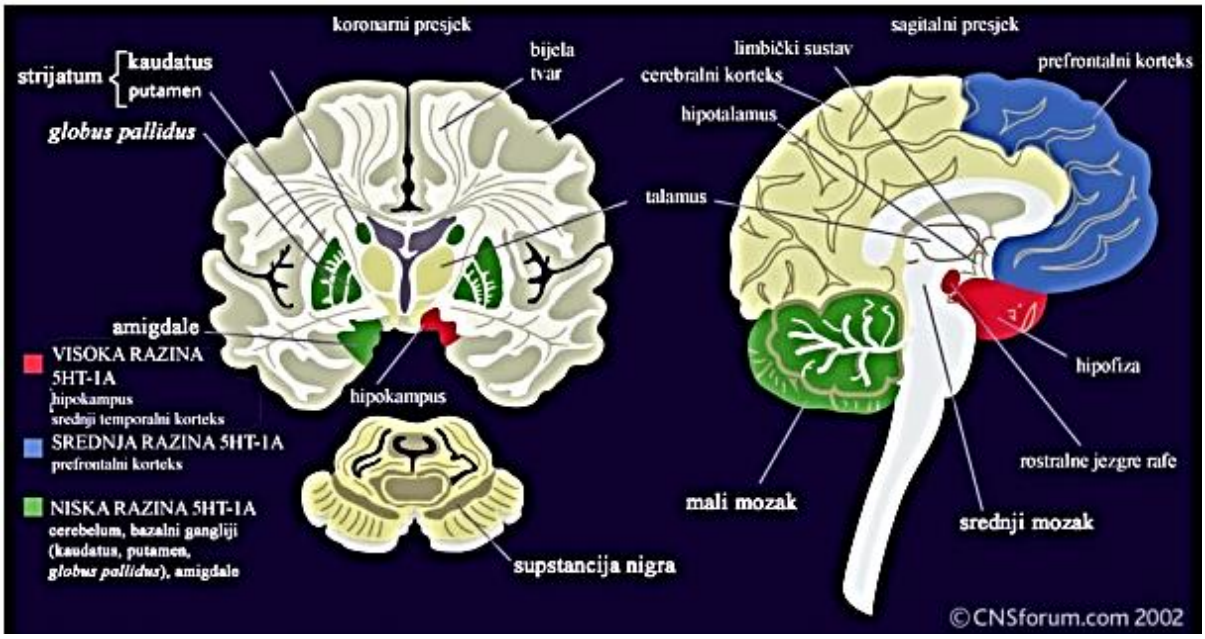
Psihofarmakološka istraživanja međuodnosa dopaminergičkih i serotonergičkih neurotransmitorskih putova, ukazuju na niz genskih lokusa povezanih sa shizofrenijom (Mowry i Nancarrow, 2001).

Veća djelotvornost i podnošljivost atipičnih antipsihotika u nekim aspektima shizofrenije, može se također djelomično pripisati izravnim ili neizravnim učincima različitih 5-HT receptora, posebice 5-HT2A i 5-HT1A (Meltzer i sur., 2003).

### 1.5.1. Serotoninski receptor 5-HT1A

5-HT1A receptor karakterizira visok afinitet za serotonin, kao i ostale 5-HT1 receptore. Također ima visoki afinitet za 8-hidroksi-2-(di-N-propilamino) tetralin ili 8-OH-DPAT koji je specifični agonist ovog receptora. Uočeno je da 8-OH-DPAT kao preferencijalni ligand 5-HT1A receptora umanjuje ekstrapiramidne popratne pojave haloperidola u animalnim modelima (Batool i Haleem, 2008), te su lijekovi koji djeluju isključivo putem D2 i 5-HT1A receptora prijeko potrebni radi potvrđivanja moguće uloge 5-HT1A receptora u poboljšanju terapije shizofrenije i Parkinsonove bolesti (Haleem, 2015).

Gen za serotoninski receptor 5-HT1A, gen je bez introna, te kodira za protein od 422 aminokiseline (~46,4 kDa). U čovjeka, gen za ovaj receptor nalazi se na 5. kromosomu (5q11.2-q13), te je osim u mozgu, eksprimiran i u limfnim tkivima, bubrezima i crijevima (Pucadyl i sur., 2005).




**Slika 5. Raspodjela 5-HT1A receptora u mozgu (preuzeto i prilagođeno sa www.cnsforum.com)**

Pronađeno je nekoliko polimorfizama ljudskog gena *HTR1A* koji kodira ta za serotoninski receptor tipa 1A. *RasI* polimorfizam prvi je detektiran RFLP metodom i varijanta identificirana kao G294A mutacija utvrđena je u skupini nesrodnih Afro-Amerikanaca. Pronađene su još neke rijetke varijante ovoga gena uključujući supstitucije dviju aminokiselina Ser22Arg i Val28Ile (Brisch i sur., 2014; Huang i sur., 2004).

Huang i suradnici (2004) otkrili su da je rs6295 polimorfizam u promotorskoj regiji gena za serotoninski 5-HT1A receptor značajno povezan sa pojavom shizofrenije. G alel ovog polimorfizma povezan je sa većom ekspresijom ovog receptora u staničnim linijama, a pronađena je i veća frekvencija G alela u shizofrenih ispitanika.

U pacijenata sa shizofrenijom, velika većina *postmortem* istraživanja govori o povećanoj gustoći 5-HT1A receptora u prefrontalnom korteksu u rasponu otprilike 15-80 % (Bantick i sur., 2001), dok pozitronska emisijska tomografija (PET) pokazuje povećano vezanje za 5-HT1A receptor (Huang i sur., 2004).

Klinička relevantnost 5-HT1A receptora mogla bi se objasniti putem atipičnih antipsihotika poput klozapina, kvetiapina i ziprasidona koji djeluju putem kombinacije D2 receptorskog antagonizma i 5-HT1A receptorskog agonizma. Povećana gustoća 5-HT1A receptora u prefrontalnom korteksu shizofrenih bolesnika i antikolinergička aktivnost 5-HT1A agonista,

te njihova sposobnost izazivanja otpuštanja dopamina u prefrontalnom korteksu, dovoljni su dokazi uloge 5-HT1A receptora u shizofreniji i liječenju antipsihoticima (Bantick i sur., 2001).

Iako je većina istraživanja usmjerena na dopamin i serotonin, uloga drugih neurotransmitora i gena uključenih u njihov metabolizam kao što je GABA, također su istraživani, gdje je uočen prije svega manji broj interneurona koji sadrže GABA-u i sniženje produkcije GABA-e unutar tih neurona. Jedan od obećavajućih pokazatelja podložnosti shizofreniji uključuje N-metil-D-aspartatne (NMDA) receptore (glutamatni receptori), koji su najgušći u prefrontalnom korteksu i u hipokampusu, a upravo te regije se najčešće povezuju sa pojavom shizofrenije (Bray i sur., 2010; Prasad i sur., 2002).

### 1. 6. Liječenje shizofrenije

Antipsihotici su lijekovi koji uklanjaju ili smanjuju psihotične simptome (prije svega sumanutosti i halucinacije, ali i druge pozitivne i negativne simptome), a koriste se u liječenju shizofrenije. Zbog izazivanja neuroleptičkog učinka (psihomotorno usporenje i emocionalno-afektivno smirenje) nazivaju se i neurolepticima. Upotrebljavaju se u liječenju psihotičnih poremećaja, ali i drugih poremećaja (poremećaji raspoloženja, opsesivno-kompulzivni poremećaj, Alzheimerova bolest, poremećaj ličnosti).

Blokada dopaminskih receptora (osobito tipa D2) u osnovi je mehanizma djelovanja antipsihotika. Što je ta blokada izraženija, antipsihotički učinci i učinci na promijenjene kognitivne procese u shizofreniji, ovih lijekova su znatniji.

Smatra se da je suvremeno liječenje psihotičnih poremećaja počelo 1952. godine otkrićem klorpromazina. Klorpromazin i njemu slični lijekovi koji su otkriveni nakon njega, imali su velik broj ekstrapiramidnih popratnih pojava (engl. *Extrapyramidal side effects*), koje se smatraju neodvojivom posljedicom neselektivne blokade dopaminskih receptora u svim dopaminskim putovima središnjeg živčanog sustava (Begić, 2011; Prasad i sur., 2002).

Postoje dvije glavne vrste antipsihotika, a to su antipsihotici prve generacije ili tipični antipsihotici i antipsihotici druge generacije ili atipični antipsihotici.

### 1.6.1. Antipsihotici prve generacije (tipični)

U antipsihotike prve generacije, uz klorpromazin koji je prvi otkriven, ubrajamo još haloperidol, tioridazin, flufenazin i još mnoge druge. Karakteristike prve generacije antipsihotika su dobro djelovanje na pozitivne simptome, uz izražene brojne motoričke popratne pojave, poznate pod nazivom ekstrapiramidne popratne pojave, kao što su akatizija, distonija, parkinsonizam, tardivna diskinezija itd.

Antipsihotični učinak prve generacije ovih lijekova posljedica je blokiranja D2 dopaminskih receptora u limbičkom sustavu, dok redukcija aktivnosti u strijatumu izaziva ekstrapiramidne simptome uključujući i tardivnu diskineziju (Lencz i Malhotra, 2009), zbog toga je važan cilj aktualnih istraživanja neuroleptika razviti antipsihotične spojeve s rijetkom pojavom ekstrapiramidnih popratnih pojava EPS (Haleem i sur., 2002).

Peuskens i suradnici (2009) navode kako kod liječenja haloperidolom naspram lijekova druge generacije (olanzapin, risperidon) zbog nuspojava vrlo često dolazi do prekidanja terapije, pacijenti rjeđe surađuju u istraživanju, te je izraženo loše socijalno funkcioniranje i češća rehospitalizacija. U pacijenata liječenih haloperidolom 72% razvilo je neki oblik ekstrapiramidnih nuspojavama, dok su olanzapin i risperidon, u manjoj mjeri izazivali nuspojave, i to u 40% , odnosno 55% ispitanika.

### 1.6.2. Antipsihotici druge generacije (atipični)

Atipični antipsihotici, koji izazivaju manje ekstrapiramidnih popratnih pojava od tipičnih antipsihotika, djeluju na negativne simptome, kogniciju i rehabilitaciju.

Većina antipsihotika druge generacije kao što su klozapin, olanzapin, risperidon, kvetiapin, ziprasidon, amisulpirid, aripiprazol djeluje blokirajući dopaminske, ali i serotoninske receptore (prvenstveno 5-HT2A), te brže disociraju sa dopaminskih (D2) receptora od tipičnih antipsihotika (Güzey i sur., 2007; Prasad i sur., 2002).

Upravo se veća brzina disocijacije atipičnih antipsihotika sa dopaminskih receptora smatra uzrokom uspješnijih rezultata liječenja shizofrenije i smanjenja pojave ekstrapiramidnih simptoma. Također, antipsihotici druge generacije pokazuju određenu selektivnost za pojedine skupine neurona (Inada i sur., 2002). Meltzer i suradnici (2003) govore kako je upravo povećano oslobađanje dopamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu,

uzrokovano djelovanjem atipičnih antipsihotika srodnih klozapinu (risperidon, olanzapin, kvetiapin i ziprasidon), najvažniji dio njihova djelovanja u poboljšanju kognitivnih i negativnih simptoma, te je utvrđeno kako se oni vežu i time zauzimaju 80% kortikalnih 5-HT2A receptora.

Atipični antipsihotici koji su direktni ili indirektni agonisti 5-HT1A receptora, imaju manje ekstrapiramidnih simptoma, te liječe pozitivne, negativne i kognitivne deficite u shizofreniji.

Kod liječenja antipsihoticima druge generacije, često se kao nuspojava javlja povećanje težine. Promotorska regija polimorfizma -759 T/C u *HTR2C* genu povezuje se upravo s tom pojavom. Tako je utvrđeno da je kod pacijenata sa shizofrenijom liječenim risperidonom ili klorpromazinom upravo T alel na prije spomenutom lokusu povezan sa manjim povećanjem težine naspram C alela kod kojeg je ono znatnije (Lencz i Malhotra, 2009).

| TIPIČNI ANTIPSIHOTICI | ATIPIČNI ANTIPSIHOTICI |
|---|---|
| klorpromazin<br>haloperidol<br>flufenazin | klozapin<br>sulpirid<br>risperidon<br>olanzapin<br>serokvel<br>kvetiapin<br>ziprasidon |

**Slika 6. Tipični i atipični antipsihotici (izvorna slika)**

### 1.6.3. Ostale metode liječenja

Učinkovitost primjene farmakoterapije je neosporno dokazana, no ona ima samo djelomični učinak na socijalne funkcije shizofrenog bolesnika. Psihosocijalne metode liječenja uključuju ranu detekciju i intervenciju, povećanje suradnje bolesnika i uvida u bolest, terapijske zajednice, različite aspekte psihoedukacije, obiteljsku terapiju, kognitivno-biheviоralnu terapiju i individualnu terapiju.

### 1.7. Motoričke popratne pojave antipsihotika

Svako liječenje antipsihoticima popraćeno je popratnim pojavama. Ekstrapiramidne popratne pojave (EPS) i metabolički sindrom predstavljaju značajan problem u kliničkoj praksi, dok se ostale popratne pojave pojavljuju sporadično kod pojedinih bolesnika (Güzey i sur., 2007).

Ekstrapiramidne popratne pojave dijelimo na rane i kasne. Rane EPS pojave uključuju distonične reakcije, akatiziju i Parkinsonov sindrom, dok je tardivna diskinezija, kasna EPS (Mihaljević-Peleš i Šagud, 2006).

| | | |
|---|---|---|
|  | DISKINEZIJA | Brze, iregularne, ponavljajuće kontrakcije (tikovi), nepomični intervali između kontrakcija, povećava se tijekom aktivnosti i nervoze. |
|  | DISTONIJA | Iznenadne, prisilne kontrakcije mišića (spazam); kontrakcije rezultiraju sporim pokretima i neobičnim položajima tijela; kontrakcije traju više od 2 sekunde. |
|  | AKATAZIJA | Povećana frekvencija uobičajenih pokreta; nemogućnost mirnog sjedenja, nemir u nogama, potreba za stalnim kretanjem. |
|  | PARKINSONIZAM | Redukcija ili usporavanje svih pokreta (bradikinezija); pognuto držanje, hod sitnim koracima; lice smanjene mimike ("lice poput maske"); tremori koji se javljaju za vrijeme mirovanja i povećavaju tokom aktivnosti. |
|  | ATAKSIJA | Nedostatak koordinacije mišića tijekom voljnih pokreta, poput hodanja ili podizanja predmeta, nije rezultat slabosti mišića. |

**Slika 7. Shematski prikaz motoričkih nuspojava pri liječenju shizofrenije (preuzeto i prilagođeno sa www.psychvisit.com)**

Motoričke popratne pojave nastaju primarno zbog blokade dopaminskih receptora u nigrostriatumu i posljedične prekomjerne aktivnosti acetilkolinskog sustava, što se klinički prezentira kao EPS. Jedan od čimbenika koji može uzrokovati ekstrapiramidne popratne pojave je i sama doza antipsihotika koji se primjenjuje pri liječenju simptoma bolesti odnosno

koncentracija lijeka u plazmi, naime blokada više od 75 do 80 % D2 receptora rezultira pojavom akutnih EPS (Güzey i sur., 2007).

Aktivacija, odnosno agonističko djelovanje na 5-HT1A i 5-HT1B receptore može ublažiti L-DOPA induciranu diskineziju uzrokovanu otpuštanjem dopamina putem serotoninskih neurona, bez utjecaja na njen anti-parkinsonski učinak (Haleem, 2015).

Güzey i suradnici (2007) genotipizirali su ispitanike, kod kojih su se pojavili ekstrapiramidni simptomi kao što su akutna distonija, parkinsonizam i tardivna diskinezija, za ukupno osam polimorfizama dopaminskih i serotoninskih receptora i transportera, kako bi utvrdili povezanost nuspojava antipsihotika sa određenim varijacijama gena shizofrenih bolesnika. Istraženi su Taq1A polimorfizam gena *DRD2* za D2 receptor dopamina, polimorfizam jedne baze Msc1 u genu za dopaminski receptor D3 (*DRD3*), polimorfizam mini satelitnih ponavljanja u genu za prijenosnik dopamina (*DAT1*), polimorfizmi u genu za serotoninski receptor 5-HT2A (*5HTR2A*) i to njih četiri (102T/C, His452Tyr, 516 C/T i Thr25Asn), te *Ins/Del* polimorfizam u promotorskoj regiji gena za prijenosnik serotonina (*5HTTLPR*). Pronađena je veća frekvencija A1 alela polimorfizma Taq1 gena *DRD2* u pacijenata sa EPS, što se objašnjava mogućom manjom ekspresijom D2 receptora u striatumu kod osoba koje imaju A1 alel polimorfizma Taq1.

Lencz i Malhotra (2009) navode da se češća pojava akatizije u istraživanjima povezuje sa ispitanicima nositeljima Gly u *DRD3* genu. Također polimorfizam rs167771 *DRD3*gena povezuju sa ekstrapiramidnim simptomima u pacijenata liječenih risperidonom.

Procijenjeno pojavljivanje ekstrapiramidnih simptoma u pacijenata koji uzimaju tipične antipsihotike je od 50% do 90%, dok pacijenti koji uzimaju atipične antipsihotike pokazuju znatno manji rizik za EPS (Inada i sur., 2002). Ove nuspojave jako su kompromitirale antipsihotičnu terapiju i dovodile do prekida uzimanja lijekova i učestalih recidiva bolesti (Mihaljević-Peleš i Šagud, 2006).

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi postoji li u ispitanika oboljelih od shizofrenije genotipska i haplotipska povezanost polimorfizama rs6295 i rs878567 u genu za 5-HT1A serotoninski receptor s motoričkim popratnim pojavama tipičnog antipsihotika haloperidola. Dobiveni rezultati trebali bi doprinijeti boljem razumijevanju uloge gena serotoninskih receptora u razvoju motoričkih popratnih pojava u shizofreniji, posebice kod primjene tipičnog antipsihotika haloperidola, te tako pridonijeti uspješnosti odgovora na terapiju, kao i potvrditi potrebu za individualiziranim terapijskim liječenjem.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. MATERIJAL

### 3.1.1. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 197 ispitanika muškog spola i hrvatskog podrijetla sa dijagnozom shizofrenije primljenih na liječenje u neuropsihijatrijsku bolnicu „Dr. Ivan Barbot“ u Popovači.

Odgovarajuća dijagnoza bolesti i simptomi kod ispitivanih osoba, postavljeni su od strane stručnjaka neuropsihijatrijske bolnice, psihijatara, temeljem propisanih dijagnostičkih kriterija. Dijagnoza je postavljena na osnovi opsežne anamneze, prema podacima prikupljenim iz kliničkog intervjua,10. revizije Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih zdravstvenih problema (MKB-10), koja obuhvaća kodove za bolesti, simptome, abnormalnosti i slično. Također je uključen broj bodova postignut na ocjenskoj PANSS (engl. *Positive and Negative Syndrome Scale*; Kay i sur., 1987) ljestvici pozitivnih i negativnih simptoma, te kriteriji iz dijagnostičkog i statističkog priručnika za duševne poremećaje (DSM–IV engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th.Edition).* Za postavljanje dijagnoze prema DSM-IV (APA, 1994) potrebna su 2 ili više karakteristična simptoma (deluzija, halucinacija, dezorganiziranost govora, dezorganiziranost ponašanja, negativni simptomi). Bolesnici su isključeni iz studije ukoliko su imali: dijagnosticiranu ozbiljnu neurološku bolest, anamnezu o težoj traumi glave, dijagnosticiranu tešku tjelesnu bolest npr. malignu bolest, tešku bolest srca, bubrega, jetre, pluća ili metaboličku bolest, anamnezu o preboljenom malignom neuroleptičkom sindromu i ovisnost bilo koje vrste u zadnjih šest mjeseci.

Svi ispitanici potvrdili su dobrovoljno sudjelovanje u ovom istraživanju putem pismenog informativnog pristanka, a istraživanje je također bilo u potpunosti provedeno u skladu s Helšinskom deklaracijom iz 1964. godine.

Nakon dva tjedna primjene 15 mg/dan haloperidola, intramuskularno ili oralno, razvoj motoričkih nuspojava u ispitanika procjenjivao se standardiziranim ocjenskim ljestvicama SAS (Simpson-Angus Rating Scale for Extrapyramidal Side Effects; Simpson i Angus, 1970), BARS (*Barnes Akathisia Rating Scale;* Barnes, 1989) i ESRS (*Extrapyramidal Symptom Rating Scale*; Chouinard i Margolese, 2005). Nakon dva tjedna liječenja ispitanici su podijeljeni na one koji su razvili akutne ekstrapiramidne popratne pojave (SAS skor > 3) i one bez nuspojava (SAS skor ≤ 3).

## 3.2. METODE

U plastične šprice sa 2 mL antikoagulansa ACD (engl. *Acid Citrate Dextrose*) uzeti su uzorci krvi ispitanika u volumenu od 8 mL. Krvni uzorci su zatim u plastičnim epruvetama pohranjeni na -20 °C do izolacije DNA.

### 3.2.1. Izolacija DNA metodom isoljavanja

Svim ispitanicima iz uzorka krvi metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988) izolirana je genomska DNA iz leukocita. Ukratko, uzorke krvi koji su bili pohranjeni na -20 °C izvadili smo iz zamrzivača i ostavili na sobnoj temperaturi da se otope, nakon čega smo ih 15 minuta miješali na valjkastoj miješalici. Mikropipetom smo prenijeli 300 μL krvi u plastične epruvete (Eppendorf, 1.5 mL), te dodali 900 μL hladnog pufera (RCLB, engl. *RedCell Lysis Buffer*; 10 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mMNaCl, pH 7.6) namijenjenog za lizu eritrocita. Sadržaj mikroepruvete dobro smo promiješali na vorteksu i ostavili 10 minuta na ledu, te zatim centrifugirali 2 minute na 13 400 g. Kako bi uklonili raspadnute eritrocite, supernatant smo odlili pazeći da se ne digne talog. Postupak ispiranja taloga u puferu (RCLB), vorteksiranje i centrifugiranje smo ponovili 3 puta, dok talog nije bio sasvim bijele boje. Na talog smo dodali 300 μL SE pufera (75 mM NaCl, 25 mM $Na_2EDTA$, pH 8.0), 30 μL 10 % SDS-a (pH 7.2) i 1.5 μL proteinaze K (20 mg/kg), promiješali laganim okretanjem mikroepruvete, te inkubirali u termobloku 2 sata na 56 °C uz miješanje.

Nakon što smo inkubacijom lizirali leukocite i jezgrine membrane, uzorke smo ohladili na sobnoj temperaturi, te dodali 120 μL 5M NaCl, snažno promiješali i centrifugirali 5 minuta na 12 000 g. Ovim smo postupkom izdvojili DNA u supernatant. U novu smo mikroepruvetu prenijeli 1.5 mL supernatanta i dodali 800 μL ohlađenog izopropanola. Pažljivo smo miješali sadržaj epruvete izvrtanjem do pojave taloga DNA, a zatim centrifugirali 2 minute na 12 000 g. Izopropanol smo odlili, a talog DNA isprali sa 250 μL 75%-tnog etanola. Ponovili smo postupak centrifugiranja (2 minute, 12 000 g), odlili supernatant i ostavili talog na sušenju u digestoru 30 minuta. Konačno smo dodali 100 μL TE pufera (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0), ostavili sat vremena pri 37 °C radi otapanja DNA. Otopljenu DNA pohranili smo na -20 °C.

#### 3.2.1.1. Kemikalije potrebne za izolaciju DNA

1. Pufer za lizu eritrocita (RCLB, engl. *Red Cell Lysis Buffer*)
2. 5 mM NaCl
3. SE pufer (Natrij- EDTA pufer, engl. *Sodium EDTA Buffer*)
4. Proteinaza K
5. SDS (Natrijev lauril sulfat, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*)
6. Etanol (96 % i 70 %)
7. TE pufer (Tris- EDTA pufer engl. *TE buffer*)
8. Izopropanol

### 3.2.2. Određivanje genotipa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-Time PCR)

Primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR, engl. *Real-Time PCR*) i alelne diskriminacije provedena je genotipizacija polimorfizama rs6295 i rs878567 u genu koji kodira za serotoninski 5-HT1A receptor. Real-time PCR metoda, odnosno PCR u „stvarnom" vremenu inačica je klasične lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*). Real-time PCR podrazumijeva praćenje PCR umnožavanja tijekom cijele reakcije. Dok se kod tradicionalnog PCR-a detekcija vrši u završnoj fazi na agaroznom gelu, kod RT-PCR-a provodi se simultana detekcija PCR produkta tijekom vremena pomoću fluorescentnih proba ili početnica, čime se postiže visoka osjetljivost metode.

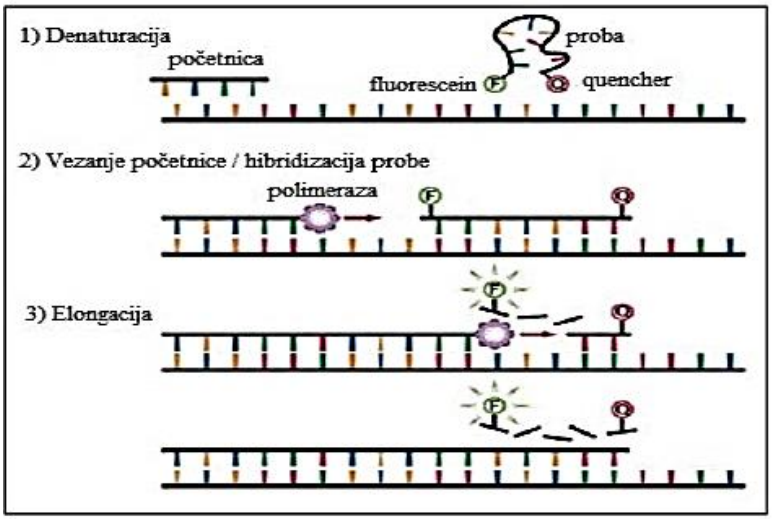
Jedna od metoda koja se temelji na ovom principu je metoda alelne diskriminacije. Ona se primjenjuje pri istraživanju promjene u samo jednom nukleotidu (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

„Real-time TaqMan PCR" tehnologija koristi dvostruko označenu fluorescentnu probu. Naime, reporter boja koja emitira fluorescentnu svjetlost vezana je za 5' kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (engl. *quencher* - onaj koji gasi) vezan za 3' kraj i smanjuje fluorescencijski signal energetskim transferom Förster-tipa (FRET engl. *Förster-type energy transfer*). U fazi hlađenja nakon denaturacije DNA kada se za ciljni dio DNA vežu neobilježene početnice, dolazi i do vezanja TaqMan probe za specifičnu regiju DNA.

Taq-polimeraza dodaje nukleotide 3'-5' polimeraznom aktivnošću pri čemu istovremeno dolazi i do uklanjanja TaqMan probe sa kalupa DNA zbog 5'-3' egzonukleazne aktivnosti Taq-polimeraze. Ovim procesom se prigušivač fluorescencije udaljava od reporter boje, te ona emitira fluorescenciju jer se prigušivač više ne nalazi u blizini reportera i ne blokira emisiju. ABI Prism uređaj detektira i mjeri povećanje u intenzitetu fluorescencije u stvarnom vremenu, odnosno u svakom ciklusu umnažanja (Čačev i Kapitanović, 2007).

U sustavu s dva alela kao što je naš koriste se dvije različite probe TaqMan probe MGB (engl. *Minor groove binder*). Sastoje se od obilježavajućih boja VIC i FAM koje se nalaze na 5' krajevima odgovarajućih proba. MGB sekvenca na 3' kraju proba omogućava povećanu temperaturu mekšanja (Tm) i dizajn kraćih proba za strožu alelnu diskriminaciju.

Na DNA uzorcima ispitanika utvrđivali smo prisutnost G ili C baze na mjestu rs6295 i prisutnost baze A ili G na mjestu rs878567 kao polimorfizme gena *HTR1A* koji kodira za serotoninski receptor 5-HT1A, a nalazi se na kromosomskoj lokaciji 5q11.2-q13 (Pucadyl i sur., 2005). Primijenili smo metodu alelne diskriminacije polimorfizma uz pomoć 5' nukleazne reakcije koja koristi fluorescentne probe i umnažanje specifičnih odsječaka DNA lančanom reakcijom polimerazom i njihovu detekciju u jednom koraku.




**Slika 8. Prikaz „Real-time TaqMan PCR“ tehnologije (slika preuzeta i prilagođena sa www.foodsafetywatch.org)**

Izoliranu DNA smo odmrznuli, te pripremili razrjeđenja u destiliranoj vodi kako bi u konačnici dobili 1-20 ng DNA za genotipizaciju. Odpipetirali smo po 4.5 µL uzorka DNA u PCR reakcijske pločice i 5.5 µL reakcijske mješavine, koja se sastojala od Taqman

univerzalne mješavine (5μL ) i Taqman mješavine za genotipizaciju ciljanog SNP-a (40 x 0.25 μl). Reakcijske pločice smo zatvorili folijom i centrifugirali 2 minute na 5000 rpm. Pločice smo zatim stavili u uređaj "*ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus*" i pokrenuli proces genotipizacije prema uvjetima navedenim u tablici 1.

**Tablica 1. Uvjeti RT-PCR reakcije**

| Uvjeti RT-PCR reakcije | Temperatura | Vrijeme |
|---|---|---|
| Početni korak | 95 °C | 10 min |
| 40 ciklusa umnožavanja: | | |
| Denaturacija | 92 °C | 15 sek |
| Vezanje početnica i ekstenzija lanca | 60 °C | 1 min |
| Detekcija fluorescencije | 60 °C | |

### 3.2.2.2. Kemikalije potrebne zaizvođenje RT-PCR metode

- Genomska DNA razrijeđena u $dH_2O$ (1-20 ng DNA), 4.5 μL
- Taqman univerzalna mješavina, 5 μL
- 40x Taqman mješavina za genotipizaciju SNP-a, 0.5 μL

### 3.2.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program «*GraphPad Prism version 4.00 for Windows*» (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). S obzirom da raspodjela podataka nije bila normalna, skupine ispitanika uspoređivane su prema dobi i bodovima ocjenskih ljestvica (izraženih kao srednja vrijednost ± standardna pogreška) primjenom Mann-Whitney testa ili Kruskal-Vallisovom ANOVA-om. Značajnost odstupanja dobivene raspodjele genotipova od očekivane (Hardy-Weinbergova raspodjela) kao i razlike u raspodjeli genotipova, alela i nosioca istraživanog polimorfizma između različitih skupina određivale su se primjenom $\chi 2$ testa, odnosno Fisherovog testa. Program «Haploview version 4.2» (Barrett i sur., 2005) korišten je za izradu LD (engl. *linkage disequilibrium*) matrice i utvrđivanje haplotipskog bloka istraživanih polimorfizama, s minimalnom D' vrijednošću podešenom na 0.80, te za usporedbu frekvencija haplotipova u shizofrenih osoba sa i bez EPS nakon tretmana haloperidolom. Statistički značajnim smatrane su one razlike kod kojih je vjerojatnost p bila manja od 0.05.

# 4. REZULTATI

Predloženo istraživanje obuhvatilo je 197 osoba oboljelih od shizofrenije muškog spola i hrvatskog podrijetla, liječenih tipičnim antipsihotikom haloperidolom tijekom dva tjedna. Prosječna dob ispitanika uključenih u studiju bila je 36.10 ± 10.23 (SD) godina. Od ukupnog broja ispitanika, njih 96 (48.73%) razvilo je akutne ekstrapiramidne popratne pojave (EPS), odnosno na SAS ocienskoj ljestvici imalo je SAS skor > 3. Nakon dva tjedna terapije haloperidolom, 47 (23.86%) bolesnika razvilo je akatiziju, 36 (18.27%) akutnu distoniju, te 64 (32.48%) diskineziju (Tablica 2).

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

| Ispitanici s dijagnozom shizofrenije | Ekstrapiramidne popratne pojave (EPS) | Akatizija | Akutna distonija | Diskinezija |
|---|---|---|---|---|
| 197 (100%) | 96 (48.73%) | 47 (23.86%) | 36 (18.27%) | 64 (32.48%) |

### 4.1. Polimorfizam rs6295 u genu *HTR1A*

Uzorci DNA izolirani iz krvi svih ispitanika podvrgnuti su genotipizaciji polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A* koji se nalazi na kromosomu 5, a kodira za serotoninski 5-HT1A receptor.

Kao što je prikazano u tablici 3., frekvencije opaženih genotipova polimorfizma rs6295 u bolesnika oboljelih od shizofrenije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ($\chi 2$ = 0.664, p =0.415)

**Tablica 3. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs6295**

| Genotipovi | | CC | CG | GG |
|---|---|---|---|---|
| p = 0.415 | Dobiveno | 51 (25.89%) | 104 (52.79%) | 42 (21.32%) |
| | Očekivano | 53.9 (27.36%) | 98.3 (49.90%) | 44.9 (22.79%) |

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

U ispitanika oboljelih od shizofrenije nakon 2 tjedna monoterapije tipičnim antipsihotikom haloperidolom razvoj EPS evaluiran je primjenom standardiziranih ocjenskih skala BARS,

SAS i ESRS. Broj bodova na navedenim ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A* (Tablica 4, slika 9).

S obzirom da rezultati nisu bili raspodijeljeni prema normalnoj raspodjeli podataka, za njihovu statističku analizu primijenila se Kruskal-Valisova ANOVA. Kruskal-Valisova ANOVA nije utvrdila značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na SAS ($H = 1.17$, $df = 2$, $p = 0.56$), ESRS ($H = 0.62$, $df = 2$, $p = 0.73$) i BARS ($H = 1.41$, $df = 2$, $p = 0.50$) ocjenskoj skali.

**Tablica 4. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs6295**

| **Ocjenska skala** | **CC (n=51)** | | **CG (n=104)** | | **GG (n=42)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Broj bodova** | **srednja vrijednost** | **standardna pogreška** | **srednja vrijednost** | **standardna pogreška** | **srednja vrijednost** | **standardna pogreška** |
| **BARS** | 1.88 | 0.46 | 1.75 | 0.33 | 0.98 | 0.32 |
| **SAS** | 5.57 | 0.76 | 4.87 | 0.55 | 4.81 | 0.94 |
| **ESRS** | 25.16 | 3.17 | 26.33 | 2.34 | 23.90 | 4.12 |

Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela G, polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A* (Tablica 5, slika 10).

**Tablica 5. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela G, polimorfizma rs6295**

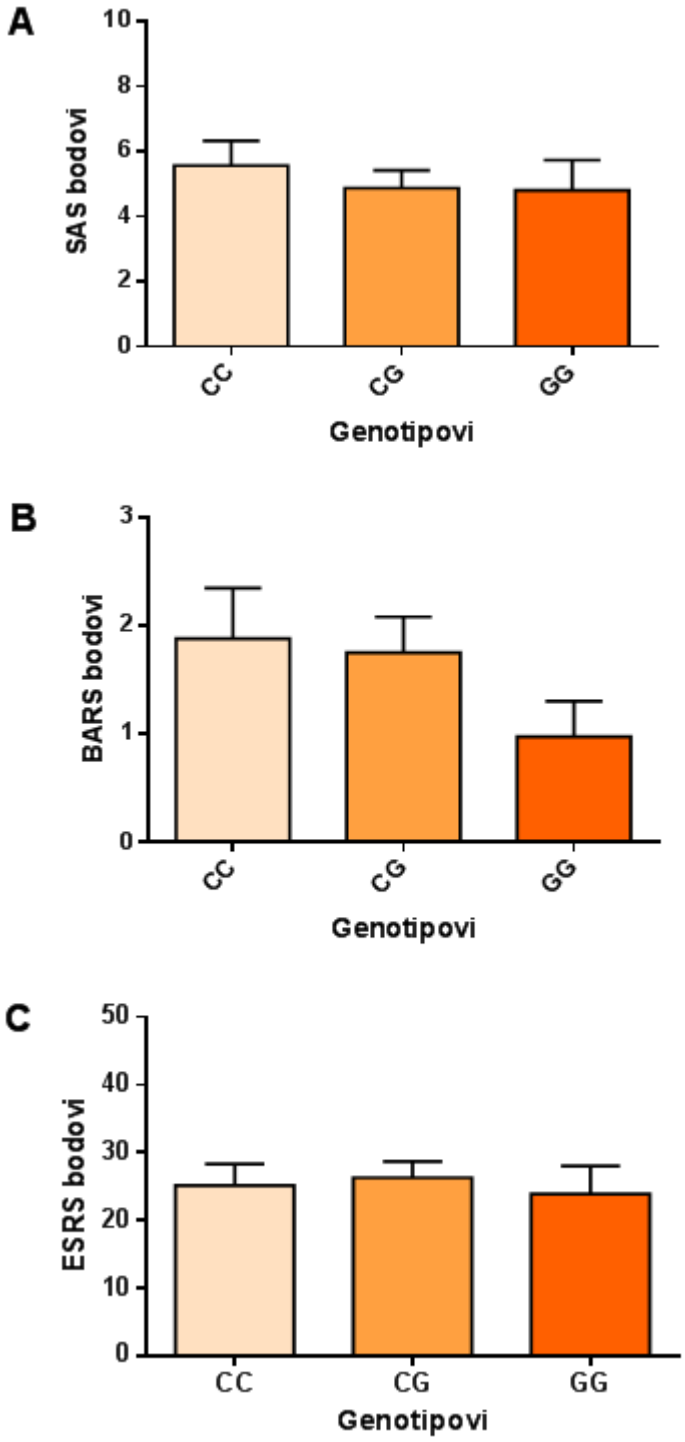
| Ocjenska skala | CC (n=51) | | G (n=146) | |
|---|---|---|---|---|
| Broj bodova | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška |
| **BARS** | 1.88 | 0.46 | 1.53 | 0.25 |
| **SAS** | 5.57 | 0.76 | 4.86 | 0.47 |
| **ESRS** | 25.16 | 3.17 | 25.63 | 2.04 |

Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela G, u broju bodova na SAS ($U = 3363$, $p = 0.29$), BARS ($U = 3547$, $p = 0.50$) i ESRS ($U = 3686$, $p = 0.92$) ocjenskoj skali.

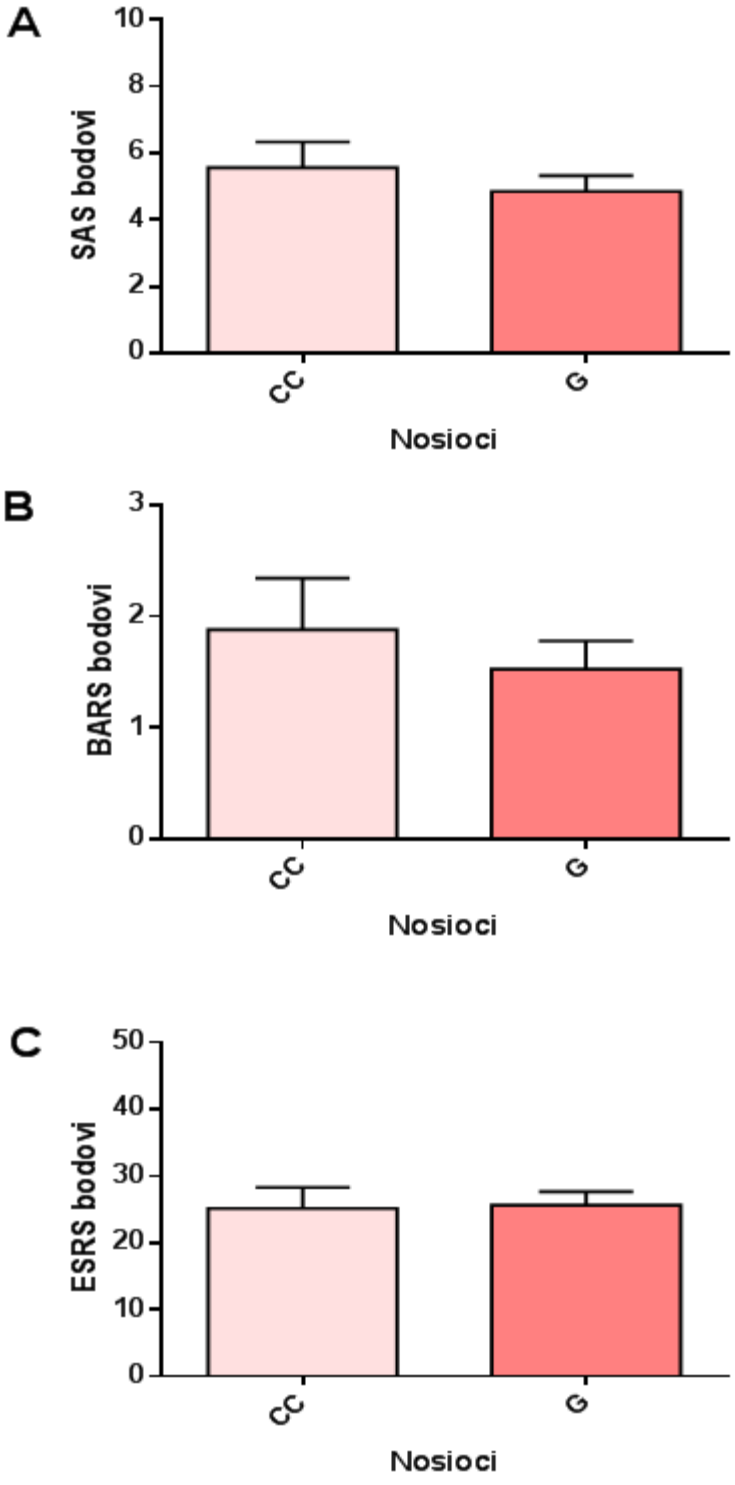
Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A* (Tablica 6, slika 11).

Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela C, u broju bodova na SAS ($U = 3078$, $p = 0.58$), ESRS ($U = 3027$, $p = 0.48$) i BARS ($U = 2974$, $p = 0.26$) ocjenskoj skali.

Kao što je prikazano u tablici 7 i na slici 12A, usporedba genotipova ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne EPS (SAS skor > 3) i na one bez EPS (SAS skor $\leq$ 3) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike ($\chi 2 = 0.58$, $df = 2$, $p = 0.75$) ($\chi 2$-test).




**Slika 9. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs6295. Slika prikazuje srednju vrijednost ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Kruskal-Valisovom ANOVA-om.**




**Slika 10. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela G, polimorfizma rs6295. Slika prikazuje srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Mann-Whitney testom**

**Tablica 6. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295**

| Ocjenska skala | GG (n=42) | | C (n=155) | |
|---|---|---|---|---|
| Broj bodova | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška |
| **BARS** | 0.98 | 0.33 | 1.79 | 0.27 |
| **SAS** | 4.81 | 0.94 | 5.10 | 0.45 |
| **ESRS** | 23.90 | 4.12 | 25.94 | 1.88 |

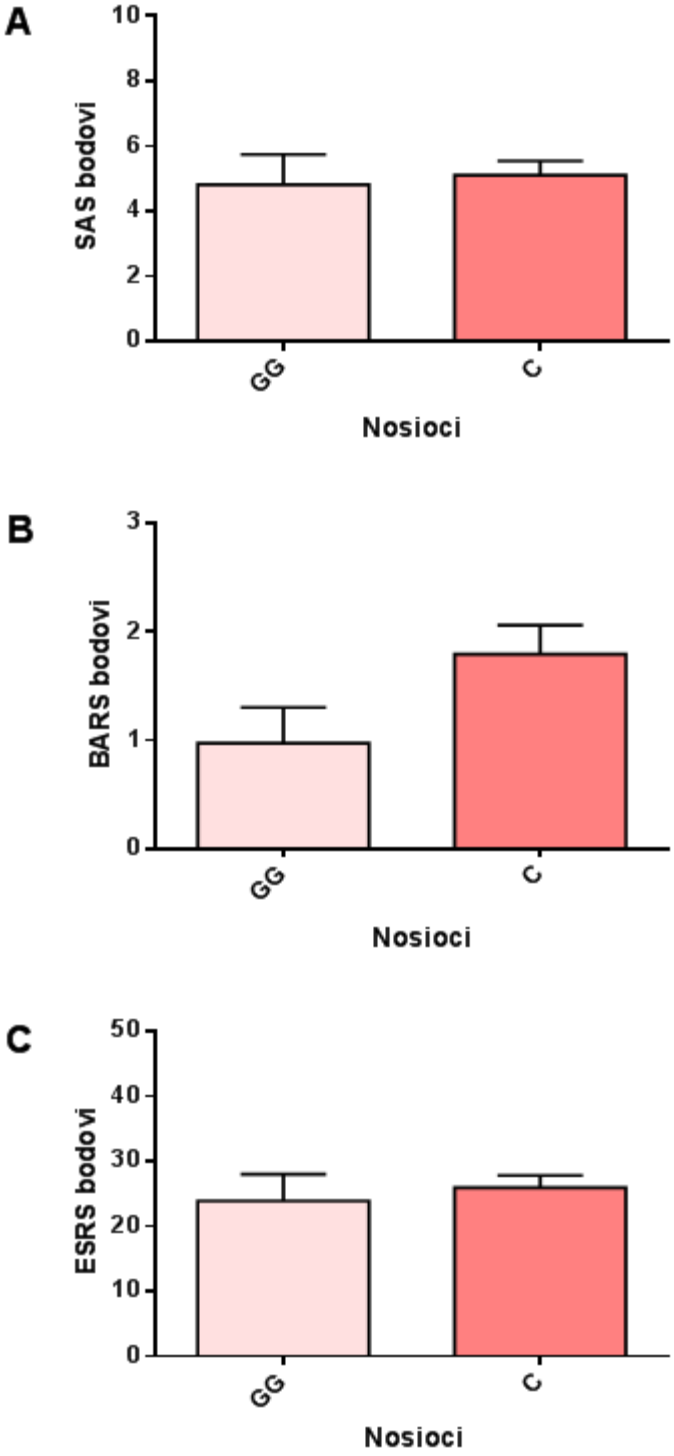
**Tablica 7. Raspodjela genotipova polimorfizma rs6295 u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akutnih EPS nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna**

| Genotipovi | CC | CG | GG |
|---|---|---|---|
| **s EPS** | 27 | 50 | 19 |
| **bez EPS** | 24 | 54 | 23 |

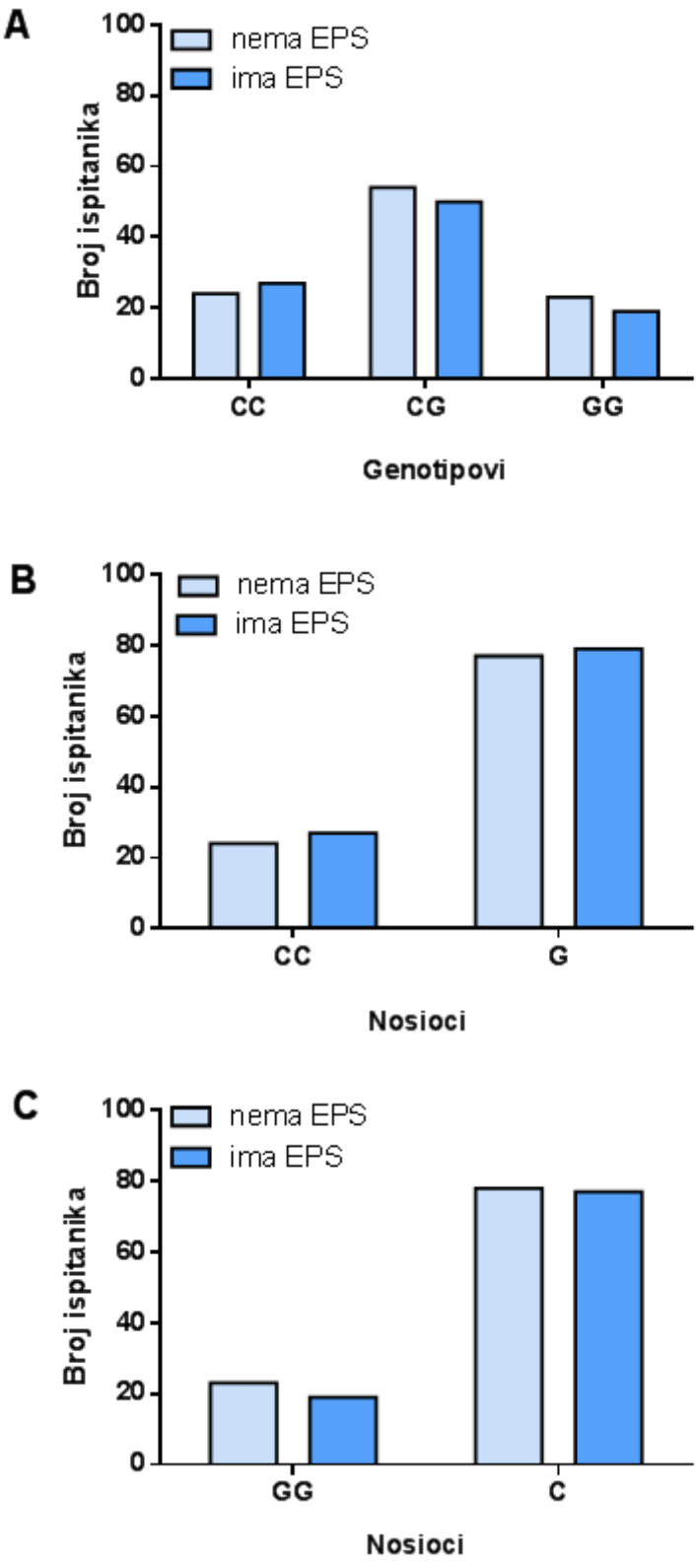
Statistički značajne razlike nisu utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez akutnih EPS nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela G ($p = 0.87$, Fisher-ov test) (Slika 12B), tj. na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela C ($p = 0.73$, Fisher-ov test) (12C) (Tablica 9).

Tablica 9. prikazuje raspodjelu genotipova polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna. U tablici 10. prikazana je raspodjela nosioca genotipa CC naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna.

Kao što se vidi i na slici 13A, nismo utvrdili statistički značajnu razliku ($\chi 2 = 0.90$, $df = 2$, $p = 0.64$) u frekvenciji genotipova u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom ($\chi 2$-test).




**Slika 11. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295. Slika prikazuje srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Mann-Whitney testom.**




**Slika 12. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa CC, odnosno nosioca genotipa GG u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akutnih EPS nakon terapije haloperidolom**

**Tablica 8. Razvoj akutnih EPS u oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela G, odnosno prema nosiocima genotipa TT naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295**

| **Nosioci** | **CC** | **G** |
|---|---|---|
| **s EPS** | 27 | 69 |
| **bez EPS** | 24 | 77 |
| **Nosioci** | **GG** | **C** |
| **s EPS** | 19 | 77 |
| **bez EPS** | 23 | 78 |

**Tablica 9. Raspodjela genotipova polimorfizma rs6295 u oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna**

| **Genotipovi** | **CC** | **CG** | **GG** |
|---|---|---|---|
| **sa akatizijom** | 14 | 25 | 8 |
| **bez akatizije** | 37 | 79 | 34 |
| **sa akutnom distonijom** | 9 | 20 | 7 |
| **bez akutne distonije** | 42 | 84 | 35 |
| **sa diskinezijom** | 16 | 37 | 11 |
| **bez diskinezije** | 35 | 67 | 31 |

Nadalje, statistički značajne razlike nisu utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akatizije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela G ($p = 0.57$, Fisher-ov test) (Slika 13B), kao ni između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela C ($p = 0.54$, Fisher-ov test) (Slika 13C).

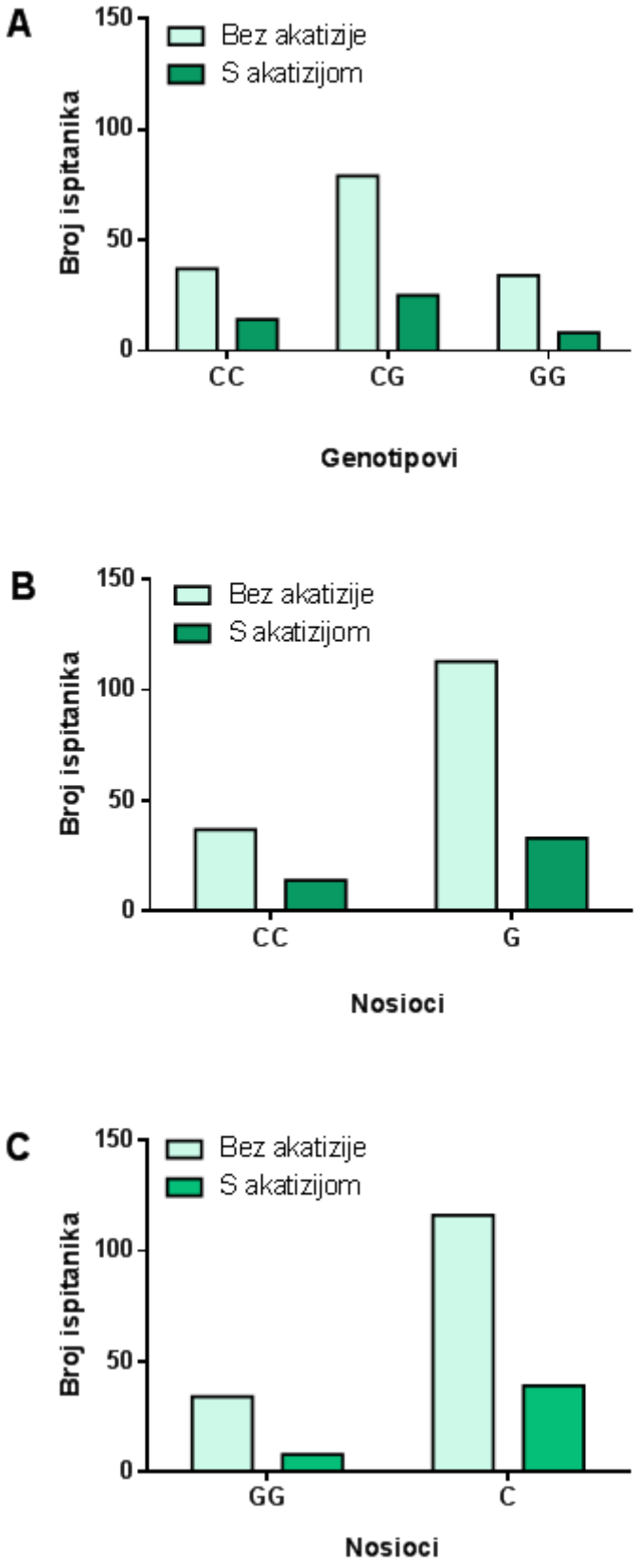
Nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom ($\chi 2 = 0.15$, $df = 2$, $p = 0.93$) ($\chi 2$-test) (Slika 14A). Također, nismo pronašli značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije

haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela G (p = 1.00, Fisher-ov test) (Slika 14B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela C (p = 1.00, Fisher-ov test) (Slika 14C).

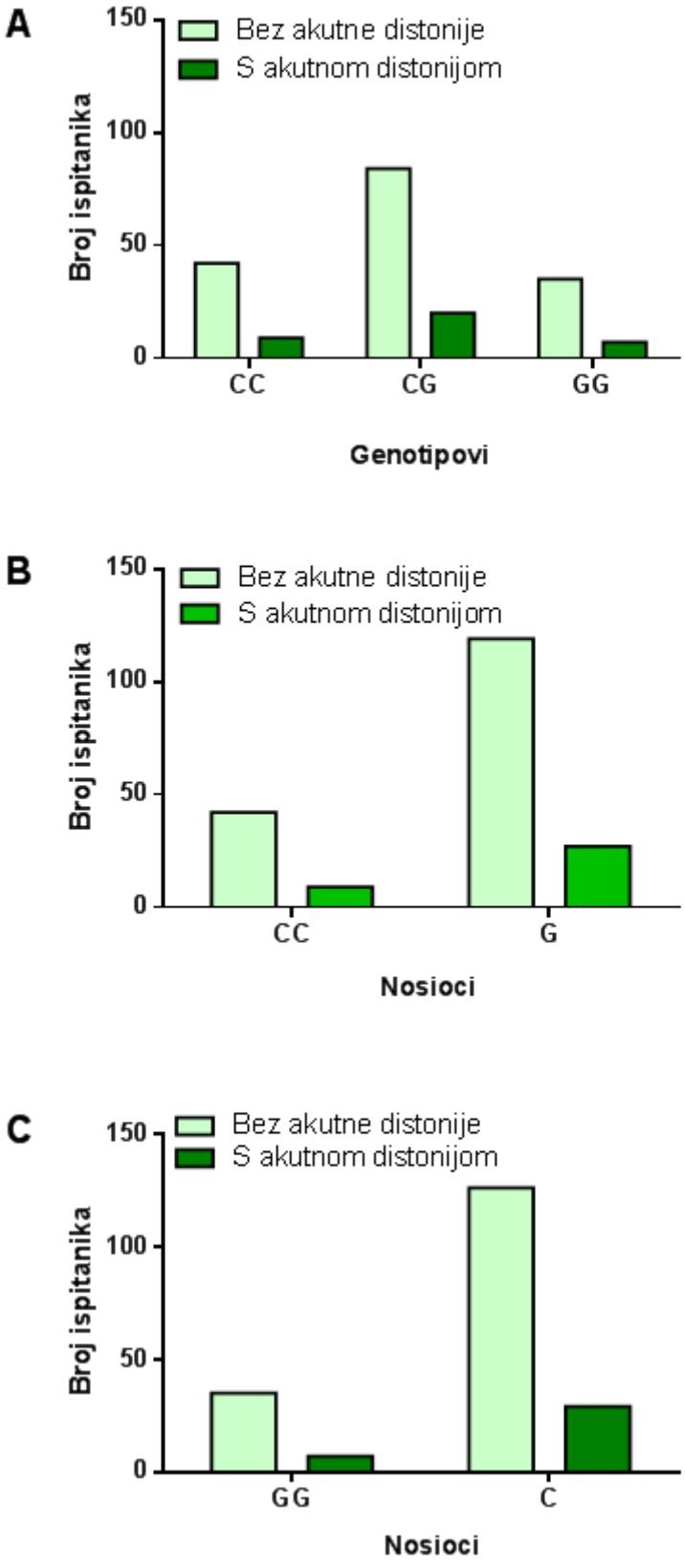
**Tablica 10. Razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije u oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa CC naspram nosioca alela G, odnosno prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295**

| **Nosioci** | **CC** | **G** |
|---|---|---|
| **sa akatizijom** | 14 | 33 |
| **bez akatizije** | 37 | 113 |
| **sa akutnom distonijom** | 9 | 27 |
| **bez akutne distonije** | 42 | 119 |
| **sa diskinezijom** | 16 | 48 |
| **bez diskinezije** | 35 | 98 |
| **Nosioci** | **GG** | **C** |
| **sa akatizijom** | 8 | 39 |
| **bez akatizije** | 34 | 116 |
| **sa akutnom distonijom** | 7 | 29 |
| **bez akutne distonije** | 35 | 126 |
| **sa diskinezijom** | 11 | 53 |
| **bez diskinezije** | 31 | 102 |

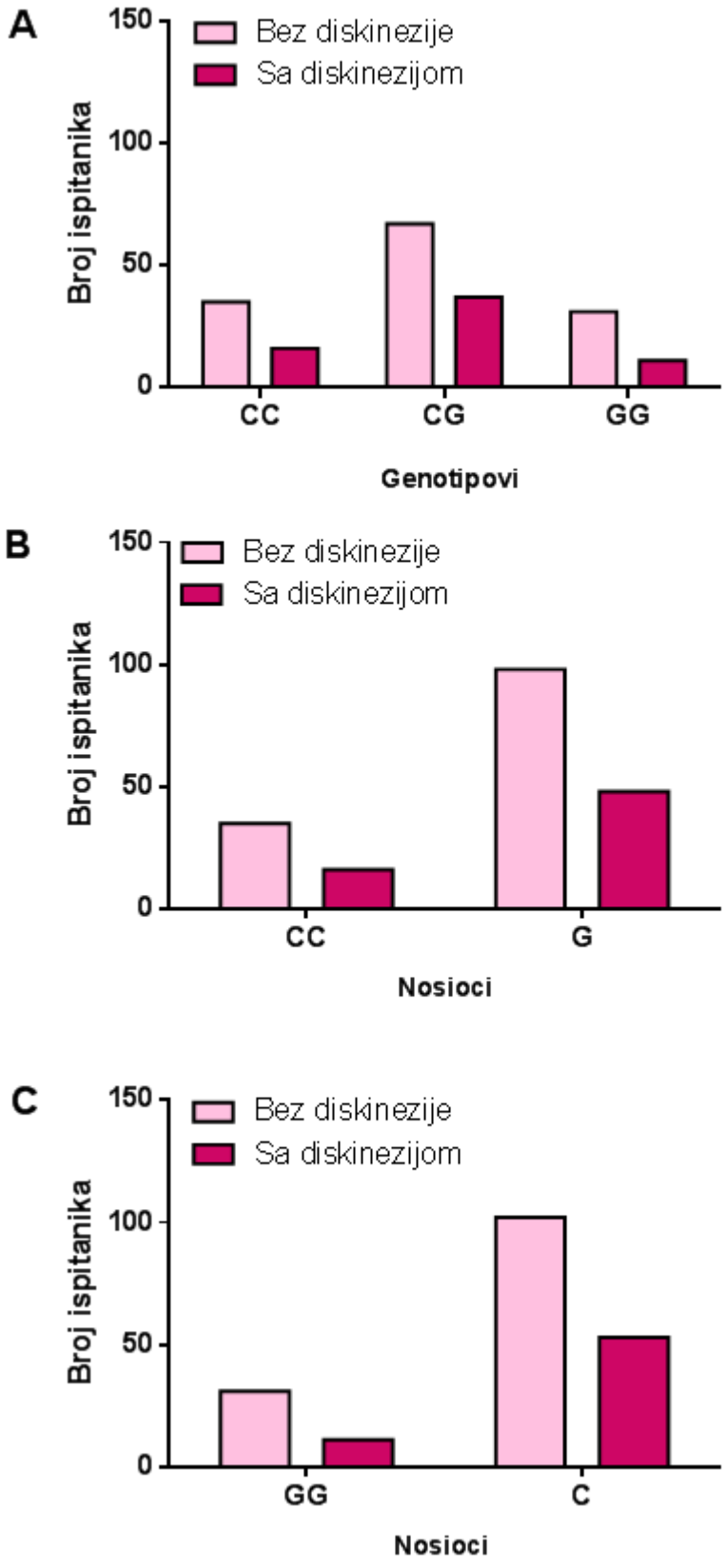
Kao što je prikazano na slici 15A, u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, primjenom $\chi 2$-testa nisu utvrđene statistički značajne razlike ($\chi 2 = 1.24$, df = 2, p = 0.54). Također, statistički značajnih razlika nije bilo između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa CC naspram nosioca alela G (p = 1.00, Fisher-ov test) (Slika 15B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela C (p = 0.36, Fisher-ov test) (Slika 15C).




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




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




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

### 4.2. Polimorfizam rs878567 u genu *5HT1A*

Uzorci DNA izolirani iz krvi svih ispitanika podvrgnuti su genotipizaciji polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A* koji se nalazi na kromosomu 5, a kodira za serotoninski 5-HT1A receptor. Kao što je prikazano u tablici 11., frekvencije opaženih genotipova polimorfizma rs878567 u bolesnika oboljelih od shizofrenije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ($\chi 2 = 2.19$, $p = 0.14$)

**Tablica 11. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs878567**

| Genotipovi | | AA | AG | GG |
|---|---|---|---|---|
| p=0.14 | Dobiveno | 86 (43.65%) | 81 (41.12%) | 30 (15.23%) |
| | Očekivano | 81.2 (41.22%) | 90.5 (45.94%) | 25.2 (12.79%) |

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

U ispitanika oboljelih od shizofrenije nakon 2 tjedna monoterapije tipičnim antipsihotikom haloperidolom razvoj EPS evaluiran je primjenom standardiziranih ocjenskih skala BARS, SAS i ESRS. Broj bodova na navedenim ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A* (Tablica 12, slika 16).

S obzirom da rezultati nisu bili raspodijeljeni prema normalnoj raspodjeli podataka, za njihovu statističku analizu primijenila se Kruskal-Valisova ANOVA. Kruskal-Valisova ANOVA nije utvrdila značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu, u broju bodova na SAS ($H = 1.12$, $df = 2$, $p = 0.57$), ESRS ($H = 1.39$, $df = 2$, $p = 0.50$) i BARS ($H = 0.64$, $df = 2$, $p = 0.73$) ocjenskoj skali.

Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa AA naspram nosioca alela G, polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A* (Tablica 13, slika 17). Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa AA naspram nosioca alela G, u broju bodova na SAS ($U = 4377$, $p = 0.32$), BARS ($U = 4770$, $p = 0.99$) i ESRS ($U = 4627$, $p = 0.71$) ocjenskoj skali.

Nadalje, broj bodova na BARS, SAS i ESRS ocjenskim skalama uspoređen je između ispitanika podijeljenih prema nosiocima homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A* (Tablica 14, slika 18). Mann-Whitney test nije utvrdio statistički značajne razlike, između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema

nosiocima homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela A, u broju bodova na SAS (U = 2329, p = 0.54), ESRS (U = 2173, p = 0.25) i BARS (U = 2345, p = 0.57) ocjenskoj skali.

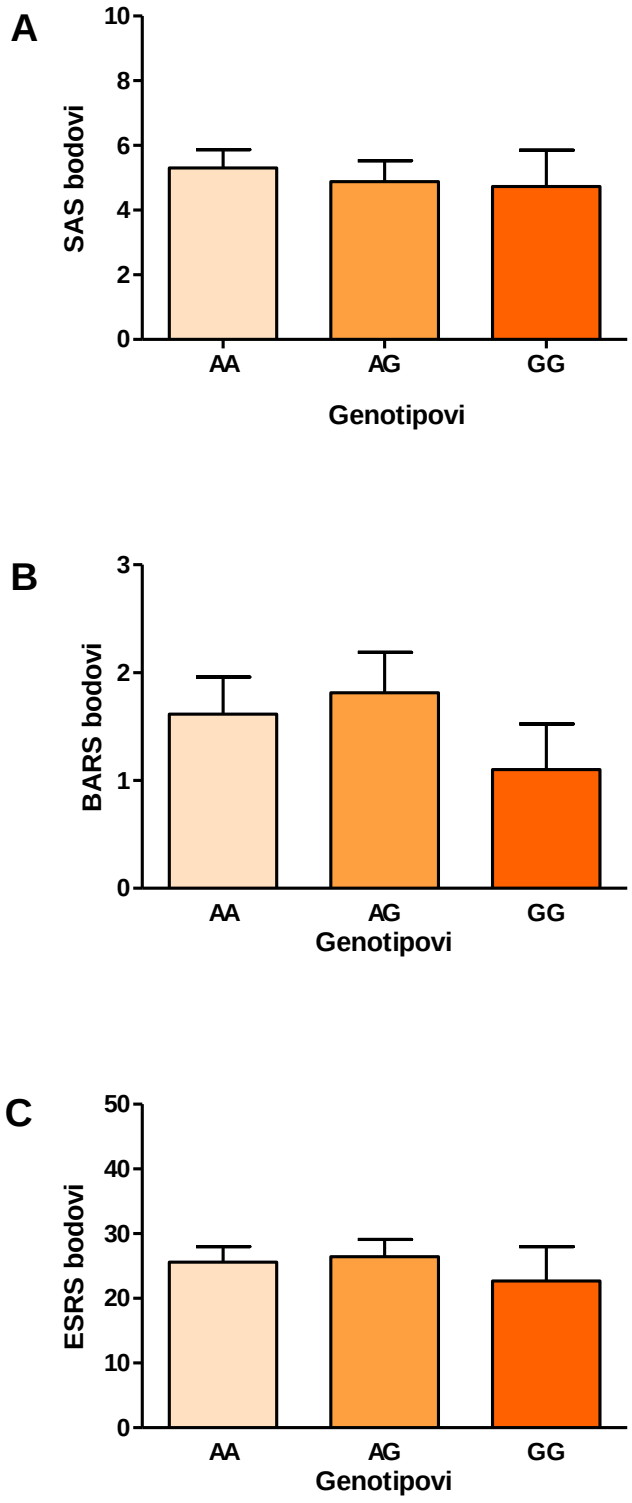
**Tablica 12. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs878567**

| Ocjenska skala | AA (n=86) | | AG (n=81) | | GG (n=30) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Broj bodova | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška |
| BARS | 1.62 | 0.34 | 1.81 | 0.37 | 1.10 | 0.42 |
| SAS | 5.30 | 0.57 | 4.88 | 0.65 | 4.73 | 1.12 |
| ESRS | 25.62 | 2.41 | 26.33 | 2.67 | 22.70 | 5.30 |

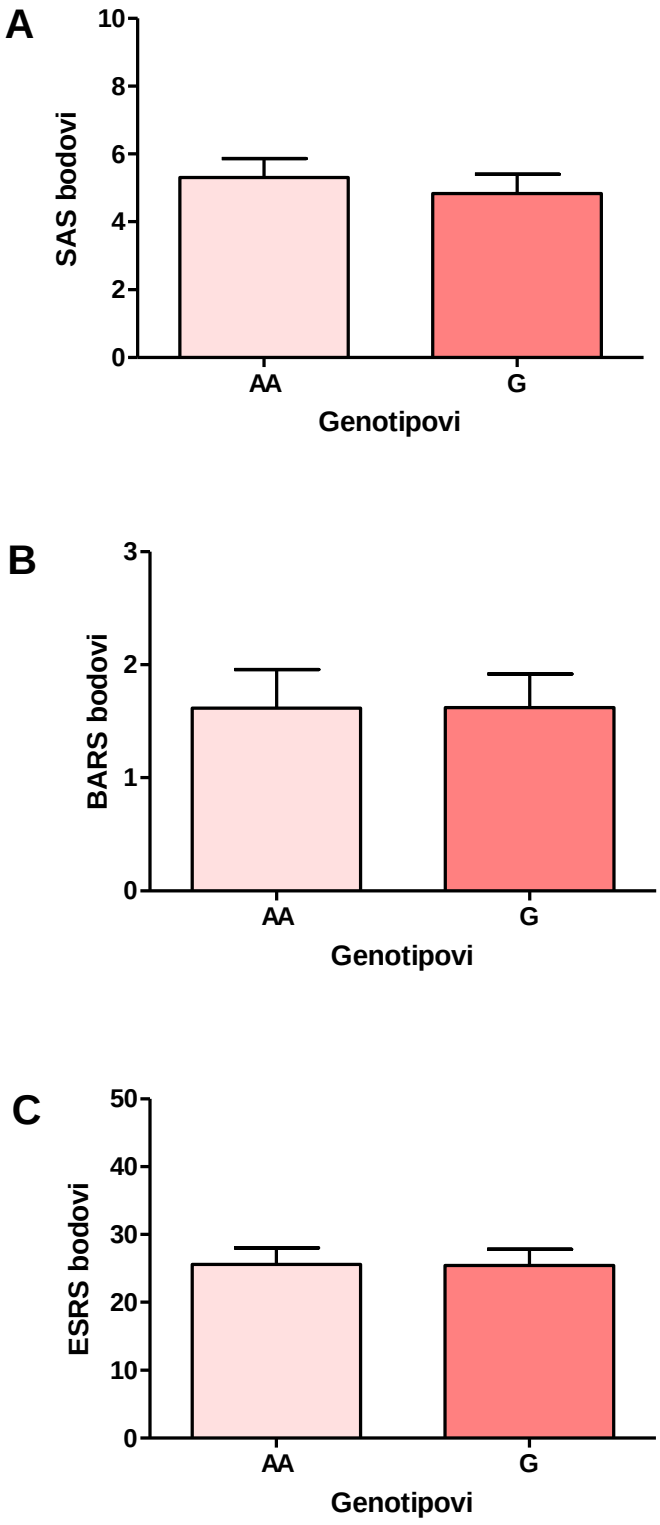
**Tablica 13. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa AA naspram nosioca alela G, polimorfizma rs878567**

| Ocjenska skala | AA (n=86) | | G (n=111) | |
|---|---|---|---|---|
| Broj bodova | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška |
| BARS | 1.62 | 0.34 | 1.62 | 0.30 |
| SAS | 5.30 | 0.57 | 4.84 | 0.56 |
| ESRS | 25.62 | 2.41 | 25.42 | 2.41 |

Kao što je prikazano u tablici 15 i na slici 19A, usporedba genotipova ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne EPS (SAS skor > 3) i na one bez nuspojava (SAS skor ≤ 3) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike ($\chi 2 = 1.18$, df = 2, p = 0.55) ($\chi 2$-test).




**Slika 16. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs878567. Slika prikazuje srednju vrijednost ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Kruskal-Valisovom ANOVA-om.**




**Slika 17. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa AA naspram nosioca alela G, polimorfizma rs878567. Slika prikazuje srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Mann-Whitney testom.**

**Tablica 14. Broj bodova na ocjenskim skalama BARS, SAS i ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567**

| Ocjenska skala | GG (n=30) | | A (n=167) | |
|---|---|---|---|---|
| Broj bodova | srednja vrijednost | standardna pogreška | srednja vrijednost | standardna pogreška |
| **BARS** | 1.10 | 0.42 | 1.71 | 0.25 |
| **SAS** | 4.73 | 1.12 | 5.10 | 0.43 |
| **ESRS** | 22.70 | 5.30 | 26.01 | 1.79 |

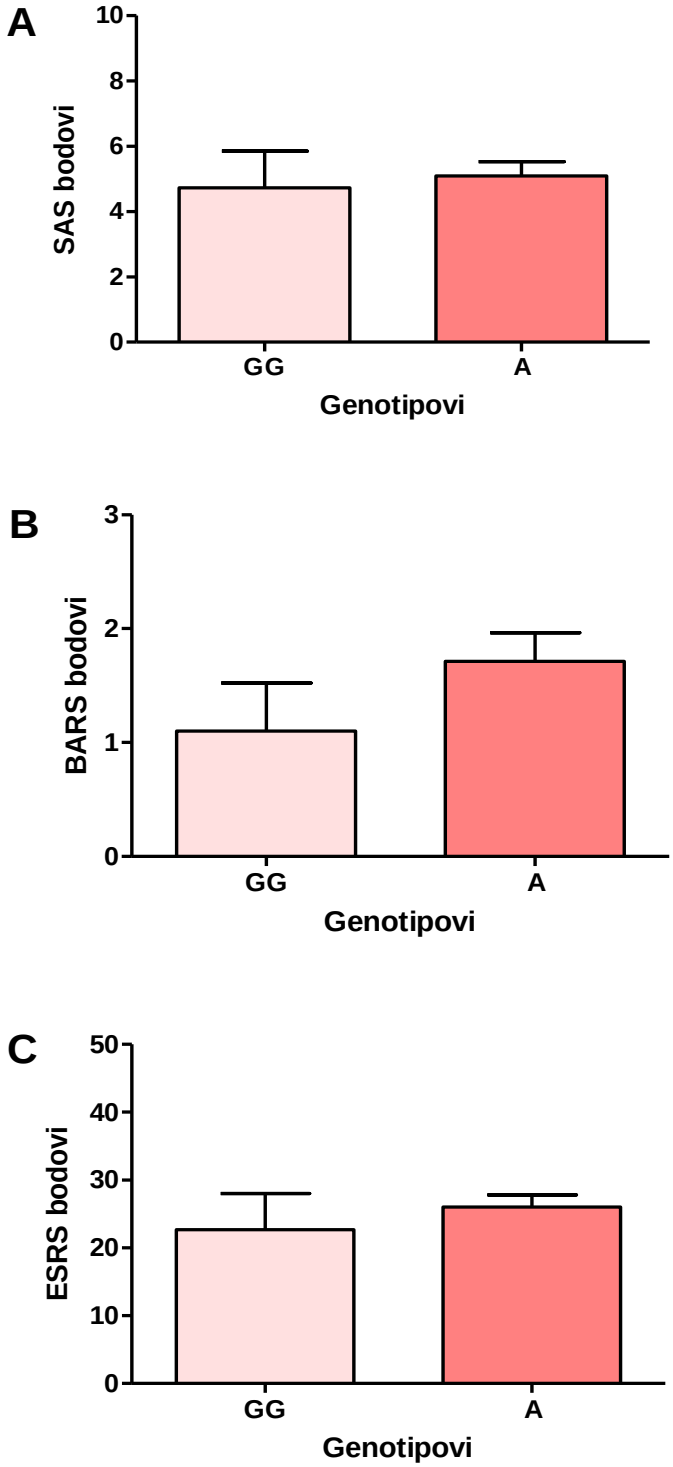
**Tablica 15. Raspodjela genotipova polimorfizma rs878567 u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akutnih EPS nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna**

| Genotipovi | AA | AG | GG |
|---|---|---|---|
| **s EPS** | 44 | 37 | 17 |
| **bez EPS** | 42 | 44 | 13 |

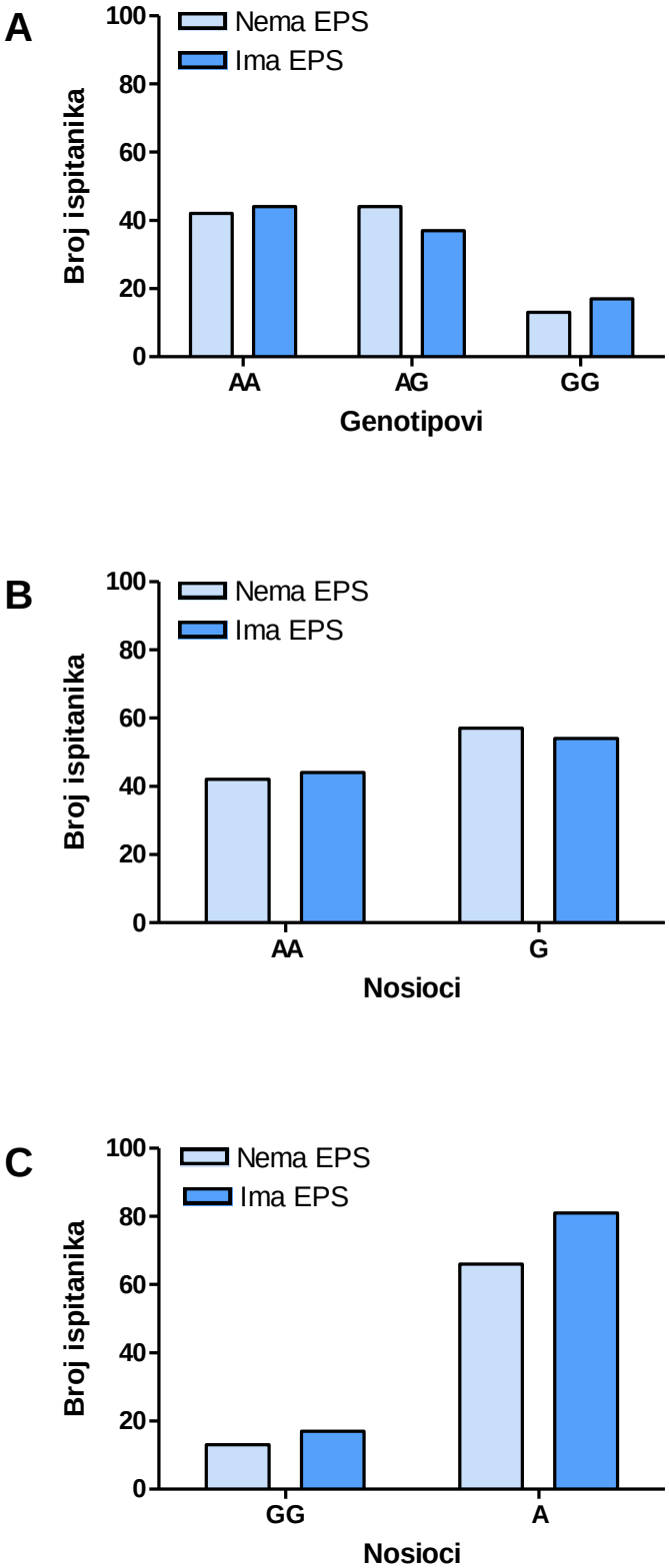
Statistički značajne razlike nisu utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez akutnih EPS nakon terapije haloperidolom podijeljenih na nosioce genotipa AA naspram nosioca alela G ($p = 0.77$, Fisher-ov test) (Slika 19B), tj. na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela A ($p = 1.00$, Fisher-ov test) (Slika 19C).

Tablica 17. prikazuje raspodjelu genotipova polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna. U tablici 18. prikazana je raspodjela nosioca genotipa AA naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna.

Kao što se vidi i na slici 20A, nismo utvrdili statistički značajnu razliku ($\chi 2 = 0.29$, df=2, p=0.86) u frekvenciji genotipova u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom ($\chi 2$-test).




**Slika 18. Broj bodova na ocjenskim skalama A) SAS B) BARS i C) ESRS, za evaluaciju EPS u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567. Slika prikazuje srednje vrijednosti ± standardna pogreška. Rezultati su obrađeni Mann-Whitney testom**




**Slika 19. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa GG u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akutnih EPS nakon terapije haloperidolom**

**Tablica 16. Razvoj akutnih EPS u oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa AA naspram nosioca alela G, odnosno prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567**

| **Nosioci** | **AA** | **G** |
|---|---|---|
| **s EPS** | 44 | 54 |
| **bez EPS** | 42 | 57 |
| **Nosioci** | **GG** | **A** |
| **s EPS** | 17 | 81 |
| **bez EPS** | 13 | 86 |

**Tablica 17. Raspodjela genotipova polimorfizma rs878567 u oboljelih od shizofrenije podijeljenih s obzirom na prisutnost akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna**

| **Genotipovi** | **AA** | **AG** | **GG** |
|---|---|---|---|
| **sa akatizijom** | 21 | 20 | 6 |
| **bez akatizije** | 65 | 61 | 24 |
| **sa akutnom distonijom** | 18 | 14 | 4 |
| **bez akutne distonije** | 68 | 67 | 26 |
| **sa diskinezijom** | 27 | 31 | 6 |
| **bez diskinezije** | 59 | 50 | 24 |

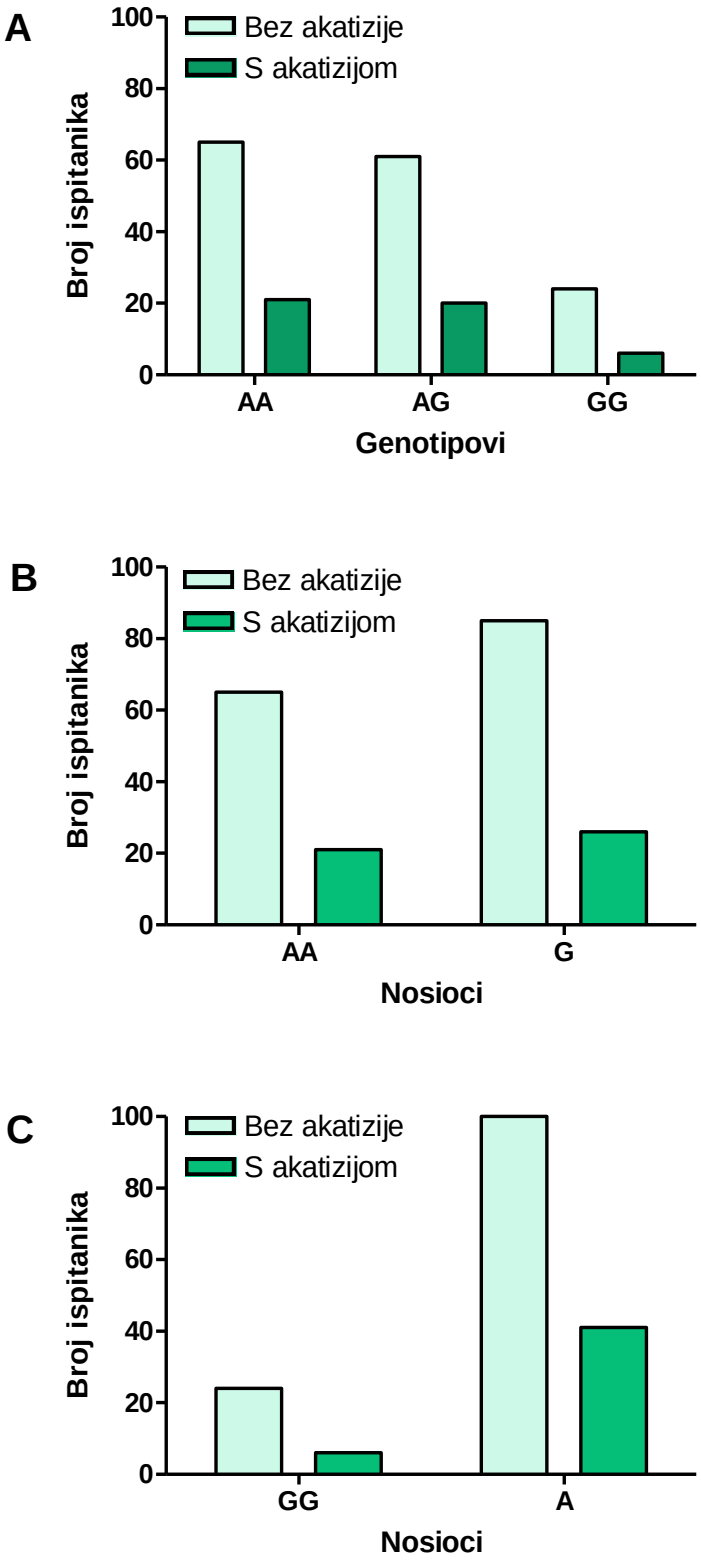
Nadalje, statistički značajne razlike nisu utvrđene između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akatizije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa AA naspram nosioca alela G (p=0.87, Fisher-ov test) (Slika 20B), kao ni između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela A (p=0.82, Fisher-ov test) (Slika 20C). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom ($\chi 2$ =0.95, df =2, p = 0.62) ($\chi 2$-test) (Slika 21A). Također, nismo pronašli značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja akutne distonije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa AA naspram

nosioca alela G (p = 0.46, Fisher-ov test) (Slika 21B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela A (p = 0.61, Fisher-ov test) (Slika 21C).

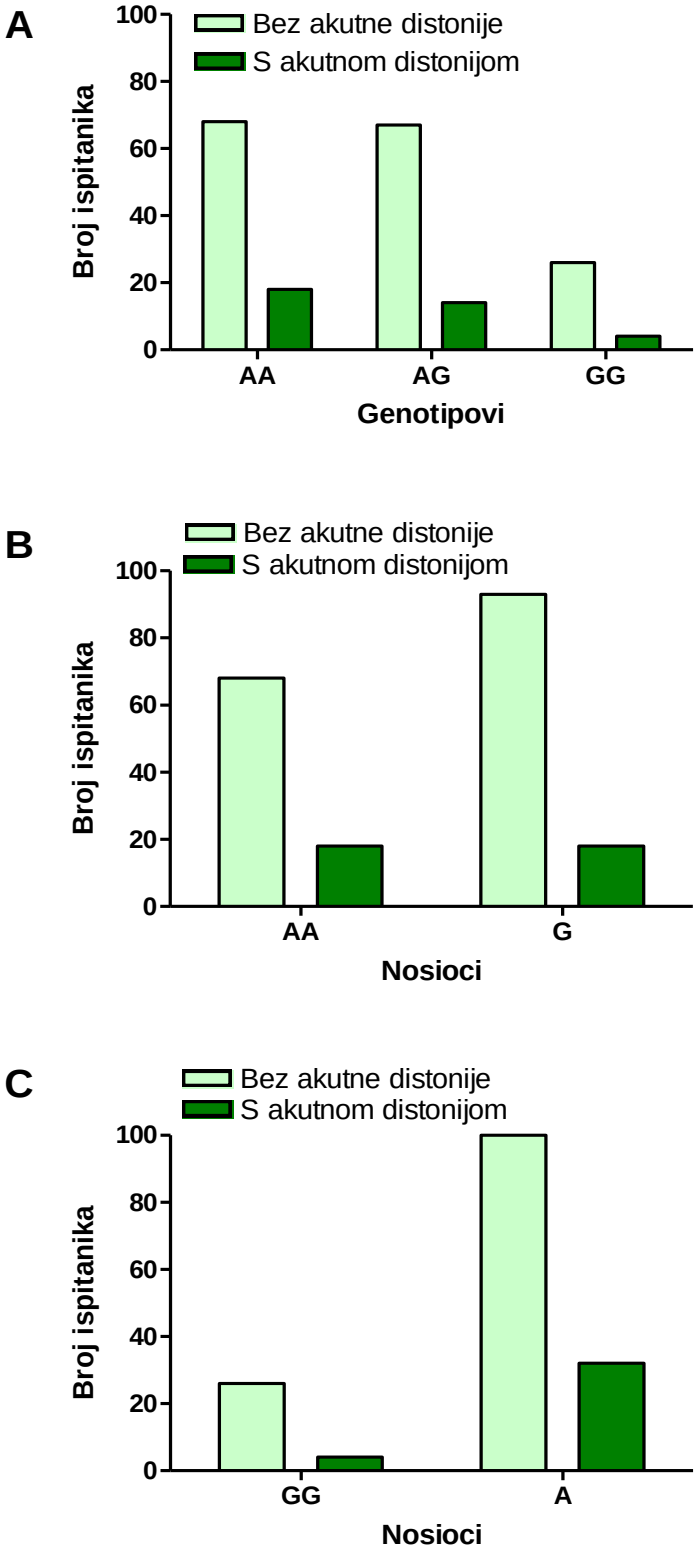
**Tablica 18. Razvoj akatizije, akutne distonije i diskinezije u oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema nosiocima genotipa AA naspram nosioca alela G, odnosno prema nosiocima genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567**

| **Nosioci** | **AA** | **G** |
|---|---|---|
| **sa akatizijom** | 21 | 26 |
| **bez akatizije** | 65 | 85 |
| **sa akutnom distonijom** | 18 | 18 |
| **bez akutne distonije** | 68 | 93 |
| **sa diskinezijom** | 27 | 37 |
| **bez diskinezije** | 59 | 74 |
| **Nosioci** | **GG** | **A** |
| **sa akatizijom** | 6 | 41 |
| **bez akatizije** | 24 | 126 |
| **sa akutnom distonijom** | 4 | 32 |
| **bez akutne distonije** | 26 | 135 |
| **sa diskinezijom** | 6 | 58 |
| **bez diskinezije** | 24 | 109 |

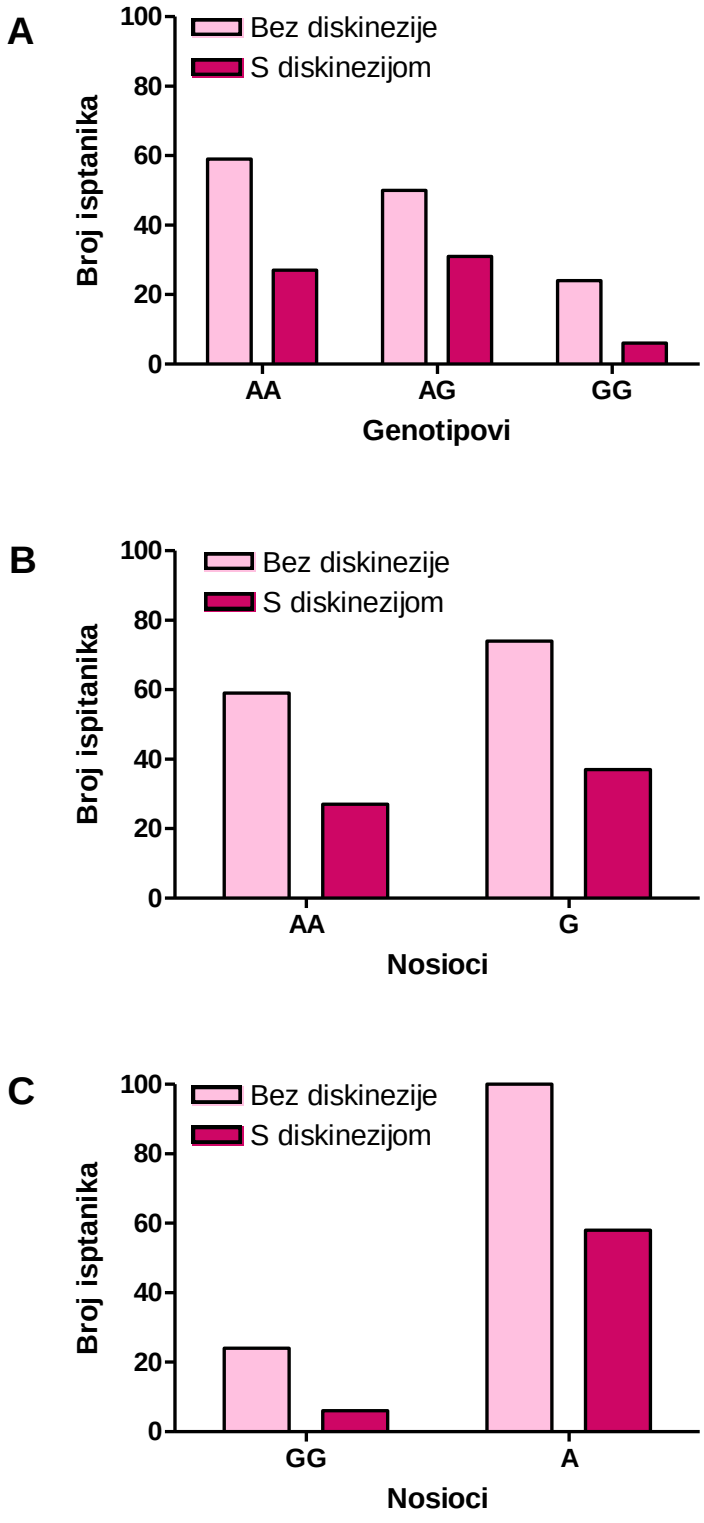
Kao što je prikazano na slici 22A, u raspodjeli genotipova između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, primjenom $\chi 2$-testa nisu utvrđene statistički značajne razlike ($\chi 2 = 3.41$, df = 2, p=0.18). Također, statistički značajnih razlika nije bilo između ispitanika oboljelih od shizofrenije, sa i bez razvoja diskinezije nakon terapije haloperidolom, podijeljenih na nosioce genotipa AA naspram nosioca alela G (p = 0.88, Fisher-ov test) (Slika 22B), kao i između ispitanika podijeljenih na nosioce genotipa GG naspram nosioca alela A (p =0.14, Fisher-ov test) (Slika 22C).




**Slika 20. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa GG u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akatizije nakon terapije haloperidolom**



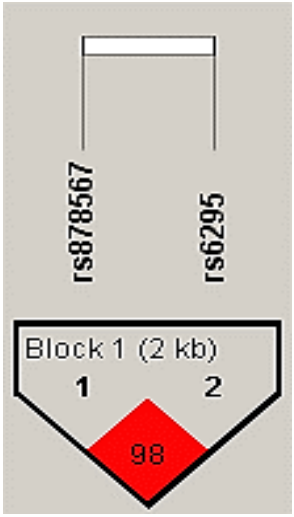

**Slika 21. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa GG u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju akutne distonije nakon terapije haloperidolom**




**Slika 22. Raspodjela genotipova i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa GG u ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema razvoju diskinezije nakon terapije haloperidolom**

### 4.3. Utvrđivanje haplotipova

Istražili smo strukturu haplotipskog bloka unutar regije gena *5-HT1A*, te moguću haplotipsku povezanost polimorfizama rs878567 i rs6295 ovoga gena s EPS nakon terapije haloperidolom u osoba s shizofrenijom. Za navedene polimorfizme utvrđen je visok stupanja neravnoteže udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD) (slika 23). Naime, LD vrijednost u istraživanom uzorku određena pomoću programa Haploview (Barrett i sur., 2005) iznosila je 98, što upućuje da se ova 2 polimorfizma nasljeđuju zajedno u bloku.




**Slika 23. Prikaz vrijednosti LD između dva SNP-a (rs878567 i rs6295) gena *5-HT1A* dobiven pomoću programa Haploview (izvorna slika)**

Ova dva polimorfizma analizirani su kao haplotipovi čija je raspodjela utvrđena za osobe oboljele od shizofrenije sa i bez EPS nakon tretmana haloperidolom. Programom Haploview utvrđena su tri najčešća haplotipa u ispitivanom uzorku (Tablica 15). Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli haplotipova između osoba oboljelih od shizofrenije sa i bez EPS nakon tretmana haloperidolom.

**Tablica 15. Frekvencije haplotipova za polimorfizme rs878567 i rs6295 u osoba oboljelih od shizofrenije sa i bez EPS nakon tretmana haloperidolom**

| *Haplotip* | *Svi* | *Bez EPS* | *Sa EPS* | *χ2; p* |
|---|---|---|---|---|
| ***AC*** | 0.520 | 0.500 | 0.541 | $\chi2 = 0.685$; $p = 0.408$ |
| ***GG*** | 0.355 | 0.361 | 0.349 | $\chi2 = 0.066$; $p = 0.797$ |
| ***AG*** | 0.122 | 0.134 | 0.110 | $\chi2 = 0.542$; $p = 0.462$ |

# 5. RASPRAVA

Iako su uzroci shizofrenije još uvijek nepoznati, činjenica je da se bolest češće pojavljuje u nekim obiteljima, među krvnim srodnicima, te ovu obiteljsku povezanost u velikoj mjeri možemo pripisati genetskim, a ne samo kulturološkim ili ekološkim čimbenicima (Prasad i sur., 2002). Identificiranje gena koji su uključeni, pokazao se kao težak zadatak, jer je shizofrenija složeni poremećaj sa raznolikim fenotipovima, te ne postoje konzistentni citogenetički ili biokemijski biljezi, ali ni jedinstveni neurofiziološki pokazatelji bolesti.

Dopaminska hipoteza nastanka shizofrenije predlaže hiperaktivnost dopaminskog sustava kao uzrok pojavi shizofrenih simptoma. Pozitivni simptomi dovedeni su u povezanost s pretjeranim otpuštanjem subkortikalnog dopamina i povećanom aktivnošću D2 receptora, dok su negativni simptomi rezultat smanjene aktivnosti receptora D1 u prefrontalnom korteksu (Prasad i sur., 2002).

U skladu s ovom hipotezom, uočeno je da lijekovi koji primarno blokiraju dopaminske receptore nisu učinkoviti kod svih pacijenata, te je postupna pojava novih podataka ukazala na bliski međuodnos dopaminergičkog i serotonergičkog sustava u mozgu (Güzey i sur., 2007).

U shizofrenih bolesnika promjene serotonergičke i dopaminergičke aktivnosti u obrnutom su odnosu, tako je u shizofreniji nađeno smanjenje serotinergičke aktivnosti u mezolimbičkom, a povećanje u prefrontalnom području. Ta prekomjerna serotoninska stimulacija u moždanoj kori osoba s shizofrenijom dovodi do poremećene glutamatne signalizacije, te smanjenog metabolizma neurona, sinaptičke atrofije i gubitka sive tvari (Eggers, 2013; Prasad i sur., 2002).

Motoričke nuspojave tipičnih antipsihotika nastaju primarno zbog blokade dopaminskih receptora u nigrostriatumu (Bray i sur., 2010), što se klinički prezentira kao ekstrapiramidne popratne pojave. Činjenica da se atipični antipsihotici vežu za serotoninske receptore i u manjoj mjeri izazivaju tardivnu diskineziju, prikazuje potencijalnu protektivnu ulogu serotoninskog sustava (Muñoz i sur., 2008). Pretkliničke studije sugerirale su da aktivacija inhibicijskih 5-HT1A autoreceptora također može spriječiti pojavu ekstrapiramidnih popratnih pojava putem blokade D2 receptora u striatumu (Huang i sur., 2004).

U regulaciji serotonergične neurotransmisije sudjeluje 5-HT1A receptor, kao somatodendritički autoreceptor i, kao što smo već napomenuli, inhibitor aktivnost

serotoninskih neurona, te 5-HT2A receptor, ekscitacijski receptor koji ima važnu ulogu u održavanju ravnoteže ekscitacijske i inhibicijske aktivnosti neurona, što je neophodno za normalnu aktivnost moždane kore (Celada i sur. 2004). Dopaminski pak sustav djeluje i obrnutim putem na serotoninski, što je pokazano pronalaskom aferentnih putova u raphe nuclei koji započinju u supstancia nigri.

Ovi navodi upućuju na jake neuroanatomske i funkcionalne interakcije serotoninskog i dopaminskog sustava, te dvosmjernu modulacijsku i regulacijsku aktivnost.

Djelovanje serotonina na velik broj različitih fizioloških funkcija, objašnjava se između ostalog i postojanjem velikog broja serotoninskih receptora. Danas važeća nomenklatura razlikuje petnaest različitih serotoninskih receptora, grupiranih u sedam skupina (Bockaert i sur., 2006) .

Genske varijacije nekoliko serotonergičkih putova opisani su i istraživani u povezanosti sa shizofrenijom i terapijskim odgovorom na antipsihotike, uključujući serotoninske prijenosnike (transportere, 5-HTT) i serotoninske receptore: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT6 i 5-HT7.

Između različitih serotoninskih receptora, 5-HT1A privlači najviše pozornosti, zbog svoje velike gustoće u različitim dijelovima mozga i raznolikim ulogama (Celada i sur., 2004).

5-HT1A receptori nalaze se postsinaptički na serotoninskim aksonima, u kortikalnom, limbičkom i hipotalamičkom području, a djelovanje na te postsinaptičke receptore utječe na kogniciju, raspoloženje, agresivnost i motoričke funkcije, što se postiže modulacijom aktivnosti različitih tipova neurona i inhibicijom otpuštanja raznovrsnih neurotransmitora, kao što su glutamat, GABA, acetilkolin i dopamin (Celada i sur., 2004).

Svrha istraživanja, bila je istražiti odnos između polimorfizama gena za serotoninski 5-HT1A receptor i pojave akutnih ekstrapiramidnih popratnih pojava antipsihotika haloperidola u oboljelih od shizofrenije.

Haloperidol, kao antipsihotik prve generacije i jedan od najčešće korištenih antipsihotika u liječenju shizofrenije, djeluje na principu snažnog vezanja na dopaminski D2 receptor i spore disocijacije sa njega. Na taj način se smanjuje povećana aktivnost dopaminskog sustava u mezolimbičkom kortikalnom putu, odnosno liječe halucinacije,

deluzije, paranoičnosti i sl. kao pozitivni simptomi koji se javljaju kod oboljelih od shizofrenije. Blokada dopaminskih receptora u nigrostriatumu i posljedična prekomjerna aktivnost acetilkolinskog sustava izaziva ekstrapiramidne popratne pojave kao što su akatazija, diskinezija, parkinsonizam, distonija i druge (Bray i sur., 2010; Güzey i sur., 2007).

Primijenjena doza haloperidola u našem istraživanju odgovara preporučenim prosječnim dozama lijeka (12-20 mg na dan), pošto se smatra kako veće doze u velikoj mjeri povećavaju rizik od ekstrapiramidnih popratnih pojava. Također ukupni postotak shizofrenih bolesnika koji su razvili ekstrapiramidne simptome u našem istraživanju u skladu je s rezultatima iz prethodnih radova o pojavi EPS-a kod liječenja haloperidolom (Kane, 2001).

U našem istraživanju nismo utvrdili značajne razlike između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu u slučaju G/C polimorfizma rs6295, kao ni kod A/G polimorfizma rs878567 u broju bodova na SAS, ESRS i BARS ocjenskoj ljestvici.

Nekoliko je istraživanja 5-HT1A receptora, *postmortem* analizom mozga i *in vivo*, pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) pokazalo povećano 5-HT1A receptorsko vezanje u shizofreniji u rasponu otprilike 15-80%, tako bi upravo ovaj gen mogao objasniti navedeni fenomenom (Bantick i sur., 2001; Huang i sur., 2004).

Polimorfizam rs6295 u jednom nukleotidu G/C, otprije je povezivan sa pojavom depresije, suicidalnosti i odgovorom na liječenje antidepresivima (Donaldson i sur., 2016).

Huang i suradnici (2004) pronašli su značajnu povezanost *5-HTR1A* C(-1019)G lokusa (rs6295) sa shizofrenijom, ovisnosti i napadajima panike. Statistički značajne razlike su uočene u raspodjeli genotipa i alela između zdravih ispitanika i oboljelih od shizofrenije, odnosno pronađena je veća frekvencija G alela u shizofreniji ($p$= 0.003). Također, utvrđen je utjecajan učinak doze antipsihotika povezan uz G alel u shizofreniji.

*In vitro* studije sugeriraju da bi polimorfizam rs6295 mogao imati funkcionalne učinke na ekspresiju gena *HTR1A*, kroz promijenjeno vezivanje brojnih transkripcijskih čimbenika, dok su Donaldson i suradnici (2016) otkrili da je rs6295 G alel povezan s povećanim rizikom zlouporabe droga, psihijatrijskom hospitalizacijom i pokušajem samoubojstva, te da je ekspresija mRNA viša u nosioca C u odnosu na nosioce G alela polimorfizma rs6295 u prefrontalnom korteksu, ali ne i u srednjem mozgu kontrolnih ispitanika.

Kao što vidimo postoje istraživanja koja su potvrdila povezanost polimorfizma rs6295 gena koji kodira za serotoninski 5-HT1A receptor s razvojem akutne distonije, akatizije i diskinezije u shizofrenih bolesnika, međutim u istraživanju na našim ispitanicima nije utvrđena ovakva statistički značajna povezanost navedenih motoričkih popratnih pojava tipičnog antipsihotika haloperidola sa istraživanim polimorfizmima gena koji kodira za serotoninski receptor tipa 1A.

Također smo proveli haplotipsku analizu povezanosti polimorfizama rs878567 i rs6295 gena *5HTR1A* s motoričkim popratnim pojavama nakon terapije haloperidolom u osoba s shizofrenijom. Struktura haplotipskog bloka unutar regije gena *5HTR1A*, za navedene polimorfizme pokazala je visok stupanja neravnoteže udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD), što upućuje da se ova dva polimorfizma vjerojatno nasljeđuju zajedno u bloku.

Rezultati meta analize koju su proveli Kishi i suradnici (2013) sugeriraju na zajedničku povezanost polimorfizama rs6295 i rs878567 u *HRT1A* genu sa patofiziologijom manične depresije i bipolarnim poremećajem, čiji nam rezultati daju dodatne indicije utjecaja navedenih polimorfizama na različite poremećaje ponašanja.

Kishi i suradnici (2010) utvrdili su alelnu i genotipsku povezanost polimorfizma rs878567 psihozom izazvanom metamfetaminom, koja je slična psihozi koja se javlja u paranoidnom tipu shizofrenije. Nadalje, uočena je haplotipska povezanost rs6295 i rs878567 u *HRT1A* genu kod pacijenata sa psihozom izazvanom metamfetaminom.

Međutim u našem istraživanjunije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli haplotipova polimorfizama rs6295 i rs878567 između osoba oboljelih od shizofrenije sa i bez motoričkih popratnih pojava nakon tretmana haloperidolom.

Dobiveni rezultati trebali bi doprinijeti boljem razumijevanju uloge gena serotoninskih receptora u razvoju motoričkih popratnih pojava u shizofreniji, te pridonijeti uspješnosti odgovora na terapiju. Trenutne terapije različitih neuroloških i psihijatrijskih poremećaja, kao što je i shizofrenija, u velikoj su mjeri simptomatska i neodgovarajuća, te i često povezana s velikim brojem neželjenih popratnih pojava. Prema tome ne može se isključiti mogućnost da svaki simptom koji se javlja u shizofreniji ima zaseban mehanizam i specifične genetske čimbenike koji povećavaju izloženost bolesti (Güzey i sur., 2007). Na tragu tome, neophodna

su daljnja ispitivanja uloge serotoninskog sustava u razvoju ekstrapiramidnih popratnih pojava izazvanih liječenjem antipsihoticima na što većem uzorku ispitanika kao i individualizirani terapijski pristup liječenju kako bi se povećala kvaliteta života oboljelih osoba.

# 6.ZAKLJUČAK

1. Od ukupno 197 uključenih ispitanika sa shizofrenijom, njih 96 (48.73%) razvilo je akutne ekstrapiramidne popratne pojave nakon dva tjedna terapije haloperidolom, pri čemu je njih 47 (23.86%) razvilo akatiziju, 36 (18.27%) akutnu distoniju, te 64 (32.48%) diskineziju.

2. Frekvencije opaženih genotipova polimorfizama rs6295 i rs878567 gena *5-HT1A* u bolesnika oboljelih od shizofrenije bile su skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

3. U istraživanju nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na SAS, BARS i ESRS ocjenskim ljestvicama između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs6295 u genu za serotoninski 5-HT1A receptor, kao niti kada su ispitanici podijeljeni na nosioce homozigotnog genotipa CC naspram nosioca alela G, te na nosioce homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela C.

4. Usporedba genotipova, te nosioca genotipa CC naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A*,u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne ekstrapiramidne popratne pojave (SAS skor > 3) i na one bez popratnih pojava (SAS skor $\leq$ 3) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike.

5. Nismo utvrdili statistički značajne razlike u frekvenciji genotipova, kao niti nosioca genotipa CC naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela C, polimorfizma rs6295 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom.

6. U istraživanju nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na SAS, BARS i ESRS ocjenskim ljestvicama između ispitanika oboljelih od shizofrenije podijeljenih prema genotipu polimorfizma rs878567 u genu za serotoninski 5-HT1A receptor, kao niti kada su ispitanici podijeljeni na nosioce homozigotnog genotipa AA naspram nosioca alela G, te na nosioce homozigotnog genotipa GG naspram nosioca alela A.

7. Usporedba genotipova, te nosioca genotipa AA naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A*, ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih na one koji su razvili akutne ekstrapiramidne popratne pojave (SAS skor > 3) i na one bez popratnih pojava (SAS skor ≤ 3) nakon terapije haloperidolom tijekom 2 tjedna, nije utvrdila statistički značajne razlike.

8. Nismo utvrdili statistički značajnu razliku u frekvenciji genotipova, kao niti nosioca genotipa AA naspram nosioca alela G, odnosno nosioca genotipa GG naspram nosioca alela A, polimorfizma rs878567 u genu *HTR1A*, u ispitanika oboljelih od shizofrenije, podijeljenih prema razvoju akatizije, akutne distonije i diskinezije nakon terapije haloperidolom.

9. Utvrdili smo visok stupanja neravnoteže udruživanja polimorfizama rs6295 i rs878567, što upućuje da se ova dva polimorfizma vjerojatno nasljeđuju zajedno u bloku.

10. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli najčešćih haplotipova (AC, GG i AG) polimorfizama rs6295 i rs878567 između osoba oboljelih od shizofrenije sa i bez motoričkih popratnih pojava nakon tretmana haloperidolom.

11. Rezultati našeg istraživanja nisu uputili na genotipsku i haplotipsku povezanost polimorfizama rs6295 i rs878567 gena *HTR1A*, koji kodira za serotoninski receptor 5-HT1A, sa razvojem motoričkih popratnih pojava uslijed liječenja antipsihotikom haloperidolom u bolesnika sa shizofrenijom.

12. U svrhu daljnjeg istraživanja uloge gena *HTR1A* u shizofreniji, te njegovih polimorfizama rs6295 i rs878567, potrebna su daljnja opširna istraživanja sa većim brojem ispitanika, kako bi se pojasnila povezanost serotoninskog sustava sa neželjenim popratnim pojavama tipičnih antipsihotika, te time osigurala bolja kvaliteta života oboljelih osoba.

# 7. LITERATURA

American Psychiatric Association (1994): Diagnostic and statistical manual of mental disorders 4th ed. Washington, DC. American Psychiatric Press.

Bantick R.A., Deakin J.F., Grasby P.M. (2001): The 5-HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? Journal of Psychopharmacology 15(1): 37-46.

Barnes T.R. (1989): A Rating Scale for Drug-Induced Akathisia. The British Journal of Psychiatry 154: 672-6.

Batool F., Haleem D.J. (2008): Serotonin (1A) receptor agonism in the expression of behavioral dopaminergic supersensitivity in subchronic haloperidol treated rats. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 21 (4): 411-420.

Begić D. (2011): Psihopatologija. Medicinska naklada. Zagreb.

Bockaert J., Claeysen S., Bécamel C., Dumuis A., Marin P. (2006): Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell & Tissue Research 326: 553-572.

Bondy B., Spellmann I. (2007): Pharmacogentics of antipsychotics: useful for the clinican? Current Opinion in Psychiatry 20: 126-130.

Bray N.J., Leweke F.M., Kapur S., Meyer-Lindenberg A. (2010): The neurobiology of schizophrenia: New leads and avenues for treatment. Current Opinion in Neurobiology 20: 810-815.

Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Bielau, H., Bernstein, H.G., Steiner, J., et al. (2014): The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. Frontiers in Psychiatry 5: 1-11.

Čačev T., Kapitanović S. (2007) Određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP) metodom TaqMan real-time PCR. U: Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 389-391.

Celada P., Puig V., Amargos-Bosch M., Adell A., Artigas F. (2004): The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. Journal of Psychiatry and Neuroscience 29: 252-265.

Chouinard G., Margolese H.C. (2005) Manual for the Extrapyramidal Symptom Rating Scale (ESRS). Schizophr Research 76: 247-65.

Donaldson Z.R., le Francois B., Santos T.L., Almli L.M., Boldrini M., Champagne F.A., Arango V., Mann J.J., Stockmeier C.A., Galfalvy H., Albert P.R., Ressler K.J., Hen R. (2016): The functional serotonin 1a receptor promoter polymorphism, rs6295, is assosiated with psychiatric illness and differences in transcription.Translational psychiatry 6: e746.

Eggers A.E. (2013): An explanation of why schizophrenia begins with excitotoxic damage to the hippocampus. Medical hypotheses 81(6): 1056-8.

Güzey C., Scordo M.G., Spina E., Landsem V.M., Spigset O. (2007): Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. European Journal of Clinical Pharmacology 63: 233-241.

Haleem D.J. (2015): 5-HT1A receptor-dependent control of nigrostriatal dopamine neurotransmission int he pharmacotherapy of Parkinson`s disease and schizophrenia. Behavioural Pharmacology 26: 45-58.

Haleem D.J., Batool F., Khan N.H., Kamil N., Ali O., Saify Z.S., Haleem M.A. (2002): Differences in the effects of haloperidol and clozapine on brain serotonin and dopamine metabolism and on tests related to extrapyramidal functions in rats. Medical Science Monitor 8 (9): 354-361.

Huang Y., Battistuzzi C., Oquendo M.A., Harkavy-Friedman J., Greenhill L., Zalsman G., Brodsky B., Arango V., Brent D.A., Mann J.J. (2004): Human 5-HT1A receptor C(-1019)G polymorphism and psychopathology. International Journal of Neuropsychopharmacology 7: 441–451.

Inada T., Yagi G., Miura S. (2002): Extrapyramidal symptom profiles in Japanese patients with schizophrenia treated with olanzapine or haloperidol. Schizophrenia Research 57: 227-238.

Kane J.M. (2001): Extrapyramidal side effects are unacceptable. European Neuropsychopharmacology 11: 397-403.

Kawanishi C., Hanihara T., Shimoda Y., Suzuki K., Sugiyama N., Onishi H., Miyakawa T., Yamada Y., Kosaka K. (1998): Lack of Association Between Neuroleptic Malignant Syndrome and Polymorphisms in the 5-HT1A and 5-HT2A Receptor Genes. The American Journal of Psychiatry 155: 1275-1277.

Kishi T., Tsunoka T., Ikeda M., Kitajima T., Kawashima K., Okochi T., Okumura T., Yamanouchi Y., Kinoshita Y., Ujike H., Inada T., Yamada M., Uchimura N., Sora I., Iyo M., Ozaki N., Iwata N. (2010): Serotonin 1A receptor gene is assosiated with Japanese methamphetamine-induced psychosis patients. Neuropharmacology 58(2): 452-6.

Kishi T., Yoshimura R., Fukuo Y., Okochi T., Matsunaga S., Nakano W.U., Nakamura J., Serretti A., Correll C.U., Kane J.M., Iwata N. (2013): The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 263 (2): 105-118.

Lencz T., Malhotra A.K. (2009): Pharmacogenetics of antipsychotic-induced side effects. Dialogues in Clinical Neuroscience 11: 405-415.

Meltzer H.Y., Li Z., Kaneda Y., Ichikawa J. (2003): Serotonin receptors: Their key role in drugs to treat schizophrenia. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 27: 1159-1172.

Mihaljević-Peleš A., Šagud M. (2006): Psihofarmakologija. U: R. Gregurek i sur. (ur.): Suradna i konzultativna psihijatrija. Zagreb, Školska knjiga, str. 195-225.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16(3): 1215.

Mowry B.J., Nancarrow D.J. (2001): Molecular genetics of schizophrenia. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 28: 66-69.

Muñoz A., Li Q., Gardoni F., Marcello E., Qin C., Carlsson T., Kirik D., Di Luca M., Björklund A., Bezard E., Carta M. (2008): Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA induced dyskinesia. Brain 131: 3380-3394.

Murphy K.C., McGuffin P. (1996): The role of candidate genes in the etiology of schizophrenia. Molecular Medicine 2(6): 665-669.

Peuskens J., Gillain B., De Graeve D.,Van Vleymen B., Albert A. (2009): Belgian Schizophrenia Outcome Survey – Results of a 2-year naturalistic study in patients stabilised on monotherapy with olanzapine, risperidone or haloperidol. European Psychiatry 24: 154-163.

Piper M., Beneyto M., Burne T.H.J., Eyles D.W., Lewis D.A., McGrath J.J. (2012): The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia: Convergent Clues from Epidemiology and Neuropathology. Psychiatric Clinics of North America 35: 571-584.

Prasad S., Semwal P., Deshpande S., Bhatia T., Nimgaonkar V.L., Thelma B.K. (2002): Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future. Journal of Biosciences 27: 35-52.

Pucadyil T.J., Kalipatnapu S., Chattopadhyay A. (2005): The serotonin 1A receptor: A representative member of the serotonin receptor family. Cellular and Molecular Neurobiology 25:553-580.

Simpson G.M., Angus J.W.S. (1970): A rating scale for extrapyramidal side effects. Acta Psychiatrica Scandinavica 212: 11-9.

Weinberger D.R., Berman K.F. (1988): Speculation on the Meaning of Cerebral Metabolic Hypofrontality in Schizophrenia. Schizophrenia Bulletin 14(2): 157-168.

Zhang J., Gallego J.A., Robinson D.G., Malhotra A.K., Kane J.M., Correll C.U. (2013): Efficacy and Safety of Individual Second-Generation vs First-Generation Antipsychotics in First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-analysis. The International Journal of Neuropsychopharmacology 16(6): 1205-1218.

Zhang J., Malhotra A.K. (2011): Pharmacogenetics and Antipsychotics: Therapeutic Efficacy and Side Effects Prediction. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology 7(1): 9-37.

# 8. ŽIVOTOPIS

**Osobne informacije**

Ime i prezime: Andrea Varga

Datum rođenja: 28. Studenog 1990.

Adresa: Zrinskih 13, Ivanovec, 40 000 Čakovec

e-mail: andrea528@net.hr

Kontakt broj: 091 185 9709

**Obrazovanje**

**2013.-2016**. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno –matematički fakultet, Biološki odsjek

diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija

**2009.-2012.** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

**Iskustvo u struci**

**2013.** Stručna praksa na Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog bolničkog centra

Zagreb

**Strani jezici:** engleski, njemački

**Informatičko znanje:** Microsoft office

**Dodatno:** vozačka dozvola B kategorije