Povezanost varijanti gena za katehol-o-metil transferazu s poremećajem kognitivnih funkcija u shizofreniji

Tkalčec, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:942368

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

Ana Tkalčec

Povezanost varijanti gena za katehol-*O* -metil transferazu s poremećajem kognitivnih funkcija u shizofreniji

Diplomski rad

Zagreb, 2015. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, na stručnom vodstvu i korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Također, hvala suvoditelju doc. dr. sc. Aleksandru Vojti.

Hvala na strpljenju, savjetima i konkretnim komentarima dr. sc. Matei Nikolac Perković.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju Instituta „Ruđer Bošković“ na ugodnoj i motivirajućoj radnoj atmosferi.

Cijeloj mojoj obitelji, osobito roditeljima, veliko hvala na podršci, strpljenju i povjerenju koje su oduvijek imali u mene. Zahvaljujem svojim prijateljima, braći i dečku koji su svojim osmijehom i podrškom ublažili svaki neuspjeh te proslavili sa mnom svaki uspjeh.

Najveće hvala mom dedi Željku, koji mi je uvijek bio podrška i oslonac, koji je sa mnom ponosno polagao svaki ispit, i čija mi je vjera u moj uspjeh davala snagu za sigurno putovanje prema cilju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Povezanost varijanti gena za katehol-*O* -metil transferazu s poremećajem kognitivnih funkcija u shizofreniji

Ana Tkalčec
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Shizofrenija je psihijatrijski poremećaj koji ozbiljno narušava život pojedinaca i njihovih najbližih. Narušene kognitivne sposobnosti kod pacijenata sa shizofrenijom najvjerojatnije su posljedica narušenog funkcioniranja dopaminergičkog sustava u prefrontalnom korteksu. Katehol-*O*-metil transferaza (COMT) je enzim koji regulira sinaptičku razinu dopamina i na taj način modulira centralnu dopaminergičku funkciju. Postoje naznake da bi funkcionalni polimorfizam rs4680 (Val$^{108/158}$Met) gena *COMT* mogao utjecati na vezu između kognicije i dopaminergičke aktivnosti u prefrontalnoj kori. Zbog nedostatka pouzdanih podataka i zbog velikog broja konfliktnih rezultata prisutnih u literaturi, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti postoji li povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* i kognitivnih sposobnosti kod 501 bolesnika sa shizofrenijom. Po prvi put je istražena povezanost druga dva polimorfizma gena *COMT* (rs4818, rs4633) s kognitivnim simptomima u bolesnika sa shizofrenijom, s pretpostavkom da bi se navedeni polimorfizmi mogli nalaziti u neravnoteži udruživanja s polimorfizmom rs4680. Razumijevanje uloge genetičkih varijanti enzima COMT, kao važne karike dopaminergičkog sustava, moglo bi pomoći u shvaćanju doprinosa dopaminergičkog sustava razvoju kognitivnih poteškoća u shizofreniji.

(72 stranice, 13 slika, 20 tablica, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: dopamin, COMT, kognitivna funkcija, polimorfizam, shizofrenija
Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Nela Pivac, znanstveni savjetnik
Suvoditelj: Doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Aleksandar Vojta, doc. dr. sc. Damjan Franjević,
izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić
Rad prihvaćen: 5.11.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The association of catechol-*O* -methyil transferase genetic variants with cognitive impairment in schizophrenia

Ana Tkalčec
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

ABSTRACT

Schizophrenia is a psychiatric disorder that severely affects patient's life and life of his/her family. Impaired cognitive functions in patients with schizophrenia are most likely a consequence of the impaired function of the dopaminergic system in the prefrontal cortex. Catechol-*O*-metil transferase (COMT) is an enzyme that regulates the synaptic level of dopamine and in that way modulates the central dopaminergic function. There are indications that functional polymorphism rs4680 ($Val^{108/158}Met$) of the *COMT* gene might affect the connection between cognition and dopaminergic activity in the prefrontal cortex. Due to the lack of reliable data and the large number of conflicting results in literature, the aim of this thesis was to explore the association between the polymorphism rs4680 of the *COMT* gene and the cognitive capabilities of 501 patients with schizophrenia. For the first time, the association of the other two polymorphisms of the *COMT* gene (rs4818, rs4633) with cognitive symptoms in patients with schizophrenia was explored, with the assumption that the aforementioned polymorphisms may exist in the linkage disequilibrium with the rs4680 polymorphism. Understanding the role of the COMT enzyme's genetic variants, as an important part of the dopaminergic system, could help in understanding the contribution of the dopaminergic system in the development of cognitive deficit in schizophrenia.

(72 pages, 13 figures, 20 tables, original language: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: dopamine, COMT, cognitive function, polymorphism, schizophrenia
Supervisor: Associate professor Nela Pivac, PhD, senior scientist
Co-supervisor: Assistant professor Aleksandar Vojta, PhD
Reviewers: Asst. Prof. Aleksandar Vojta, PhD, Asst. Prof. Damjan Franjević, PhD,
Assoc. Prof. Domagoj Đikić, PhD
Thesis accepted: 5.11.2015.

KRATICE:

COMT - katehol-*O*-metil transferaza

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

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

NAc - nukleus akumbens (lat. *nucleus accumbens*)

PANSS – ljestvica pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji (eng. *Positive and negative syndrome scale for schizophrenia*)

PANSS-COGN – kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

PFC – prefrontalna kora (eng. *prefrontal cortex*)

SAM – *S*- adenozilmetionin

S-COMT – topivi citosolni oblik proteina COMT (eng. *soluble*)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida

VTA - ventralno tegmentalno područje

Sadržaj

1 UVOD 1

1.1 Dopaminergički sustav 1

1.2 Katehol-*O*-metil transferaza (COMT) 4

1.2.1 Gen *COMT*, oblici i rasprostranjenost enzima COMT 5

1.2.2 Prostorna struktura i polimorfizmi enzima COMT 7

1.3 Shizofrenija 11

1.3.1 Uloga dopamina i enzima COMT u shizofreniji 12

1.3.2 Kognicija i kognitivna disfunkcija u shizofreniji 14

1.3.3 Dopamin, enzim COMT i kognitivne sposobnosti u shizofreniji 16

1.3.4 Terapija 18

2 CILJ ISTRAŽIVANJA 21

3 MATERIJALI I METODE 23

3.1 Ispitanici 23

3.2 Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja 24

3.3 Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam gena *COMT* 25

3.4 Statistička obrada podataka 28

4 REZULTATI 29

4.1 Demografski podaci 29

4.2 Povezanost polimorfizama gena *COMT* s kognitivnim sposobnostima 30

4.2.1 Polimorfizam rs4680 30

4.2.2 Polimorfizam rs4633 35

4.2.3 Polimorfizam rs4818 38

4.3 Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena *COMT* 41

4.3.1 Povezanost haplotipova gena *COMT* s kognitivnim simptomima 43
4.3.2 Utjecaj haplotipova na česticu N5 podljestvice PANSS-COGN 49
5 RASPRAVA 51
5.1 Demografski podaci 51
5.2 Povezanost polimorfizama gena *COMT* s kognitivnim sposobnostima 52
5.2.1 Polimorfizam rs4680 52
5.2.2 Polimorfizmi rs4633 i rs4818 55
5.3 Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena *COMT* 57
6 ZAKLJUČAK 59
7 LITERATURA 61

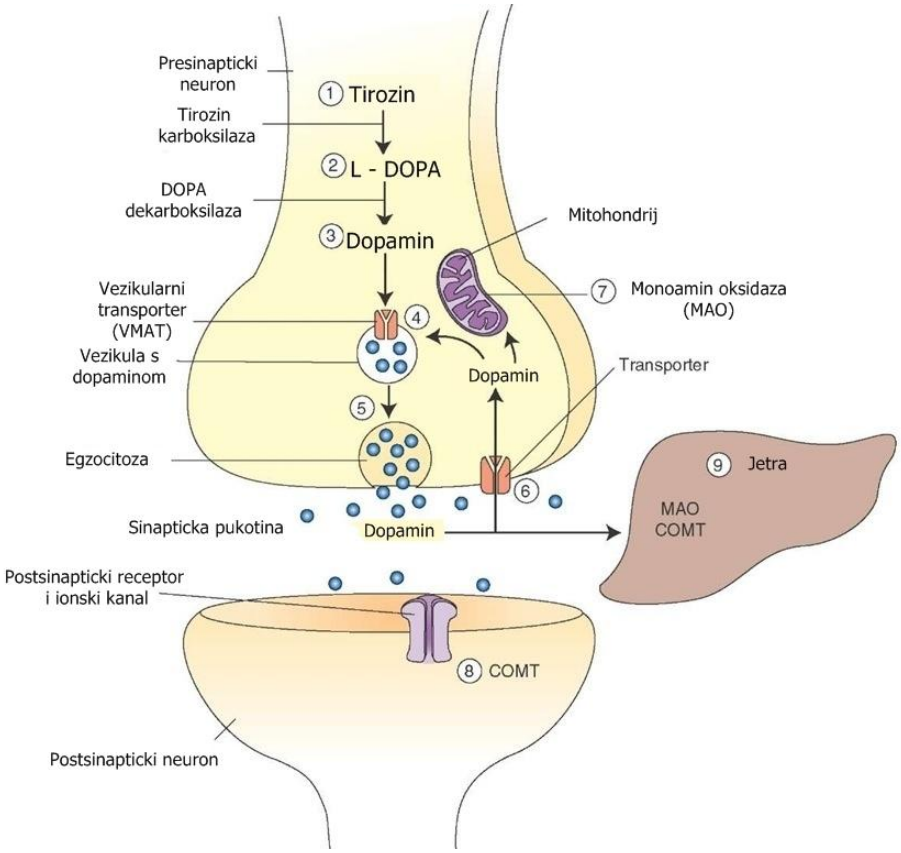
1 UVOD

1.1 Dopaminergički sustav

Kateholamini dopamin, adrenalin i noradrenalin kemijski su neurotransmiteri i hormoni vrlo važni u regulaciji fizioloških procesa te u razvoju neuroloških, psihijatrijskih, endokrinih i kardiovaskularnih bolesti (Eisenhofer i sur., 2004). Dopamin je ključni neurotransmiter u mozgu sisavaca. Kontrolira različite funkcije kao što su emocije, kognicija, unos hrane, motorička aktivnost i endokrina regulacija. Na periferiji ima ulogu modulatora kardiovaskularnih funkcija, otpuštanja kateholamina, lučenja hormona, vaskularnog tonusa, funkcije bubrega i pokretljivosti gastrointestinalnog trakta (Missale i sur., 1998). Obzirom na veliku važnost dopamina i dopaminergičkog sustava, nepravilnosti u njihovoj funkciji rezultiraju brojnim neurološkim i psihijatrijskim bolestima, uključujući poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (ADHD), Parkinsonovu bolest, depresiju, ovisničko ponašanje te shizofreniju (Arias-Carrion i sur., 2010).

Sinteza dopamina, kao i ostalih kateholamina, počinje reakcijom hidroksilacije zajedničkog prekursora aromatske aminokiseline L-tirozina. U toj reakciji, koju katalizira enzim tirozin hidroksilaza (TH), nastaje L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). Enzim dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina tada katalizira reakciju dekarboksilacije molekule L-DOPA te nastaje dopamin. U neuronima, koji kao neurotransmiter koriste dopamin, nema daljnjih enzimskih modifikacija. Međutim, u neuronima koji izlučuju noradrenalin postoji dodatni enzim, dopamin-*β*-hidroksilaza (pretvara dopamin u noradrenalin), a u neuronima koji za prijenos signala koriste adrenalin nalazi se i enzim feniletanolamin-*N*-metiltransferaza (pretvara noradrenalin u adrenalin). Sinteza, pohranjivanje, signalizacija i inaktivacija dopamina prikazana je na Slici 1. Molekule dopamina, netom sintetizirane, pohranjuju se u sinaptičke vezikule na završecima aksona uz pomoć vezikularnog monoaminskog transportera. Dopamin se egzocitozom otpušta iz stanice, kao odgovor na presinaptički akcijski potencijal, u sinaptičku pukotinu te aktivira razne postsinaptičke neurone. Aktivacija postsinaptičkih neurona događa se kroz vezanje dopamina na jedan od pet podtipova metabotropnih receptora koji vežu G-protein (D_1-D_5). Prenošenje signala dopaminom inaktivira se ponovnim unosom dopamina u presinaptički neuron dopaminskim transporterom (DAT). Ponovno uneseni dopamin u

presinaptički neuron metabolizira enzim katehol-*O*-metil transferaza (COMT) i monoaminooksidaza tipa A (MAOA). Najčešći produkt metabolizma dopamina je homovanilna kiselina koja se urinom izlučuje iz organizma. Molekule dopamina koje navedeni enzimi ne metaboliziraju slobodne su i skladište se u posebnim vezikulama te se čuvaju za moguću kasniju upotrebu (Jones i Miller, 2008; Fernstorm i Fernstorm, 2007; Missale i sur., 1998; Eisenhofer i sur., 2004).

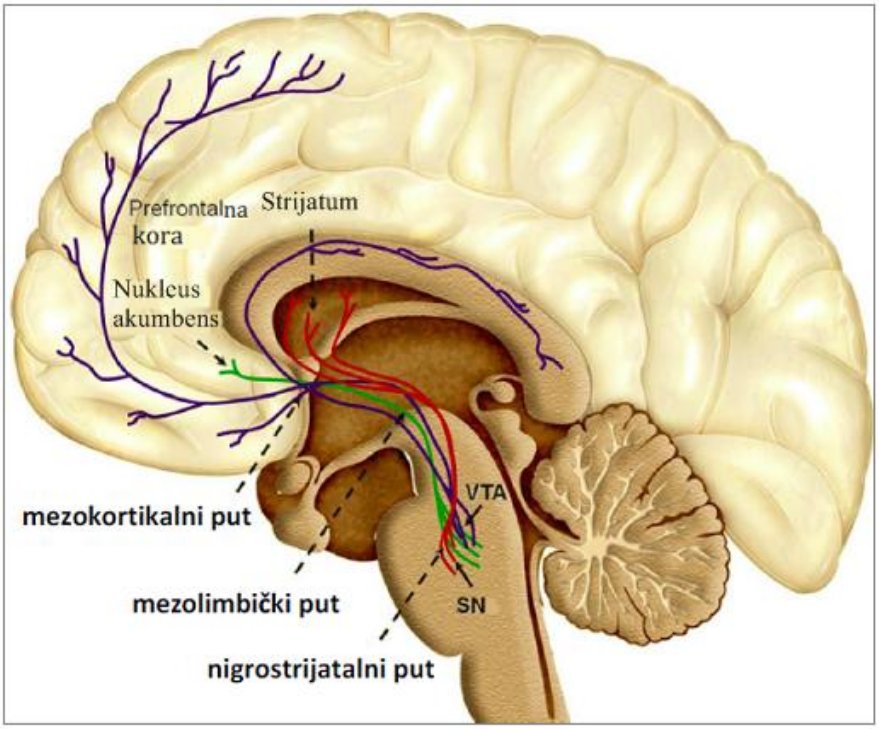


Slika 1. Shematski prikaz koraka uključenih u sintezu, otpuštanje i razgradnju dopamina. Preuzeto i obrađeno s http://what-when-how.com/neuroscience/neurotransmitters-the-neuron-part-3/

1) Tirozin je prekursor za sintezu dopamina; 2) U citoplazmi dopaminergičkog neurona enzim tirozin hidroksilaza pretvara tirozin u DOPA-u; 3) Enzim DOPA dekarboksilaza pretvara DOPA-u u dopamin; 4) Dopamin se aktivnim transportom pakira u vezikule; 5) Dopamin se egzocitozom izbacuje u sinaptičku pukotinu kao odgovor na akcijski potencijal; 6) Ponovni unos dopamina u presinaptički neuron dopaminskim transporterom kao glavnim mehanizmom inaktivacije prenošenja signala dopaminom: oko 50% dopamina skladišti se u vezikulama za ponovnu

upotrebu; 7) Ostatak dopamina metabolizira mitohondrijska MAOA; 8) Dio dopamina aktivno se transportira u postsinaptički neuron gdje ga inaktivira COMT; 9) Ostatak dopamina u sinaptičkoj pukotini ulazi u cirkulaciju, odlazi do jetre gdje ga metaboliziraju COMT i MAOA.

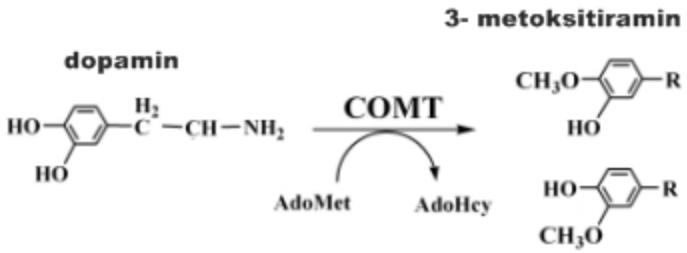
Dopamin modulira aktivnost specifičnih jezgara u mozgu, kao što su nukleus akumbens (Nac, lat. *nucleus accumbens*), putamen te ventralno tegmentalno područje (VTA, lat. *area tegmentalis ventralis*), usklađuje njihovu aktivnost i time tvori dio neurobioloških mehanizama koji su podloga za učenje. U mozgu odrasle osobe dopaminergički neuroni čine heterogenu skupinu stanica koje se nalaze u mezencefalonu, diencefalonu i olfaktornim lukovicama. Ipak, velika većina takvih stanica nalazi se u ventralnom dijelu mezencefalona gdje formiraju crnu tvar/jezgru (SN, lat. *substantia nigra*) i VTA. Dopaminergički sustav u ljudskom mozgu prikazan je na Slici 2. Nigrostrijatalni sustav čine dopaminergički neuroni iz SN-a koji pružaju svoje aksone u bazalne ganglije, područje strijatuma. Taj sustav ima važnu ulogu u kontroli voljnih pokreta pa ga se dovodi u izravnu vezu s razvojem Parkinsonove bolesti. Sustavi koji započinju u VTA nazivaju se mezolimbički i mezokortikalni sustav. Aksoni neurona mezolimbičkog sustava protežu se do NAc i limbičkih područja (amigdala i hipokampus), dok se oni mezokortikalnog sustava protežu u prefrontalnu, cingulatnu i entorinalnu koru. Mezolimbički sustav odgovoran je za osjećaj nagrade i zadovoljstva te ima glavnu ulogu u razvoju ovisničkog ponašanja, dok je mezokortikalni sustav odgovoran za kratkoročno pamćenje, planiranje i rješavanje problema. Budući da se ova dva sustava preklapaju, obično se smatraju jednim, mezokortikolimbičkim sustavom. Mezokortikolimbički sustav povezan je sa sustavom nagrade i shizofrenijom. Postoji još jedan dopaminergički sustav, tuberoinfundibularni sustav, čiji neuroni počinju u arkuatnim i periventrikularnim jezgrama hipotalamusa, a protežu se do srednjeg režnja hipofize. Važan je za inhibitornu kontrolu prolaktina, a povišena razina prolaktina nuspojava je uobičajenih antipsihotika (Arias-Carrion i sur., 2010; Marsden, 2006).



Slika 2. Dopaminergički sustav u ljudskom mozgu. Crveno je označen nigrostrijatalni put, zeleno mezolimbički put, a ljubičasto mezokortikalni put. Preuzeto i obrađeno iz rada Arias-Carriona i suradnika (2010).

1.2 Katehol-*O*-metil transferaza (COMT)

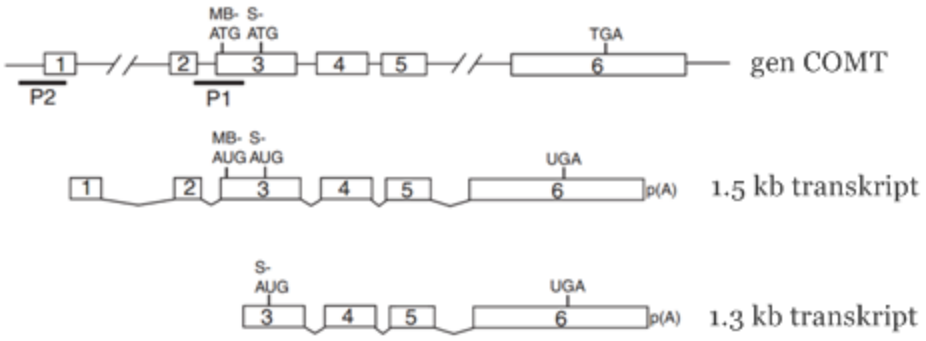
COMT je po prvi put opisan 1957., kada ga je Julius Axelrod izolirao iz jetre štakora, kao enzim koji katalizira *O*-metilaciju adrenalina i drugih kateholamina. Glavna uloga ovog enzima je inaktivacija kateholaminskih neurotransmitera, uključujući dopamin, katalizom prijenosa metilne skupine sa *S*-adenozil-L-metionina (SAM) na hidroksilnu skupinu kateholne jezgre neurotransmitera (Slika 3). Prijenosom metilne skupine na dopamin nastaje 3-metoksitiramin (Matsumoto i sur., 2003). Reakcija se događa uz prisutnost iona Mg^{2+} te se češće odvija metilacija 3' –hidroksilne skupine u odnosu na metilaciju 4' –hidroksilne skupine (Mannisto i Kaakkola, 1999).



Slika 3. Shema razgradnje dopamina pomoću enzima COMT. Preuzeto i obrađeno s http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2916818_pone.0011951.g001&req=4

1.2.1 Gen *COMT*, oblici i rasprostranjenost enzima COMT

Gen *COMT* kod ljudi nalazi se na 22. kromosomu, u regiji q11.2 koja se povezuje s razvojnim poremećajem poznatim kao velokardiofacijalni sindrom (VCFS, eng. *velo-cardiofacial syndrome*, ili DiGeorgeov sindrom). Taj je sindrom rezultat hemizigotnih mikrodelecija regije 22q11 u kojoj se nalazi i gen *COMT*, a u području neuroznanosti je zanimljiv zbog povećane incidencije psihijatrijskih poremećaja, posebno shizofrenije koja se fenotipom ne razlikuje od one koja nije povezana s delecijama u regiji 22q11 (Tunbridge, 2010). Gen *COMT* sastoji se od šest eksona, od kojih su prva dva nekodirajuća. Njegovu ekspresiju kontroliraju dva različita promotora, kako je prikazano na Slici 4. Promotor P1 kontrolira ekspresiju kraćeg transkripta od 1,3 kb, dok uzvodni, 5' promotor (P2) kontrolira ekspresiju transkripta dugog 1,5 kb. Taj je gen neobičan, budući da kodira za dvije različite izoforme proteina COMT i sadrži dva ATG startna kodona u eksonu 3. Dva oblika proteina COMT su protein vezan za membranu (MB-COMT, eng. *membrane-bound*) i topivi citosolni oblik (S-COMT, eng. *soluble*). Iz duljeg transkripta (1,5 kb) mogu nastati oba oblika proteina, dok iz kraćeg (1,3 kb) nastaje samo S-COMT. Razlog tome je smještaj promotora P1 između startnih kodona za S-COMT i MB-COMT te njegovo djelomično preklapanje s kodirajućom sekvencom za MB-COMT. S-COMT gradi 221 aminokiselina, dok MB-COMT ima dodatnih 50 hidrofobnih aminokiselina koje tvore regiju proteina koja se veže na membranu (Mannisto i Kaakkola, 1999; Tunbridge, 2010).



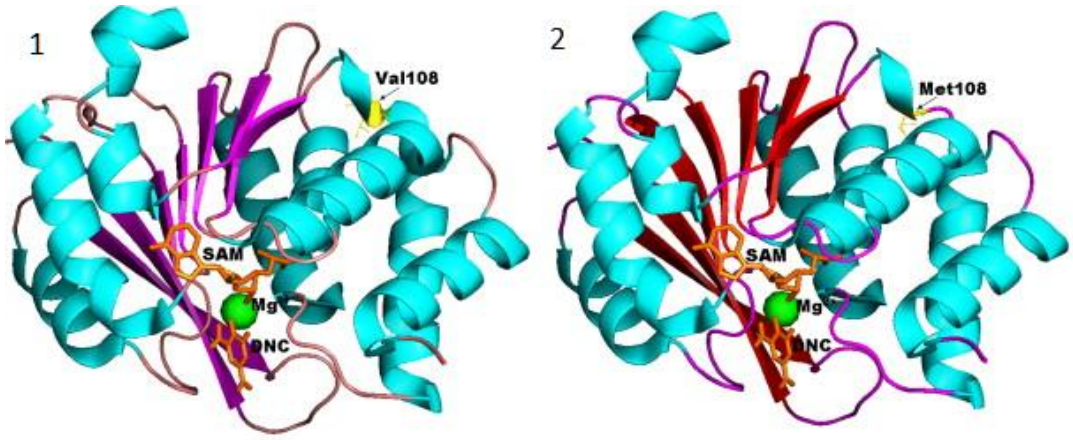
Slika 4. Gen *COMT* i njegovi transkripti. Preuzeto i obrađeno iz rada Tunbridge (2010).

COMT se neprestano eksprimira u visokoj koncentraciji u jetri, bubregu, mozgu, nadbubrežnoj žlijezdi i plućima. Ipak, postoji razlika u ekspresiji dvaju transkripata u različitim tkivima što upućuje na regulaciju transkripcije ovisnu o tkivu. Promotori sadrže više veznih mjesta za transkripcijske faktore koji posreduju različite ekspresijske profile. U promotoru P2 nađeni su motivi za vezanje transkripcijskih faktora AP-2, Ets-1 i Sp1, a u promotoru P1 za HNF-4, Sp1, AP2 i NF-IL6 (Tunbridge, 2010). U većini ljudskih tkiva prisutna su oba transkripta, a S-COMT dominira. Jedina iznimka je ljudski mozak gdje prevladava MB-COMT što dokazuje činjenicu da iz transkripta dugog 1,5 kb mogu nastati oba oblika (u mozgu je eksprimiran samo dulji transkript). Različitosti u razini ekspresije ovisno o tkivu potvrđuje postojanje transkripcijskih faktora specifičnih za tkivo, koji se vežu na brojna vezna mjesta na proteinu COMT (Mannisto i Kaakkola, 1999). Visoka razina proteina COMT prisutna je u stanicama koje nisu neuroni, kao što su ependimalne stanice ventrikula, stanice u koroidnom pleksusu i Bergmannove glija stanice, a pokazalo se da je eksprimiran i u dendritima neurona u kori mozga i strijatumu (Matsumoto i sur., 2003). Također, poznato je da COMT nema značajnu aktivnost u presinaptičkim dopaminergičkim neuronima. Prisutna je njegova aktivnost u postsinaptičkim neuronima, a posebno u glija stanicama (Mannisto i Kaakola, 1999). Dulji transkript neprestano se eksprimira u ljudskom mozgu, ponajviše u leđnoj moždini, malom mozgu, produljenoj moždini i kori velikog mozga, a najmanje u amigdali i talamusu. Najveća ekspresija glasničke RNA (mRNA, eng. *messenger RNA*) proteina COMT nađena je u slojevima II, IV i VI dorzolateralne prefrontalne kore (PFC, eng. *prefrontal cortex*), a na staničnoj razini ekspresija je

najveća u piramidalnim neuronima, no mala u glija stanicama. U kaudatnim jezgrama protein COMT je slabije eksprimiran, i to primarno u srednje velikim i velikim neuronima, a manje u glija stanicama. U ventralnom mezencefalonu, u regijama dopaminergičkih izdužetaka iz SN i VTA, ekspresija proteina COMT je niska (Tunbridge, 2010). Posebno važnu ulogu COMT ima u PFC-u gdje se dopaminski transporter, koji ima tisuću puta veći afinitet za dopamin, nalazi u vrlo malim količinama. Zbog prisutnosti u malim količinama, dopaminski transporter u ovoj regiji nema utjecaj na razinu izvanstaničnog dopamina, već je inaktivacija dopamina zadaća kataboličkih enzima, uključujući i COMT (Chen i sur., 2004).

1.2.2 Prostorna struktura i polimorfizmi enzima COMT

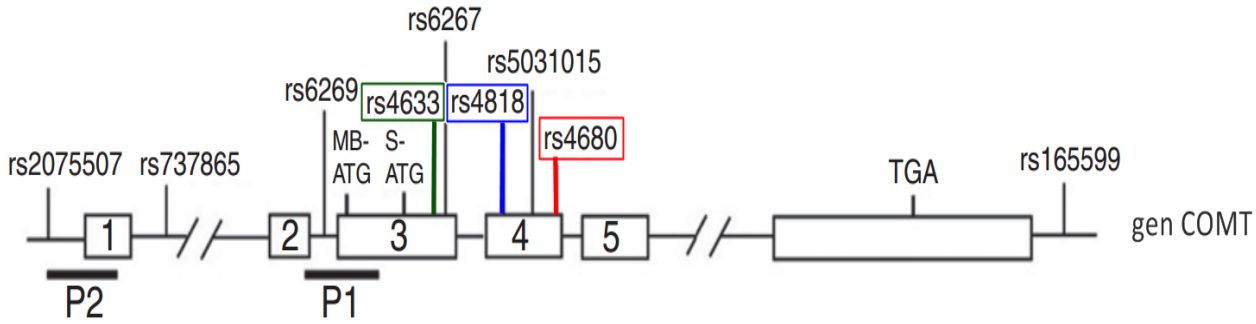
Kao što je prikazano na Slici 5, COMT je monomerni protein, ima jednu domenu koju čini osam α zavojnica što okružuju središnju β ploču. Aktivno mjesto nalazi se u plitkom utoru na vanjskoj površini proteina, a čine ga vezno mjesto za SAM i katalitičko mjesto koje formira nekoliko aminokiselina bitnih za vezanje supstrata, vode, iona Mg^{2+} te za katalizu *O*-metilacije. Aktivno mjesto isto je u oba oblika proteina COMT, katalitička mjesta imaju identične aminokiselinske sekvence, međutim, zbog dijela koji se veže za membranu ili zbog same membrane, MB-COMT ostvaruje povoljnije, ali slabo okarakterizirane interakcije sa supstratom. U aktivno mjesto prvo se veže SAM, zatim Mg^{2+} te naposlijetku supstrat. Ioni Mg^{2+} pridonose ionizaciji hidroksilne skupine kateholnog supstrata te kontroli njegove orijentacije. Pokraj jedne od hidroksilnih skupina supstrata nalazi se aminokiselina lizin na poziciji 144 (Lys144) koji služi kao katalitička baza za nukleofilnu reakciju; lizin prihvaća proton od hidroksilne skupine te se metilna skupina sa SAM-a prenosi na hidroksilnu skupinu. Ion Mg^{2+} koordiniraju asparaginska kiselina na poziciji 141 (Asp141) i 169 (Asp169) te asparagin na poziciji 170 (Asn170), obje kateholne hidroksilne skupine i molekula vode (oktaedralna koordinacija). Triptofan na poziciji 38 (Trp38) i 143 (Trp143) te prolin na poziciji 174 (Pro174) čine hidrofobnu barijeru, definiraju selektivnost proteina za različite supstrate te izravno sudjeluju u reakciji metilacije održavajući kateholni prsten u pravilnoj poziciji (Mannisto i Kaakola, 1999).



Slika 5. Kristalna struktura proteina COMT kod čovjeka. Preuzeto iz rada Jatane i suradnika (2008). DNC=3,5-dinitrokatehol (analog supstrata). 1. COMT s aminokiselinom valin (Val) u polimorfnom mjestu; 2. COMT s aminokiselinom metionin (Met) u polimorfnom mjestu.

Ljudski gen *COMT* sadrži brojne polimorfizme, do 2010. godine ih je zabilježeno 314, od kojih mnogi nisu potvrđeni, a veliki broj se pojavljuje s izrazito malom učestalošću. Većina tih polimorfizama nalazi se izvan kodirajuće sekvence te im funkcija nije poznata. Ipak, za nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP, eng. *single nucleotide polymorphism*) i haplotipova poznata je ili funkcija ili povezanost s ekspresijom mRNA proteina COMT. Najpoznatiji i najbolje istražen polimorfizam je $Val^{108/158}Met$ (rs4680) (Tunbridge, 2010). Radi se o zamjeni jedne baze, gvanina za adenin, što dovodi do zamjene jedne aminokiseline (valin, Val) za drugu (metionin, Met) na poziciji 158 (MB-COMT) ili 108 (S-COMT) (Lotta i sur., 1995). Polimorfizam rs4680 nalazi se u eksonu 4 gena *COMT* (Slika 6). Odavno je poznato da postoji trimodalna distribucija aktivnosti COMT-a u ljudskoj populaciji (Tunbridge, 2010). Aktivnost COMT-a može biti niska, srednja ili visoka. Niska aktivnost COMT-a povezana je s termolabilnosti enzima, čak i na 37 °C (Mannisto i Kaakola, 1999). U usporedbi s enzimom koji sadrži aminokiselinu valin u polimorfnom mjestu, enzim s aminokiselinom metionin ima nižu termostabilnost, a time i nižu aktivnost na 37 °C (Tunbridge, 2010). Alel Val kodira za enzim veće stabilnosti pri temperaturama 37 °C-56 °C, međutim, prava razlika u stabilnosti enzima možda nastaje zbog drugih polimorfizama koji utječu na aktivnost enzima (Chen i sur., 2004). Homozigoti za aminokiselinu valin imaju 3-4 puta veću aktivnost enzima COMT u eritrocitima,

u usporedbi s homozigotima za aminokiselinu metionin. Budući da su aleli kodominantni, heterozigoti imaju srednju razinu aktivnosti COMT-a (Tunbridge, 2010). Učestalost alela niske aktivnosti koji kodira za aminokiselinu Met kreće se između otprilike 50% u populaciji bijelaca do 20-30% u populaciji istočne Azije, a postoje populacije koje imaju i nižu učestalost alela, kao što je 6% u Gani (Palmatier i sur., 1999; Ameyaw i sur., 2000). Val$^{108/158}$Met polimorfizam ima važnu ulogu u metabolizmu kateholamina, a povezuje ga se i sa rizikom za obolijevanje od shizofrenije, opsesivno–kompulzivnog poremećaja, bipolarnog poremećaja, Parkinsonove bolesti, raka dojke (Shield i sur., 2004), povećanom agresijom, težim simptomima otpornosti na terapiju u shizofreniji te boljom funkcijom prefrontalne kore u zdravih ljudi, kao i onih sa shizofrenijom (Bilder i sur., 2004). Alel veće aktivnosti (alel Val) povezuje se sa smanjenim učinkom radnog pamćenja pod pretpostavkom da povećana enzimatska aktivnost toga enzima vodi k smanjenju koncentracije dopamina u PFC-u, a time i do promjena u aktivnosti tijekom obavljanja zadaće radnog pamćenja (Nickl-Jockschat i sur., 2015). Radno pamćenje omogućuje prolaznu procjenu, upravljanje i sintezu novo dobivenih ili pohranjenih informacija. Djeluje u kratkoročnom pamćenju, ali ta dva pojma nisu sinonimi (Millan i sur., 2012).



Slika 6. Organizacija gena *COMT* i položaj polimorfizma Val$^{108/158}$Met (rs4680) (označen crveno), rs4633 (označen zeleno) i rs4818 (označen plavo). Pravokutnici označeni brojevima predstavljaju eksone. Preuzeto i obrađeno iz rada Tunbridge (2010).

Polimorfizam Val$^{108/158}$Met nije jedini funkcionalni polimorfizam unutar sekvence gena *COMT*. Slično ovom polimorfizmu, Ala$^{22/72}$Ser (rs6267) također utječe na termostabilnost proteina te smanjuje njegovu katalitičku aktivnost, ali se u populaciji pojavljuje puno rjeđe. Polimorfizam Ala$^{52/102}$Thr (rs5031015), čini se, nema utjecaj na enzimatsku aktivnost COMT-a. Osim polimorfizama unutar kodirajuće sekvence postoje polimorfizmi koji se nalaze u intronima ili u 5' i 3' netranslatirajućim regijama, a također utječu na aktivnost enzima, vjerojatno kroz učinak na ekspresiju mRNA. Istraživanja o razlikama u ekspresiji jednog alela naspram drugog kod heterozigotnih pojedinaca pokazala su značajnu alelnu ekspresiju za polimorfizam rs4633 i rs4818 (Tunbridge, 2010). Polimorfizam rs4633 (Slika 6) rezultat je tranzicije citozina u timin (C/T) (Tunbridge, 2010), pri čemu ne dolazi do promjene aminokiseline. Nalazi se u 62. kodonu u genu *COMT* (http://www.snpedia.com/index.php/Rs4633), eksonu 3 transkripta MB-COMT, odnosno, eksonu 1 transkripta S-COMT (Bray i sur., 2003). Pokazalo se da je ovaj polimorfizam, rs4633, u savršenoj neravnoteži udruživanja (LD, eng. *linkage disequilibrium*) s polimorfizmom Val$^{108/158}$Met, pri čemu se alel C polimorfizma rs4633 uvijek nalazi u haplotipu s alelom G polimorfizma Val$^{108/158}$Met (kodira za valin) (Bray i sur., 2003). Ta činjenica upućuje na smanjenu ekspresiju transkripata s valinom naspram onih s metioninom u ljudskom mozgu (Bray i sur., 2003). Polimorfizam rs4818 (Slika 6) nastaje uslijed zamjene citozina za gvanin (C/G), ali ne dovodi do promjena u aminokiselinskom slijedu (http://www.snpedia.com/index.php/Rs4818). Nalazi se u istom eksonu kao i polimorfizam Val$^{108/158}$Met (Tunbridge, 2010). Polimorfizam rs4818 pokazao je alelnu ekspresiju i u limfoblastima i u mozgu. Kod heterozigota rs4818, u većini slučajeva, alel C jače je eksprimiran od alela G i u limfoblastima i u mozgu. Oni heterozigoti rs4818 koji nisu pokazali diferencijalnu alelnu ekspresiju, svi do jednoga bili su homozigoti za aminokiselinu valin (polimorfizam Val$^{108/158}$Met) (Zhu i sur., 2004).

1.3 Shizofrenija

Shizofrenija je kronični, složeni, neurorazvojni i genetički poremećaj kojeg karakterizira prisutnost kroničnih psihotičkih simptoma, poremećaj kognitivnih sposobnosti te pomanjkanje percepcije i emocija (Egan i sur., 2001; Godar i Bortolato, 2014). Pogađa više od 21 milijun ljudi diljem svijeta (oko 1% populacije) i često se percipira kao vrsta invaliditeta pri čemu se osoba nije u stanju brinuti za sebe, educirati se ili biti zaposlena (Pearlson, 2000; WHO, 2014). Ljudi sa shizofrenijom imaju 2-2,5 puta veću vjerojatnost za preranu smrt u odnosu na većinsku populaciju, a k tome često vode fizičke bolesti kao što su kardiovaskularne, metaboličke ili infekcijske bolesti (WHO, 2014). Oko 50% pacijenata sa shizofrenijom pokuša tijekom života počiniti samoubojstvo, a oko 10% uspije ostvariti svoju namjeru (Pearlson, 2000). Bolesnici sa shizofrenijom često su u društvu stigmatizirani na način da ih se sramoti, diskriminira te se narušavaju njihova ljudska prava, iako se ova bolest može vrlo dobro kontrolirati adekvatnim lijekovima i psihosocijalnom podrškom. Bolest je okarakterizirana kao poremećaj u razmišljanju, percepciji, emocijama, jeziku, samosvijesti i kao poremećaj ponašanja. Ono po čemu je u društvu poznata jesu slušne halucinacije i deluzije (WHO, 2014). Shizofrenija češće pogađa muškarce nego žene, a kod muškaraca se ranije i javlja (između 15 i 25 godina, a kod žena između 18 i 28 godina). Kod žena postoji veća vjerojatnost da već imaju člana obitelji s ovom bolešću, češće razvijaju pozitivne i emocionalne simptome te imaju bolji odgovor na terapiju, dok muškarci više pokazuju negativne simptome i imaju lošiju dugoročnu prognozu (Pearlson, 2000; WHO, 2014). Istraživanja do sada još nisu identificirala samo jedan čimbenik koji bi bio uzrok ove bolesti. Pretpostavlja se da bi shizofreniju mogla uzrokovati interakcija između gena i čitave lepeze okolišnih čimbenika, primjerice određenih infekcija, pothranjenosti tijekom trudnoće i ranog djetinjstva te problema tijekom poroda. Razvoju shizofrenije doprinose i psihosocijalni čimbenici kao što su urbanizacija, imigracija, konzumiranje droga, psihološka trauma i stres (WHO, 2014). Budući da nema nikakvih patognomoničnih simptoma niti bioloških markera, dijagnoza se određuje isključivanjem mogućnosti drugih psihijatrijskih i neuroloških poremećaja (Pearlson, 2000). Prema dosadašnjim dijagnostičkim kriterijima, simptomi shizofrenije grupirani su u tri grupe simptoma:

1) pozitivni simptomi; halucinacije i deluzije (Godar i Bortolato, 2014), psihotične abnormalnosti u percepciji i testiranje stvarnosti (Simpson i sur., 2010);

2) negativni simptomi; smanjeno izražavanje emocija, otupljivanje, problemi s govorom, nesposobnost osjećaja užitka te povlačenje iz društva (Godar i Bortolato, 2014), nedostatak motivacije i abnormalnosti u socijalnim interakcijama (Simpson i sur., 2010);

3) kognitivni simptomi; odnose se na poremećaje pažnje, pamćenja, percepcije i misli (Godar i Bortolato, 2014), nesposobnost organizacije života, sljedstvenog i učinkovitog rada, nedostatke u semantičkom, eksplicitnom i radnom pamćenju te izvršnim funkcijama (Simpson i sur., 2010). Semantičko pamćenje je oblik dugoročnog pamćenja koje uključuje učenje i pohranu postojanih činjenica, informacija i ideja. Izvršne funkcije su smislene, svrsishodne operacije poput planiranja, donošenja odluka, rješavanja problema, prosuđivanja itd., a recipročno interagiraju s pažnjom i radnim pamćenjem. Uključuju i započinjanje prikladnih, kao i potiskivanje neprikladnih odgovora (Millan i sur., 2012).

Postavljanje dijagnoze zahtjeva prisutnu povijest pogoršanja funkcija koje su vezane za posao, međuljudske odnose te brigu o samome sebi. Tradicionalni klinički podtipovi nastali su identifikacijom simptoma koji se obično pojavljuju zajedno. Klasifikacija DSM-IV uključuje pet podtipova: paranoidni, dezorganizirani, katatonički, nediferencirani i ostali (Pearlson, 2000). Iako su pozitivni simptomi najizraženiji i karakteristični za shizofreniju, mogu se uspješno liječiti antipsihoticima, za razliku od negativnih i kognitivnih simptoma (Simpson i sur., 2010). Dokazi pronađeni u istraživanjima upućuju na to da su primarni poremećaji u shizofreniji posredovani dopaminom u suradnji s drugim neurotransmiterima (glutamat, γ-aminomaslačna kiselina - GABA i serotonin) (Simpson i sur., 2010).

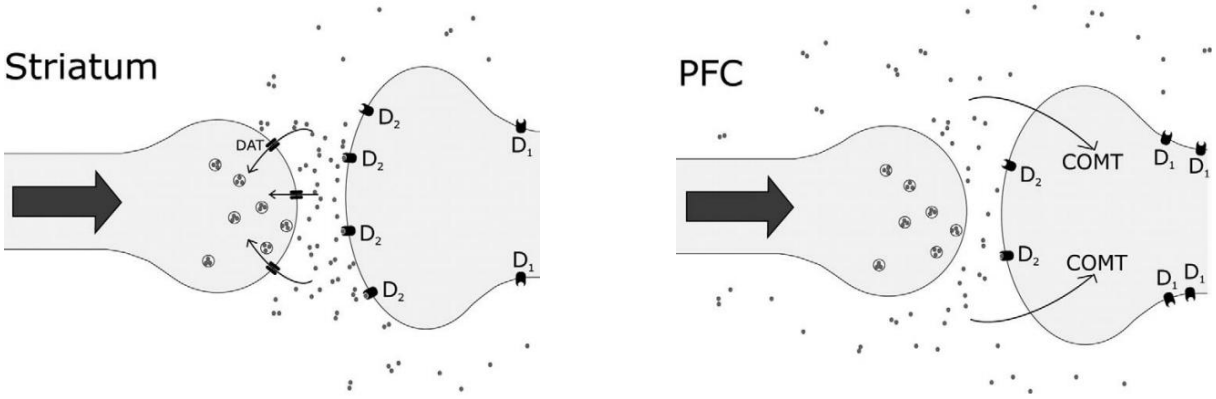
1.3.1 Uloga dopamina i enzima COMT u shizofreniji

Uloga dopamina u patogenezi shizofrenije postala je jasna nakon otkrića antagonističkog djelovanja antipsihotičkih lijekova na dopaminski receptor D_2, glavno ciljno mjesto antipsihotičkih lijekova (Godar i Bortolato, 2014). Svi antipsihotici su antagonisti dopaminskih receptora D_2, a njihova klinička učinkovitost izravno korelira s njihovom moći inhibicije tih receptora (Simpson i sur., 2010). Duže vrijeme se zna da je hiperaktivnost transmisije dopamina odgovorna za pozitivne simptome shizofrenije. Budući da su projekcije dopaminergičkih neurona i receptori D_2 pretežito smješteni u subkortikalnim regijama (strijatum, NAc), na njih je

u početnim istraživanjima bila usmjerena pozornost. U posljednje vrijeme, sve je teže objasniti nastajanje negativnih i kognitivnih simptoma, koji se ne smanjuju nakon terapije antagonistima receptora D_2. Pretpostavlja se da ovi simptomi možda nastaju uslijed promijenjene funkcije PFC-a gdje je smanjena transmisija dopamina putem receptora D_1 (Laruelle i sur., 2003) tj. dolazi do nedovoljne aktivacije dopaminom (Goldman-Rakić i Selemon, 1997). Dakle, smatra se da se u shizofreniji radi o hiperfunkciji dopamina u strijatumu te hipofunkciji dopamina u PFC-u (Simpson i sur., 2010). Budući da postoje tri dopaminergička puta, nigrostrijatalni i mezolimbički put vjerojatno su hiperaktivni i ispoljavaju pozitivne simptome dok je mezokortikalni put hipoaktivan i odgovoran za negativne i kognitivne simptome u shizofreniji (Weinberger, 1987). Kod bolesnika sa shizofrenijom, pokazana je pojačana sinteza dopamina u presinaptičkim strijatalnim neuronima, kao i pojačano otpuštanje dopamina u sinaptičku pukotinu u strijatumu (Howes i Kapur, 2009). Smatra se da dinamične promjene u dopaminergičkoj neurotransmisiji imaju ključnu ulogu u adaptivnim i neurorazvojnim procesima koji su posebno aktivni tijekom djetinjstva i adolescencije. Ti bi razvojni periodi mogli biti ključni za interakciju dopaminergičkih gena s okolišnim i štetnim čimbenicima ovisnima o spolu u shizofreniji (Godar i Bortolato, 2014).

Još ne postoji nedvosmislen dokaz za hipofunkciju kortikalnog dopamina, međutim, pokazano je da je signalizacija dopaminom važna za kogniciju i da razina dopamina u PFC-u utječe na kognitivnu funkciju (Simpson i sur., 2010). Budući da se u PFC-u dopamin metabolizira putem COMT-a (Egan i sur., 2001), taj se enzim i njegovi polimorfizmi dovode u vezu s razvojem kognitivnih simptoma u shizofreniji (Simpson i sur., 2010). U PFC-u, za razliku od strijatuma, dopaminski transporter je eksprimiran u malim količinama i ne nalazi se unutar sinapsi. Dopamin se, stoga, inaktivira difuzijom, internalizacijom receptora i razgradnjom putem enzima COMT (Slika 7) (Egan i sur., 2001). S obzirom na to da je vrlo bitan za PFC, COMT utječe na funkcioniranje te regije. Postoji mogućnost da dopamin u PFC-u može difundirati u mjesta izvan sinapsi, što povećava vjerojatnost da će ga razgraditi COMT (Tunbridge i sur., 2006). Genetičke varijante enzima COMT i njihove aktivnosti mogle bi utjecati na aktivnost PFC-a, posebno tijekom izvršnog i radnog pamćenja. Radi se o polimorfizmu $Val^{108/158}Met$, gdje bi alel Val mogao biti čimbenik povećanog rizika za razvoj shizofrenije. Ipak, alel Val nije potreban ni dostatan uzročni čimbenik za razvitak shizofrenije, niti je čimbenik povećanog rizika samo za

shizofreniju. Alel Val utječe na funkciju PFC-a, a time i na biologiju shizofrenije (Egan i sur., 2001).



Slika 7. Dopaminergička transmisija u strijatumu i PFC-u. U strijatumu, dopamin se putem DAT-a unosi natrag u presinaptički neuron. U PFC-u, zbog nedostatka DAT-a, COMT ima značajniju ulogu u inaktivaciji dopamina. Smanjena aktivnost COMT-a (alel Met) upućuje na povišenu razinu dopamina u PFC-u. Preuzeto i obrađeno iz rada Tunbridge i suradnika (2006).

1.3.2 Kognicija i kognitivna disfunkcija u shizofreniji

Kognicija je skupina međusobno povezanih svjesnih, i nesvjesnih mentalnih aktivnosti koje uključuju: pažnju, učenje i pamćenje, rješavanje problema, planiranje, rasuđivanje i procjenjivanje, razumijevanje, znanje i zastupanje, kreativnost, intuiciju, uvid, „spontano“ mišljenje, introspekciju, samosvijest, mentalno putovanje kroz vrijeme i meta-kogniciju (mišljenje i znanje o kogniciji) (Millan i sur., 2012). Kognicija je kao kompleksna mreža, isprepletena na više razina i u više različitih dimenzija, od staničnih kaskada i regija u mozgu te, na kraju, do društva. Za kogniciju su odgovorne razne međusobno povezane i preklapajuće regije u mozgu te raznovrsna paleta neuromodulatora, uključujući acetilkolin, citokine i moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, eng. *brain-derived neurotrophic factor*). Frontalni režanj, bazalni gangliji i talamus čine petlju koja sjedinjuje pažnju, radno pamćenje i izvršne funkcije. Dorzolateralni PFC, prednja cingulatna kora i orbitofrontalna kora pridonose planiranju, donošenju odluka i inhibiciji odgovora. Bazalni gangliji važni su i za proceduralno učenje i

pamćenje (učenje kroz vježbu koje obično uključuje motoričku vještinu). PFC je povezan s parijetalnom korom koja ima modulatorni utjecaj na pažnju i radno pamćenje, a zajedno čine srž skupine koja podupire nastanak inteligencije te imaju utjecaj na subkortikalne regije. Subkortikalne regije uključuju hipokampalnu formaciju (hipokampus i entorinalna kora) i parahipokampus (peririnalna kora i postrinalna kora). Hipokampalna formacija sjedinjuje dimenzije vremena, prostora i konteksta pa je zato od velike važnosti za deklarativno učenje i pamćenje (dugoročno pamćenje koje zahtjeva svjesno učenje), iako dugoročno pamćenje može biti preneseno u regije kao što su temporalni režnjevi, parijetalna kora i PFC (Millan i sur., 2012).

Kognitivna disfunkcija slabo se može kontrolirati i stoga je vrlo važna dimenzija u psihijatrijskim poremećajima. Izazov je precizirati promjene u kogniciji, a pogotovo vezu između njih i promjena u raspoloženju, sustavu nagrade, motoričkim sposobnostima itd. Kognitivna disfunkcija ne znači samo slabo pamćenje, ona je puno širi i kompleksniji pojam. Zapravo, postoje poremećaji (opsesivno-kompulzivni, posttraumatski stresni poremećaj) kod kojih je karakterističan simptom upravo suprotno – nesposobnost zaboravljanja ili inhibicije misli i sjećanja (Millan i sur., 2012). Kognitivne poteškoće u shizofreniji su glavna karakteristika bolesti i imaju veliki utjecaj na svakodnevni život (Green i sur., 2000). Shizofreniju karakterizira velik uzorak kognitivnih poremećaja, od pažnje do socijalne kognicije i jezika. Socijalna kognicija odnosi se na procese koji se koriste za usvajanje i interpretaciju informacija o drugima, kao što su njihov karakter, namjere i ponašanje. Ljudi koji boluju od shizofrenije imaju slab osjećaj za planiranje, teško se prilagođavaju, imaju problema s donošenjem odluka te inhibicijom odgovora (izvršne funkcije). Deklarativno pamćenje također je pogođeno, s time da je slabljenje semantičkog pamćenja ograničeno na shizofreniju, dok je pogoršanje epizodičkog (svjesno pamćenje iskustava povezanih s vremenom i mjestom u prošlosti) zajedničko za nekoliko poremećaja, uključujući i shizofreniju. Neispravna socijalna kognicija je veliki problem; vodi k prijelazu u potpunu psihozu kod visokorizičnih, asimptomatskih pojedinaca, posljedično povlačenje iz društva pogoršava negativne simptome, a pogrešno pripisivanje loših namjera drugima pogoršava paranoju i deluzije. Naposljetku, socijalna kognicija trebala bi biti netaknuta za govorni jezik, a dezorganizacija jezika, nepravilna govorna tečnost i loše shvaćanje semantike karakteristike su shizofrenije (Millan i sur., 2012).

1.3.3 Dopamin, enzim COMT i kognitivne sposobnosti u shizofreniji

Glavni poremećaji kognitivnih funkcija u shizofreniji (radno pamćenje i izvršne funkcije), prema hipotezama, povezani su s disfunkcijom frontalnog režnja, a posebno sa smanjenom razinom dopamina u PFC-u. Razina dopamina u PFC-u vrlo je važna za kognitivno izvršavanje (Lopez-Garcia i sur., 2013). Kognicija je kompleksno svojstvo koje vjerojatno određuje veći broj gena, a svaki ima razmjerno mali utjecaj. Geni i obitelji gena koji se eksprimiraju u PFC-u očiti su kandidati koji bi bili uključeni u kogniciju. Uzevši u obzir njihov broj, pronaći te gene nije nimalo lako, međutim, uloga dopamina u funkciji PFC-a i kogniciji čvrsto je dokazana. Prvi pokazatelji temeljeni su na istraživanjima u kojima je primjenom prekursora dopamina, L-DOPA-e, došlo do poboljšanja nekih kognitivnih funkcija u pacijenata (Cools i sur., 2001; Cools i sur., 2002; Mattay i sur., 2002). Nadalje, dokazi o toj teoriji temeljeni su na istraživanjima na životinjama (Brozoski i sur., 1979; Kodoma i sur., 1997; Goldman-Rakić, 1995) i ljudima (Lange i sur., 1992; Ollat i sur., 1992; Luciana i sur., 1998) u kojima su se primjenjivali agonisti dopamina. Noviji podaci pokazuju da veza između dopamina i kognicije nije jednostavna i linearna. Dopamin ne pospješuje kognitivnu funkciju u svakom slučaju, a u nekim slučajevima može je i usporiti (Savitz i sur., 2006). Smatra se da veza između dopamina i funkcije PFC-a izgleda poput obrnutog slova U jer premala ili prevelika signalizacija dopaminom izaziva poremećaj u radnom pamćenju. Na tu vezu mogu utjecati i genetički i farmakološki čimbenici (Farrell i sur., 2012). Takvom djelovanju dopamina na kognitivnu funkciju mogli bi posredovati različiti učinci njegovog vezanja na receptore D_1 i D_2. U teoriji, djelovanje dopamina putem D_2 receptora upućuje na prisutnost važne informacije, često temeljene na nagradi, i omogućuje odgovor neuronske mreže PFC-a ažuriranjem sustava radnog pamćenja (Weinberger i sur., 2001). S druge strane, stimulacijom receptora D_1 kontrolira se najveća granica od značaja koju informacija mora prijeći kako bi se uopće propustila u radno pamćenje i obradila u PFC-u (Weinberger i sur., 2001). Kada se poremeti omjer vezanja dopamina na receptor D_1, odnosno D_2, kognitivna će se funkcija poremetiti na jedan od dva načina. Nedostatak signalizacije putem receptora D_1 (hipodopaminergičko stanje) vodi do poremećaja kognitivnih funkcija kao što su planiranje i radno pamćenje, a u težim slučajevima može dovesti i do deluzija, paranoje i neurokognitivne disfunkcije karakteristične za shizofreniju (Winterer i Weinberger, 2004). Pojačana signalizacija putem receptora D_1 (hiperdopaminergičko stanje) može dovesti do toga da

su funkcije PFC-a održane, ali se ne ažuriraju učinkovito. U ekstremnim slučajevima to može dovesti do ustrajnih ili stereotipnih ponašanja (Weinberger i sur., 2001) i smanjene učinkovitosti u obavljanju zadaća koje zahtijevaju kognitivnu fleksibilnost (Cools i Robbins, 2004). Obzirom na ravnotežu koju moraju održavati kako bi postigli optimalnu kognitivnu funkciju, regulatori aktivnosti dopamina u PFC-u čine odlične kandidate koji utječu na različitosti u kogniciji između pojedinaca (Savitz i sur., 2006).

Zbog velike važnosti kontrole razine dopamina u PFC-u koju obavlja, enzim COMT jest jedan od odličnih kandidata koji imaju ulogu u podešavanju funkcije PFC-a te zbog toga utječu na kogniciju (Tunbridge i sur., 2006). Funkcionalni polimorfizam u genu *COMT*, $Val^{108/158}Met$, ima snažan utjecaj na razinu dopamina u PFC-u. Alel Val povezuje se s većom enzimatskom aktivnošću, a time i s bržom razgradnjom dopamina. Iako je slabo povezan s rizikom od shizofrenije, može pomoći u razumijevanju veze između razine dopamina u PFC-u i kognitivne funkcije (Lopez-Garcia i sur., 2013). Mnoga su istraživanja otkrila poveznice između genotipa gena *COMT* i kognicije kod pacijenata sa shizofrenijom i njihovih obitelji, gdje su homozigoti za alel Met (Met/Met) pokazali bolji učinak od homozigota za alel Val (Val/Val) u testovima kojima se procjenjuju kognitivne funkcije ovisne o PFC-u (Bosia i sur., 2015). Genotipovi Val/Val, Val/Met i Met/Met gena *COMT* povezuju se s aktivnošću PFC-a, koja je određena korištenjem funkcionalne magnetske rezonance tijekom radnog pamćenja. Homozigoti za Val/Val pokazali su veću aktivaciju dorzolateralnog PFC-a i cingulatne kore u odnosu na homozigote Met/Met. Heterozigoti su pokazali srednju razinu aktivnosti (Egan i sur., 2001). Homozigoti Val/Val, prema tom istraživanju, koriste svoj PFC relativno manje učinkovito, odnosno, treba im jača prefrontalna aktivacija za isti učinak u odnosu na homozigote Met/Met. Visoka aktivnost COMT-a, koja je prisutna kod homozigota Val/Val, vodi do slabijeg učinka i nedostatne prefrontalne funkcije jer ti pojedinci imaju nižu razinu dopamina u PFC-u (Tunbridge i sur., 2006). Homozigoti za alel Met, čini se, imaju optimalnu dostupnost dopamina i nalaze se na vrhu krivulje u obliku obrnutog slova U koja prikazuje vezu dopamina s kognitivnom funkcijom (Green i sur, 2013). Točan učinak aktivnosti enzima COMT na funkciju PFC-a i kogniciju ovisi o nizu čimbenika, kao što su okolišni, genetički, dob ispitanika, mentalni status osobe te izloženost stresu. Istraživanja o interakciji između enzima COMT i drugih čimbenika koji bi mogli utjecati na funkciju PFC-a nisu potpuna (Tunbridge i sur., 2006). Pokazano je da kalorijska restrikcija pospješuje pamćenje u zdravih starijih ispitanika (Witte i sur., 2009) te da

kognitivni odgovor na kalorijsku restrikciju ovisi o genotipu Val$^{108/158}$Met gena *COMT*. Homozigoti Val/Val imali su značajno niže rezultate od homozigota Met/Met i heterozigota, a poboljšanje kognitivne funkcije bilo je značajno veće kod homozigota Val/Val u odnosu na nositelje alela Met nakon kalorijske restrikcije (Witte i sur., 2010). Čini se da bi varijacije u genima koji djeluju aditivno ili modificiraju funkciju enzima COMT mogle biti poveznica između genotipa Val$^{108/158}$Met gena *COMT* i dijela fenotipske varijabilnosti. Jedan od takvih gena je *MTHFR*, gen za metilentetrahidrofolat reduktazu, enzim koji je važan za nastanak SAM-a. Pokazano je da polimorfizam gena *MTHFR* u kombinaciji sa slabom aktivnošću enzima COMT (Met/Met) i stresom dovodi do pojačanih psihotičkih simptoma u pacijenata sa psihozom (Peerbooms i sur., 2012). Također, pokazan je aditivni učinak polimorfizma gena *COMT* i gena *STH* (gen u intronu 9 gena za ljudski protein tau) kod bolesnika sa shizofrenijom (Bosia i sur., 2015). Osim utjecaja drugih gena i njihovih polimorfizama na funkciju i aktivnost enzima COMT, moguće je da isti ili sličan utjecaj imaju i drugi polimorfizmi u istom tom genu. Postoje dodatni lokusi u genu *COMT* koji imaju utjecaj na funkciju enzima, a neovisni su o polimorfizmu Val$^{108/158}$Met. Ta činjenica upućuje na to da je veza između shizofrenije i enzima COMT kompleksnija od obične linearne veze između alela jednog lokusa i rizika za shizofreniju. Moguće je da određeni haplotipovi koji se povezuju s poremećajima u funkciji PFC-a mogu povećati rizik za shizofreniju, stoga se u budućim istraživanjima treba usredotočiti na moguće interakcije različitih lokusa, kako unutar gena *COMT*, tako i unutar drugih gena koji utječu na funkciju PFC-a (Tunbridge i sur., 2006).

1.3.4 Terapija

Iako su pozitivni simptomi najizraženiji i karakteristični za shizofreniju, mogu se uspješno liječiti antipsihoticima, za razliku od negativnih i kognitivnih simptoma (Simpson i sur., 2010). Glavno svojstvo tradicionalnih antipsihotika jest farmakološki antagonizam receptora sličnih D_2, ali neki pacijenti na njih ne reagiraju. S obzirom na hipotezu o manjku dopamina u PFC-u, kao uzroku negativnih simptoma shizofrenije, tradicionalni antipsihotici mogu čak i pogoršati simptome (Inoue i Nakata, 2001). Čini se da je za učinkovitost antipsihotika ključno optimalno zauzimanje dopaminskih receptora D_2, ali i otpuštanje s njih nakon što lijek počne djelovati. Dakle, najbolje je da se antagonist na receptor veže privremeno, a ne trajno, jer trajni

antagonizam receptora D_2 povećava rizik za nuspojave (Horacek i sur., 2006). Novi antipsihotici imaju prednost pred tradicionalnim jer uzrokuju slabije ekstrapiramidalne nuspojave (Rosencheck i sur., 1997; Simpson i Lindenmayer, 1997), smanjuju rizik za diskineziju (Lieberman i sur., 1994; Chouinard, 1995) te imaju bolji učinak na negativne i pozitivne simptome (Kane i sur., 1988; Marder i Meibach, 1994; Beasley i sur., 1996), a možda i na kognitivnu funkciju (Harvey i Keefe, 2001). U potrazi za antipsihoticima koji su učinkoviti protiv pozitivnih i negativnih simptoma, a koji uzrokuju manje nuspojava, poduzeti su sljedeći koraci: pronađeno je najmanje pet različitih podtipova dopaminskih receptora, istražuje se uključenost drugih neurotransmiterskih sustava (glutamatergični, kolinergički, serotonergički, peptidergički i GABAergički sustav) u patogenezu shizorenije te se istražuju i opisuju djelomični agonisti D_2 receptora sa srednjim do jakim afinitetom i neznatnim intrinzičnim učinkom (Inoue i Nakata, 2001). Djelomični agonizam znači da lijek svojim vezanjem na receptor blokira vezanje izvanstaničnih fiziološki aktivnih tvari, a istovremeno ima agonistički učinak na taj receptor. Dok je originalna klasifikacija antipsihotika odražavala njihovu kemijsku strukturu, klasifikacija novih (atipičnih) antipsihotika povezana je s njihovim farmakodinamičkim svojstvima i odražava njihove afinitete za specifične receptore. Neki od njih su antagonisti serotonina i dopamina (tj. imaju visoku specifičnost za serotoninske receptore 5-HT_{2A}, receptore D_2 i α_1-adrenergičke receptore), antagonisti receptora D_2/D_3 (lijekovi koji prvenstveno blokiraju D_2 i D_3 podtipove receptora sličnih D_2), a postoje i multi-aktivni antipsihotici koji ciljaju različite receptore (imaju afinitet za receptore 5-HT_{2A}, receptore D_2 i receptore drugih sustava – kolinergičkog, histaminergičkog, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} i dr.) (Horacek i sur., 2006). Uz to, istražuje se dodatna terapija adrenergičkim, kolinergičkim i glutamatergičkim agensima kod pacijenata sa shizofrenijom koji bi mogli pospješiti kognitivne funkcije neovisno o antipsihoticima (Harvey i Keefe, 2001). Klinička istraživanja dala su ograničene informacije za mnoge tvari koje bi mogle pospješiti kognitivnu funkciju, kao što su agonisti dopaminskih receptora, inhibitori enzima COMT, agonisti GABA receptora, nikotinskih receptora za acetilkolin, receptora za serotonin, oksitocin i drugih. Problem u istraživanjima predstavlja doziranje jer ono ovisi o nekoliko varijabli. Većina ovih tvari ima krivulju u obliku obrnutog slova U koja prikazuje ovisnost odgovora o dozi, a istraživanja o inhibitorima enzima COMT najbolje pokazuju značaj tog fenomena. Inhibitori enzima COMT povećavaju izvanstaničnu razinu dopamina u PFC-u što pospješuje kognitivnu funkciju kada je osnovna razina dopamina niska (homozigoti Val/Val i

druga stanja zbog kojih je razina dopamina u PFC-u niska), a pogoršavaju je kad je osnovna razina dopamina visoka (homozigoti Met/Met) (Millan i sur., 2012). Iz tih razloga, COMT bi mogao biti važan u terapiji shizofrenije u smislu farmakogenetičkih istraživanja i kao izravna meta lijeka kojim bi se liječila kognitivna disfunkcija (Tunbridge i sur., 2006). Danas se istraživanja kreću u svim smjerovima te se istražuju i drugi neurotransmiterski sustavi. Primjerice, istražuju se lijekovi koji djeluju na receptore glutamata (analozi aminokiselina) te lijekovi koji djeluju na oksidazu D-aminokiselina (promjena metabolizma D-serina) (Sacchi i sur., 2013.). Uz terapiju lijekovima postaje sve jasnije da je i psihološka intervencija važan dio terapeutskog pristupa (Pilling i sur., 2002.).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Zbog nedostatka pouzdanih podataka u literaturi, cilj ovog diplomskog rada je istražiti postoji li povezanost polimorfizma rs4680 (Val$^{108/158}$Met) gena *COMT* i kognitivnih sposobnosti kod osoba oboljelih od shizofrenije. Po prvi put se namjerava istražiti i uloga druga dva polimorfizma gena *COMT* (rs4818, rs4633) u kognitivnim simptomima kod bolesnika sa shizofrenijom, s pretpostavkom da bi se navedeni polimorfizmi mogli nalaziti u istom LD bloku s polimorfizmom rs4680.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U istraživanje je uključen 501 bolesnik sa shizofrenijom, od toga 274 muškarca i 227 žena. Bolesnici su liječeni u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče u Zagrebu ili u Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb te im je postavljena dijagnoza shizofrenije prema kriterijima navedenima u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 4. izdanje (DSM-IV). Bolesnici u dobi 17-78 godina zadovoljavali su kriterije za shizofreniju prema DSM-IV kriterijima i kriterijima koje propisuje 10. revizija Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB-10). Dijagnoza je postavljena nakon dijagnostičkog kliničkog intervjua.

Uzorci krvi kod svih ispitanika uključenih u istraživanje uzeti su prije uspostavljanja odgovarajuće terapije te je tada napravljena klinička procjena težine simptoma ljestvicom pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji (PANSS, eng. *Positive and negative syndrome scale for schizophrenia*). PANSS ljestvica je u širokoj primjeni u istraživanjima bolesnika sa shizofrenijom. Sastoji se od 30 čestica koje se boduju vrijednostima od 1 do 7 (1=odsutsvo simptoma, 2=minimalni simptomi, 3=blagi simptomi, 4=umjereni simptomi, 5=umjereni do ozbiljni simptomi, 6=ozbiljni simptomi, 7=ekstremni simptomi). Podijeljena je u 3 podljestvice: pozitivni simptomi (7 čestica), negativni simptomi (7 čestica) i opća psihopatologija (16 čestica). 9 čestica (P2, N5, N7, G7, G10, G11, G12, G14, G15) povezano je s kognitivnom funkcijom i korelira s postavljenim neuropsihološkim mjerama te čini kognitivnu domenu (PANSS-COGN) (Tuinier i sur., 2008.).

U ovom su istraživanju ispitanici dodatno podijeljeni s obzirom na ozbiljnost simptoma na ispitanike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) za što je korištena granična, tj. lomna vrijednost od 36 bodova. Budući da u literaturi ne postoji zadana lomna vrijednost s obzirom na podljestvicu PANSS-COGN, podjela je nastala vođena kriterijima da bi na svakoj od 9 čestica podljestvice PANSS-COGN prosječan broj bodova trebao iznositi 4 ili više.

3.2 Izolacija DNA iz krvi metodom isoljavanja

Kemikalije:

- pufer za lizu eritrocita (RCLB pufer, eng. *red cell lysis buffer*): 10 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl (pH 7,6)
- SE pufer (sodium EDTA): 75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA (pH 8)
- 5 M NaCl
- proteinaza K (TaKaRa, 20 mg/ml)
- SDS 10% (sodium dodecil sulfat)
- etanol 70%
- izopropanol
- 1xTE pufer (Tris-EDTA): 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7,6)

Nakon što se uzorci krvi odmrznu, miješaju se na valjkastoj miješalici (roleru) 15 min kako bi se homogenizirali. Zatim se 300 µl krvi doda u Eppendorf epruvete od 1,5 ml te 900 µl hladnog RCLB pufera. Uzorci se dobro promiješaju na vorteks miješalici (15-20 s) i zatim se ostave 10 min na ledu kako bi se lizirali eritrociti. Nakon toga slijedi postupak centrifugiranja (13400 g, 2 min, 4 ºC) pri čemu lizirani eritrociti ostanu u supernatantu, a netaknuti leukociti se istalože. Supernatant se izvuče pipetom i baci, a talog ostaje i pročišćava se u 900 µl RCLB pufera i centrifugiranjem još tri puta. Potom se na čisti talog dodaje 300 µl SE pufera i dobro promiješa na vorteks miješalici, 1,5 µl proteinaze K te 30 µl 10%-tnog SDS-a. Eppendorf epruvete se lagano okrenu par puta rukom kako bi se sadržaj dobro izmiješao. Slijedi inkubacija u termobloku na 56 °C, 1,5-2h uz miješanje (500 rpm) pri čemu se leukociti liziraju. Nakon inkubacije i nakon što se uzorci ohlade na sobnu temperaturu, doda se 250 µl 5 M NaCl-a te se kratko miješa vorteks miješalicom. Slijedi centrifugiranje (13 400 g, 5 min, 4 °C) kojim DNA ostaje u supernatantu, a ostali stanični dijelovi ostaju u talogu. Supernatant se prelije u nove označene Eppendorf epruvete te mu se doda 800 µl hladnog izopropanola. Čim se doda izopropanol, Eppendorf epruvete se zatvore te se okrenu par puta, dok se ne pojavi precipitat DNA. Slijedi centrifugiranje (12 000 g, 2 min, 4 ºC) kako bi se DNA istaložila. Supernatant se odlije te se na talog doda 250 µl 75%-tnog etanola. Nakon centrifugiranja (12 000 g, 2 min), supernatant se odlije, Eppendorf epruvete se ocijede na papiru i ostave 15-30 min otvorene u

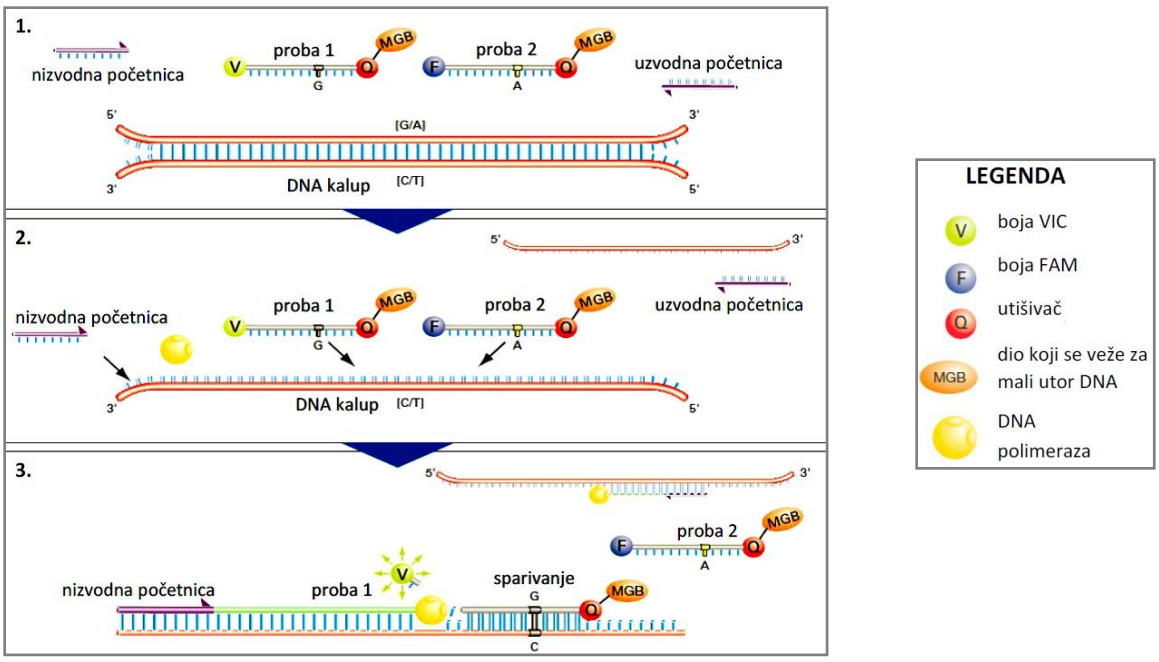
termobloku na 37 ºC. Na talog se doda 100 µl TE pufera (pH 8,0) te se ostavi oko sat vremena na 37 ºC ili na sobnoj temperaturi preko noći kako bi se DNA otopila. DNA se pohrani na 4 ºC.

3.3 Određivanje genotipa s obzirom na polimorfizam gena *COMT*

Genotipovi ispitanika s obzirom na polimorfizme gena *COMT* (rs4680, rs4818, rs4633) određeni su metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) u stvarnom vremenu (Real-time PCR). Korišteni su komercijalno dostupni kompleti (ID: C_25746809_50, C_2538750_10, C_2538747_20) za određivanje SNP-ova tvrtke Applied Biosystems (SAD) i uređaja „ABI Prism 7300 Sequence Detection System“ istog proizvođača.

Real-time PCR modificirana je metoda klasične PCR reakcije pri kojoj uređaj prati nastanak novosintetizirane DNA kroz cikluse te se koristi za genotipizaciju DNA (Slika 8). Navedena metoda koristi se i za određivanje razine genske ekspresije gena od interesa.

U svrhu genotipizacije DNA, u reakcijsku smjesu dodaju se dvije fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. One hibridiziraju s komplementarnim polimorfnim mjestima na DNA. Na 5' kraju imaju vezanu fluorescentnu boju (VIC ili FAM) te se specifično vežu za slijed DNA koji sadrži promijenjenu bazu, a na 3' kraju probe nalazi se vezan utišivač fluorescencije. Utišivač sprječava fluorescenciju boje kad je proba hibridizirana na DNA. Prilikom umnažanja DNA, u fazi produljivanja početnica, DNA polimeraza svojom 5′→3′ egzonukleaznom aktivnošću uklanja probu s DNA čime se omogućava odvajanje fluorescentne boje od utišivača te dolazi do fluorescencije.



Slika 8. Shematski prikaz PCR-a u stvarnom vremenu (preuzeto od Applied Biosystems): 1. komponente reakcije i DNA kalup; 2. denaturacija kalupa DNA, vezanje proba i početnica; 3. umnažanje DNA i stvaranje fluorescencijskog signala.

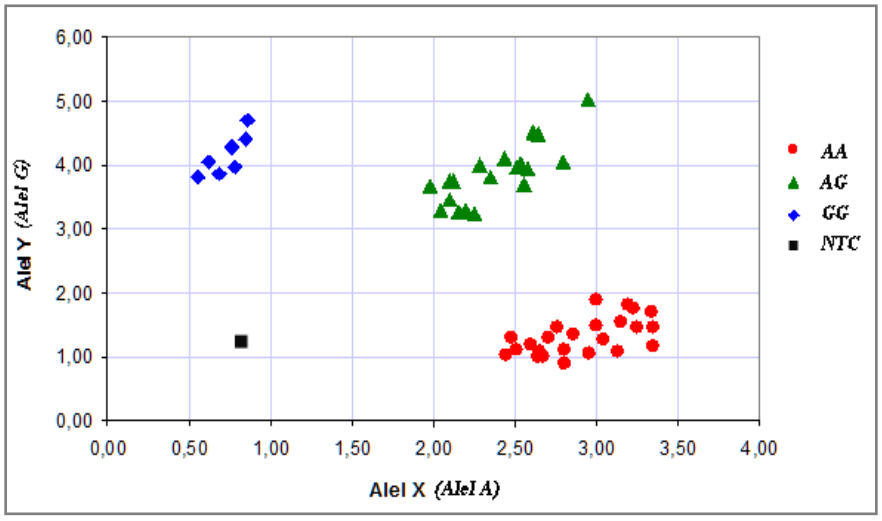
Uređaj fluorescenciju bilježi kao signal, a jačina i vrsta signala omogućuje određivanje genotipa za pojedini uzorak. Ako je zabilježena fluorescencija obje boje radi se o heterozigotnom genotipu, a ukoliko je prisutna fluorescencija jedne od dviju boja to upućuje na homozigotnost jednog alela. Računalni program daje ispis razine fluorescencije za svaku boju i grafički prikaz kao konačni prikaz rezultata. U ovom radu za genotipizaciju polimorfizama jedne baze gena *COMT* metodom PCR-a u stvarnom vremenu reakcije su postavljene u ukupnom volumenu od 10 µl prema Tablici 1 i prema uvjetima u Tablici 2. Primjer grafičkog prikaza dobiven pri genotipizaciji polimorfizama gena *COMT* prikazan je Slikom 9.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

SASTOJAK	VOLUMEN
TaqMan univerzalna matična mješavina	5 µl
TaqMan mješavina neoznačenih početnica i bojom označenih proba (VIC i FAM)	0,5 µl
genomska DNA (1-20 ng) otopljena u vodi	4,5 µl

Tablica 2. Uvjeti reakcije za genotipizaciju metodom PCR-a u stvarnom vremenu.

KORAK	TEMPERATURA	VRIJEME
početni koraci	95 °C	10 min
denaturacija	92 °C	15 s
vezanje i produljenje početnica	60 °C	90 s
broj ciklusa	50	



Slika 9. Primjer rezultata genotipizacije metodom Real-time PCR s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*.

3.4 Statistička obrada podataka

Za usporedbu vrijednosti različitih istraživanih parametara korišteni su parametrijski testovi s obzirom na to da su svi podaci imali normalnu razdiobu, što je utvrđeno Kolmogorov-Smirnovim testom. U slučaju usporedbe između dvije skupine korišten je Studentov t-test, a u slučaju usporedbe više skupina jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) nakon koje je po potrebi napravljen Tukeyjev test višestruke usporedbe. Za analize u kojima je bilo potrebno provjeriti utjecaj većeg broja nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu korištena je metoda višestruke linearne regresije.

U slučaju kategoričkih podataka, kao što su frekvencije genotipova i alela, distribucija između pojedinih skupina uspoređena je χ^2-testom koji se također koristio za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Kako bi se provjerilo koji od genotipova najviše doprinosi statističkoj značajnosti, izračunati su standardizirani reziduali i vrijednosti R.

S obzirom na to da se svi navedeni polimorfizmi nalaze unutar istog gena i s obzirom da u literaturi postoje naznake da navedeni SNP u genomu nisu potpuno nezavisni, već između njih postoji neravnoteža udruživanja (LD), korišten je program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) koji za određivanje LD-a koristi standardizirani koeficijent D'. Procjena parova haplotipova za svakog pojedinog ispitanika napravljen je pomoću programa PHASE, verzija 2.1.1 (University of Washington, SAD).

Sve statističke analize napravljene su pomoću statističkog programa Sigma Stat 3,5 (Jandell Scientific Corp., SAD). Razina značajnosti α za sve analize postavljena je na 0,05, a svi korišteni testovi su dvosmjerni.

4 REZULTATI

4.1 Demografski podaci

U istraživanje je bio uključen 501 bolesnik sa shizofrenijom, od toga 274 muškarca i 227 žena. Kako bi se isključio potencijalni učinak spola, provjereno je postoji li razlika u distribuciji genotipova za svaki od istraživanih polimorfizama između muških i ženskih bolesnika. Usporedbe frekvencije genotipova za svaki istraživani polimorfizam pokazale su da nema statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između muških i ženskih bolesnika sa shizofrenijom s obzirom na polimorfizam rs4680 (χ^2=5,66; DF=2; P=0,059), polimorfizam rs4633 (χ^2=0,65; DF=2; P=0,722) te polimorfizam rs4818 (χ^2=0,53; DF=2; P=0,769).

Za svaki od navedenih polimorfizama provjereno je postoji li odstupanje raspodjele genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE). U slučaju polimorfizma rs4633 (χ^2=3,10; DF=1; P=0,078) i polimorfizma rs4818 (χ^2=0,91; DF=1; P=0,340) nije bilo značajnog odstupanja od HWE. Kod polimorfizma rs4680 uočeno je odstupanje od HWE (χ^2=4,28; DF=1; P=0,039).

Svi klinički i demografski parametri prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Bolesnici uključeni u istraživanje bili su u dobi između 17 i 78 godina (37,4±11,8), medijan iznosi 36, a interkvartilni raspon 29-46. Na PANSS ljestvici bolesnici su skupili ukupno 73-172 boda (108,4±17,2), a na podljestvici PANSS-COGN 19-57 bodova (31,6±5,7). Dob, broj bodova skupljenih na PANSS ljestvici te broj bodova skupljenih na PANSS-COGN podljestvici ovisno o spolu prikazuje Tablica 3. Rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u dobi (P<0,001), ukupnom broju bodova na ljestvici PANSS (P=0,008) te u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN (P<0,001) s obzirom na spol. Zbog navedenog, spol je uključen kao varijabla u sve daljnje statističke analize, unatoč tome što nije bilo utjecaja samog spola na raspodjelu genotipova s obzirom na istraživane polimorfizme.

Tablica 3. Demografski podaci ispitanika podijeljenih prema spolu

	Muškarci		Žene	
	Srednja vrijednost	**SD**	**Srednja vrijednost**	**SD**
Dob	36,1	11,3	40,3	12,4
	Studentov t-test: t=2,67; DF=256; **P=0,008**			
PANSS - UK	111,9	17,7	104,1	15,6
	Studentov t-test: t=-5,19; DF=499; **P<0,001**			
PANSS - COGN	32,7	5,8	30,2	5,3
	Studentov t-test: t=-4,93; DF=499; **P<0,001**			

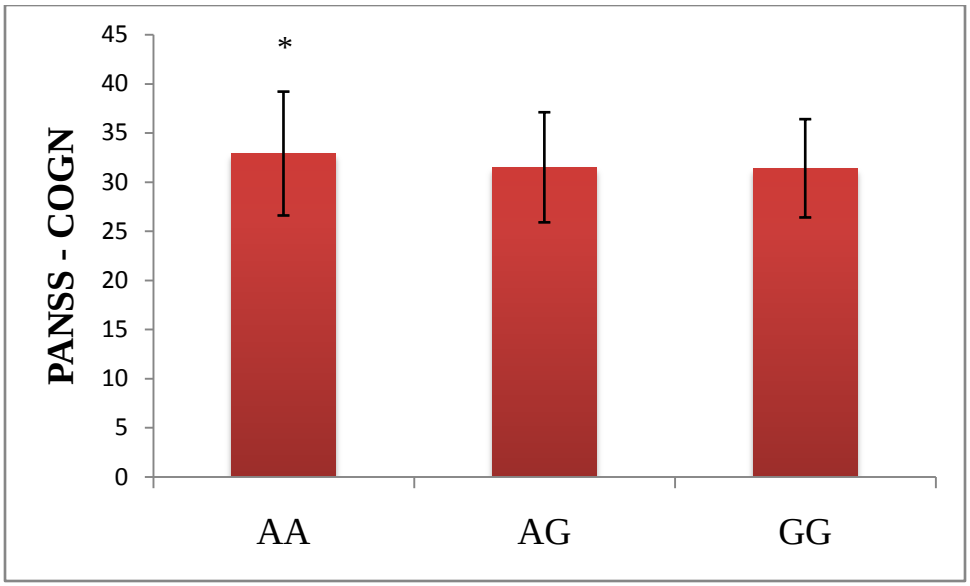
SD, standardna devijacija; PANSS-UK, ukupan broj bodova na ljestvici pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji; PANSS-COGN, broj bodova na kognitivnoj domeni PANSS-a

4.2 Povezanost polimorfizama gena *COMT* s kognitivnim sposobnostima

Za svaki polimorfizam napravljeni su testovi kojima se ispituje postoji li razlika između pojedinog genotipa i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno i ovisno o spolu. Svi bolesnici su također podijeljeni s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na ispitanike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i ispitanike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) te je provjereno postoji li povezanost postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN s genotipom, odnosno pojedinim alelom neovisno i ovisno o spolu.

4.2.1 Polimorfizam rs4680

Rezultati ANOVA-e pokazuju da postoji značajna razlika (P=0,043) u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika sa shizofrenijom podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* (Slika 10). Razlika proizlazi iz značajnije većeg broja bodova na podljestvici PANSS-COGN kod homozigota AA (Met/Met) u odnosu na ostale bolesnike, a posebice u odnosu na bolesnike koji su heterozigoti s obzirom na ispitivani polimorfizam.



Slika 10. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4680 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno o spolu (F=3,16; DF=2,460; P=0,043; ANOVA). PANSS-COGN, broj bodova na kognitivnoj domeni ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

*p<0,05 vs heterozigoti AG (Tukeyev post-hoc test)

Kako bi se dodatno potvrdila razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT*, napravljena je usporedba broja bodova na podljestvici PANSS-COGN između homozigota AA (Met/Met) i nosioca alela G (Val). Usporedba je potvrdila značajno veći broj bodova na podljestvici PANSS-COGN kod homozigota AA (Met/Met; t=2,51; DF=461; P=0,012; Studentov t-test).

Kada su bolesnici podijeljeni s obzirom na spol, gubi se statistički značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika sa shizofrenijom podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* (Tablica 4).

Tablica 4. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4680 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN nakon podjele bolesnika po spolu.

	Muškarci		Žene	
	Srednja vrijednost	**SD**	**Srednja vrijednost**	**SD**
AA	34,2	6,2	30,1	5,5
AG	32,9	5,3	29,7	4,4
GG	33,4	5,2	31,0	6,0
ANOVA	F=1,19; DF=2,236; P=0,307		F=0,92; DF=2,221; P=0,399	

SD, standardna devijacija

Kada su svi bolesnici podijeljeni s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36), vidljiva je značajna razlika u distribuciji genotipova (P=0,007) i alela (P=0,021) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* između ispitivanih skupina prije podjele po spolu (Tablica 5). Nakon podjele bolesnika po spolu, značajna razlika u distribuciji genotipova vidljiva je kod ženskih bolesnica (P=0,040), a u slučaju raspodjele alela vidljiv je sličan trend (P=0,064). Statistički značajna razlika posljedica je značajno većeg udjela homozigota AA (Met/Met; R=2,26) u skupini bolesnika s ozbiljnijim kognitivnim simptomima te zbog značajno većeg udjela homozigota AA (Met/Met; R=2,03) u skupini bolesnica s ozbiljnijim kognitivnim simptomima.

Tablica 5. Distribucija genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4680 između bolesnika s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnika s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

	PANSS-COGN	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)	A N (%)	G N (%)
Svi	**<36**	87 (25,3)	166 (48,2)	91 (26,5)	340 (49,4)	348 (50,6)
	≥36	48 (40,4)	43 (36,1)	28 (23,5)	139 (58,6)	99 (41,6)
		χ^2=10,04; DF=2; P=0,007			χ^2=5,36; DF=1; P=0,021	
Muškarci	**<36**	47 (30,5)	72 (46,7)	35 (22,7)	166 (53,9)	142 (46,1)
	≥36	34 (40,0)	31 (36,5)	20 (23,5)	99 (58,2)	71 (41,8)
		χ^2=2,81; DF=2; P=0,245			χ^2=0,67; DF=1; P=0,414	
Žene	**<36**	40 (21,0)	94 (49,5)	56 (29,5)	174 (45,8)	206 (54,2)
	≥36	14 (41,2)	12 (35,3)	8 (23,5)	40 (58,8)	28 (41,2)
		χ^2=4,43; DF=2; P=0,040			χ^2=3,422; DF=1; P=0,064	

PANSS-COGN, broj bodova na kognitivnoj domeni ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

Kako bi se dodatno potvrdila razlika u distribuciji genotipova između bolesnika podijeljenih s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima, napravljena je usporedba udjela homozigota AA (Met/Met) u odnosu na nosioce alela G (Val). Usporedba je potvrdila da postoji statistički značajna razlika u raspodjeli homozigota AA (Met/Met) i nosioca alela G (Val) između ispitivanih skupina prije podjele po spolu (χ^2=8,98; DF=1; P=0,003). Kod ženskih bolesnica postoji značajna razlika u raspodjeli homozigota AA (Met/Met) i nosioca alela G (Val) (χ^2=5,33; DF=1; P=0,021), dok kod muških bolesnika nije pronađena razlika u udjelu homozigota AA (Met/Met) u odnosu na nosioce alela G (Val) između skupine ispitanika s blagim i one s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (χ^2=1,79; DF=1; P=0,180).

Kako bi se provjerio utjecaj polimorfizma rs4680 na pojedine simptome unutar podljestvice PANSS-COGN, korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za navedenu analizu svi su bolesnici podijeljeni prema genotipu s obzirom na istraživani polimorfizam (nezavisna

varijabla), a model je korigiran za utjecaj spola. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je broj bodova na pojedinim domenama podljestvice PANSS-COGN (Tablica 6).

Tablica 6. Utjecaj polimorfizma rs4680 gena *COMT* na broj bodova na pojedinim česticama podljestvice PANSS-COGN.

Čestice PANSS-COGN	Polimorfizam rs4680			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	**t**	**p**	**Korigirani R^2**	**F**	**p**
P2: Konceptualna dezorganizacija	-0,006	-1,07	0,284	0,016	4,78	0,009
N5: Apstraktno razmišljanje	-0,010	-2,14	**0,033**	0,033	8,94	<0,001
N7: Stereotipno razmišljanje	-0,001	-0,27	0,785	0,018	5,15	0,006
G7: Motorička retardacija	-0,006	-0,98	0,330	0,000	1,03	0,358
G10: Dezorijentacija	0,004	0,65	0,516	0,022	6,23	0,002
G11: Slaba pažnja	-0,003	-0,68	0,497	0,015	4,56	0,011
G12: Nedostatak kritičnosti (procjene) i uvida	-0,004	-0,75	0,452	0,091	24,08	<0,001
G14: Slaba kontrola nagona	0,006	0,95	0,341	0,077	20,25	<0,001
G15: Zainteresiranost	-0,004	-0,68	0,494	0,032	8,62	<0,001

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola.
PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

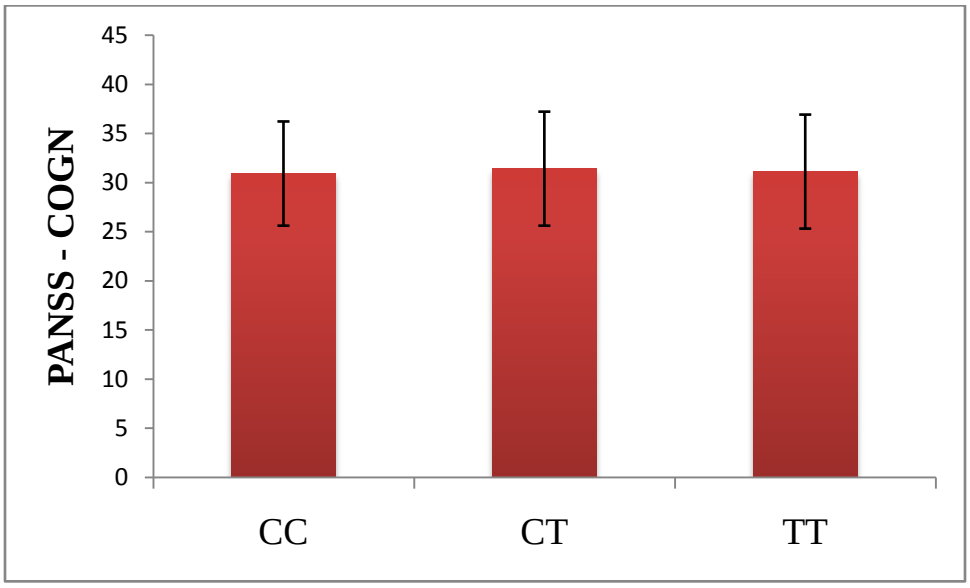
Tablica 6 prikazuje rezultate višestruke linearne regresije, odnosno, prikazuje rezultate za ukupni model, koji je korigiran za utjecaj spola, te zasebno prikazuje rezultat za istraživani polimorfizam rs4680. Pojedini modeli su značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog polimorfizma na broj bodova na česticama podljestvice PANSS-COGN, već zbog značajnog utjecaja spola.

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju polimorfizma rs4680 gena *COMT* pokazuju da postoji značajna (P=0,033) razlika u broju bodova koji se odnose na sposobnost apstraktnog razmišljanja (N5) između bolesnika podijeljenih na homozigote AA (Met/Met), homozigote GG

(Val/Val) i heterozigote AG (Met/Val), nakon korekcije za spol (Tablica 6). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 3,3% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni N5.

4.2.2 Polimorfizam rs4633

Rezultati ANOVA-e pokazuju da nema značajne razlike (P=0,816) u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika sa shizofrenijom podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4633 gena *COMT* (Slika 11), a isti trend je vidljiv i nakon podjele bolesnika po spolu (Tablica 7).



Slika 11. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4633 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno o spolu (F=0,20; DF=2,304; P=0,816; ANOVA).

Među bolesnicima nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs4633 niti nakon podjele s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) (Tablica 8).

Tablica 7. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4633 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN nakon podjele bolesnika po spolu.

	Muškarci		Žene	
	Srednja vrijednost	**SD**	**Srednja vrijednost**	**SD**
CC	32,2	5,7	29,3	4,3
CT	31,9	5,7	30,8	5,9
TT	32,0	6,2	29,8	5,1
ANOVA	F=0,03; DF=2,168; P=0,968		F=1,02; DF=2,133; P=0,363	

SD, standardna devijacija

Tablica 8. Distribucija genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4633 između bolesnika s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnika s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

	PANSS-COGN	**CC N (%)**	**CT N (%)**	**TT N (%)**	**C N (%)**	**T N (%)**
Svi	**<36**	64 (26,4)	109 (45,0)	69 (28,5)	237 (49,0)	247 (51,0)
	≥36	17 (26,1)	29 (44,6)	19 (29,2)	63 (48,5)	67 (51,5)
		χ^2=0,01; DF=2; P=0,993			χ^2<0,001; DF=1; P=0,997	
Muškarci	**<36**	32 (25,6)	54 (43,2)	39 (31,2)	118 (47,2)	132 (52,8)
	≥36	13 (28,3)	20 (43,5)	13 (28,3)	46 (50,0)	46 (50,0)
		χ^2=0,19; DF=2; P=0,910			χ^2=0,11; DF=1; P=0,736	
Žene	**<36**	32 (27,4)	55 (47,0)	30 (25,6)	119 (50,9)	115 (49,1)
	≥36	4 (21,0)	9 (47,4)	6 (13,5)	17 (44,7)	21 (55,3)
		χ^2=0,46; DF=2; P=0,793			χ^2=0,27; DF=1; P=0,600	

PANSS-COGN, broj bodova na kognitivnoj domeni ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

Kako bi se provjerio utjecaj polimorfizma rs4633 na pojedine simptome unutar podljestvice PANSS-COGN, korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za navedenu analizu svi bolesnici su podijeljeni prema genotipu s obzirom na istraživani polimorfizam (nezavisna varijabla), a model je korigiran za utjecaj spola. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je broj bodova na pojedinim domenama podljestvice PANSS-COGN (Tablica 9).

Tablica 9. Utjecaj polimorfizma rs4633 gena *COMT* na broj bodova na pojedinim česticama podljestvice PANSS-COGN.

Čestice PANSS-COGN	Polimorfizam rs4633			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	**t**	**p**	**Korigirani R^2**	**F**	**p**
P2: Konceptualna dezorganizacija	-0,005	-0,828	0,408	-0,002	0,65	0,521
N5: Apstraktno razmišljanje	0,009	1,80	0,072	0,017	3,66	0,027
N7: Stereotipno razmišljanje	-0,004	-0,59	0,553	-0,005	0,27	0,761
G7: Motorička retardacija	0,009	1,34	0,181	-0,000	0,98	0,378
G10: Dezorijentacija	0,002	0,29	0,771	0,008	2,23	0,109
G11: Slaba pažnja	0,000	0,03	0,976	0,006	1,86	0,157
G12: Nedostatak kritičnosti (procjene) i uvida	-0,008	-1,26	0,209	0,041	7,47	0,001
G14: Slaba kontrola nagona	-0,012	-1,69	0,092	0,029	5,58	0,004
G15: Zainteresiranost	-0,000	-0,02	0,981	0,010	2,58	0,077

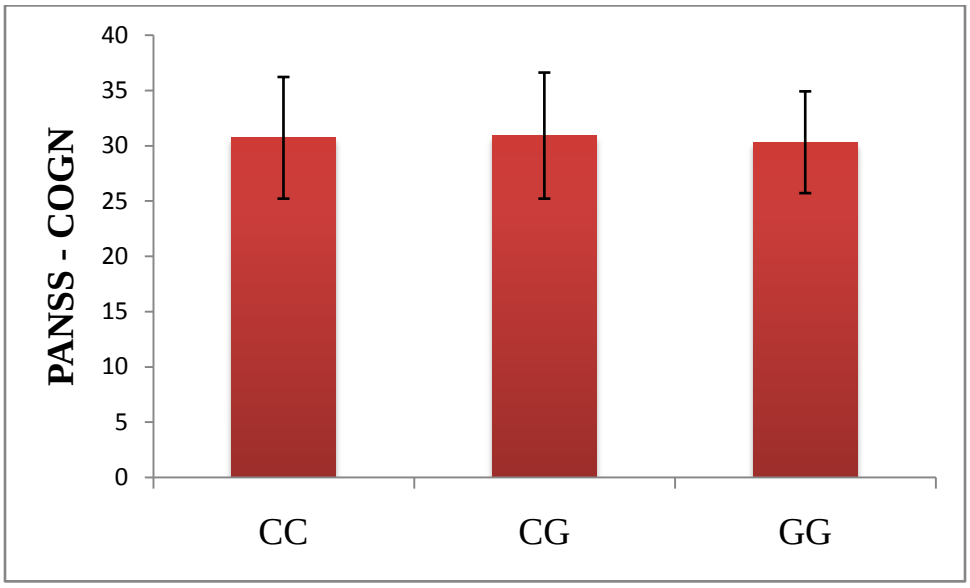
Svi modeli višestruke linearne regresije korigirani su za utjecaj spola.
PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

Tablica 9 prikazuje rezultate višestruke linearne regresije, odnosno, prikazuje rezultate za ukupni model, koji je korigiran za utjecaj spola, te zasebno prikazuje rezultat za istraživani polimorfizam rs4633. Pojedini modeli su značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog polimorfizma na broj bodova na česticama podljestvice PANSS-COGN, već zbog značajnog utjecaja spola.

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju polimorfizma rs4633 gena *COMT* pokazuju da postoji sličan, ali ne značajan, trend kao u slučaju polimorfizma rs4680, a koji upućuje na potencijalni utjecaj polimorfizma rs4633 na sposobnost apstraktnog razmišljanja (N5) kod bolesnika sa shizofrenijom (Tablica 9).

4.2.3 Polimorfizam rs4818

U slučaju polimorfizma rs4818 gena *COMT* rezultati ANOVA-e pokazuju da nema značajne razlike (P=0,792) u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika prije podjele po spolu (Slika 12), a isti trend je vidljiv i nakon podjele bolesnika po spolu (Tablica 10).



Slika 12. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4818 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno o spolu (F=0,23; DF=2,341; P=0,792; ANOVA) za polimorfizam rs4818.

Nakon podjele bolesnika s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36), također nisu pronađene značajne razlike u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs4818 između ispitivanih skupina bolesnika (Tablica 11).

Tablica 10. Povezanost genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4818 i postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN nakon podjele bolesnika po spolu.

	Muškarci		Žene	
	Srednja vrijednost	**SD**	**Srednja vrijednost**	**SD**
CC	31,8	6,0	29,5	4,7
CG	31,7	5,6	29,9	5,6
GG	31,8	4,5	28,9	4,4
ANOVA	F=0,01; DF=2,177; P=0,991		F=0,44; DF=2,161; P=0,645	

SD, standardna devijacija

Tablica 11. Distribucija genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4818 između bolesnika s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnika s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

	PANSS-COGN	**CC N (%)**	**CG N (%)**	**GG N (%)**	**C N (%)**	**G N (%)**
Svi	**<36**	106 (37,6)	127 (45,0)	49 (17,4)	339 (60,1)	225 (39,9)
	≥36	24 (38,7)	29 (46,8)	9 (14,5)	77 (62,1)	47 (37,9)
		χ^2=0,30; DF=2; P=0,862			χ^2=0,095; DF=1; P=0,757	
Muškarci	**<36**	51 (37,5)	64 (47,1)	21 (15,4)	166 (61,0)	106 (38,9)
	≥36	17 (38,6)	20 (45,5)	7 (15,9)	54 (61,4)	34 (38,6)
		χ^2=0,03; DF=2; P=0,956			χ^2=0,005; DF=1; P=0,944	
Žene	**<36**	55 (37,7)	63 (43,2)	28 (19,2)	173 (59,2)	119 (40,8)
	≥36	7 (38,9)	9 (50,0)	2 (0,1)	23 (63,9)	13 (36,1)
		χ^2=0,75; DF=2; P=0,689			χ^2=0,127; DF=1; P=0,722	

PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

Kako bi se provjerio utjecaj polimorfizma rs4818 na pojedine simptome unutar podljestvice PANSS-COGN, korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za navedenu analizu svi ispitanici su podijeljeni prema genotipu s obzirom na istraživani polimorfizam (nezavisna varijabla), a model je korigiran za utjecaj spola. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je broj bodova na pojedinim domenama podljestvice PANSS-COGN (Tablica 12).

Tablica 12. Utjecaj polimorfizma rs4818 gena *COMT* na broj bodova na pojedinim česticama podljestvice PANSS-COGN.

Čestice PANSS-COGN	Polimorfizam rs4818			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	**t**	**p**	**Korigirani R^2**	**F**	**p**
P2: Konceptualna dezorganizacija	-0,008	-0,573	0,567	-0,002	0,74	0,479
N5: Apstraktno razmišljanje	-0,026	-2,211	**0,028**	0,026	5,51	0,004
N7: Stereotipno razmišljanje	-0,015	-1,04	0,298	-0,000	0,93	0,397
G7: Motorička retardacija	-0,000	-0,02	0,980	-0,005	0,14	0,868
G10: Dezorijentacija	0,013	1,00	0,316	0,013	3,20	0,042
G11: Slaba pažnja	-0,013	-1,05	0,293	0,019	4,34	0,014
G12: Nedostatak kritičnosti (procjene) i uvida	0,006	0,37	0,711	0,061	12,18	<0,001
G14: Slaba kontrola nagona	0,014	0,91	0,365	0,029	6,20	0,002
G15: Zainteresiranost	-0,006	-0,40	0,692	0,014	3,43	0,034

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola.
PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

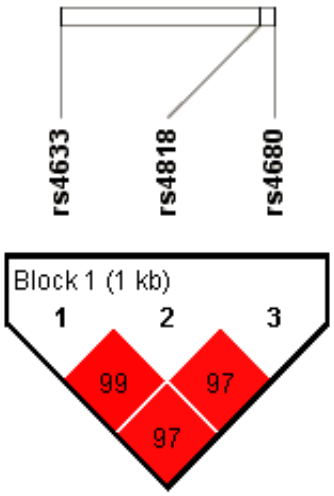
Tablica 12 prikazuje rezultate višestruke linearne regresije, odnosno, prikazuje rezultate za ukupni model, koji je korigiran za utjecaj spola, te zasebno prikazuje rezultat za istraživani polimorfizam rs4818. Pojedini modeli su značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog

polimorfizma na broj bodova na česticama podljestvice PANSS-COGN, već zbog značajnog utjecaja spola.

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju polimorfizma rs4818 gena *COMT* pokazuju da postoji značajna (P=0,028) razlika u broju bodova koji se odnose na sposobnost apstraktnog razmišljanja (N5) između bolesnika podijeljenih na homozigote CC, homozigote GG i heterozigote CG, nakon korekcije za spol (Tablica 12). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 2,6% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni N5.

4.3 Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena *COMT*

Kako bi se provjerilo jesu li istraživani polimorfizmi u LD-u, tj. postoje li određene kombinacije alela (haplotip) koje se češće zajedno nasljeđuju, korišten je program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD). Za određivanje, tj. prikaz LD-a korišten je standardizirani koeficijent D'. Vrijednosti D' iznad 0,80 označavaju da su dva istraživana polimorfizma u LD-u. Analiza programom Halpoview pokazuje da se sva 3 istraživana polimorfizama nalaze u LD-u (Slika 13).



Slika 13. Prikaz analize neravnoteže udruživanja između polimorfizama gena *COMT*.

Blokovi neravnoteže udruživanja (LD) označeni su trokutom. Vrijednosti u kvadratima predstavljaju vrijednosti LD-a (D' vrijednosti od 1,0 nisu prikazane) između parova polimorfizama, a pojedini kvadrati obojani su prema standardnoj Haploview shemi: crvena boja, LOD > 2 i D' = 1; nijanse ružičaste/crvene boje, LOD > 2 i D' < 1; plava boja, LOD < 2 i D' = 1; bijela boja, LOD < 2 i D' < 1 (LOD se odnosi na logaritamsku vrijednost omjera izgleda).

Analiza programom Haploview identificirala je 3 haplotipa u skupini bolesnika sa shizofrenijom:

1. TCA (frekvencija: 0,497),
2. CGG (frekvencija: 0,389),
3. CCG (frekvencija: 0,093).

Programom PHASE 2.1.1 (University of Washington, SAD) napravljena je procjena parova haplotipova za svakog pojedinog ispitanika i identificirana su 3 najčešća haplotipa, kao i programom Haploview, te još 5 dodatnih haplotipova:

1. CCA (frekvencija: 0,006)
2. CCG (frekvencija: 0,096)
3. CGA (frekvencija: 0,004)
4. CGG (frekvencija: 0,392)
5. TCA (frekvencija: 0,494)
6. TCG (frekvencija: 0,006)
7. TGA (frekvencija: 0,002)
8. TGG (frekvencija: 0,000)

U obzir su uzeti parovi haplotipova koji su procijenjeni sa sigurnošću većom od 95% (Tablica 13), a haplotipovi s frekvencijom manjom od 1% nisu uvršteni u daljnje statističke analize.

Tablica 13. Haplotipovi gena *COMT* koje su identificirali program PHASE 2.1.1 i Haploview s frekvencijom većom od 1%.

Oznaka haplotipa	SNP - Aleli		
	rs4633	**rs4818**	**rs4680**
H1	T	C	A
H2	C	G	G
H3	C	C	G

SNP, polimorfizam jedne baze.

4.3.1 Povezanost haplotipova gena *COMT* s kognitivnim simptomima

Za utvrđivanje mogućeg utjecaja haplotipova gena *COMT* na kognitivne simptome u shizofreniji, napravljen je Studentov t-test u kojem je uspoređen broj bodova na podljestvici PANSS-COGN između nosioca i ne-nosioca pojedinih haplotipova gena *COMT*. Test je proveden za svaki haplotip zasebno tako da su svi ispitanici podijeljeni na nosioce i ne-nosioce određenog haplotipa. Kako bi se provjerilo postoji li povezanost ozbiljnosti kognitivnih simptoma s različitim haplotipovima gena *COMT* (nezavisna varijabla) prije i nakon podjele prema spolu, korišten je χ^2-test. Za test su svi ispitanici podijeljeni na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i na bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36)

4.3.1.1 Haplotip H1

Rezultati Studentovog t-testa s obzirom na haplotip H1 gena *COMT* pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1 prije podjele prema spolu (P=0,919), ali ni nakon podjele po spolu (muškarci, P=0,675; žene, P=0,368) (Tablica 14).

Tablica 14. Utjecaj haplotipa H1 gena *COMT* na broj bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno i nakon podijele prema spolu.

		PANSS-COGN	
		Srednja vrijednost	**SD**
Svi zajedno	**Nosioci H1**	29,2	3,5
	Ostali	29,2	3,8
	t-test	t=0,10; DF=351; P=0,919	
Muškarci	**Nosioci H1**	29,6	3,7
	Ostali	29,9	3,7
	t-test	t=0,42; DF=173; P=0,675	
Žene	**Nosioci H1**	28,8	3,3
	Ostali	28,2	3,8
	t-test	t=0,90; DF=176; P=0,368	

SD, standardna devijacija; Ostali, ne-nosioci haplotipa H1

Kada su bolesnici podijeljeni s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36), nije utvrđena značajna razlika između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1 neovisno o spolu (P=0,871), ali niti nakon podjele prema spolu (muškarci, P=0,828; žene, P=0,522) (Tablica 15).

Tablica 15. Povezanost ozbiljnosti kognitivnih simptoma s haplotipom H1 gena *COMT*. Bolesnici su podijeljeni na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

		PANSS-COGN	
		<36	**≥36**
		N (%)	**N (%)**
Svi zajedno	**Nosioci H1**	208 (72,7)	50 (74,6)
	Ostali	78 (27,3)	17 (25,4)
	χ^2-test	χ^2=0,03; DF=1; P=0,871	
Muškarci	**Nosioci H1**	104 (75,4)	34 (72,3)
	Ostali	34 (24,6)	13 (27,7)
	χ^2-test	χ^2=0,05; DF=1; P=0,828	
Žene	**Nosioci H1**	104 (70,3)	16 (80,0)
	Ostali	44 (29,7)	4 (20,0)
	χ^2-test	χ^2=0,41; DF=1; P=0,522	

Ostali, ne-nosioci haplotipa H1; PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji.

4.3.1.2 Haplotip H2

Rezultati Studentovog t-testa s obzirom na haplotip H2 gena *COMT* pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između nosioca i ne-nosioca haplotipa H2 prije podjele prema spolu (P=0,397), ali niti nakon podjele po spolu (muškarci, P=0,326; žene, P=0,976) (Tablica 16).

Tablica 16. Utjecaj haplotipa H2 gena *COMT* na broj bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno i nakon podjele prema spolu.

		PANSS-COGN	
		Srednja vrijednost	**SD**
Svi zajedno	**Nosioci H2**	29,3	3,7
	Ostali	29,0	3,4
	t-test	t=-0,85; DF=351; P=0,397	
Muškarci	**Nosioci H2**	29,9	3,8
	Ostali	29,3	3,5
	t-test	t=-0,99; DF=173; P=0,326	
Žene	**Nosioci H2**	28,7	3,6
	Ostali	28,6	3,3
	t-test	t=-0,03; DF=176; P=0,976	

Ostali, ne-nosioci haplotipa H2; PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji; SD, standardna devijacija.

Među bolesnicima nije bilo značajne razlike između nosioca i ne-nosioca haplotipa H2 gena *COMT* niti nakon podjele s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) (Tablica 17).

Tablica 17. Povezanost ozbiljnosti kognitivnih simptoma s haplotipom H1 gena *COMT*. Bolesnici su podijeljeni na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

		PANSS-COGN	
		<36	**≥36**
		N (%)	**N (%)**
Svi zajedno	**Nosioci H2**	179 (62,6)	41 (61,2)
	Ostali	107 (37,4)	26 (38,8)
	χ^2-test	χ^2<0,01; DF=1; P=0,943	
Muškarci	**Nosioci H2**	86 (62,3)	29 (61,7)
	Ostali	52 (37,7)	18 (38,3)
	χ^2-test	χ^2=0,01; DF=1; P=0,921	
Žene	**Nosioci H2**	93 (62,8)	12 (60,0)
	Ostali	55 (37,2)	8 (40,0)
	χ^2-test	χ^2=0,00; DF=1; P=1,000	

Ostali, ne-nosioci haplotipa H2; PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji.

4.3.1.3 Haplotip H3

U slučaju haplotipa H3 gena *COMT* rezultati Studentovog t-testa pokazuju da nema značajne razlike (P=0,063) u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika prije podjele po spolu, ali je vidljiv trend većeg broja bodova tj. ozbiljnijih kognitivnih oštećenja kod osoba koje nisu nosioci haplotipa H3 gena *COMT* (Tablica 18). Nakon podjele prema spolu, kod muških je bolesnika vidljivo da je razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN na granici značajnosti (P=0,051) te je također vidljiv trend prema većem broju bodova, odnosno, ozbiljnijem kognitivnom oštećenju kod muškaraca koji nisu nosioci haplotipa H3. Kod ženskih bolesnica nema značajne razlike u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN s obzirom na istraživani haplotip (Tablica 18).

Tablica 18. Utjecaj haplotipa H3 gena *COMT* na broj bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno i nakon podjele prema spolu.

		PANSS-COGN	
		Srednja vrijednost	**SD**
Svi zajedno	**Nosioci H3**	28,4	3,7
	Ostali	29,3	3,5
	t-test	t=1,86; DF=351; P=0,063	
Muškarci	**Nosioci H3**	28,6	3,8
	Ostali	30,0	3,6
	t-test	t=1,97; DF=173; P=0,051	
Žene	**Nosioci H3**	28,3	3,6
	Ostali	28,7	3,4
	t-test	t=0,654; DF=176; P=0,514	

Ostali, ne-nosioci haplotipa H3; PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji; SD, standardna devijacija

Nakon podjele bolesnika s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) nisu utvrđene značajne razlike između osoba koje su nosioci haplotipa H3 i onih osoba koje to nisu (Tablica 19).

Tablica 19. Povezanost ozbiljnosti kognitivnih simptoma s haplotipom H3 gena *COMT*. Bolesnici su podijeljeni na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).

		PANSS-COGN	
		<36	**≥36**
		N (%)	**N (%)**
Svi zajedno	**Nosioci H3**	55 (19,2)	10 (14,9)
	Ostali	231 (80,8)	57 (85,1)
	χ^2-test	χ^2=0,41; DF=1; P=0,520	
Muškarci	**Nosioci H3**	19 (13,8)	8 (17,0)
	Ostali	119 (86,2)	39 (83,0)
	χ^2-test	χ^2=0,09; DF=1; P=0,759	
Žene	**Nosioci H3**	36 (24,3)	2 (10,0)
	Ostali	112 (75,7)	18 (90,0)
	χ^2-test	χ^2=1,33; DF=1; P=0,249	

Ostali, ne-nosioci haplotipa H3; PANSS-COGN, kognitivna domena ljestvice pozitivnih i negativnih simptoma u shizofreniji

4.3.2 Utjecaj haplotipova na česticu N5 podljestvice PANSS-COGN

Utjecaj haplotipova na česticu N5 (apstraktno razmišljanje) podljestvice PANSS-COGN istražen je metodom višestruke linearne regresije, a rezultate prikazuje Tablica 20. Čestica N5 je odabrana jer je samo ona bila značajno ili marginalno povezana sa pojedinim polimorfizmima. Tablica 20 prikazuje rezultate za ukupni model, koji je korigiran za utjecaj spola, te zasebno prikazuje rezultat za pojedine haplotipove gena *COMT* (nosioci pojedinih haplotipova gena COMT u odnosu na ostale kombinirane haplotipove). Pojedini modeli (za haplotip H1 i H3) su značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog polimorfizma na broj bodova na čestici N5 podljestvice PANSS-COGN, već zbog utjecaja spola.

Tablica 20. Utjecaj haplotipova gena *COMT* na broj bodova na domeni N5 podljestvice PANSS-COGN.

Haplotip	Utjecaj haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	**t**	**p**	**Korigirani R^2**	**F**	**p**
Nosioci H1	0,156	1,50	0,134	0,018	4,18	0,016
Nosioci H2	-0,201	-2,13	**0,034**	0,024	5,33	0,005
Nosioci H3	0,019	0,16	0,876	0,011	3,04	0,049

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola.

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju haplotipa H2 gena *COMT* pokazuju da postoji značajna (P=0,034) razlika u broju bodova koji se odnose na sposobnost apstraktnog razmišljanja (N5) između ispitanika podijeljenih na nosioce haplotipa H2 i nosioce ostalih kombiniranih haplotipova, nakon korekcije za spol (Tablica 20). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 2,4% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni N5.

5 RASPRAVA

5.1 Demografski podaci

U istraživanje je bio uključen 501 bolesnik sa shizofrenijom, od toga 274 muškaraca i 227 žena. Za svaki istraživani polimorfizam napravljene su usporedbe frekvencije genotipova koje su pokazale da nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između muškaraca i žena s obzirom na polimorfizme rs4680, rs4633 i rs4818.

Za svaki od polimorfizama provjereno je odstupa li raspodjela genotipova po spolu od HWE. U slučaju polimorfizama rs4633 i rs4818 nije bilo značajnog odstupanja od HWE, ali je kod polimorfizma rs4680 ono uočeno. Takvo odstupanje moglo bi biti posljedica neravnoteže udruživanja između bolesti i istraživanog lokusa u cijeloj populaciji, a ukazuje na heterogenu genetičku osnovu bolesti (Nielsen i sur., 1999). Testiranje HWE obično se koristi za kontrolu kvalitete genotipizacije u velikim uzorcima, ali još uvijek nije usuglašeno mišljenje zašto u nekim slučajevima dolazi do odstupanja od HWE-a. Glavni razlozi odstupanja koji se navode su: genetički drift, stratifikacija populacije (Cardon i Palmer, 2003; Freedman i sur., 2004), pogreška u genotipizaciji (Xu i sur., 2002; Hosking i sur., 2004) i prirodna selekcija (Lachance, 2009). Pogreška pri genotipizaciji u našem uzorku je minimalizirana na način da je određivanje pojedinih polimorfizama ponovljeno na 5-10% uzoraka kao oblik kontrole. Također, činjenica je da kod druga dva polimorfizma koji su određivani u istom uzorku nije bilo ozbiljnih odstupanja od HWE-a. Međutim, uvijek postoji mogućnost da kod odabira pacijenata prema određenim uključnim i isključnim kriterijima dolazi do jednog oblika stratifikacije populacije. Postoje i naznake da se lokalizacija lokusa koji su povezani s razvojem složenih bolesti može obaviti na temelju odstupanja od HWE-a među pogođenim pojedincima (Nielsen i sur., 1999).

Studentovim t-testom istraženo je postoji li razlika u dobi, broju bodova skupljenih na PANSS ljestvici te broju bodova skupljenih na kognitivnoj podljestvici ljestvice PANSS (PANSS-COGN) između muških i ženskih bolesnika. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u dobi, ukupnom broju bodova na ljestvici PANSS te broju bodova na podljestvici PANSS-COGN, zbog čega je spol uključen kao varijabla u sve daljnje statističke analize. Iz rezultata je vidljivo da su ženske bolesnice u prosjeku starije od muških bolesnika te imaju manji

broj bodova na ukupnoj ljestvici PANSS, ali i na podljestvici PANSS-COGN. Manji broj bodova na podljestvici PANSS-COGN kod ženskih bolesnica sa shizofrenijom upućuje na to da one imaju manje izražene kognitivne simptome u odnosu na muške bolesnike sa shizofrenijom. Dosadašnja istraživanja upućuju na to da žene s dijagnozom shizofrenije pokazuju bolje socijalno funkcioniranje i prilagodbu u odnosu na muške bolesnike (Walkup i sur., 1999; Ochoa i sur., 2006). Naši rezultati također odgovaraju istraživanjima koja su pokazala da ženske bolesnice sa shizofrenijom imaju slabije kognitivno oštećenje u odnosu na muške bolesnike (Goldstein i sur., 1998; Longenecker i sur., 2010).

5.2 Povezanost polimorfizama gena *COMT* s kognitivnim sposobnostima

5.2.1 Polimorfizam rs4680

Budući da PFC sadrži znatno manje količine drugih regulatora sinaptičkog dopamina, enzim COMT ima glavnu ulogu u regulaciji razine dopamina u PFC-u (Tunbridge i sur., 2004; Meyer-Lindenberg i Weinberger, 2006). Ljudski gen *COMT* sadrži visoko funkcionalni polimorfizam u kodirajućoj sekvenci u eksonu 4, polimorfizam Val$^{108/158}$Met (rs4680). Taj polimorfizam utječe na termostabilnost enzima i smanjuje njegovu enzimatsku aktivnost u ljudskome mozgu za 50% (Weinshilboum i sur., 1999; Chen i sur., 2004). Stabilniji alel, alel G ili Val, povezuje se s pojačanom razgradnjom dopamina i smanjenjem dopamina u sinapsama. Smatra se da bi polimorfizam Val$^{108/158}$Met zato mogao imati veliki utjecaj na regulaciju dopamina u PFC-u, a genotip gena *COMT* na kogniciju posredovanu PFC-om (Meyer-Lindenberg i Weinberger, 2006). Mnoga su istraživanja otkrila poveznice između genotipa gena *COMT* i kognicije kod bolesnika sa shizofrenijom i njihovih obitelji, gdje su homozigoti za alel A (Met/Met) pokazali bolji učinak od homozigota za alel G (Val/Val) u testovima kojima se procjenjuju kognitivne funkcije ovisne o PFC-u (Bosia i sur., 2015).

Rezultati ovog rada pokazuju da polimorfizam Val$^{108/158}$Met (rs4680) gena *COMT* utječe na kognitivne sposobnosti osoba oboljelih od shizofrenije dok su rezultati ranije provedenih istraživanja na uzorku osoba sa shizofrenijom dvojaki; hipoteza o povezanosti genotipa gena *COMT* i kognicije potvrđena je (Egan i sur., 2001; Goldberg i sur., 2003; Wirgenes i sur., 2010), ali i opovrgnuta (Bilder i sur., 2002; Mata i sur., 2008; Liao i sur., 2009) u različitim

istraživanjima. Ishod istraživanja na uzorku zdravih ispitanika je također oprečan pa su tako dobiveni i pozitivni (Blasi i sur., 2005; Bruder i sur., 2005; Papaleo i sur., 2008) i negativni (Stefanis i sur., 2004) rezultati.

Egan i suradnici (2001) su proveli istraživanje koje je uključivalo 55 zdravih ispitanika, 175 bolesnika sa shizofrenijom i 219 zdravih braće i sestara bolesnika sa shizofrenijom Europskog podrijetla. Ispitali su učinak polimorfizma rs4680 na ponašanje na testu kognicije (Wisconsin testu sortiranja karata ili WCST, eng. *Winsconsin Card Sorting Test*); rezultati su pokazali da je alel G ili Val povezan sa smanjenom učinkovitošću na testu kao i učinkovitošću fiziološkog odgovora u dorzolateralnom PFC-u. Utjecaj enzima COMT bio je sličan u svim grupama i neovisan o psihijatrijskoj dijagnozi ili riziku za razvoj bolesti (Egan i sur., 2001). Rezultati ovog rada pokazali su da bi genotip gena *COMT* mogao posredovati i normalno i poremećeno funkcioniranje PFC-a, pa tako i prefrontalne kognicije. Ovo istraživanje replicirano je na zdravim ispitanicima (Joober i sur., 2002; Malhotra i sur., 2002; Mattay i sur., 2003; Rosa i sur., 2004; Bruder i sur., 2005). Međutim, nakon tih istraživanja, druga istraživanja nisu potvrdila te rezultate (Bilder i sur., 2002; Tsai i sur., 2003; Ho i sur., 2005; Aguilera i sur., 2008). Najvažniji je nalaz da izvorna WCST otkrića Egana i suradnika (2001), posredovana alelom G ili Val, nisu potvrđena na zdravim kontrolnim ispitanicima, oboljelima od shizofrenije te zdravoj braći i sestrama oboljelih od shizofrenije u proširenom uzorku iz istog laboratorija (Diaz-Asper i sur., 2008).

Meta-analiza utjecaja polimorfizma Val$^{108/158}$Met (rs4680) na kognitivne sposobnosti, koju je provela Barnett sa suradnicima (2008), pokazala je da povezanost između tog polimorfizma i kognitivnih funkcija ne postoji ili je vrlo slaba. Razlozi za izostanak povezanosti mogu biti brojni. Fiziološke domene su kompleksni konstrukti koji se teško mogu dovesti u vezu sa samo jednom genetičkom varijantom. Nadalje, u različitim istraživanjima korišteni su različiti alati za procjenjivanje neurofiziološke funkcije što otežava interpretaciju rezultata (Lopez-Garcia i sur., 2013).

U našem uzorku, između ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* postoji značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN. Razlika proizlazi iz značajnije većeg broja bodova na podljestvici PANSS-COGN kod homozigota AA (Met/Met) u odnosu na ostale ispitanike, a posebice u odnosu na ispitanike koji

su heterozigoti s obzirom na ispitivani polimorfizam. Usporedba broja bodova na podljestvici PANSS-COGN između homozigota AA (Met/Met) i nosioca alela G (Val) potvrdila je značajno veći broj bodova na podljestvici PANSS-COGN kod homozigota AA (Met/Met) što upućuje na značajnije kognitivno oštećenje kod osoba koje su homozigoti za alel A (Met). Osobe koje su homozigoti za alel Met nosioci su varijante enzima koji ima nižu aktivnost što rezultira višom razinom dopamina u PFC-u. Kod ovih osoba prisutno je dugotrajnije zadržavanje dopamina u sinaptičkim pukotinama, što kao posljedicu ima dugotrajniju stimulaciju postsinaptičkih neurona. Postoji mišljenje da bi se alel Met mogao povezati s boljom kognitivnom stabilnošću dok bi alel Val mogao biti više vezan uz kognitivnu fleksibilnost (Ettinger i sur., 2008). Do sada, rezultati istraživanja povezanosti alela Met gena *COMT* i aktivnosti mozga bili su i pozitivni (Baker i sur., 2005; Winterer i sur., 2006; Congdon i sur., 2009; Krach i sur., 2010; Stokes i sur., 2011) i negativni (Winterer i Weinberger, 2004; Bertolino i sur., 2006; Tan i sur., 2007; Bishop i sur., 2008), a neka su istraživanja otkrila pozitivnu i negativnu povezanost u odvojenim frontalnim regijama istih ispitanika (de Frias i sur. 2009; Sambataro i sur., 2009). Heterogenost utjecaja gena *COMT* u skladu je s dokazima da gen *COMT* ima pleiotropni učinak te da oba alela gena *COMT*, i Met i Val, mogu dodijeliti prednost podsetovima prefrontalne kognicije (Mier i sur., 2010)

Statistički značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između bolesnika podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 gubi se nakon podjele prema spolu što nije u skladu s istraživanjima koja su pokazala da je spol važna varijabla kada se gleda utjecaj polimorfizma rs4680 gena *COMT* na kogniciju (O'Hara i sur., 2006). U našem uzorku je kod muških bolesnika vidljiv sličan trend većeg broja bodova na podljestvici PANSS-COGN kod homozigota AA (Met/Met) u odnosu na ostale bolesnike, ali taj trend nije prisutan kod bolesnica ženskog spola.

Kada su bolesnici podijeljeni s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima, vidljiva je značajna razlika u distribuciji genotipova i alela s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* prije podjele prema spolu. Nakon podjele prema spolu, značajna razlika u distribuciji genotipa vidljiva je samo kod ženskih bolesnica, a sličan je trend vidljiv i u slučaju raspodjele alela. Statistički značajna razlika posljedica je značajno većeg udjela homozigota AA (Met/Met) u

skupini bolesnika s ozbiljnijim kognitivnim simptomima, a isti trend je vidljiv i kod ženskih bolesnica. Za dodatnu potvrdu razlike u distribuciji genotipova između ispitanika podijeljenih s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma, uspoređen je udio homozigota AA (Met/Met) u odnosu na nosioce alela G (Val). Prije podjele po spolu, usporedba je potvrdila statistički značajnu razliku u raspodjeli homozigota AA (Met/Met) i nosioca alela G (Val), a nakon podjele prema spolu takav trend je vidljiv samo kod ženskih ispitanica. Ovi rezultati su u skladu s našim rezultatima koji su pokazali da osobe koje su nosioci isključivo alela Met pokazuju značajnije kognitivno oštećenje kada se gleda konkretan broj bodova na podljestvici PANSS-COGN. Ovaj rezultat mogao bi upućivati na to da alel A (Met) predstavlja rizičan čimbenik za razvitak ozbiljnijih kognitivnih simptoma u shizofreniji, tj. da bi alel G (Val) mogao imati protektivan učinak.

Pojedini modeli višestruke linearne regresije, korigirani za utjecaj spola, u kojima je analiziran utjecaj polimorfizma rs4680 gena *COMT* na broj bodova na pojedinim česticama podljestvice PANSS-COGN, bili su značajni. Ipak, uzrok tome bio je utjecaj spola, a ne istraživanog polimorfizma na broj bodova na česticama podljestvice PANSS-COGN. Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju povezanost čestice N5 (sposobnost apstraktnog razmišljanja) i polimorfizma rs4680 gena *COMT* između ispitanika podijeljenih na homozigote AA (Met/Met), homozigote GG (Val/Val) i heterozigote AG (Met/Val), nakon korekcije za spol. Prema našim saznanjima, u dostupnoj literaturi ne postoje istraživanja koja upućuju na povezanost polimorfizma rs4680 gena *COMT* sa sposobnošću apstraktnog razmišljanja kod bolesnika sa shizofrenijom.

5.2.2 Polimorfizmi rs4633 i rs4818

U ovom istraživanju utvrđeno je da ne postoji povezanost između polimorfizma rs4633 gena *COMT* i kognitivnih sposobnosti kod bolesnika sa shizofrenijom, a isti rezultat je dobiven i za polimorfizam rs4818. Ovo je, prema našem saznanju, ujedno i prvo istraživanje u kojem je istražena povezanost ovih dvaju polimorfizama s kognitivnim simptomima u shizofreniji. Ipak, za polimorfizam rs4818 prvi su Roussos i suradnici (2008) u svojem istraživanju pokazali da ima utjecaj na kognitivne sposobnosti kod zdravih muškaraca. Za razliku od našeg istraživanja koje je uključivalo 501 bolesnika sa shizofrenijom, njihovo je istraživanje napravljeno na uzorku

od 107 zdravih muškaraca grčkog/srednjoeuropskog podrijetla, a istražen je utjecaj polimorfizma rs4818 na planiranje i rješavanje problema te planiranje ovisno o emocionalnom procesiranju i integraciji poticajnih informacija za donošenje odluka (Roussos i sur., 2008). Zanimljivo je da istraživani polimorfizam na navedene ispitane domene utječe različito što je vjerojatno posljedica različitosti prefrontalnih neuralnih sustava odgovornih za ispitane domene (Roussos i sur., 2008).

Ovo istraživanje je pokazalo da nema povezanosti između genotipova gena *COMT* s obzirom na polimorfizam rs4633 i polimorfizam rs4818 te postignutog broja bodova na podljestvici PANSS-COGN neovisno o spolu, ali ni nakon podjele bolesnika sa shizofrenijom po spolu.

Među bolesnicima nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs4633 te polimorfizam rs4818 niti nakon podjele s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma.

Pojedini modeli višestruke linearne regresije, korigirani za utjecaj spola, u kojima je analiziran utjecaj polimorfizma rs4633 i polimorfizma rs4818 gena *COMT* na broj bodova na pojedinim česticama podljestvice PANSS-COGN, bili su značajni zbog utjecaja spola, a ne zbog istraživanog polimorfizma na broj bodova na česticama podljestvice PANSS-COGN. Međutim, rezultati višestruke linearne regresije pokazuju povezanost čestice N5 (sposobnost apstraktnog razmišljanja) i polimorfizma rs4818 gena *COMT* između bolesnika podijeljenih na homozigote CC, homozigote GG i heterozigote CG, nakon korekcije za spol, a sličan je trend vidljiv i u slučaju polimorfizma rs4633. Zanimljivo je da u slučaju sva tri istraživana polimorfizma gena *COMT* postoji povezanost ili bar naznaka povezanosti sa sposobnošću apstraktnog razmišljanja. Prema našim saznanjima, u dostupnoj literaturi ne postoje istraživanja koja upućuju na povezanost gena *COMT* sa sposobnošću apstraktnog razmišljanja kod bolesnika sa shizofrenijom. Ovi rezultati upućuju na potencijalan učinak enzima COMT na sposobnosti apstraktnog razmišljanja vezanog uz pojam fluidne inteligencije koja se zapravo odnosi na brzinu razmišljanja ili brzinu snalaženja u novim situacijama.

5.3 Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena *COMT*

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se sva tri istraživana polimorfizma (rs4680, rs4633 i rs4818) nalaze u LD-u. U istraživanju Hoenicke i suradnika (2010) pokazano je da su polimorfizmi rs4680 i rs4818 u LD-u, u istraživanju Braya i suradnika (2003) pokazano je da su polimorfizmi rs4680 i rs4633 u potpunom LD-u, a da su sva tri polimorfizma u LD-u, pokazalo je istraživanje Gupte i sur. (2009). Za polimorfizam rs4633 utvrđeno je da se nalazi u savršenom LD-u s polimorfizmom rs4680, pri čemu se alel C polimorfizma rs4633 uvijek nalazi u haplotipu s alelom G polimorfizma rs4680 (Bray i sur., 2003). Ovo je bio slučaj i u uzorku korištenom u ovom istraživanju, gdje je, unutar haplotipa u kojem je prisutan alel C s obzirom na polimorfizam rs4633, prisutan i alel G s obzirom na polimorfizam rs4680 (haplotipovi H2 i H3).

Analizom programima Haploview i PHASE 2.1.1. identificirana su 3 haplotipa s frekvencijom većom od 1% u skupini ispitanika sa shizofrenijom: TCA, CGG i CCG. Istražen je utjecaj svakog pojedinog haplotipa gena *COMT* na postignut broj bodova na podljestvici PANSS-COGN, odnosno na ozbiljnost kognitivnih simptoma u shizofreniji, i to tako da su bolesnici bili podijeljeni na nosioce i ne-nosioce određenog haplotipa. Također, provjereno je postoji li povezanost ozbiljnosti kognitivnih simptoma s različitim haplotipovima gena *COMT* prije i nakon podjele prema spolu.

Za sva tri haplotipa (H1, H2 i H3) rezultati su pokazali da ti haplotipovi ne utječu na kognitivne simptome u shizofreniji, tj. da ne postoji značajna razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN između nosioca i ne-nosioca određenog haplotipa. Međutim, u slučaju haplotipa H3 gena *COMT* vidljiv je trend većeg broja bodova, tj. ozbiljnijih kognitivnih oštećenja, kod osoba koje nisu nosioci haplotipa H3 gena *COMT* (Tablica 18), prije podjele prema spolu, a nakon podjele prema spolu taj je trend vidljiv samo kod muških bolesnika, jer je u muških bolesnika sa shizofrenijom razlika u broju bodova na podljestvici PANSS-COGN na granici značajnosti. Tu je potrebno istaknuti da se unutar haplotipa H3 nalazi alel G (Val) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* za koji je već utvrđeno u ovom radu da bi mogao imati protektivan učinak na razvoj kognitivnih simptoma kod osoba s dijagnozom shizofrenije. Zbog toga ovaj nalaz upućuje na manje izraženo kognitivno oštećenje kod bolesnika koji su nosioci haplotipa H3 u odnosu na nosioce druga dva haplotipa (H1 ili H2).

Kada su bolesnici podijeljeni s obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma na bolesnike s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i bolesnike s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36), nije pronađena značajna razlika između nosioca i ne-nosioca haplotipa H3 neovisno o spolu, ali ni nakon podjele prema spolu. Isti rezultat dobiven je i u slučaju nosioca haplotipova H1 i H2.

Istražen je i utjecaj haplotipova na apstraktno razmišljanje (čestica N5 podljestvice PANSS-COGN), a ta je domena bila odabrana jer je samo ona bila značajno ili marginalno povezana s pojedinim polimorfizmima. Pojedini modeli su značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog haplotipa na broj bodova na čestici N5 podljestvice PANSS-COGN, već zbog utjecaja spola. Međutim, rezultati su pokazali da u slučaju haplotipa H2 gena *COMT* postoji značajna razlika u broju bodova koji se odnose na sposobnost apstraktnog razmišljanja (N5) između bolesnika podijeljenih na nosioce haplotipa H2 i nosioce ostalih kombiniranih haplotipova, nakon korekcije za spol. U slučaju nosioca haplotipa H2, vidljiv je manji broj bodova na čestici N5 nego kod nosioca druga dva haplotipa, što upućuje na to da je kod osoba, koje nisu nosioci haplotipa H2, jače narušena sposobnost apstraktnog razmišljanja. Unutar haplotipa H2 nalazi se i alel G (Val) s obzirom na polimorfizam rs4680 gena *COMT* za koji je već utvrđeno da bi mogao imati protektivan učinak na razvoj kognitivnih simptoma, ali se konkretno povezuje i sa značajno manjim brojem bodova na čestici N5 u našem uzorku.

Prema našem saznanju, ovo je prvo istraživanje koje upućuje na povezanost haplotipa gena *COMT* sa sposobnošću apstraktnog razmišljanja. U istraživanju Wanga i suradnika (2010), provedenom na 290 bolesnika sa shizofrenijom kineskog podrijetla, utvrđeno je da haplotipovi rs4633-rs4680 (C-Met, C-Val, T-Met, T-Val) nisu povezani sa sposobnošću apstraktnog razmišljanja. Međutim, u istraživanje su bili uključeni samo oni bolesnici sa shizofrenijom kod kojih su dominantni simptomi bili negativni simptomi (sposobnost apstraktnog razmišljanja spada u podljestvicu negativnih simptoma ljestvice PANSS). Također, bolesnici su prije početka istraživanja i tijekom istraživanja primali terapiju, a većina bolesnika je primala antipsihotike druge generacije koji mogu znatno smanjiti pojavu negativnih simptoma u usporedbi s antipsihoticima prve generacije (Wang i sur., 2010).

6 ZAKLJUČAK

1. Broj bodova na podljestvici PANSS-COGN značajno se razlikuje između ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih s obzirom na polimorfizam rs4680 ($Val^{108/158}Met$), a razlika proizlazi zbog veće ozbiljnosti kognitivnih simptoma kod homozigota AA (Met/Met) u odnosu na druge ispitanike. Isto je potvrđeno kada su bolesnici prema ukupnom broju bodova podijeljeni na one s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i one s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36). Nakon podjele bolesnika po spolu značajna razlika se gubi, osim u slučaju ženskih bolesnica sa shizofrenijom podijeljenih na kategorije prema ozbiljnosti kognitivnih simptoma.
2. Broj bodova na podljestvici PANSS-COGN ne razlikuje se značajno između ispitanika sa shizofrenijom podijeljenih na nosioce različitih genotipova s obzirom na polimorfizam rs4633 i rs4818. Nije bilo značajnih razlika u broju bodova kada su bolesnici podijeljeni prema ukupnom broju bodova podljestvice PANSS-COGN na one s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i one s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36) te prema različitim genotipovima s obzirom na polimorfizme rs4633 i rs4818.
3. Rezultati višestruke linearne regresije su u slučaju polimorfizama rs4680 i rs4818 pokazali da postoji značajna razlika u broju bodova koji se odnose na simptome povezane uz mogućnost apstraktnog razmišljanja između ispitanika s različitim genotipovima. Sličan trend je pronađen i u slučaju polimorfizma rs4633, ali rezultat nije bio statistički značajan.
4. Analiza programom Haploview potvrdila je da se sva tri istraživana polimorfizma nalaze u neravnoteži udruživanja i identificirala je 3 najčešća haplotipa u našem uzorku. Samo u slučaju haplotipa H3 (CCG) vidljiv je trend većeg broja bodova na podljestvici PANSS-COGN kod osoba koje nisu nosioci spomenutog haplotipa. Nakon podjele po spolu ovaj trend je ostao vidljiv kod muških ispitanika. Ovi rezultati nisu potvrđeni kada su ispitanici prema ukupnom broju bodova podijeljeni na one s blagim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN<36) i one s ozbiljnijim kognitivnim simptomima (PANSS-COGN≥36).
5. Rezultati višestruke linearne regresije su u slučaju haplotipa H2 (CGG) pokazali da postoji značajna razlika u broju bodova koji se odnose na simptome povezane uz mogućnost

apstraktnog razmišljanja između ispitanika koji su nosioci navedenog haplotipa i onih koji su nosioci ostalih kombiniranih haplotipova.

7 LITERATURA

- Aguilera M., Barrantes-Vidal N., Arias B., Moya J., Villa H., Ibáñez M.I., *et al.* (2008): Putative role of the COMT gene polymorphism (Val158Met) on verbal working memory functioning in a healthy population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B** (6): 898–902.
- Ameyaw M., Syvanen A., Ulmanen I., Ofori-Adjei D., McLeod H.L. (2000): Pharmacogenetics of catechol-O-methyltransferase: frequency of low activity allele in a Ghanaian population. *Hum Mutat* **16**: 445–446.
- Arias-Carrion O., Stamelou M., Murillo-Rodriguez E., Menedez-Gonzalez M., Poppel E. (2004): Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine* **3**:24.
- Axelrod, J. (1957): O-Methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo. *Science* **126**: 400–401.
- Baker K., Baldeweg T., Sivagnanasundaram S., Scambler P., Skuse D. (2005): COMT Val108/158Met modifies mismatch negativity and cognitive function in 22q11 deletion syndrome. *Biol Psychiatry* **58**: 23-31.
- Barnett J.H., Scoriels L., Munafo M.R. (2008): Meta-analysis of the cognitive effects of the catechol-O-methyltransferase gene Val$^{158/108}$Met polymorphism. *Biological Psychiatry* **64**(2): 137–144.
- Beasley C.M. Jr., Tollefson G., Tran P., Satterlee W., Sanger T., Hamilton S. (1996): Olanzapine versus haloperidol: acute phase results of the North American Double-Blind Olanzapine Trial. *Neuropsychopharmacology* **14**: 111–123.
- Bertolino A., Blasi G., Latorre V., Rubino V., Rampino A., Sinibaldi L., Caforio G., Petruzzella V., Pizzuti A., Scarabino T., *et al.* (2006): Additive effects of genetic variation in dopamine regulating genes on working memory cortical activity in human brain. *J Neurosci* **26**: 3918-3922.

- Bilder R.M., Volavka J., Czobor P., Malhotra A.K., Kennedy J.L., Ni X., Goldman R.S., Hoptman M.J., Sheitman B., Lindenmayer J.P., Citrome L., McEvoy J.P., Kunz M., Chakos M., Cooper T.B. Lieberman J.A. (2002): Neurocognitive correlates of the COMT (Val^{158}Met) polymorphism in chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry* **52**: 701–707.
- Bilder R.M., Volavka J., Lachman H.M., Grace A.A. (2004): The Catechol-O-Methyltransferase Polymorphism: Relations to the Tonic–Phasic Dopamine Hypothesis and Neuropsychiatric Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* **29**:1943-1961.
- Bishop S.J., Fossella J., Croucher C.J., Duncan J. (2008): COMT val158met genotype affects recruitment of neural mechanisms supporting fluid intelligence. *Cereb Cortex* **18**: 2132-2140.
- Blasi G., Mattay V.S., Bertolino A., Bertolino A., Elvevag B., Callicott J.H., Das S., Kolachana B.S., Egan M.F., Goldberg T.E., Weinberger D.R. (2005): Effect of catechol-O methyltransferase Val^{158}Met genotype on attentional control. *Journal of Neuroscience* **25**: 5038–5045.
- Bosia M., Pigoni A., Pirovano A., Lorenzi C., Spangaro M., Buonocore M., Bechi M., Cocchi F., Guglielmino C., Bramanti P., Smeraldi E., Cavallaro R. (2015): COMT and STH polymorphisms interaction on cognition in schizophrenia. *Neurol Sci* **36**: 215–220.
- Bray N.J., Buckland P.R., Williams N.M., Williams H.J., Norton N., Owen M.J. O'Donovan M.C. (2003): A Haplotype Implicated in Schizophrenia Susceptibility Is Associated with Reduced COMT Expression in Human Brain. *Am. J. Hum. Genet.* **73**:152-161.
- Brozoski T., Brown R.M., Rosvold H.E., Goldman P.S. (1979): Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *Science* **205**: 929–932.
- Bruder G.E., Keilp J.G., Xu H., Shikhman M., Schori E., Gorman J.M., Gilliam T.C. (2005): Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes and working memory: associations with differing cognitive operations. *Biological Psychiatry* **58**: 901–907.
- Cardon L.R. and Palmer L.J. (2003): Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* **361**: 598–604.

- Chen J., Lipska B.K., Halim N., Ma Q.D., Matsumoto M., Melhem S., Kolachana B.S., Hyde T.M., Herman M.M., Apud J., Egan M.F., Kleinman J.E., Weinberger D.R. (2004): Functional analysis of genetic variation in catechol-Omethyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *American Journal of Human Genetics* **75**: 807–821.
- Chouinard G. (1995): Effects of risperidone in tardive dyskinesia: an analysis of the Canadian Multicenter Risperidone Study. *J Clin Psychopharmacol* **15**(suppl1): 36S–44S.
- Congdon E., Constable R.T., Lesch K.P., Canli T. (2009): Influence of SLC6A3 and COMT variation on neural activation during response inhibition. *Biol Psychol* **81**: 144-152.
- Cools R. & Robbins T.W. (2004): Chemistry of the adaptive mind. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **362**: 2871–2888.
- Cools R., Barker R.A., Sahakian B.J., Robbins T.W. (2001): Enhanced or impaired cognitive function in Parkinson's disease as a function of dopaminergic medication and task demands. *Cereb Cortex* **11**: 1136–1143.
- Cools R., Stefanova E., Barker R.A., Robbins T.W., Owen A.M. (2002): Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET. *Brain* **125**: 584–594.
- de Frias C.M., Marklund P., Eriksson E., Larsson A., Oman L., Annerbrink K., Backman L., Nilsson L.G., Nyberg L. (2009): Influence of COMT gene polymorphism on fMRI-assessed sustained and transient activity during a working memory task. *J Cogn Neurosci* **22**: 1614-1622.
- Diaz-Asper C.M., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Straub R.E., Egan M.F., Weinberger D.R., (2008): Genetic variation in catechol-O-methyltransferase: effects on working memory in schizophrenic patients, their siblings, and healthy controls. *Biological Psychiatry* **63:** 72–79.
- Egan M.F., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Callicott J.H., Mazzanti C.M., Straub R.E., Goldman D., Weinberger D.R. (2001): Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(12): 6917–6922.
- Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. (2004): Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews* **56**: 331-349.

- Ettinger, U., Kumari, V., Collier, D. A., Powell, J., Luzi, S., Michel, T. M., Zedomi, O., & Williams, S. C. R. (2008). Catechol-OMethyltransferase (COMT) Val158Met genotype is associated with BOLD response as a function of task characteristic. *Neuropsychopharmacology* **33**: 3046–3057.
- Farrell S.M., Tunbridge E.M., Braeutigam S., Harrison P.J. (2012): COMT Val158Met Genotype Determines the Direction of Cognitive Effects Produced by Catechol-Omethyl transferase Inhibition. *Biologycal Psychiatry* **71**: 538-544.
- Fernstrom J.D., Fernstrom M.H. (2007): Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J. Nutr.* **137**: 1539-1547.
- Freedman M.L., Reich D., Penney K.L., McDonald G.J., Mignault A.A., Patterson N., Gabriel S.B., Topol E.J., Smoller J.W., Pato C.N. (2004): Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* **36**:388–393.
- Godar S.C., Bortolato M. (2014): Gene sex interactions in schizophrenia:focus on dopamine neurotransmission. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **8**:1-16.
- Goldberg T.E., Egan M.F., Gscheidle T., Coppola R., Weickert T., Kolachana B.S., Goldman D., Weinberger D.R. (2003): Executive subprocesses in working memory: relationship to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* **60**(9): 889–896.
- Goldman-Rakic P.S. (1995): Cellular basis of working memory. *Neuron* **14**: 477–485.
- Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D. (1997): Functional and Anatomical Aspects of Prefrontal Pathology in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **23**:437-458.
- Goldstein J.M., Seidman L.J., Goodman J.M., Koren D., Lee H., Weintraub S., et al. (1998): Are there sex differences in neuropsychological functions among patients with schizophrenia? *American Journal of Psychiatry* **155**(10):1358–1364.
- Green A.E., Kraemer D.J.M., DeYoung C.D., Fossella J.A., Gray J.R. (2013): A Gene-Brain-Cognition Pathway: Prefrontal Activity Mediates the Effect of COMT on Cognitive Control and IQ. *Cerebral Cortex March* **23**: 552-559.
- Gupta M., Bhatnagar P., Grover S., Kaur H., Baghel R., Bhasin Y., Chauhan C., *et al.* (2009): Association studies of catechol-*O*-methyltransferase (*COMT*) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics* **10**: 385-397.

- Harvey P.D., Keefe R.S.E. (2001): Studies of Cognitive Change in Patients With Schizophrenia Following Novel Antipsychotic Treatment. *Am J Psychiatry* **158**: 176–184.
- Ho B.C., Wassink T.H., O'Leary D.S., Sheffield V.C., Andreasen N.C. (2005): Catechol-O-methyl transferase Val^{158}Met gene polymorphism in schizophrenia: working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow. *Molecular Psychiatry* **10**(229): 287–298.
- Hoenicka J., Garrido E., Martinez I., Ponce G., Aragues M., Rodriguez-Jimenez R., *et al.* (2009): Gender-Specific *COMT* Val158Met Polymorphism Association in Spanish Schizophrenic Patients. *Am J Med Genet Part B* **153B**: 79-85.
- Horacek J., Bubenikova-Valesova V., Kopecek M., Palenicek T., Dockery C., Mohr P., Hösch C. (2006): Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia. *CNS Drugs* **20**: 389-409.
- Hosking L., Lumsden S., Lewis K., Yeo A., McCarthy L., Bansal A., Riley J., Purvis I., Xu C.F. (2004): Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* **12**:395–399.
- Howes O.D., Kapur S. (2009): The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin* **35**:549-562.
- Inoue A., Nakata Y. (2001): Strategy for Modulation of Central Dopamine Transmission Based on the Partial Agonist Concept in Schizophrenia Therapy. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**: 376-380.
- Jatana N., Sharma A., Latha N. (2013): Pharmacophore modeling and virtual screening studies to design potential COMT inhibitors as new leads. *Journal of Molecular Graphics and Modeling* **39**:145-164
- Jones C.D., Miller G.W. (2008): The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochemical Pharmacology* **76**: 569-581.
- Joober R., Gauthier J., Lal S.., Bloom D., Lalonde P., Rouleau G., Benkelfat C., Labelle A. (2002): Catechol-O-methyltransferase Val-108/158-Met gene variants associated with performance on the Wisconsin Card Sorting Test. *Archives of General Psychiatry* **59**(7): 662–663.

- Kane J., Honigfeld G., Singer J., Meltzer H. (1988): Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* **45**: 789–796.
- Kodoma T., Hikosaka K., Watanabe M. (1997): Differential changes in glutamate concentration in the primate prefrontal cortex during delayed spatial alteration and sensory-guided tasks. *Exp Brain Res* **145**: 133–141.
- Krach S., Jansen A., Krug A., Markov V., Thimm M., Sheldrick A.J., Eggermann T., Zerres K., Stocker T., Shah N.J., *et al.* (2010): COMT genotype and its role on hippocampal-prefrontal regions in declarative memory. *Neuroimage*.
- Lachance J. (2009): Detecting selection - induced departures from Hardy - Weinberg proportions. *Genet Sel Evol* **41**:15.
- Lange K.W., Loschmann P.A., Wachtel H., Horowski R., Jahnig P., Jenner P., Marsden C.D. (1992): Terguride stimulates locomotor activity at 2 months but not 10 months after 1-Methyl-4-phyl-2, 3, 6-tetrahydropyridine treatment of common marmosets. *Eur J Pharmacol* **212**: 247–252.
- Laruelle M., Kegeles L.S., Abi-Dargham A. (2003): Glutamate, Dopamine and Schizophrenia. From Pathophisiology to Treatment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1003**: 138-158.
- Liao S.Y., Lin S.H., Liu C.M., Hsieh M.H., Hwang T.J., Liu S.K., Guo S.C., Hwu H.G., Chen W.J. (2009): Genetic variants in COMT and neurocognitive impairment in families of patients with schizophrenia. *Genes, Brain and Behavior* **8**: 228–237.
- Lieberman J.A., Safferman A.Z., Pollack S., Szymanski S., Johns C., Howard A., Kronig M., Bookstein P., Kane J.M. (1994): Clinical effects of clozapine in chronic schizophrenia: response to treatment and predictors of outcome. *Am J Psychiatry* **151**: 1744–1752.
- Longenecker J., Dickinson D., Weinberger D.R., and Elvevåg B. (2010): Cognitive differences between men and women: a comparison of patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Schizophr Res* **120**(1-3): 234–235.
- Lopez-Garcia P., Young Espinoza L., Molero Santos P., Marin J., Ortuno Sanchez-Pedreno F. (2013): Impact of COMT genotype on cognition in schizophrenia spectrum patients and their relatives. *Psychiatry Research* **208**:118-124.

- Lotta T., Vidgren J., Tilgmann C., Ulmanen I., Melen K., Julkunen I., Taskinen J. (1995): Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol Omethyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* **34**: 4202–4210.
- Luciana M., Collins P.F., Depue R.A. (1998): Opposing roles for dopamine and serotonin in the modulation of human spatial working memory functions. *Cereb Cortex* **8**: 218–226.
- Malhotra A.K., Kestler L.J., Mazzanti C., Bates J.A., Goldberg T., Goldman D. (2002): A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am J Psychiatry* **159**: 652– 654.
- Mannisto P.T., Kaakkola S. (1999): Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *Pharmacological Reviews* **51**: 523-628.
- Marder S.R., Meibach R.C. (1994): Risperidone in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* **151**: 825–835.
- Marsden C.A. (2006): Dopamine: the rewarding years. *British Journal of Pharmacology* **147**:136-144.
- Mata I., Perez-Iglesias R., Pelayo-Teran J.M., Rodrı´guez-Sanchez J.M., Gonzalez Blanch C., Carrasco-Marin E., Vazquez-Barquero J.L., Crespo-Facorro B. (2008): Lack of influence of COMT Val158Met genotype on cognition in first-episode non-affective psychosis. *Schizophrenia Research* **102**: 206–209.
- Matsumoto M., Weickert S.C., Akil M., Lipska B.K., Hyde T.M., Herman M.M., Kleinman B.K., Weinberger D.R. (2003): Catechol o-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* **116**: 127-137.
- Mattay V.S., Goldberg T.E., Fera F., Hariri A.R., Tessitore A., Egan M.F., Kolachana B., Callicott J.H., Weinberger D.R. (2003): Catechol O-methyltransferase val158met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6186–6191.
- Mattay V.S., Tessitore A., Callicott J.H., Bertolino A., Goldberg T.E., Chase T.N., Hyde T.M., Weinberger D.R. (2002): Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* **51**: 156–174.

- Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R. (2006): Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **7**:818–827.
- Mier D., Kirsch P., Meyer-Lindenberg A. (2010): Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* **15**: 918-927.
- Millan M.J., Agid Y., Brune M., Bullmore E., Carter C.S., Clayton N.S., Connor R., Davis S., Deakin B. *et al.* (2012): Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nature Reviews* **11**: 141-168.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G., (1998): Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **78**: 189-225.
- Nickl-Jockschat T., Janouschek H., Eickhoff S.B., Rottschy C. (2015): Lack of meta-analytic evidence for an impact of COMT Val158Met genotype on brain activation during working memory tasks. *Biological Psychiatry* pii: S0006-3223(15)00156-0. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.02.030. [Epub ahead of print].
- Nielsen D.M., Ehm M.G., Weir B.S. (1999): Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at marker locus. *Am J Hum Genet* **63**:1531–1540.
- Ochoa S., Usall J., Villalta-Gil V., Vilaplana M., Márquez M., Valdelomar M. et al. (2006): Influence of age at onset on social functioning in outpatients with schizophrenia. *Eur. J Psychiat* **20**(3): 157-163.
- O'Hara R., Miller E., Liao C., Way N., Lin X., Hallmayer J. (2006): COMT Genotype, Gender and Cognition in Community-Dwelling, Older Adults. *Neurosci Lett* **409**(3): 205–209.
- Ollat H. (1992): Dopaminergic insufficiency reflecting cerebral ageing: value of a dopaminergic agonist, piribedil. *J Neurol* **239**: S13–S16.
- Palmatier M.A., Kang A.M., Kidd K.K. (1999): Global variation in the frequencies of functionally different catechol O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry* **46**: 557–567.
- Papaleo F., Crawley, J.N., Song J., Lipska B.K., Pickel J., Weinberger D.R., Chen J. (2008): Genetic dissection of the role of catechol-O-methyltransferase (COMT) in cognition and stress reactivity in mice. *Journal of Neuroscience* **28**: 8709–8723.
- Pearlson G.D. (2000): Neurobiology of schizophrenia. *Annals of Neurology* **48**: 556-566.

- Peerbooms O., Rutten B. P. F., Collip D., Lardinois M., Lataster T., Thewissen V., Mafi Rad S., Drukker M., Kenis G., van Os J., Myin-Germeys I., van Winkel R. (2012): Evidence that interactive effects of COMT and MTHFR moderate psychotic response to environmental stress. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **125**: 247–256.
- Pilling S., Bebbington P., Kuipers E., Garety P., Geddes J., Orbach G., Morgan C. (2002): Psychological treatments in schizophrenia: I. Meta-analysis of family intervention and cognitive behaviour therapy. *Psychological Medicine* **32**: 763-782.
- Rosa A., Peralta V., Cuesta M.J., Zarzuela A., Serrano F., Martinez-Larrea A, Fananas L. (2004): New evidence of association between COMT gene and prefrontal neurocognitive function in healthy individuals from sibling pairs discordant for psychosis. *American Journal of Psychiatry* **161**: 1110–1112.
- Rosenheck R., Cramer J., Xu W., Thomas J., Henderson W., Frisman L., Fye C., Charney D. (1997): A comparison of clozapine and haloperidol in hospitalized patients with refractory schizophrenia. *N Engl J Med* **337**: 809–815.
- Roussos P., Giakoumaki S.G., Pavlakis S., Bitsios P. (2008): Planning, decision-making and the COMT rs4818 polymorphism in healthy males. *Neuropsychologia* **46**: 757-763.
- Sacchi S., Rosini E., Pollegioni L., Molla G. (2013): D-Amino Acid Oxidase Inhibitors as a Novel Class of Drugs for Schizophrenia Therapy. *Current Pharmaceutical Design* **19**: 1-13.
- Sambataro F., Reed J.D., Murty V.P., Das S., Tan H.Y., Callicott J.H., Weinberger D.R., Mattay V.S. (2009): Catechol-O-methyltransferase valine(158)methionine polymorphism modulates brain networks underlying working memory across adulthood. *Biol Psychiatry* **66**:540-548.
- Savitz J., Solms M., Ramesar R. (2012): The molecular genetics of cognition: dopamine, COMT and BDN. *Genes, brain and behavior* **5**: 311-328.
- Shield A.J., Thomae B.W., Eckloff B.W., Wieben E.D., Weinshilboum R.M. (2004): Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Molecular Psychiatry* **9**:151-160.
- Simpson E.H., Kellendonk C., Kandel E. (2010): A Possible Role for the Striatum in the Pathogenesis of the Cognitive Symptoms of Schizophrenia. *Neuron* **65**: 585-596.
- Simpson G.M., Lindenmayer J.P. (1997): Extrapyramidal symptoms in patients treated with risperidone. *J Clin Psychopharmacol* **17**: 194–201.

- Stefanis N.C., Van Os J., Avramopoulos D., Smyrnis N., Evdokimidis I., Hantoumi I., Stefanis C.N. (2004): Variation in catechol-O methyltransferase Val158Met genotype associated with schizotypy but not cognition: a population study in 543 young men. *Biological Psychiatry* **56**: 510–515.
- Stokes P.R., Rhodes R.A., Grasby P.M., Mehta M.A. (2011): The effects of the COMT val(108/158)met polymorphism on BOLD activation during working memory, planning, and response inhibition: a role for the posterior cingulate cortex? *Neuropsychopharmacology* **36**: 763-771.
- Tan H.Y., Chen Q., Sust S., Buckholtz J.W., Meyers J.D., Egan M.F., Mattay V.S., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R., Callicott J.H. (2007): Epistasis between catechol-O-methyltransferase and type II metabotropic glutamate receptor 3 genes on working memory brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12536-12541.
- Tuinier S., Eschauzier J.C., Egger J.I.M., Verhoeven W.M.A. (2008): Response and remission in schizophrenia: the limited value of new remission criteria. *Clinical Neuropsychiatry* **5**: 83-89.
- Tunbridge E.M. (2010): The catechol-o-methyltransferase gene: its regulation and polymorphisms. *International Review of Neurobiology* **95**: 7-27.
- Tunbridge E.M., Bannerman D.M., Sharp T., Harrison P.J. (2004): Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* **24**: 5331–5335.
- Tunbridge E.M., Harrison P.J., Weinberger D.R. (2006): Catechol-o-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val158Met and Beyond. *Biologycal Psychiatry* **60**:141-151.
- Walkup J., Gallaher S.K. (1999): Schizophrenia and the life course: national findings on gender differences in disability and service use. *Int. J. Aging and human development* **49**(2): 79-105.
- Wang Y., Fang Y., Shen Y., Xu Q. (2010): Analysis of association between the catechol-*O*-methyltransferase (*COMT*) gene and negative symptoms in chronic schizophrenia. *Psychiatry Research* **179**: 147-150
- Weinberger D.R. (1987): Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **44**: 660–669.

- Weinberger D.R., Egan M.F., Bertolino A., Callicott J.H., Mattay V.S., Lipska B.K., Berman K.F., Goldberg T.E. (2001): Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **50**: 825–844.
- Weinshilboum R.M., Otterness D.M., Szumlanski C.L. (1999): Methylation pharmacogenetics: catechol Omethyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 19–52.
- Winterer G., Musso F., Vucurevic G., Stoeter P., Konrad A., Seker B., Gallinat J., Dahmen N., Weinberger D.R. (2006): COMT genotype predicts BOLD signal and noise characteristics in prefrontal circuits. *Neuroimage* **32**: 1722--1732.
- Winterer G., Weinberger D.R. (2004): Genes, dopamine and cortical signalto-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **27**:683--690.
- Wirgenes K.V., Djurovic S., Sundet K., Agartz I., Mattingsdal M., Athanasiu L., Melle I., Andreassen O.A. (2010): Catechol O-methyltransferase variants and cognitive performance in schizophrenia and bipolar disorder versus controls. *Schizophrenia Research* **122:** 31–37.
- Witte A.V., Fobker M., Gellner R., Knecht S., and Floel A. (2009): Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 1255–1260.
- Witte A.V., Jansen S., Schirmacher A., Young P., Flöel A. (2010): COMT Val158Met polymorphism modulates cognitive effects of dietary intervention. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2**: 1-7.
- World health Organization (WHO) (2014): www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/en/
- Xu J., Turner A., Little J., Bleeker E.R., Meyers D.A. (2002): Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: Hint for genotyping error? *Hum Genet* **111**:573–574.
- Zhu G., Lipsky R.H., Xu K., Ali S., Hyde T., Kleinman J., Akhtar L.A., Mash D.C., Goldman D. (2004): Differential expression of human COMT alleles in brain and lymphoblasts detected by RT coupled 5 nuclease assay. *Psychopharmacology* **177**:178-184.
- http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2916818_pone.0011951.g001&req=4
- http://what-when-how.com/neuroscience/neurotransmitters-the-neuron-part-3/
- http://www.snpedia.com/index.php/Rs4633
- http://www.snpedia.com/index.php/Rs4818

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime:	Ana Tkalčec
Datum i mjesto rođenja:	28. kolovoza 1991., Koprivnica
Adresa:	Branitelja Hrvatske 16, Križevci (Hrvatska)
Državljanstvo:	Hrvatsko
e-mail:	a.tkalcec@gmail.com

Obrazovanje

2010 – 2015	Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2006 – 2010	Opća gimnazija I.Z.Dijankovečkoga, Križevci

Stručna praksa

2013	Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu
	Laboratorij za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku

Radno iskustvo

2015 - danas	Osnovna škola Sv. Petar Orehovec, Orehovec; učiteljica kemije

Osobne vještine i kompeticije

Jezici:	Hrvatski (materinji jezik)
	Engleski (strani jezik)
Rad na računalu:	dobro vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)