

Polimorfizmi gena signalnog puta fosfolipaze A2 i niacinski odgovor kože u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem

Nadalin, Sergej

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:780331>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Sergej Nadalin

POLIMORFIZMI GENA SIGNALNOG PUTA FOSFOLIPAZE A2 I
NIACINSKI ODGOVOR KOŽE U BOLESNIKA SA SHIZOFRENIJOM
I SHIZOAFEKTIVNIM POREMEĆAJEM

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Sergej Nadalin

POLIMORFIZMI GENA SIGNALNOG PUTA FOSFOLIPAZE A2 I
NIACINSKI ODGOVOR KOŽE U BOLESNIKA SA SHIZOFRENIJOM
I SHIZOAFEKTIVNIM POREMEĆAJEM

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

Mentor rada: prof. dr. sc. Alena Buretić-Tomljanović

Doktorski rad obranjen je dana _____2013. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Tanja Frančišković
2. dr. sc. Dorotea Muck-Šeler, znanstveni savjetnik
3. prof. dr. sc. Branka Blagović

Rad ima 149 listova.

UDK: _____

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aleni Buretić-Tomljanović, na poticanju i usmjeravanju mojih interesa prema znanstveno-istraživačkom radu, ukazanom povjerenju te predanom vodstvu, savjetima i kritikama kroz doktorski studij, kao i tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Miljenku Kapoviću, pročelniku Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku te prof. dr. sc. Bojani Brajenović-Milić, na podršci od trenutka mog dolaska na Zavod. Hvala svim kolegama sa Zavoda, koji su svojim razumijevanjem, potporom i savjetima, također, doprinijeli izradi mog doktorskog rada, kao i tehničarkama Ivani i Azemini za pomoć u laboratoriju.

Osobitu zahvalu dugujem prof. dr. sc. Gordani Rubeša s Klinike za psihijatriju KBC-a Rijeka, prof. dr. sc. Jasminki Giacometti s Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci te dr. sc. Suzani Jonovska iz Psihijatrijske bolnice Rab, koji su, u okviru izrade i oplemenjivanja ovog doktorskog rada, proveli važan i zahtjevan dio istraživanja. Iskreno se, također, zahvaljujem prof. dr. sc. Giulianu Ljubičiću, prof. dr. sc. Tanji Frančišković (Klinika za psihijatriju KBC-a Rijeka), prof. dr. sc. Čedomili Milin (Zavod za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci) i doc. dr. sc. Vesni Šendula Jengiće (Psihijatrijska bolnica Rab), budući da su omogućili realizaciju istraživanja u njihovim ustanovama.

Mojoj obitelji i prijateljima veliko hvala na ljubavi, bezuvjetnoj i nesebičnoj podršci, te vjeri u moj uspjeh i ostvarenje mog cilja.

Neki, meni posebno dragi ljudi, poput moje bake, nonića, none i tete, nažalost, više nisu uz mene i ne mogu se sa mnom veseliti mome uspjehu. U znak da ih nisam zaboravio, posvećujem im ovaj doktorski rad.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: U okviru fosfolipidne membranske hipoteze ispitana je uloga polimorfizama gena uključenih u signalni put PLA2 na podložnost za razvoj shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja te kliničku ekspresiju bolesti. U genetičku analizu uključeno je pet genskih polimorfizama: rs10798059 (polimorfizam A/G - varijanta BanI) gena PLA2G4A za cPLA2, rs4375 (polimorfizam C/T) gena PLA2G6 za iPLA2, rs1549637 (polimorfizam A/T) gena PLA2G4C za cPLA2, rs689466 (polimorfizam A/G) gena PTGS2 za COX-2 i rs1800206 (polimorfizam C/G - varijanta L162V) gena PPAR α . Nadalje, istražena je moguća uloga polimorfizama gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 (BanI u PLA2G4A te rs689466 u PTGS2) i sastava masnih kiselina perifernih stanica (eritrocita) u etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u skupini bolesnika.

Ispitanici i metode: U istraživanju je sudjelovalo 203 bolesnika s dijagnozama shizofrenije ili shizoafektivnog poremećaja i 291 pripadnik kontrolne skupine. Identifikacija ispitivanih polimorfničkih varijanti provedena je PCR-RFLP metodom. U testiranju kožne osjetljivosti na niacin na kožu volarne strane podlaktice nanosila su se četiri flastera, pri čemu je svaki od njih sadržavao otopinu niacina druge koncentracije (0,1 M, 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M). Nakon 5 minuta, flasteri su uklanjani, a rezultate (pojava crvenila) evaluirala su dva nezavisna procjenitelja u rasponu od 0 do 3 (0 = nema crvenila; 1 = minimalno crvenilo; 2 = umjereno crvenilo; 3 = maksimalno crvenilo praćeno edemom), u 5-minutnim intervalima, tijekom 15 minuta. Prema metodi volumetrijskog niacinskog odgovora (VNR), vizualni skorovi za svakog ispitanika koji su procjenjivani tijekom tri vremenska intervala su se zbrajali, a ovisno o koncentraciji niacinske otopine, računali su se ukupni VNR te VNR1-4 za različite koncentracije niacinske otopine. U određivanju sadržaja masnih kiselina membrana eritrocita korišteni su ukupni lipidi eritrocita, koji su nakon izdvajanja metanolizirani, a metilni esteri masnih kiselina su ekstrahirani pomoću petroletera i

analizirani metodom plinske kromatografije. Određena je relativna koncentracija različitih zasićenih masnih kiselina (SFA), mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), kao i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) obitelji n-3 i n-6, a testirano je i nekoliko indeksa i omjera.

Rezultati: Distribucije genotipova i alela svih istraženih genskih polimorfizama nisu se značajno razlikovale između bolesnika i kontrolne skupine ($P > 0,05$). Prilikom ispitivanja interakcije različitih genotipova gena PLA2 i PTGS2, pronađena je značajno veća učestalost kombinacije CT genotipa (PLA2G6) i AT genotipa (PLA2G4C) u bolesnika ($OR = 2,2$, $CI = 1,1 - 4,3$, $z = 2,30$, $P = 0,02$), dok se distribucije ostalih kombinacija nisu razlikovale između dviju skupina ispitanika ($P > 0,05$). Nadalje, nije utvrđena sinergija alela polimorfnih genskih varijanti PLA2 i PTGS2 ($P > 0,05$). Meta-analize studija genetičke udruženosti i obiteljskih studija nisu potvrdile statistički značajnu povezanost polimorfne varijante BanI gena PLA2G4A s etiologijom bolesti. Nije uočena povezanost dobi prve hospitalizacije i ispitivanih genskih polimorfizama, ali je utvrđen slab, iako značajan učinak polimorfnih varijanti gena PLA2G6, PLA2G4C i PPAR α na PANSS psihopatologiju. Polimorfne varijante opisale su 3,2 – 12% varijabilnosti simptoma PANSS-a. Pri tome su vrijednosti općih i ukupnih simptoma pokazale pozitivnu korelaciju s prisutnošću C alela polimorfizma C/T (PLA2G6) na ukupnom uzorku bolesnika ($P < 0,05$). U muškaraca su vrijednosti negativnih simptoma pozitivno korelirale s prisutnošću T alela PLA2G4C genotipa ($P < 0,01$), a vrijednosti općih i ukupnih simptoma s kombinacijom prisutnosti C alela (PLA2G6) i T alela (PLA2G4C) ($P < 0,05$, $P < 0,01$). Nadalje, bolesnice heterozigoti za PPAR α genotip (L162V), imale su značajno niže vrijednosti negativnih simptoma u odnosu na homozigote (L162L) ($P < 0,05$). Srednje vrijednost ukupnog VNR-a ($21,4 \pm 3,8$ vs. $12,7 \pm 6,0$), kao i vrijednosti VNR1-4, bile su značajno više u kontroli ($P < 0,001$). Polimorfne varijante gena PLA2G4A i PTGS2 pokazale su značajan, iako slab učinak na oslabljenu niacinsku reakciju kože u

oboljelih, a pri tome su oba genska polimorfizma opisala približno 3,4 % (svaki po 1,7%, $P < 0,01$) varijabilnosti ukupnog VNR-a. Bolesnici koji u svom PLA2G4A genotipu ne posjeduju A alel (GG homozigoti), a u PTGS2 genotipu posjeduju G alel (AG heterozigoti ili GG homozigoti) imali su veće vrijednosti ukupnog VNR-a. U bolesnika su utvrđene značajno više koncentracije ukupnih SFA ($P < 0,01$), značajan deficit PUFA iz obitelji n-3 i n-6 ($P < 0,01$) te ukupnih PUFA ($P < 0,001$). Smanjene koncentracije linolne kiseline (LA) ($P < 0,01$), eikozapentaenske kiseline (EPA) ($P < 0,001$) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) ($P < 0,01$) najviše su doprinijele nižim vrijednostima PUFA. Broj dvostrukih veza (DBI) ($P < 0,001$), indeks peroksidacije (PI) ($P < 0,01$) te omjeri EPA/AA ($P < 0,001$), ukupne PUFA/ukupne SFA ($P < 0,001$) i ukupne PUFA/ukupne MUFA ($P < 0,01$), bili su, također, značajno niži u bolesnika. Deficit n-3 i n-6 PUFA, utvrđen u membranama eritrocita, međutim, nije bio povezan s oslabljenim niacinskim odgovorom u bolesnika.

Zaključak: Ispitivani polimorfizmi, kao zasebni čimbenici, ne pridonose podložnosti za razvoj bolesti. Kombinacija CT genotipa (PLA2G6) i AT genotipa (PLA2G4C) mogla bi biti povezana s većim rizikom za nastanak bolesti. Istražene polimorfne varijante, pojedinačno ili u kombinaciji, ne utječu na dob nastupa shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja. Polimorfizmi gena PLA2G6, PLA2G4C i PPAR α , u interakciji sa spolom bolesnika, u manjoj mjeri, moduliraju ekspresiju kliničkih simptoma. Polimorfizmi BanI (PLA2G4A) i rs689466 (PTGS2) neznatno doprinose etiologiji oslabljene niacinske reakcije, dok deficit n-3 i n-6 PUFA nije uzrok oslabljenom niacinskom odgovoru kože u bolesnika.

Ključne riječi: esencijalne polinezasićene masne kiseline; genski polimorfizmi; membrane eritrocita; niacinski test kožnog crvenila; shizofrenija; shizoafektivni poremećaj; signalni put fosfolipaze A2.

ABSTRACT

Polymorphisms in genes in phospholipase A2 signalling pathway and niacin skin flush response in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder

Objectives: To test phospholipid membrane hypothesis we investigated a possible role of gene polymorphisms involved in PLA2 signaling pathway on the risk of developing schizophrenia or schizoaffective disorder and clinical expression of illness. We included five gene polymorphisms into genetic analysis: rs10798059 (A/G polymorphism - BanI variant) of the PLA2G4A gene for cPLA2, rs4375 (C/T polymorphism) of the PLA2G6 gene for iPLA2, rs1549637 (A/T polymorphism) of the PLA2G4C gene for the cPLA2, rs689466 (A/G polymorphism) of the PTGS2 gene for COX-2 and rs1800206 (C/G polymorphism - L162V variant) of the PPAR α gene. We further tested the possible impact of polymorphisms in genes of the cPLA2/COX-2 metabolic cascade (BanI of the PLA2G4A and rs689466 of the PTGS2) and fatty acid (FA) content of red blood cell (RBC) membranes on attenuated niacin skin flush response in patients.

Patients and methods: The study included 203 patients with schizophrenia or schizoaffective disorder and 291 healthy controls. Identification of investigated polymorphisms was performed by PCR-RFLP analysis. For niacin sensitivity we used four patches that contained different concentrations of niacin solution (0.1 M, 0.01 M, 0.001 M and 0.0001 M) which were kept on the forearm skin. After 5 minutes, patches were removed, and visual evaluation of flushing, rated from 0 to 3 (0 = no erythema, 1 = incomplete erythema, 2 = complete erythema within definite patch area, 3 = erythema plus edema beyond the patch area) was done in 5-minute intervals for 15 minutes by two independent raters. According to the method of volumetric niacin response (VNR), visual scores for each individual, across three time intervals at each of the four different niacin concentrations were summed, and regarding concentrations, total VNR and VNR1-4 were yielded. To test FA

content, total RBC lipids were extracted, converted into FA methyl esters, and further analyzed by gas chromatography. We determined the relative amount of different saturated FAs (SFAs), monounsaturated FAs (MUFAs) and polyunsaturated FAs (PUFAs) from n-3 and n-6 series. We further introduced several indices and ratios into analysis.

Results: Allele and genotype frequencies of investigated gene polymorphisms between patients and controls were not significantly different ($P > 0.05$). While investigating interactions between different genotypes of the PLA2 and PTGS2 genes, we detected significantly higher frequency of the CT genotype (PLA2G6) and AT genotype (PLA2G4C) combination in the patient group (OR = 2.2, CI = 1.1 - 4.3, $z = 2.30$, $P = 0.02$). However, distributions of other genotype combinations did not differ between groups ($P > 0.05$). Furthermore, there was no synergy between alleles of tested polymorphic variants of the PLA2 and PTGS2 genes ($P > 0.05$). Neither meta-analysis of the case control studies, nor meta-analysis of the family based studies, revealed statistically significant association between BanI polymorphism of the PLA2G4A gene and etiology of illness. We found no evidence for association between age at first hospital admission and investigated polymorphisms, but we detected small, although significant impact of polymorphic variations of the PLA2G6, PLA2G4C and PPAR α genes on PANSS psychopathology. Polymorphic variations accounted for 3.2 – 12% symptoms' variability. General and total symptoms showed positive correlation with the presence of the C allele of the C/T polymorphism (PLA2G6) in all patients ($P < 0.05$). In males, negative symptoms correlated positively with the presence of the T allele of the PLA2G4C genotype ($P < 0.01$), while general and total symptoms were positively associated with combination of the C allele (PLA2G6) and T allele (PLA2G4C) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, females heterozygous for the PPAR α genotype (L162V), manifested significantly lower negative symptoms than homozygous (L162L) ($P < 0.05$). The mean values of total VNR (21.4 ± 3.8 vs. 12.7 ± 6.0) and VNR1-4

were significantly higher in controls ($P < 0.001$). PLA2G4A and PTGS2 gene polymorphisms affected niacin flushing to a small, although significant extent, accounting for approximately 3.4% of the VNR variability (each polymorphism accounted for 1.7%, $P < 0.01$) in the patient group. Patients lacking the A allele in their PLA2G4A genotype (genotype GG) or those carrying G allele in their PTGS2 genotype (AG heterozygous or GG homozygous) had higher values of total VNR. In patients, the total SFAs were significantly increased ($P < 0.01$), while both n-3 and n-6 PUFAs ($P < 0.01$), and total PUFAs were significantly reduced ($P < 0.001$). Lower contents of linoleic acid (LA) ($P < 0.01$), eicosapentaenoic acid (EPA) ($P < 0.001$) and docosahexaenoic acid (DHA) ($P < 0.01$) contributed the most to decreased PUFA levels. In patients, significant decreases were also detected for double bond index (DBI) ($P < 0.001$), peroxidizability index (PI) ($P < 0.01$) and several ratios, such as EPA/AA ($P < 0.001$), total PUFAs/SFAs ($P < 0.001$) and PUFAs/MUFAs ($P < 0.01$). However, although both n-3 and n-6 PUFAs were reduced in patients, an association with niacin sensitivity was not detected.

Conclusion: Investigated gene polymorphisms, individually, do not contribute to the development of illness. CT genotype (PLA2G6) and AT genotype (PLA2G4C) combination is associated with higher risk for schizophrenia and schizoaffective disorder. Investigated polymorphic variants, alone, or in combination, show no impact on age at first admission. Interaction between PLA2G6, PLA2G4C and PPAR α gene polymorphisms and gender, in a smaller extent, modulate expression of clinical symptoms of illness. BanI (PLA2G4A) and rs689466 (PTGS2) polymorphisms affect niacin flush response to a negligible extent, while deficit of n-3 and n-6 PUFAs is not associated with attenuated skin flush in the patient group.

Key words: essential polyunsaturated fatty acids; gene polymorphisms; niacin skin flush test; phospholipase A2 signaling pathway; red blood cell membranes; schizoaffective disorder; schizophrenia.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Genetika shizofrenije.....	3
1.2. Etiologija shizofrenije	4
1.2.1. Neurorazvojna hipoteza.....	5
1.2.2. Neurodegenerativna hipoteza	6
1.2.3. Neuroplastična hipoteza	7
1.2.4. Neurotoksična hipoteza	8
1.2.5. Neurotransmitterska hipoteza.....	9
1.2.6. Neuroimunološka hipoteza	10
1.2.7. Neuroendokrina hipoteza	11
1.3. Fosfolipidna membranska hipoteza.....	12
1.4. Enzimi superobitelji PLA2.....	18
1.4.1. Uloga LC-PUFA i enzima PLA2 u homeostazi neurona	20
1.5. Biomarkeri u dijagnozi shizofrenije	23
1.5.1. Niacinski test crvenila kože.....	24
1.5.1.1. Niacin	24
1.5.1.2. Mehanizam djelovanja niacina.....	25
1.5.1.3. Metode aplikacije niacina i procjene rezultata niacinske reakcije	27
1.5.1.4. Osjetljivost na niacin u shizofreniji i drugim neuropsihijatrijskim bolestima	28
1.5.1.5. Oslabljen niacinski odgovor kao potencijalni endofenotip u shizofreniji.....	29
1.5.1.6. Učinak čimbenika okoline, dobi i spola na niacinski odgovor	30
1.7. Polimorfizmi gena PLA2 i PTGS2 u podložnosti za razvoj shizofrenije	31
1.7.1. Polimorfizmi gena PLA2G4A.....	31

1.7.2. Polimorfizmi gena PLA2G6.....	33
1.7.3. Polimorfizmi gena PLA2G4C	34
1.7.4. Polimorfizmi gena PTGS2	35
1.8. Gen PPAR α u shizofreniji	36
1.8.1. Polimorfizmi gena PPAR α	37
1.9. Etiologija oslabljenog odgovora kože na niacin u bolesnika sa shizofrenijom.....	38
1.9.1. Povezanost niacinskog odgovora kože i genotipa.....	38
1.9.2. Povezanost niacinskog odgovora kože i sastava masnih kiselina eritrocita.....	38
2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	40
3. ISPITANICI I METODE.....	44
3.1. Ispitanici	44
3.2. Metode.....	48
3.2.1. Molekularno genetička analiza.....	48
3.2.1.1. Izolacija DNA	48
3.2.1.2. Analiza polimorfizama gena PLA2 i PTGS2	48
3.2.1.3. Analiza polimorfizma gena PPAR α	49
3.2.2. Test kožnog crvenila nakon lokalne primjene niacina	52
3.2.3. Određivanje masnih kiselina eritrocita.....	53
3.2.4. Statistička obrada podataka	55
3.2.4.1. Analize genetičke udruženosti	55
3.2.4.1.1. Analiza frekvencija genotipova i alela ispitivanih genskih polimorfizama	55
3.2.4.1.2. Meta-analiza polimorfizma BanI gena PLA2G4A.....	55
3.2.4.2. Povezanost kliničkih varijabli i istraženih genskih polimorfizama	56
3.2.4.3. Povezanost istraženih genetičkih polimorfizama i sadržaja masnih kiselina eritrocita s volumetrijskim niacinskim odgovorom kože.....	57

4. REZULTATI	59
4.1. Učestalost genotipova i alela istraženih polimorfnih varijanti	59
4.2. Sinergija polimorfizama gena PLA2 i PTGS2	61
4.3. Meta-analiza studija genetičke udruženosti i obiteljskih studija polimorfizma BanI gena PLA2G4A	66
4.4. Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama i kliničke ekspresije bolesti	69
4.5. Volumetrijski niacinski odgovor	76
4.6. Analiza masnih kiselina membrana eritrocita	77
4.7. Povezanost volumetrijskog niacinskog odgovora kože i polimorfnih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2	81
4.8. Povezanost volumetrijskog niacinskog odgovora kože i sastava masnih kiselina eritrocita	84
5. RASPRAVA	85
5.1. Genski polimorfizmi i podložnost za pojavu shizofrenije ili shizoafektivnog poremećaja	86
5.2. Genski polimorfizmi i klinička ekspresija bolesti	92
5.3. Genski polimorfizmi i volumetrijski niacinski odgovor	97
5.4. Sastav masnih kiselina eritrocita i volumetrijski niacinski odgovor	99
6. ZAKLJUČCI	106
7. LITERATURA	107
8. POPIS SKRAĆENICA	140
9. ŽIVOTOPIS	142

1. UVOD

Shizofrenija je složena duševna bolest multifaktorijalne etiologije u čijem razvoju sudjeluju genetički i okolišni čimbenici. Shizofreniju karakterizira ubrzano propadanje mase kore velikog mozga i sinaptičkih veza, naglašena promjena osobnosti te gubitak kognitivnih funkcija (1). Naziv "shizofrenija" potječe od švicarskog psihijatra Eugena Bleulera koji ga je prvi puta upotrijebio 1911. godine za bolest koja je do tada bila poznata kao *dementia praecox*. Zasluge za nozološko određenje bolesti pripisuju se, međutim, njemačkom psihijatru Emilu Kraepelinu koji je još 1896. godine prvi uočio zajedničke osobine psihopatološke manifestacije i kliničke slike katatone, hebefrene i paranoidne *dementiae praecox*.

Najveći broj oboljelih pokazuje kroničan tijek bolesti s izmjenama recidiva i remisije, pri čemu je očekivano trajanje života u bolesnika sa shizofrenijom u prosjeku kraće 12 – 15 godina u odnosu na zdravu populaciju (2,3). Tome, između ostalog, pridonose veća učestalost kardiovaskularnih bolesti u bolesnika, povezana s njihovim načinom života (nepravilna prehrana, pretilost, pušenje), negativni učinci lijekova - antipsihotika te viša stopa samoubojstava u (4). Shizofrenija je jedan od glavnih uzroka radne nesposobnosti, pri čemu zauzima treće mjesto odmah nakon kvadriplegije i demencije (5), a prema nekim literaturnim podacima, shizofrenija se smatra češćim uzrokom smrti od pojedinih zloćudnih tumora ili različitih tjelesnih bolesti (3).

Rizik obolijevanja od shizofrenije tijekom života u čitavom svijetu iznosi 0,5 – 1%. Najveći rizik obolijevanja u muškaraca uočen je između 15. i 24. godine, a u žena između 25. i 34. godine (1,6). U zemljama u razvoju opisana je nekoliko puta veća učestalost shizofrenije u muškaraca u odnosu na žene, dok u razvijenim zemljama nije uočena razlika u učestalosti obolijevanja s obzirom na spol (1). Lošija prognoza shizofrenog oboljenja u osoba muškog

spola povezuje se s već spomenutim ranijim javljanjem bolesti i težom kliničkom slikom shizofrenije (7).

Simptomi shizofrenije obično se klasificiraju prema psihičkim funkcijama koje su oštećene, a uključuju karakteristične poremećaje mišljenja po sadržaju i formi te poremećaje percepcije, emocija, afekta, psihomotorike i ego funkcija. Možemo ih podijeliti na pozitivne simptome (sumanute ideje, poremećaji mišljenja, halucinacije) i negativne simptome (gubitak sposobnosti osjećajnog doživljavanja i stvaranja, gubitak energije, volje i inicijative, teškoće koncentracije, alogija) (1,3,8). Ovisno o prevladavajućim simptomima u vrijeme procjene bolesti, razlikujemo različite tipove shizofrenije, kao što su paranoidna, hebefrena, katatona, nediferencirana, shizofrenija simplex, post-shizofrena depresija i rezidualna shizofrenija (1).

Ne postoji objektivni klinički test za dijagnozu shizofrenije (3). Dijagnoza se postavlja na temelju dogovorenih dijagnostičkih kriterija koji jasno definiraju simptome koje bolesnik mora, odnosno, može imati te simptome i znakove koji ne smiju biti prisutni da bi se mogla postaviti dijagnoza shizofrenije (1). Dva najvažnija dijagnostička sustava za shizofreniju su 10. revizija Međunarodne klasifikacije bolesti – MKB-10, koju liječnici koriste u svakodnevnoj praksi te američka DSM-IV klasifikacija (engl. *Diagnostic and statistical manual for mental disorders* – DSM-IV), koja se više primjenjuje u kliničkim istraživanjima (1,3,8).

Nakon postavljanja dijagnoze, antipsihotici čine temelj liječenja bolesnika sa shizofrenijom (1,3,9).

1.1. Genetika shizofrenije

Studije na jednojajčanim blizancima upućuju na visok stupanj nasljednosti shizofrenije (80 – 85%) (6), posebice u usporedbi s drugim oboljenjima multifaktorijalne etiologije, kao što su osteoartritis (nasljednost je oko 60%), multipla skleroza (nasljednost je oko 35%) i hipertenzija (nasljednost iznosi 30 – 50%) (3,10,11). Studije genetičke povezanosti (engl. *linkage analysis*) i asocijacijske studije ukazuju na više od 1000 gena kandidata za shizofreniju (12). Rezultati meta-analiza upućuju na lokuse 8p, 22q, 2p12-q22.1, 3p, 5q, 6p, 11q, 13q i 20p kao najvažnije lokuse podložnosti (13).

Polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms* – SNP) predstavljaju najjednostavniji oblik genetičkih varijacija koje nastaju kao posljedica zamjene pojedinih nukleotida, njihove insercije (umetanje) ili pak delecije (brisanje). SNP-i se mogu nalaziti u regijama genoma koje kodiraju proteine te intronskim i intergenskim regijama (14,15). Pokušaji identificiranja potencijalnih gena za shizofreniju temelje se, između ostalog, na istraživanju različitih SNP varijanti gena čiji su produkti uključeni u moguću patogenezu bolesti (16). Osobita se važnost pripisuje genima kao što su PRODH (engl. *proline dehydrogenase*; 22q11), DTNBP1 (engl. *dystrobrevin-binding protein 1*; 6p22), NRG1 (engl. *neuregulin 1*; 8p12), G72 (13q34), DISC1 (engl. *disrupted in schizophrenia 1*; 1q42.1), EPN4 (engl. *epsin 4*; 5q33), COMT (engl. *catechol-O-methyltransferase*; 22q11) i RGS4 (engl. *regulator of G-protein signaling 4*; 1q23). Naime, više od stotinu SNP varijanti u spomenutim genima tako se povezuje s etiologijom shizofrenije, a rezultati su potvrđeni na velikom uzorku bolesnika te u različitim populacijama. S obzirom da je shizofrenija oboljenje multifaktorijalne etiologije, svaki se potencijalni gen zapravo nalazi u interakciji s drugim genima i/ili čimbenicima okoliša koji moduliraju njegovu povezanost sa samom bolesti, pri čemu se pojedinačnim genima, odnosno polimorfnim varijantama istih, pripisuje relativno malen učinak (13,16).

Najnovije studije ukazuju na važnost nekih strukturnih varijacija u etiologiji shizofrenije, kao što su varijacije broja kopija (engl. *copy number variations* – CNV), nastalih kao posljedica submikroskopskih duplikacija, delecija, translokacija ili inverzijskih promjena (3). CNV-i su prisutni u različitom broju kopija u različitim individua, a njihova najveća učestalost utvrđena je u nestabilnim regijama genoma koje su podložnije strukturnim promjenama. Tako promjenom ukupne količine genske doze, CNV-i mogu značajno pridonositi varijacijama fenotipa, kako u bolesnih, tako i u zdravih osoba (17,18). Strukturne promjene 22q kromosomske regije su povezane s kognitivnim deficitom i shizofrenijom, a utvrđeno je i da CNV-i u 1q21, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 22q12 značajno pridonose riziku za razvoj shizofrenije, ali i drugih neuropsihijatrijskih entiteta, kao što su mentalna retardacija, bipolarni afektivni poremećaj, poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (engl. *attention deficit hyperactivity disorder* – ADHD) i autizam (19,20).

1.2. Etiologija shizofrenije

Još uvijek nije poznato kako nastaje shizofrenija niti koji su patofiziološki poremećaji ključni za razvoj bolesti, stoga, različite hipoteze (neurorazvojna, neurodegenerativna, neuroplastična, neurotransmitterska, neurotoksična, neuroendokrina, neuroimunološka) pokušavaju razjasniti nepoznatu i vrlo heterogenu etiologiju shizofrenije (1,9). Među hipotezama posebno mjesto zauzima fosfolipidna membranska hipoteza, koja bi, zapravo, mogla objediniti sve navedene hipoteze (1).

1.2.1. Neurorazvojna hipoteza

Prema neurorazvojnoj hipotezi, shizofrenija nastaje kao kasna posljedica ranih oštećenja središnjeg živčanog sustava u prenatalnom ili perinatalnom razdoblju, a koja dovode do njegovog abnormalnog razvoja i posljedične disfunkcije (1,21). Neuroslikovne metode, poput kompjuterizirane tomografije i magnetske rezonance, upućuju na abnormalnosti morfologije mozga u bolesnika sa shizofrenijom, kao što su povećanje volumena treće moždane komore i lateralnih moždanih komora, smanjenje ukupnog volumena mozga te redukcija sive moždane tvari (3,22). U većini slučajeva opisane su promjene utvrđene u vrijeme postavljanja dijagnoze bolesti te nije opisana njihova daljnja progresija, što svjedoči u prilog prvenstveno neurorazvojnom, a ne neurodegenerativnom procesu (21,22).

Prisutnost tjelesnih minor anomalija ili odstupanja od normalne morfogeneze, uočena je u značajno većem broju u bolesnika sa shizofrenijom, negoli u zdravoj populaciji (23,24). Njihov nalaz, naročito u kraniofacijalnom području, povezuje se, između ostalog, s ranim abnormalnostima razvoja mozga zbog bliske povezanosti razvoja mozga i lica između 6. i 12. pa sve do 17. tjedna gestacije pa su, s obzirom na neurorazvojnu hipotezu bolesti, minor anomalije predložene kao mogući markeri poremećenog razvoja mozga (25). U oboljelih od shizofrenije je, također, uočena pozitivna povezanost minor anomalija s povećanim volumenom treće moždane komore, negativnim i ukupnim simptomima ocjenske ljestvice PANSS-a (engl. *Positive and negative symptom scale*) te negativna povezanost s dobi prve hospitalizacije (26,27).

Neurotrofini su skupina dimernih proteina niske molekularne mase (približno 13 kDa) koji imaju važnu ulogu u razvoju živčanog sustava u svih vrsta kralješnjaka, a među njima se posebno ističu čimbenik rasta neurona (engl. *nerve growth factor* – NGF), moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain derived neurotrophic factor* – BDNF) i neurotrofin-3

(engl. *neurotrophin-3* – NT-3). Kao ekstracelularni ligandi, neurotrofini imaju važnu ulogu u regulaciji diferencijacije, preživljavanja i održavanja plastičnosti živčanih stanica, pri čemu abnormalnosti funkcioniranja neurotrofina mogu uključivati njihovu poremećenu produkciju, sekreciju ili signalizaciju (21). Značajno promijenjena koncentracija neurotrofina (povišena, ali i snižena) pronađena je u serumu, plazmi i moždanom tkivu oboljelih od shizofrenije u odnosu na pripadnike zdrave populacije i mogla bi, u okviru neurorazvojne i neuroplastične hipoteze bolesti, pridonositi poremećenom razvoju mozga i abnormalnom sinaptičkom povezivanju neurona u bolesnika (21,28-30).

1.2.2. Neurodegenerativna hipoteza

Iako abnormalnosti morfologije mozga u bolesnika sa shizofrenijom potvrđene neinvazivnim neuroslikovnim metodama prvenstveno upućuju na poremećaj razvoja mozga, neke studije ukazuju da se spomenute abnormalnosti povećavaju s dobi oboljelih, što svjedoči u prilog neurodegenerativnoj hipotezi shizofrenije (31). U bolesnika je tako potvrđeno progresivno povećanje volumena moždanih komora, smanjenje ukupnog volumena mozga te propadanje sive tvari (31-33). Na moguću uključenost neurodegenerativnih procesa u shizofrenom oboljenju upućuju i uočeno pogoršanje kliničke simptomatologije u određenoj skupini bolesnika te rezistencija na uobičajenu terapiju antipsihoticima (34,35).

Smatra se da pojačana gliozna, demijelinizacija i apoptotska aktivnost, utvrđene u moždanom tkivu bolesnika, osobito doprinose razvoju neurodegenerativnih promjena (1,31,36). Abnormalnosti apoptotskog procesa podupire i post-mortem nalaz smanjene ekspresije Bcl-2 antiapoptotskog proteina te pojačana ekspresija proapoptotskog Bax proteina u temporalnom reznju oboljelih (37,38). Prema ekscitotoksičnoj hipotezi, a u okviru neurodegenerativne hipoteze, neurodegenerativne promjene u mozgu bolesnika mogle bi,

između ostalog, biti i posljedica pretjerane ekscitacijske glutamatergične neurotransmisije (1,39).

1.2.3. Neuroplastična hipoteza

Prethodno spomenuta abnormalna ekspresija različitih neurotrofina, kao što su NGF, BDNF i NT-3, pronađena u serumu, plazmi i moždanom tkivu oboljelih, podupire neuroplastičnu hipotezu shizofrenije (28-30). Osim toga, abnormalna ekspresija i nekih drugih čimbenika važnih za uredno odvijanje procesa sinaptogeneze, kao što su GAP-43 (engl. *growth-associated protein-43*) i sinaptofizin (engl. *synaptophysin*), koja je uočena u bolesnika, mogla bi, također, pridonositi poremećenoj neuroplastičnosti u shizofrenom oboljenju (9,40).

U okviru rane neurorazvojne/neuroplastične hipoteze, zbog oštećenja, ali i odumiranja pojedinih neurona, kao posljedice djelovanja nekih okolišnih čimbenika u vrijeme intenzivnog neurorazvoja (trauma, virusna infekcija), dolazi do uspostavljanja neprimjerenih sinapsi između preostalih neurona, što dovodi do pogrešnog prijenosa informacija, zbog čega se javljaju halucinacije i sumanute ideje (1).

U skladu s kasnom neurorazvojnou/neuroplastičnou hipotezou, neki autori shizofreniju smatraju posljedicou abnormalnog sinaptičkog čišćenja (engl. *pruning*) u adolescentnoj dobi (1,41). Naime, gustoća sinapsi se ubrzano povećava od rođenja pa sve do druge godine života djeteta, kada je najveća. Nakon druge godine života gustoća sinapsi počinje opadati, pri čemu u kasnoj adolescentnoj dobi doseže svoj plato i upravo je tada zabilježena najveća učestalost obolijevanja. Prema nekim studijama, genetička bi predispozicija, također, mogla pridonositi pretjeranom sinaptičkoum čišćenju u bolesnika sa shizofrenijou (42,43).

1.2.4. Neurotoksična hipoteza

Prema neurotoksičnoj hipotezi, shizofrenija bi mogla biti posljedica djelovanja različitih neurotoksičnih utjecaja u fetalnoj fazi, ali i tijekom kasnijeg razvoja središnjeg živčanog sustava, kao što su prenatalna ili perinatalna hipoksija, uslijed komplikacija tijekom trudnoće i poroda te virusne infekcije intrauterino, odnosno, u ranoj životnoj dobi (1,44). Pretpostavlja se da spomenuti uzroci dovode do smanjene ekspresije neurotrofina i drugih neurotropnih čimbenika, prevladavanja proapoptotskih nad antiapoptotskim proteinima te posljedično do apoptoze neurona i atrofije pojedinih moždanih struktura (1).

Prethodno spomenuta obilna ekscitacijska glutamatergična neurotransmisija do koje dolazi uslijed poremećenog metabolizma glutamata, pokazala se, također, neurotoksičnom i mogla bi predstavljati jedan od mogućih mehanizama u patogenezi shizofrenog oboljenja (1,39). Ista se, između ostalog, povezuje s prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala kisika, odnosno pojačanim stanjem oksidacijskog stresa u bolesnika, na kojeg su, zbog niske koncentracije antioksidativnih enzima, kao i visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid* – PUFA) u svojim membranama, moždane stanice osobito osjetljive (45,46).

U okviru teorije endogenih halucinogena, shizofrenija bi mogla biti jedna od posljedica poremećenog metabolizma nekih monoaminskih neurotransmitera, kao što su dopamin, serotonin i noradrenalin, uslijed čega se u mozgu oboljelih pojačano stvaraju različiti endogeni amini koji posjeduju halucinogeni učinak, tzv. endogeni halucinogeni ili psihotoksini (1,47).

1.2.5. Neurotransmitterska hipoteza

Složena disfunkcija i dezintegracija različitih neurotransmiterskih sustava u mozgu oboljelih od shizofrenije, napose dopaminergičkog, serotoninergičkog i glutamatergičnog sustava, dobro je opisana, iako još uvijek nije poznato u kojoj je mjeri poremećena funkcija istih uzrok, a u kojoj posljedica ili pak jedan od kompenzacijskih mehanizama već prisutne i postojeće patologije same bolesti (48).

Dopaminska hipoteza shizofrenije implicira dopaminergičku hiperaktivnost vezanu uz D2 dopaminske receptore u mezolimbickim strukturama, koja se dovodi u svezu s pozitivnim simptomima bolesti te dopaminergičku hipofunkciju u prefrontalnoj kori mozga i frontalnom korteksu, a koja se smatra odgovornom za pojavu negativnih simptoma (1,48). Čitav niz dokaza, kao što su učinkovitost antagonista dopamina u terapiji bolesti, pozitivna korelacija metabolita dopamina homovanilinske kiseline u plazmi s težinom kliničke simptomatologije, veća gustoća D2 dopaminergičkih receptora, osobito u striatumu, utvrđena metodom pozitronske emisijske tomografije (engl. *positron emission tomography* – PET), podupiru spomenutu hipotezu (49,50).

U prilog serotoninске hipoteze shizofrenije svjedoči nastanak psihotičnih simptoma bolesti uslijed vezivanja nekih halucinogenih droga, kao što su LSD (engl. *lysergic acid diethylamide*) i meskalin za serotoninergičke receptore, povećana koncentracija 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} serotoninergičkih receptora utvrđena PET metodom u mozgu oboljelih te terapijski učinak blokade istih od strane nekih antipsihotika u terapiji negativnih simptoma (48,51).

Glutamatergički sustav je jedan od najvažnijih ekscitacijskih sustava u mozgu te stoga gotovo svi neuroni posjeduju neku od vrsta glutamatergičkih receptora. Glutamatu se pripisuje važna uloga u prenatalnom razvoju mozga i sinaptogenezi, a osim toga, neophodan je za procese učenja i dugotrajnog pamćenja. Tako bi hipofunkcija glutamatergičkih receptora, između ostalog, mogla biti odgovorna za abnormalno sinaptičko povezivanje

neurona, prisutno u bolesnika sa shizofrenijom (48). Već je prethodno spomenuto da poremećeni metabolizam glutamata može dovesti do pretjerane ekscitacijske glutamatergične neurotransmisije i posljedične neurotoksičnosti (1,39).

U okviru neurotransmitterske hipoteze i abnormalnosti glutamatergičkog sustava, najvjerojatniji mehanizam patogeneze shizofrenije bila bi smanjena funkcija N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat u moždanom tkivu. Tome u prilog svjedoče učinci nekompetitivnih antagonista NMDA receptora, fenciklina i ketamina, na nastanak simptoma sličnih onima u shizofreniji u zdravih osoba, kao i na pogoršavanje kliničke simptomatologije u oboljelih (52). Inhibicija glutamatergičke aktivnosti antagonistima NMDA receptora pospješuje dopaminergičku neurotransmisiju u području striatuma, što upućuje na važnu recipročnu povezanost dopaminergičkog i glutamatergičkog sustava u regulaciji kliničke simptomatologije bolesti (53,54).

1.2.6. Neuroimunološka hipoteza

U shizofreniji su prisutni brojni pokazatelji disfunkcije imunološkog sustava, iako isti, još uvijek, nisu u potpunosti objašnjeni. Dokazi poremećenog imunološkog odgovora su negativna korelacija shizofrenije i reumatoidnog artritisa te oslabljena kožna reakcija uslijed aplikacije niacina u oboljelih, koja bi mogla biti posljedica deficita vazodilatatornih prostaglandina i važnih medijatora upale, prostaglandina D2 i E2 (PGD2 i PGE2), čiju sintezu inducira niacin (9,55). Nadalje, na poremećeno funkcioniranje imunološkog sustava upućuju povišena koncentracija proupalnih citokina, posebice interleukina-6 (IL-6), interleukina-2 (IL-2) te interferona gama (IF γ) u serumu, povišena aktivnost protutijela na tkivo mozga u serumu, povišena aktivnost proteina akutne faze upale u plazmi, kao i abnormalnosti u odgovoru limfocita na različite mitogene (9,48,56). Pojačana aktivnost spomenutih čimbenika upale, napose proupalnih citokina, poput IL-2 i IL-6, mogla bi biti odgovorna za trajno stanje

blage upale u bolesnika, ali i abnormalnu neurotransmisiju u središnjem živčanom sustavu, budući da navedeni citokini mogu interferirati s aktivnošću brojnih neurotransmitera u mozgu (57). Jedna od novijih teorija, a u okviru neuroimunološke hipoteze, ukazuje da bi shizofrenija mogla nastati kao posljedica vaskularne upale mozga, najvjerojatnije uslijed infekcije, hipoksije ili traumatskog oštećenja moždanog tkiva (58,59).

1.2.7. Neuroendokrina hipoteza

Opisani su brojni, ali nespecifični pokazatelji abnormalnog funkcioniranja endokrinog sustava u bolesnika sa shizofrenijom. U prilog istih, a u skladu s neuroendokrinom hipotezom, svjedoče disfunkcija hipotalamno-hipofizne osi utvrđena deksametazon-supresijskim testom te povišene koncentracije adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortizola u plazmi bolesnika sa shizofrenijom (48,60). Neke pak studije spomenutu hiperkortizolemiju povezuju s težinom kliničke slike u oboljelih, pri čemu istoj pripisuju učinak na pozitivne, ali i negativne simptome bolesti (61,62). Neuroendokrinu disfunkciju, također, podupire i utvrđena smanjena funkcija gonada u bolesnika, što rezultira smanjenim fertilitetom i nepotpunim seksualnim sazrijevanjem oboljelih (1). Smatra se da estrogen, svojim protektivnim učinkom na razvoj mozga i neurotransmisiju, utječe na kasniji početak bolesti, kao i njenu bolju prognozu u žena u odnosu na muškarce, što dodatno implicira važnost uloge spolnih hormona u shizofreniji (63).

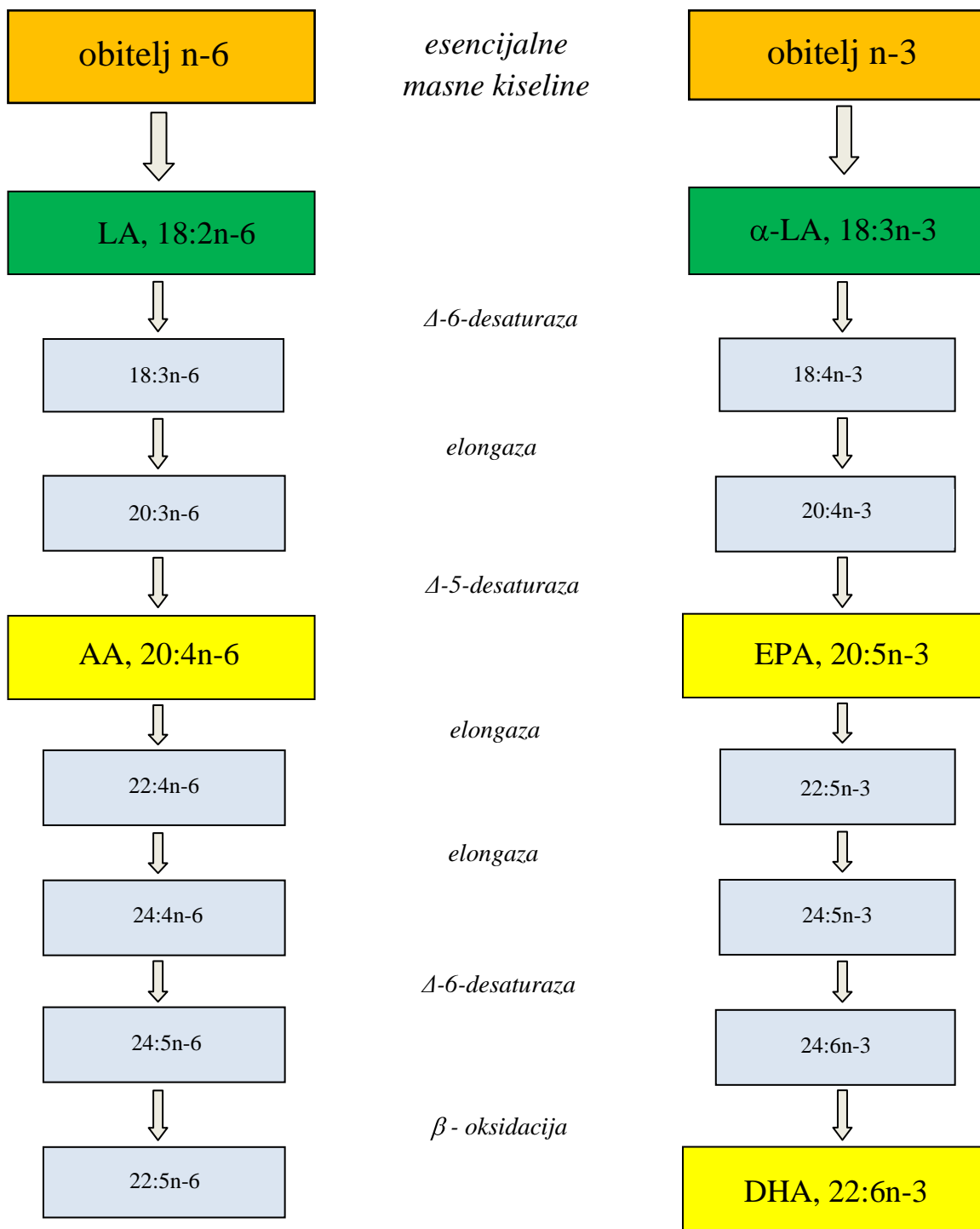
1.3. Fosfolipidna membranska hipoteza

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća Feldberg (64) i Horrobin (65) nepoznatu i heterogenu etiologiju shizofrenije pokušali su objasniti poremećenom sintezom prostaglandina u oboljelih, iz čega je proizašla fosfolipidna membranska hipoteza. Negativna korelacija shizofrenije i nekih upalnih bolesti, poput reumatoidnog artritisa, slabija osjetljivost bolesnika sa shizofrenijom na osjet boli te prethodno spomenuta oslabljena kožna reakcija na niacin u oboljelih, upućuju na manjak molekula prostaglandina (65,66). Uzroke navedenog manjka Horrobin (65) pokušava objasniti deficitom prekursorskih PUFA molekula, ili pak abnormalnom aktivnošću enzima koji su uključeni u proces sinteze prostaglandina, poput fosfolipaze A2 (PLA2) i ciklooksigenaze-2 (COX-2). Naime, enzimi PLA2, hidrolizom membranskih fosfolipida otpuštaju molekule PUFA, dok enzimi COX-2, otpuštene PUFA metaboliziraju u prostaglandine (55). Dakle, prvobitno uočen deficit prostaglandina u bolesnika sa shizofrenijom, mogao bi biti značajan indikator deficita specifičnih membranskih PUFA i, samim time, naposljetku, ukazivati na poremećeni metabolizam fosfolipida u membranama.

S obzirom na poligeniski/multifaktorijalni karakter shizofrenije, biološke membrane predstavljaju idealno mjesto na kojem možemo pratiti međudjelovanje genetičkih i okolišnih čimbenika. Naime, enzimi koji reguliraju metabolizam membranskih fosfolipida genetički su određeni, a dugolančane PUFA (engl. *long-chain PUFA* – LC-PUFA), kao ključne sastavnice molekula membranskih fosfolipida, kojima su membrane živčanih stanica osobito bogate, unose se u organizam prvenstveno putem prehrane. Poremećeni metabolizam fosfolipida te posljedični deficit PUFA i abnormalan sastav membrana, u skladu s fosfolipidnom membranskom hipotezom, predstavljaju jedinstvenu biokemijsku podlogu za poremećaj brojnih neurorazvojnih procesa, ali i čitavog niza staničnih funkcija u bolesnika sa shizofrenijom, što nedvojbeno narušava homeostazu u središnjem živčanom sustavu (67).

Iako najprije hipotetski spomenut, deficit PUFA, kasnije je potvrđen brojnim studijama koje su ispitivale sastav bioloških membrana u bolesnika sa shizofrenijom (68-73). Redukcija PUFA pri tome je uočena u centralnim membranama (membrane živčanih stanica) (68,71), ali i membranama perifernih stanica (eritrocita) oboljelih (69,73). Deficit PUFA najviše se može pripisati smanjenoj koncentraciji LC-PUFA, kao što su arahidonska kiselina (AA, 20:4n-6) (68,71,73) i dokozaheksaenska kiselina (DHA, 22:6n-3) (71-73). Zanimljivo je da je nekoliko autora uočilo bimodalnu raspodjelu PUFA, napose DHA i AA u membranama bolesnika sa shizofrenijom, što upućuje da bi poremećen metabolizam PUFA mogao biti prisutan samo u subpopulaciji oboljelih (73-75). Na važnost deficita PUFA ukazuju neke od studija koje su, između ostalog, utvrdile povezanost između smanjene koncentracije PUFA u membranama i težine kliničke slike u bolesnika (70,74,75). Naposljetku, potrebno je istaknuti da smanjena koncentracija PUFA nije isključiva značajka shizofrenije, budući da je utvrđena i u drugim neuropsihijatrijskim bolestima, poput depresije, bipolarnog afektivnog poremećaja, ADHD-a, disleksije, multiple skleroze i Alzheimerove bolesti (76-79).

Zanimljivo je da ljudski organizam nema sposobnost sinteze LC-PUFA *de novo*, nego ih dobiva ili gotove, ili pretvorbom iz linolne kiseline (LA, 18:2n-6), odnosno, alfa-linolenske kiseline (α -LA, 18:3n-3) (slika 1). Nazivi n-3 i n-6 su sinonimi za termine ω -3 i ω -6 koji označavaju položaj prve dvostruke kovalentne veze u molekuli masnih kiselina, počevši od metilnog (CH₃) kraja lanca. U procesu pretvorbe od posebne je važnosti uloga enzima Δ 6-desaturaza i Δ 5-desaturaza te elongaza (80,81). Δ 6-desaturaze i Δ 5-desaturaze zaslužne su za stvaranje dvostrukih kovalentnih veza na specifičnom mjestu LC-PUFA, dok elongaze dodavanjem ugljikovih atoma, produžuju duljinu lanca. Glavni izvor LA ili α -LA je, također, prehrana, a najvažniji organ u kojemu se događa pretvorba spomenutih LA i α -LA u



LA, 18:2n-6 – linolna kiselina; AA, 20:4n-6 – arahidonska kiselina; α-LA, 18:3n-3 – alfa-linolenska kiselina; 20:5n-3, EPA – eikozapentaenska kiselina; DHA, 22:6n-3 – dokozaheksaenska kiselina

Slika 1. Metabolički putevi od esencijalnih masnih kiselina do n-6 i n-3 LC-PUFA

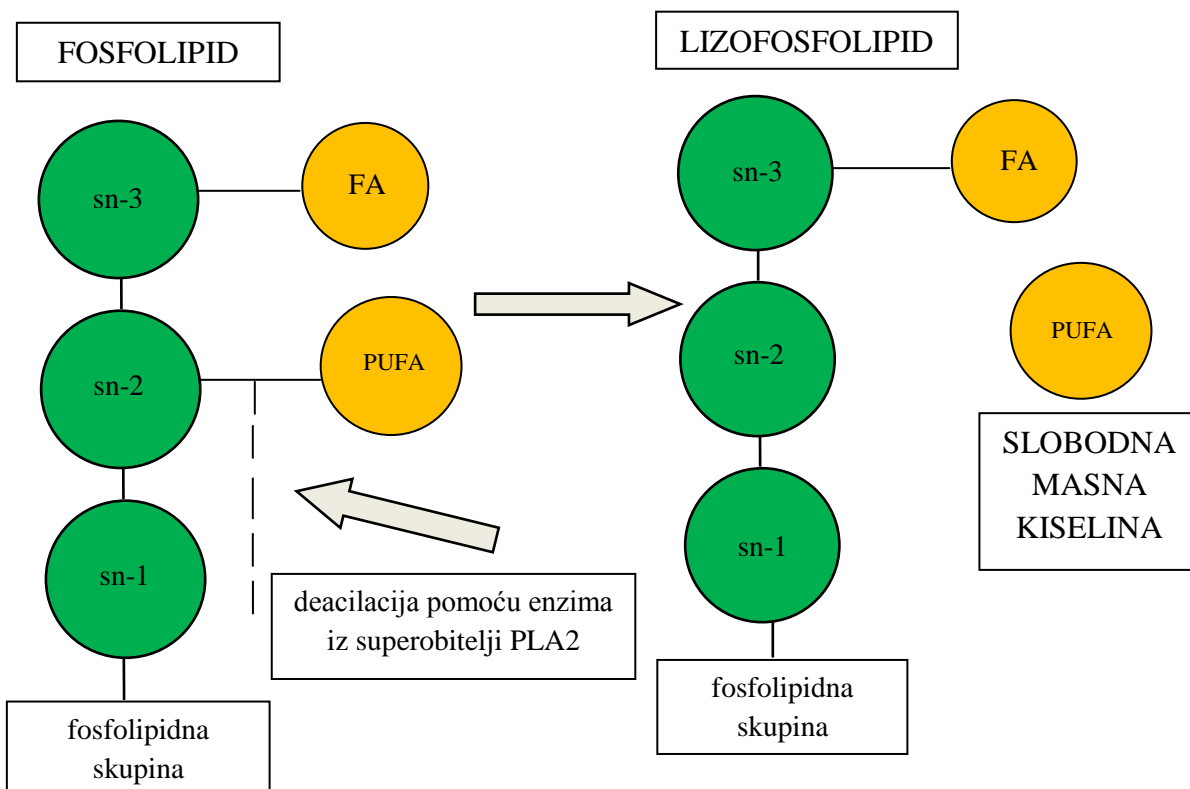
LC-PUFA je jetra. Potrebno je istaknuti da spomenuti proces pretvorbe nije osobito učinkovit u čovjeka, s obzirom da konverzijom iz LA i α -LA nastaje manje od 5% LC-PUFA u organizmu (9,80). Budući da u konverziji LA i α -LA u LC-PUFA sudjeluju isti enzimi, veće koncentracije LA (uslijed većeg unosa istih prehranom), inhibiraju pretvorbu α -LA u LC-PUFA (82). Inače, omjer unosa n-6 i n-3 PUFA u tipičnoj zapadnjačkoj prehrani varira od 15:1 do 20:1, a preporučeni omjer je 2:1 (83). Učinkovitija konverzija, napose α -LA u eikozapentaensku kiselinu (EPA, 20:5n-3) i DHA, u osoba ženskog spola implicira, između ostalog, važnu ulogu estrogena u navedenom procesu (84). Nadalje, uspješnost konverzije prekursorskih molekula u LC-PUFA, slabija je u starijoj dobi, a mogu je zakočiti i virusne infekcije te stres tijekom kojega se pojačano luče katekolamini i glukokortikoidi (67). Moguće je da smanjena koncentracija membranskih LC-PUFA u bolesnika sa shizofrenijom odražava njihov smanjen unos putem prehrane (85,86). Neke pak epidemiološke studije ukazuju na manji rizik obolijevanja od shizofrenije i bolju prognozu bolesti u populacijama u kojima se konzumira manje zasićenih masnih kiselina (engl. *saturated fatty acid* – SFA), a više PUFA, kao što su neke afričke i azijske države, poput Nigerije i Indije (9).

Pojačano stanje oksidacijskog stresa, uslijed abnormalnih i nedostatnih antioksidativnih obrambenih mehanizama te posljedična lipidna peroksidacija, dodatni su mehanizmi koji se povezuju s poremećenim metabolizmom membranskih fosfolipida i deficitom PUFA u bolesnika sa shizofrenijom (9). Moždane LC-PUFA osobito su osjetljive na oksidaciju koja se događa u puno većoj mjeri kada se nalaze u slobodnoj formi, primjerice uslijed otpuštanja iz molekule membranskih fosfolipida djelovanjem enzima PLA2 (9,67). Nekoliko studija utvrdilo je povezanost između smanjene koncentracije PUFA u membranama eritrocita i povišene količine lipidnih peroksida u neliječeni bolesnika s prvom epizodom shizofrenog oboljenja (87,88). Pojačanom stanju oksidacijskog stresa mogla bi pridonositi značajno veća učestalost uživanja duhanskog dima u bolesnika sa shizofrenijom u

odnosu na pripadnike zdrave populacije (89,90) s obzirom da se duhanskom dimu pripisuje snažan prooksidativni učinak (9). Prema nekim studijama, upravo nikotin povisuje aktivnost enzima PLA2 (91), iako su, doduše, zabilježeni i proturječni rezultati (92).

Pojedini lijekovi, također, mogu poremetiti metabolizam bioloških membrana i posljedično reducirati količinu membranskih PUFA (93). Tako su studije na animalnim modelima pokazale da kronična uporaba litij klorida, karbamazapina i valproata smanjuje ponovnu ugradnju AA u molekule fosfolipida (93-95). Drugi lijekovi, poput fluoksetina, mogu povisiti aktivnost PLA2 i na taj način prouzročiti pojačano otpuštanje LC-PUFA iz molekula membranskih fosfolipida (96).

U prilog poremećenom metabolizmu membranskih fosfolipida u bolesnika sa shizofrenijom, između ostalog, svjedoči i povišena aktivnost enzima iz superobitelji PLA2, pronađena u serumu, krvnim stanicama i moždanom tkivu oboljelih (97-99). Navedeni enzimi skupina su ubikvitarnih enzima zaduženih za otpuštanje masnih kiselina, prvenstveno LC-PUFA, sa sn-2 položaja membranskih fosfolipida (100-102). Hidroliza membranskih fosfolipida, uslijed djelovanja spomenutih enzima, ima za posljedicu nastanak slobodnih molekula LC-PUFA i molekula lizofosfolipida (102) (slika 2). Prethodno spomenuto pojačano stanje oksidacijskog stresa moglo bi doprinijeti povišenoj aktivnosti enzima PLA2 u bolesnika sa shizofrenijom. Nadalje, predloženi su i drugi potencijalni uzroci, poput pojačane aktivnosti proupalnih citokina, posebice IL-2 i IL-6, uslijed abnormalnog funkcioniranja imunološkog sustava u oboljelih (9,103). Neke od studija koje su proučavale učinak terapije antipsihoticima na aktivnost enzima PLA2, ukazuju na njezinu ulogu u smanjenju aktivnosti PLA2 (98,104,105), što dodatno implicira važnost navedenih enzima u razvoju ili ekspresiji bolesti. Potrebno je spomenuti da je povišena aktivnost PLA2, osim u shizofreniji, uočena i u drugim neuropsihijatrijskim bolestima, kao što su depresija, bipolarni afektivni poremećaj, disleksija, epilepsija i autizam (106-108).



FA – masna kiselina; PUFA – polinezasićena masna kiselina; PLA2 – fosfolipaza A2

Slika 2. Mehanizam djelovanja enzima iz superobitelji PLA2

S obzirom da je povišena aktivnost enzima iz superobitelji PLA2, pronađena u oboljelih od shizofrenije, mogući uzrok deficita LC-PUFA u njihovim biološkim membranama, geni za enzime PLA2 su, u okviru membranske fosfolipidne hipoteze, predloženi i istraživani kao potencijalni geni kandidati za razvoj bolesti (67,109,110). Relativno velik broj studija je utvrdio pozitivnu povezanost polimorfizama navedenih gena s etiologijom shizofrenije (111-114). Nadalje, polimorfnim varijantama gena PLA2 pripisuje se značajan učinak na aktivnost enzima PLA2 (114) i kliničku ekspresiju bolesti (115).

Potrebno je istaknuti da je značajno smanjena ponovna ugradnja LC-PUFA, prvenstveno AA, u molekule membranskih fosfolipida, uočena u neliječenih bolesnika s prvom epizodom shizofrenije u odnosu na bolesnike koji su uzimali terapiju i pripadnike kontrolne skupine (116) te je u okviru fosfolipidne membranske hipoteze, također, predložena kao jedan od mogućih uzroka deficita membranskih PUFA i nastanka bolesti (67).

Iako konverzijom iz LA i α -LA u organizmu čovjeka nastaje manje od 5% LC-PUFA (9,80), abnormalnosti u sintezi LC-PUFA mogle bi, također, pridonositi njihovom deficitu u bolesnika (81). Utvrđena značajna povezanost između reducirane koncentracije LC-PUFA u membranama i polimorfnih varijanti gena uključenih u njihovu konverziju iz prekursorskih molekula, dodatno upućuju na važnu ulogu genetičkih čimbenika u kompoziciji membranskih fosfolipida (117-119).

Zaključno, s obzirom na poligeniski/multifaktorijalni karakter shizofrenije, interakcija različitih gena uključenih u metabolizam masnih kiselina i fosfolipida (prvenstveno gena PLA2, ali i gena za enzime koji reguliraju ugradnju PUFA u membranske fosfolipide te sintezu LC-PUFA iz prekursorskih molekula), uz smanjen unos i povećanu oksidaciju PUFA, mogla bi, u okviru fosfolipidne membranske hipoteze, dovesti do podložnosti za razvoj bolesti.

1.4. Enzimi superobitelji PLA2

Enzimi iz superobitelji PLA2 hidroliziraju molekule fosfolipida u membranama i tako dovode do nastanka slobodne masne kiseline i lizofosfolipida (101,102). Otpuštene PUFA, njihovi derivati - eikozanoidi (prostaglandini, tromboksani, prostaciklini, leukotrieni), dokozaanoidi, kao i nastali lizofosfolipid, potentne su signalne molekule i poznati medijatori upalnih procesa u organizmu (9,120). Veće koncentracije otpuštenih PUFA i lizofosfolipida, međutim, pokazuju neurotoksični učinak (121,122).

U čovjeka je opisano najmanje 10 skupina enzima iz superobitelji PLA2 kodiranih s 19 gena, pri čemu je klasifikacija enzima PLA2 u pojedine skupine provedena na temelju njihove strukture, stanične lokalizacije, ovisnosti o ionima Ca^{2+} i vrsti supstrata koje preferiraju (101,102). Za učinkovitu kaskadu membranskih PUFA u mozgu najvažnije su sekretorna PLA2 (sPLA2), citosolna PLA2 (cPLA2) i citosolna, kalcij-neovisna PLA2 (engl. *calcium-independent* – iPLA2) (101-103).

sPLA2 su izvanstanični enzimi niske molekularne mase (12 – 18 kDa) čija je katalitička aktivnost ovisna o milimolarnim koncentracijama iona Ca^{2+} (101,102,123). Preferiraju različite vrste masnih kiselina na sn-2 položaju molekula membranskih fosfolipida (101,123). Prisutnost enzima sPLA2 dobro je utvrđena u izvanstaničnim tekućinama, kao što su probavni sok gušerače, zglobova tekućina i upalne tekućine (102,121). Enzimima sPLA2 se pripisuje važna uloga u regulaciji upalnog odgovora u organizmu (101,102), a pojedine skupine enzima posjeduju i važan antimikrobni učinak (102).

cPLA2 su enzimi visoke molekularne mase (65 – 110 kDa) čija je katalitička aktivnost ovisna o nanomolarnim ili mikromolarnim koncentracijama iona Ca^{2+} (101,102,123). cPLA2 preferiraju otpuštanje AA sa sn-2 položaja molekula membranskih fosfolipida i uglavnom se nalaze u citosolu (123,124). Opisani su brojni aktivatori cPLA2, kao što su čimbenici rasta, mitogeni, citokini, UV zračenje, stanični stres i hiperglikemija (125). Najvažnijim se, međutim, smatra porast koncentracije iona Ca^{2+} u citosolu, uslijed čega se cPLA2 translocira na membranu i započinje svoju katalitičku aktivnost (102,125). Enzimima cPLA2 se, također, pripisuje važna uloga u regulaciji upalnog odgovora u organizmu (101,102).

iPLA2 su enzimi visoke molekularne mase (85 – 88 kDa) čija katalitička aktivnost, za razliku od sPLA2 i cPLA2, nije ovisna o ionima Ca^{2+} (101,102,123). Prema nekim studijama, iPLA2 ne preferiraju otpuštanje specifičnih PUFA sa sn-2 položaja molekula membranskih fosfolipida (123), dok drugi literaturni podaci upućuju na veći afinitet iPLA2 prema DHA

(126,127), odnosno AA (101,128). iPLA2 su prvenstveno kućepaziteljski enzimi (engl. *housekeeping enzymes*) koji održavaju strukturu membranskih fosfolipida (129) te kao i ostali enzimi PLA2 reguliraju upalni odgovor organizma (101). Pojedini autori im, između ostalog, pripisuju važnu ulogu i u drugim procesima, kao što su regulacija kontrakcije glatke muskulature krvnih žila, osteogeneza, apoptoza, regulacija sekrecije inzulina i spermiogeneza (130-134).

1.4 1. Uloga LC-PUFA i enzima PLA2 u homeostazi neurona

LC-PUFA, napose DHA i AA, su biološki izrazito aktivne molekule koje čine glavnu masnih kiselina u moždanom tkivu (135,136). Održavanje homeostaze u središnjem živčanom sustavu zahtijeva prisustvo slobodnih, neesterificiranih PUFA molekula, kao i esterificiranih PUFA, koje se nalaze u sastavu membranskih fosfolipida (137).

Otpuštanje PUFA iz molekula membranskih fosfolipida pomoću enzima iz superobitelji PLA2, od posebne je važnosti za uredno odvijanje procesa neurogeneze i sinaptogeneze (103,123). Slobodne PUFA su potentne signalne molekule koje mogu inducirati aktivnost brojnih čimbenika neophodnih za neurogenezu i sinaptogenezu, kao što su već prethodno spomenuti GAP-43, NGF i BDNF (9,138,139). Molekule PUFA, između ostalog, imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji sudjeluju u brojnim neurorazvojnim procesima, poput B-FABP (engl. *brain fatty acid binding protein*), RXR (engl. *retinoid X receptor*) i dr. (137,140). Naposljetku, programirana stanična smrt - apoptoza, jedan od ključnih procesa koji se odvijaju tijekom razvoja i sazrijevanja mozga, uključuje, također, mehanizme otpuštanja PUFA iz membranskih fosfolipida (123,124).

Hidroliza molekula membranskih fosfolipida pomoću enzima PLA2 dio je mehanizma prijenosa živčanih signala u stanicama (9,103). Naime, vezivanje neurotransmitera za receptore povezane s G-proteinima na staničnoj membrani potiče aktivaciju PLA2, nakon

čega uslijedi otpuštanje drugog glasnika - AA iz molekula membranskih fosfolipida (103,123). Pri tome konačni učinak na neuronalnu homeostazu može biti posredovan izravno, signalizacijom putem otpuštene molekule AA, ili pak neizravno, putem nekog od metabolita AA (101,141).

Uloga enzima PLA2 indicirana je tijekom ranog embrionalnog razvoja mozga i živčevlja. Njihova je najveća aktivnost u mozgu štakora tako utvrđena u 12. danu gestacije, nakon čega se smanjuje i zadržava bazalnu aktivnost tijekom postnatalnog razvoja (142). Rana aktivnost PLA2 zabilježena je i u primarnim kulturama embrionalnih neurona korteksa štakora, što upućuje na to da bi navedeni enzimi mogli imati ulogu u preživljavanju neurona i stvaranju brojnih ogranaka aksona. Osim toga, aktivnost PLA2 mogla bi biti ključna za sposobnost neurona da odgovori na vanjske signale te za sposobnost preraspodjele elemenata citoskeleta. Štoviše, prema studiji Forlenezze i sur. (101), za normalan je razvoj kortikalnih neurona, kao i neurona hipokampusa u staničnoj kulturi, bio neophodan funkcionalni integritet različitih enzima PLA2.

Studije na animalnim modelima upućuju na važnu ulogu neuroprotektina D1 (NPD1), metabolita DHA, u zaštiti moždanog tkiva od razvoja neurodegenerativnih promjena nastalih kao posljedica apoptotskih uštećenja uslijed pojačanog stanja oksidacijskog stresa (137,143). Pri tome je dokazano da NPD1 povećava ekspresiju antiapoptotskih Bcl-2 proteina, smanjuje ekspresiju proapoptotskih Bax i Bad proteina i inaktivira kaspazu-3 (144). S obzirom da je utvrđeno da NPD1 inhibira aktivnost enzima COX-2, pripisuje mu se i važan antiupalni učinak (137,144).

Metaboliti različitih LC-PUFA su, također, potentne signalne molekule, a najbolje je opisana njihova uloga u regulaciji upalnog odgovora u središnjem živčanom sustavu. Pri tome se osobit značaj pridaje omjeru n-3 i n-6 LC-PUFA molekula, budući da se AA može enzimski prevesti u niz metabolita s proupalnim djelovanjem, dok metaboliti EPA i DHA

pokazuju snažan antiupalni učinak (9,145). Spomenuti derivati LC-PUFA, osim toga, imaju važnu ulogu u održavanju sinaptičke plastičnosti, kontroli moždanog protoka krvi te procesima poput angiogeneze i apoptoze (141,146,147).

Prisutnost dvostrukih kovalentnih veza između dvaju ugljikovih atoma stvara pregibe u lancu masne kiseline i omogućava bolju bočnu pokretljivost fosfolipida, čime membrane postaju fluidnije. Pojedine LC-PUFA, kao što su DHA i EPA, zbog velikog broja dvostrukih kovalentnih veza, osobito pridonose održavanju fluidnosti bioloških membrana (148,149). Odgovarajuća fluidnost stanične membrane neophodna je za odvijanje signalnih procesa u svakoj stanici, uredno funkcioniranje receptora, (npr. onih za molekule neurotransmitera, ionskih kanala), brojnih enzimskih sustava, kao i regulaciju dinamike lipidnih splavi, važnih mikrostruktura bioloških membrana (55,148,150).

Deficit LC-PUFA, posebice DHA i AA, koji je prisutan u oboljelih od shizofrenije, i samim time, poremećen sastav bioloških membrana, narušava homeostazu u središnjem živčanom sustavu te uzrokuje poremećaje u razvoju mozga, abnormalan prijenos signala u živčanim stanicama, ometa proces urednog sinaptičkog povezivanja neurona, uzrokuje pojačanu peroksidaciju lipida, nastanak slobodnih radikala i neurodegeneraciju (103,123). Budući da poremećen sastav bioloških membrana jasno implicira poremećaj brojnih neurorazvojnih procesa, kao i čitavog niza staničnih funkcija, fosfolipidna membranska hipoteza mogla bi vjerodostojno objediniti prethodno predložene hipoteze o nastanku shizofrenije.

1.5. Biomarkeri u dijagnozi shizofrenije

Otkrićem specifičnog biomarkera za shizofreniju omogućila bi se pravodobna dijagnoza ove bolesti, čime bi se uvelike poboljšala i njena prognoza. Iako su predloženi brojni potencijalni biokemijski markeri, poput povišene razine etana u izdahu oboljelih (151), različiti metabolički markeri (152) te neurokognitivni i neurofiziološki biomarkeri (153), niti jedan se nije pokazao dovoljno specifičnim u dijagnozi shizofrenije. Najveći broj istraživanja, međutim, posvećen je ispitivanju oslabljene ili izostale kožne reakcije nakon aplikacije u vodi topivog vitamina B kompleksa - niacina (154).

Povišena koncentracija etana u izdahnutom zraku bolesnika, utvrđena metodom masene spektrometrije, podudara se s već prethodno uočenim pojačanim stanjem oksidacijskog stresa i predstavlja neinvazivnu, kvantitativnu i direktnu metodu evaluacije pojačane peroksidacije PUFA. Osim toga, dokazano je da koncentracija etana u izdahu ne ovisi o uživanju duhanskog dima (151), koje je značajno učestalije u bolesnika u odnosu na zdravu populaciju (89,90), niti o terapiji antipsihoticima (151).

Uočena veća učestalost tolerancije na glukozu i rezistencije na inzulin pripisuje se abnormalnom metabolizmu glukoze u bolesnika sa shizofrenijom (155-157). Stoga je, poremećeni metabolizam glukoze, predložen kao jedan od mogućih patogenetskih mehanizama bolesti (158,159). U prilog abnormalnom metabolizmu glukoze svjedoči i značajno povišena koncentracija piruvata uočena u serumu oboljelih, a koja, između ostalog, implicira poremećen energetskei metabolizam (152). Na prisutnost poremećenog energetskeg metabolizma ukazuje, također, pojačani katabolizam masnih kiselina. Tako je, uslijed istog, u bolesnika sa shizofrenijom uočena povišena koncentracija glicerata, eikozenske kiseline i beta-hidroksibutirata u serumu te multiplih masnih kiselina i ketonskih tijela u serumu i urinu (152). Nadalje, u serumu oboljelih pronađena je i smanjena koncentracija aminokiseline cisteina (152). S obzirom da je cistein ključna molekula u sintezi peptida glutationa, važnog

antioksidansa, smanjena koncentracija cisteina, mogući je indikator pojačanog stanja oksidacijskog stresa u shizofreniji (152,160).

Novije studije ukazuju na važnost neurofizioloških i neurokognitivnih biomarkera u dijagnozi shizofrenije, s obzirom na brojne neurofiziološke i neurokognitivne disfunkcije u oboljelih (153,161,162). U okviru istraživanja navedenih disfunkcija, u bolesnika je ispitivano funkcioniranje osnovnih percepcijskih procesa, provedeni su različiti testovi pažnje, pamćenja, učenja i sl. S obzirom da se utvrđene neurofiziološke i neurokognitivne abnormalnosti nisu značajnije mijenjale između dvaju kliničkih testiranja te da su postojale, čak i kada nisu bili posve prisutni klinički simptomi bolesti, Light i sur. (153) ukazuju na neurofiziološke i neurokognitivne biomarkere kao pouzdane, stabilne i, naposljetku, dugoročne pokazatelje moždanih disfunkcija u shizofreniji.

1.5.1. Niacinski test crvenila kože

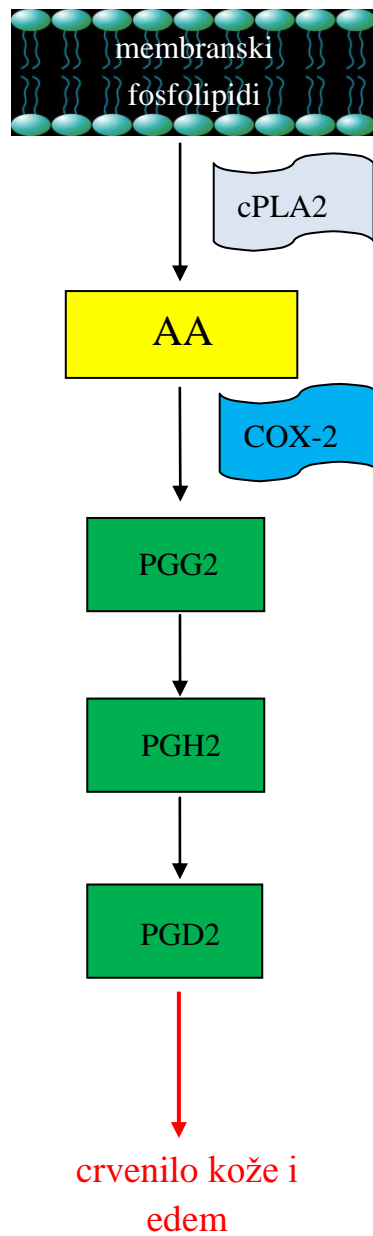
1.5.1.1. Niacin

Niacin, poznat i kao nikotinska kiselina, u vodi je topiv vitamin B kompleksa. Kao prekursoru nikotinamid adenin dinukleotida (NADH; NAD; NAD+) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP), pripisuje mu se važna uloga u brojnim metaboličkim putevima u organizmu (154). Ljudska jetra ima sposobnost sinteze niacina iz aminokiseline triptofana, pri čemu je potrebno 60 mg triptofana za sintezu 1 mg niacina (163). Dugotrajni nedostaci niacina u prehrani mogu dovesti do nastanka oboljenja pod nazivom pelagra, a čije su glavne značajke promjene na koži u vidu dermatitisa, proljevi koji su nerijetko i krvavi te razvoj demencije (164). Moguće nuspojave uzimanja niacina u terapijske svrhe, kao što je npr. liječenje hiperlipidemije, su suhoća i svrbež kože, smetnje u probavnom sustavu, napose u vidu dispepsije i mučnine, aritmije, hiperglikemija i hiperuricemija, a u većim koncentracijama niacin dovodi do promjena na makuli i retini oka. Neovisno o tome da li je

primijenjen oralnim putem, ili pak nanesen lokalno na kožu, najčešća nuspojava uzimanja niacina je pojava kutanog crvenila i edema (165-167).

1.5.1.2. Mehanizam djelovanja niacina

Nakon kutane aplikacije niacin se veže za receptore povezane s G-proteinima (HM74A) koji se nalaze na kožnim makrofazima i epidermalnim Langerhansovim stanicama (168,169). Vezivanje niacina za navedene receptore dovodi do porasta koncentracije iona Ca^{2+} u citosolu koji zatim potiče aktivnost enzima cPLA2 i ekspresiju COX-2 (170). Porast koncentracije Ca^{2+} u citosolu ima za posljedicu translokaciju cPLA2 na membranu, gdje enzim započinje svoju katalitičku aktivnost (102,125). cPLA2, naime, katalizira otpuštanje AA iz membranskih fosfolipida, dok prethodno spomenuti enzim COX-2, metabolizira otpuštenu molekulu AA u vazodilatatorne PGD2 i PGE2. Nadalje, sintetizirani PGD2 i PGE2 stimuliraju produkciju cikličkog adenzin monofosfata (cAMP) koji zatim relaksira glatku muskulaturu kožnih kapilara, pri čemu dolazi do njihove vazodilatacije, a što rezultira crvenilom i edemom kože (slika 3) (171,172). Zanimljivo je da se serumska koncentracija vazodilatatornih prostaglandina, kao odgovor na primjenu niacina, može povisiti i do nekoliko stotina puta (173). Iz svega navedenog, vidljivo je da bi oslabljena ili pak izostala reakcija na niacin mogla biti indikator abnormalnog funkcioniranja metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 (154,174). Poremećeni kaskadni put cPLA2/COX-2, stoga bi, između ostalog, mogao upućivati na manjak specifičnih PUFA, posebice AA, u molekulama membranskih fosfolipida, koje su nužni prekursori vazodilatatornih PGD2 i PGE2 (175), iako uzroke, zapravo, možemo tražiti na bilo kojem dijelu metaboličke kaskade cPLA2-COX-2 (abnormalnoj aktivnosti enzima cPLA2 i COX-2, abnormalnoj ekspresiji receptora za niacin i prostaglandine, poremećenoj vazomotornoj funkciji) (154,172).



Slika 3. Dio metaboličke kaskade arahidonske kiseline

cPLA2 – citosolna fosfolipaza A2, AA – arahidonska kiselina, COX-2 – ciklooksigenaza-2, PGG2 – prostaglandin G2, PGH2 – prostaglandin H2, PGD2 – prostaglandin D2

1.5.1.3. Metode aplikacije niacina i procjene rezultata niacinske reakcije

Početne studije niacinskog testiranja koristile su oralnu aplikaciju niacina različitih koncentracija (od 25 mg do 250 mg) (66,176). Ward i sur. (177) uvode metodu lokalne aplikacije niacina pomoću posebnog flastera koji se nanosi na kožu volarne strane podlaktice. Prednost spomenute aplikacije je mogućnost istovremene uporabe otopina različitih koncentracija (0,1 M, 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M), a na taj je način ujedno i moguće utvrditi pri kojoj se koncentraciji niacina najbolje diferenciraju bolesnici i kontrolna skupina. Osim toga, lokalna aplikacija poboljšala je suradljivost ispitanika, uklonila sistemske nuspojave, omogućila lakšu i objektivniju procjenu rezultata, a i samo testiranje traje kraće. Učinak oralne aplikacije niacina vrednovan je vizualnom inspekcijom crvenila lica i gornjih dijelova tijela (66), mjerenjem temperature kože (176), mjerenjem porasta temperature u ušnoj resici (178), fotopletizmografijom (179) te određivanjem termalnog indeksa koji označava omjer temperature kože i tjelesne temperature (180). Reakcija na kutanu aplikaciju najčešće se evaluirala vizualnom deskriptivnom metodom, pri čemu su korištene dvije mjerne ljestvice: prema Wardu i sur. (177), koji su predložili raspon od 0 do 3 (0 = nema reakcije, 1 = minimalno crvenilo, 2 = umjereno crvenilo, 3 = maksimalno crvenilo) te prema Bergeru i McGorriu (181), s rasponom od 1 do 7 (1 označava izostanak reakcije, a 7 najjaču reakciju koja se manifestira kao edem koji zauzima šire područje od onog na koje je nanesen flaster). Flaster s otopinama niacina uklanjao se nakon 5 minuta, a evaluacija niacinske reakcije vršila se u 3 do 5-minutnim intervalima nakon uklanjanja flastera, najduže do 30 minuta. Neki su autori u vrednovanju kutanog crvenila koristili i druge metode evaluacije, kao što volumetrijski niacinski odgovor (engl. *volumetric niacin response* - VNR) (182), optička refleksijska spektroskopija (183), laserska doplerska floumetrija (184).

Prije provođenja testa kožne osjetljivosti na niacin neophodno je provesti pregled i anamnestičku obradu ispitanika u svrhu evidentiranja oboljenja ili medikamentozne terapije koji bi mogli utjecati na odgovor organizma na niacin. Sve pojedince s promjenama na koži i kožnim bolestima (egzem, psorijaza), kao i one koji su neposredno prije izvođenja testa uzimali nesteroidne protuupalne lijekove koji inhibiraju sintezu prostaglandina, potrebno je isključiti iz testiranja (177,185).

Uočeno je da na jačinu niacinskog odgovora mogu utjecati koncentracije apliciranih otopina, dužina trajanja izloženosti kože otopinama niacina, dužina trajanja evaluacije same reakcije, kao i metoda procjene rezultata testiranja (98,154,171,177,186,187). U svakom slučaju, usporedba različitih metoda evaluacije odgovora kože na primjenu niacina i postignutih rezultata, upućuje da je vizualna inspekcija dovoljno dobra, neinvazivna, brza, jednostavna, jeftina i po potrebi lako ponovljiva metoda koja može diferencirati skupine ispitanika pri različitim koncentracijama apliciranih otopina (od 0,1 M do 0,0001 M). Koncentracije niacina pri kojima je u većini studija postignuta najbolja diferencijacija jačine kožnog odgovora između bolesnika i kontrolne skupine jesu 0,01 M i 0,001 M, a preporučljivo vrijeme trajanja evaluacije rezultata je 5 do 20 minuta u 3 do 5-minutnim intervalima (154).

1.5.1.4. Osjetljivost na niacin u shizofreniji i drugim neuropsihijatrijskim bolestima

Reakciju organizma na niacin otkrili su Murrell i Taylor 1959. godine, dok je prvo testiranje na niacin u bolesnika sa shizofrenijom proveo Hoffer 1962. godine (188). Oslabljena ili izostala reakcija kože nakon aplikacije niacina utvrđena je čak u 24 – 90% bolesnika sa shizofrenijom (154). Međutim, osim u kroničnih bolesnika sa shizofrenijom koji uzimaju antipsihotike, oslabljena niacinska reakcija uočena je i u skupini neliječenih bolesnika s prvom psihozom (171). Nekoliko studija ispitalo je povezanost kliničke slike

shizofrenije i abnormalnog odgovora na niacin (169,171,174,186), pri čemu su Smesny i sur. (186) utvrdili predominaciju negativnih simptoma PANSS-a u ispitanika neosjetljivih na niacin. Rezultati navedene studije, stoga, upućuju na mogućnost postojanja fenotipske subpopulacije bolesnika sa shizofrenijom i na potencijalnu ulogu testiranja kožne osjetljivosti na niacin u njenoj identifikaciji (98). Učestalost abnormalne reakcije kože na niacin pokazala se značajno većom u bolesnika sa shizofrenijom, negoli u bolesnika s bipolarnim afektivnim poremećajem, ili pak u oboljelih od depresije (168,174,187). Međutim, s obzirom da je oslabljena ili izostala reakcija na niacin, uočena i u nekim drugim neuropsihijatrijskim bolestima, kao što su Huntingtonova bolest (189), socijalna fobija (190) i disleksija (191), abnormalan odgovor kože na niacin ne može predstavljati pouzdan dijagnostički test u shizofreniji (154).

1.5.1.5. Oslabljen niacinski odgovor kao potencijalni endofenotip u shizofreniji

Veliki broj studija upućuje na moguću nasljednu komponentu abnormalnog niacinskog odgovora u bolesnika sa shizofrenijom. Značajno slabija niacinska reakcija utvrđena je u prvih rođaka bolesnika u odnosu na pripadnike kontrolne skupine (192-195). Nedavna studija, provedena na većem uzorku ispitanika u kineskoj populaciji, uočila je slabiji odgovor na niacin u bolesnika u čijim je obiteljima više članova bolovalo od shizofrenije u odnosu na bolesnike u kojima je samo jedan član obitelji bio bolestan. Osim toga, prvi rođaci oboljelih od shizofrenije, u čijim je obiteljima više članova imalo shizofreniju, imali su značajno slabiju reakciju kože na niacin u usporedbi s prvim rođacima u čijim je obiteljima samo jedan član bio bolestan (195). Nasljedna komponenta oslabljenog odgovora na niacin u navedenoj studiji varira od 47 do 54%. Neosjetljivost na niacin u neliječenih bolesnika s prvom psihozom (171), kao i u kroničnih bolesnika sa shizofrenijom koji su uzimali antipsihotike te utvrđena nasljednost abnormalnog niacinskog odgovora (195), svjedoče u

prilog oslabljenom niacinskom odgovoru kao potencijalnom endofenotipu u shizofreniji, što su, između ostalog, neki autori i predložili (169,195).

1.5.1.6. Učinak čimbenika okoline, dobi i spola na niacinski odgovor

Veći broj studija istraživao je utjecaj uživanja duhanskog dima na jačinu odgovora kože na niacin (171,187,196,197), međutim, niti jedna nije pronašla značajnu povezanost između navike pušenja i kožne osjetljivosti na niacin. Uporaba kanabisa (169,171,186,198), kave i alkohola (194), također, nije pokazala značajnu povezanost s jačinom niacinskog odgovora u bolesnika sa shizofrenijom, međutim, uočeno je da učestalo uživanje kanabisa u zdravih osoba može smanjiti jačinu kožne osjetljivosti na niacin (198). Svega jedna studija upućuje da bi uporaba antipsihotika mogla biti povezana s jačinom niacinske reakcije, s obzirom da je u istoj, nakon dvomjesečne terapije, uočena konverzija negativnog odgovora na niacin u pozitivni u trećine bolesnika sa shizofrenijom (98). Do sada nije dokazano da bi na jačinu odgovora kože na niacin mogli utjecati neki drugi lijekovi, kao što su kortikosteroidi, blokatori acetilkolinskih i histaminskih receptora ili pak lokalni anestetici poput prokaina (199).

Smesny i sur. (183,200) pronašli su značajnu razliku u odgovoru kože na niacin ovisno o dobi i spolu, pri čemu su uočili da reakcija kože slabi s dobi ispitanika te da osobe muškog spola pokazuju slabiju reakciju u odnosu na žene.

1.7. Polimorfizmi gena PLA2 i PTGS2 u podložnosti za razvoj shizofrenije

Zbog povišene aktivnosti enzima iz superobitelji PLA2 u bolesnika sa shizofrenijom, kao i moguće uloge navedenih enzima u etiologiji oslabljene reakcije kože na niacin u oboljelih, geni za enzime PLA2 su, u okviru fosfolipidne membranske hipoteze, istraživani kao potencijalni geni kandidati za shizofreniju u različitim populacijama (99,109,111,201). Važnu osnovu za istraživanje genetike abnormalne niacinske reakcije predstavlja njezina nasljedna komponenta, utvrđena na velikom broju bolesnika u kineskoj populaciji (N = 1059), a koja iznosi 47 – 54% (95). S obzirom da niacinska reakcija pored enzima cPLA2 koji je ovisan o Ca^{2+} , implicira i važnu ulogu enzima COX-2, kao potencijalni gen kandidat u etiologiji shizofrenije istraživan je i gen prostaglandin-endoperoksid sintetaza 2 (engl. *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* – PTGS2) koji kodira COX-2 (201-203). Budući da su međusobno udaljeni svega 149 kb, geni PLA2G4A i PTGS2 bi, osim pojedinačno, mogli i sinergistički doprinosti pojačanom riziku za razvoj shizofrenog oboljenja (201).

1.7.1. Polimorfizmi gena PLA2G4A

Gen PLA2G4A kodira enzim cPLA2 skupine 4 za čiju je katalitičku aktivnost potrebno prisustvo iona Ca^{2+} . Humani gen PLA2G4A dimenzija je oko 160 kb, nalazi se na prvom kromosomu (1q25) i sadrži 18 egzona. Dokazano je da procesom alternativnog prekrajanja nastaju dvije mRNA varijante navedenog gena, veličine 2933 i 2350 bp (202,204).

Osim u shizofreniji, moguća uloga gena PLA2G4A implicirana je i u drugim neuropsihijatrijskim bolestima, kao što su bipolarni afektivni poremećaj (205,206) i Alzheimerova bolest (207) te napose upalnim bolestima, poput osteoartritisa (10,208) i astme (209,210).

Do sada su, povezano sa shizofrenijom, istraživane dvije polimorfne varijante gena PLA2G4A: rs10798059 (polimorfizam BanI) i ponavljajući polimorfizam poli-A (12,211). Pri tome je najviše istraživanja bilo usmjereno prema analizi polimorfizma BanI, koji je ispitivan pojedinačno, ili u kombinaciji s drugim genima superobitelji PLA2.

Polimorfizam BanI gena PLA2G4A nastaje substitucijom baze adenina (A) u guanin (G) u prvom intronu gena PLA2G4A (211). S obzirom na dokazan učinak polimorfne varijante BanI na aktivnost enzima cPLA2, BanI se smatra funkcijskim polimorfizmom. Naime, utvrđeno je da aktivnost enzima cPLA2 korelira s prisutnošću G alela, pri čemu je najveća aktivnost enzima cPLA2 zabilježena u GG homozigota, a najmanja u AA homozigota (99). Uočeno je da distribucija G alela pokazuje varijacije s obzirom na regionalnu i etničku pripadnost. Tako je učestalost G alela veća u europskoj, sjevernoameričkoj, brazilskoj i indijskoj populaciji (54 – 70%), a gotovo dvostruko manja u korejskoj i kineskoj populaciji (32 – 37%) (12).

Značajna povezanost između etiologije shizofrenije i polimorfizma BanI uočena je u britanskoj, brazilskoj i korejskoj populaciji, pri čemu je prisutnost G alela povezana s većim rizikom za razvoj bolesti u svim spomenutim studijama (99,112,201). Nadalje, kombinacija polimorfizma BanI s polimorfnim varijantama drugih gena superobitelji PLA2, kao što su polimorfizmi rs1648833 (PLA2G4B) i rs1549637 (PLA2G4C), pokazala se rizičnom za nastanak shizofrenije u kineskoj populaciji (113). Međutim, relativno veliki broj studija nije pronašao povezanost između polimorfne varijante BanI i rizika za razvoj shizofrenije (109,202,211-214). Do sada je mali broj studija ispitivao ulogu polimorfizma BanI u kliničkoj ekspresiji shizofrenije, pri čemu je utvrđena povezanost navedene polimorfne varijante s težinom kliničke slike bolesti (115).

1.7.2. Polimorfizmi gena PLA2G6

Gen PLA2G6 kodira enzim iPLA2 skupine 6 čija katalitička aktivnost nije ovisna o prisustvu iona Ca²⁺. Humani gen PLA2G6 dimenzija je 80.61 kb, nalazi se na 22. kromosomu (22q13.1) i sadrži 17 egzona. Tijekom procesa alternativnog prekrajanja nastaje 40 mRNA varijanti navedenog gena (204,215).

Uloga gena PLA2G6 prvenstveno je istraživana u etiologiji neurodegenerativnih oboljenja, napose Parkinsonove bolesti (215,216) i infantilne neuroaksonalne distrofije (217). Njegova moguća uloga implicirana je i u etiologiji nekih tumora, poput karcinoma pluća (218) i melanoma (219).

Povezano s etiologijom shizofrenije, istraživano je nekoliko polimorfizama gena PLA2G6, pri čemu su polimorfne varijante rs2235346, rs2272831 i rs2284060 ispitivane u kineskoj populaciji, a polimorfizam rs4375 u brazilskoj populaciji (12,220,221).

Polimorfizam rs4375 gena PLA2G6 posljedica je supstitucije baze citozina (C) u timin (T) u 4. intronu gena PLA2G6. Do sada nije utvrđena moguća funkcionalnost spomenute polimorfne varijante. Zastupljenost C alela rs4375 pokazuje značajne razlike unutar pripadnika različitih rasa i populacija. Prema literaturnim podacima, učestalost C alela na području subsaharske Afrike je oko 67%, u azijskim populacijama varira od 23 – 68%, dok u Europi iznosi oko 43% (222).

Povezanost između etiologije shizofrenije i polimorfizma rs4375 uočena je u brazilskoj populaciji, pri čemu je prisutnost C alela povezana s većim rizikom za razvoj bolesti (220).

1.7.3. Polimorfizmi gena PLA2G4C

Gen PLA2G4C kodira enzim cPLA2 skupine 4 čija katalitička aktivnost nije ovisna o prisustvu iona Ca^{2+} . Humani gen PLA2G4C dimenzija je 63.61 kb, nalazi se na 19. kromosomu (19q13.3) i sadrži 17 egzona (204,223). Procesom alternativnog prekrajanja nastaje 23 mRNA varijanti navedenog gena (204).

Gen PLA2G4C jedan je od slabije istraženih gena iz PLA2 superobitelji. Osim u shizofreniji, njegova moguća uloga implicirana je u etiologiji prijevremenog poroda (224), astme (225) i nekih tumora, poput moždanih glioma (223,226).

Do sada je, povezano s etiologijom shizofrenog oboljenja, istraživana samo polimorfna varijanta rs1549637 gena PLA2G4C (113,221,227,228).

Polimorfizam rs1549637 gena PLA2G4C nastaje supstitucijom baze adenina (A) u timin (T) u 16. intronu gena PLA2G4C. Nije potvrđena moguća funkcionalnost spomenute polimorfne varijante. Učestalost T alela je najveća među pripadnicima afroameričke populacije (60 – 63%) i na području subsaharske Afrike (68,3%), a znatno je manja u azijskim (17 – 25 %) i europskim populacijama (7 – 20%) (229).

Povezanost između etiologije shizofrenog oboljenja i polimorfizma rs1549637 utvrđena je u samo jednoj studiji u kineskoj populaciji, pri čemu je prisutnost T alela povezana s većim rizikom za razvoj bolesti (113). U istoj studiji, rizičnom za pojavu shizofrenije pokazala se kombinacija polimorfne varijante rs1549637 i polimorfizma BanI. Ostale dvije kineske studije, kao i studija provedena u britanskoj populaciji, dale su negativan rezultat (221,227,228).

1.7.4 . Polimorfizmi gena PTGS2

Humani gen PTGS2 dimenzija je 8.64 kb, nalazi se na prvom kromosomu (1q25.2-q25.3) i sadrži 10 egzona. Alternativnim prekrajanjem nastaje 8 mRNA varijanti gena PTGS2 (202,204).

Uloga gena PTGS2 prvenstveno je istraživana u etiologiji tumora, poput karcinoma dojke (230,231), ovarija (232), pluća (233), debelog crijeva (234) i melanoma (235) te nekih upalnih bolesti, kao što su astma (236,237) i periodontitis (238,239). Osim toga, ista je implicirana i u mogućoj etiologiji neurodegenerativnih oboljenja, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (240,241).

Dvije britanske i jedna kineska studija do sada su ispitale povezanost gena PTGS2 s etiologijom shizofrenije, pri čemu su istražene polimorfne varijante rs689466 i rs274557 navedenog gena (201-203).

Polimorfizam rs689466 (A/G) gena PTGS2 posljedica je supstitucije baze adenina (A) u guanin (G) u promotorskom mjestu gena (242,243). Utvrđeno je da slabija aktivnost enzima COX-2 u bolesnika s vitiligom značajno korelira s prisutnošću G alela polimorfizma rs689466 (243). Učestalost G alela je najveća među pripadnicima azijskih populacija (42 – 51%), nešto manja u Europi (13 – 17%), a najniža među pripadnicima afroameričke populacije (7 – 9%) i na području subsaharske Afrike (8 – 9%) (242).

Povezanost između etiologije shizofrenog oboljenja i rs689466 polimorfizma objavljena je u studiji provedenoj u britanskoj populaciji (201), dok su rezultati druge britanske studije, kao i rezultati studije u kineskoj populaciji, bili negativni (202,203).

1.8. Gen PPAR α u shizofreniji

Peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor alfa (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* – PPAR α) je transkripcijski čimbenik koji pripada superobitelji jezgrinih steroidnih receptora (244,245). Navedeni termin potječe od opažanja da PPAR α agonisti u jetri glodavaca potiču izraženu proliferaciju peroksisoma, što uzrokuje hepatomegaliju, β -oksidaciju masnih kiselina te povećano stanje oksidacijskog stresa (246). Prilikom regulacije genske ekspresije, PPAR α tvori heterodimere s RXR-om, nakon čega se cijeli kompleks vezuje na promotorska mjesta ciljnih gena – PPREs (engl. *peroxisome proliferator response elements*) (247). Do sada su, iz PPAR obitelji, osim PPAR α , identificirana još dvije vrste PPAR receptora: peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* – PPAR γ) i peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor beta (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor beta* – PPAR β) (247).

PPAR α regulira ekspresiju gena koji sudjeluju u lipogenezi, transportu i metabolizmu masnih kiselina te njihovoj oksidaciji i stoga se smatra jednim od glavnih medijatora metabolizma lipida i ugljikohidrata u organizmu (248,249). Zanimljivi rezultati studija na animalnim modelima, ukazuju na važnu ulogu PPAR α , kao senzora deficita masnih kiselina u organizmu (250,251). Naime, uočeno je da PPAR α potiče endogenu sintezu masnih kiselina, prije svega LC-PUFA, koje su ujedno i njegovi najvažniji prirodni ligandi, poticanjem aktivnosti Δ 6-desaturaza, Δ 5-desaturaza i elongaza (252). Stoga, PPAR α predstavlja svojevrstan senzor PUFA u organizmu, posebice u slučajevima gladovanja, kada organizam ne dobiva dovoljne količine esencijalnih PUFA. Nedostatak LC-PUFA osobito pogađa membrane živčanih stanica, budući da one, u normalnim uvjetima, sadrže veće količine AA i DHA koje su ugrađene u molekule membranskih fosfolipida (67,253). Iz svega navedenog,

vidljivo je da PPAR α , kao transkripcijski čimbenik, ima nedvojbeno važnu ulogu u regulaciji metabolizma ugljikohidrata i lipida u organizmu, pri čemu je od posebnog značaja njegova uloga u metabolizmu i održavanju homeostaze slobodnih masnih kiselina, napose LC-PUFA.

1.8.1. Polimorfizmi gena PPAR α

Humani gen PPAR α dimenzija je 93.24 kb, smješten je na 22. kromosomu (22q12-q13.1/22q13.31) i sadrži 8 egzona. Alternativnim prekrajanjem nastaje 16 mRNA varijanti gena PPAR α (204,254).

Uloga gena PPAR α istraživana je u etiologiji dislipidemija (244,255,256), dijabetesa (257), pretilosti (248) te posljedičnih kardiovaskularnih oboljenja (258), ali i nekih malignih bolesti, poput karcinoma dojke (259) i endometrija (260). Potrebno je istaknuti da bolesnici sa shizofrenijom značajno češće obolijevaju od dislipidemija i dijabetesa, skloniji su razvoju pretilosti, a smrtnost od kardiovaskularnih bolesti čak je dva do tri puta veća u oboljelih od shizofrenije u odnosu na zdrave pripadnike opće populacije (261,262).

Svega je jedna studija do sada ispitivala povezanost gena PPAR α s etiologijom shizofrenije, pri čemu je istražen polimorfizam Val227Ala (varijanta rs1800234, polimorfizam T/C) u japanskoj populaciji, međutim, rezultati su bili negativni (254). Literaturni podaci pokazuju da navedeni polimorfizam ne postoji u europskoj populaciji (263).

Supstitucija baze citozina (C) u guanin (G) u 5. egzonu gena PPAR α dovodi do zamjene aminokiseline leucina (Leu) valinom (Val) u 162. kodonu, a koja se označava još i kao polimorfizam L162V (248,255). Utvrđeno je da jača transkripcijska aktivnost gena PPAR α značajno korelira s prisutnošću G alela (162V) (264,265). Distribucija G alela varijante rs1800206 u europskoj populaciji iznosi od 2 – 4%, dok u ostalim ispitivanim

populacijama (azijska, afroamerička, populacija subsaharske Afrike), nije utvrđen polimorfizam rs1800206 (263).

Pregledavanjem znanstvene literature nismo pronašli niti jednu studiju koja je ispitivala povezanost polimorfizma L162V gena PPAR α s etiologijom/kliničkom ekspresijom shizofrenije.

1.9. Etiologija oslabljenog odgovora kože na niacin u bolesnika sa shizofrenijom

1.9.1. Povezanost niacinskog odgovora kože i genotipa

Samo je jedna studija dosad istražila povezanost niacinskog odgovora i genskih polimorfizama. Covault i sur. (266) su ispitali povezanost između jačine niacinske reakcije kože i polimorfne varijante C/T gena za FACL4 (engl. *long chain fatty acid-CoA ligase type 4*; Xq22.3), u bolesnika sa shizofrenijom i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika. Navedeni gen kodira enzim koji selektivno esterificira AA, DHA i EPA s koenzimom A (CoA) te omogućuje njihovu ponovnu ugradnju u molekule membranskih fosfolipida. U muških bolesnika, kao i pripadnika kontrolne skupine muškog spola, jačina niacinskog odgovora značajno je korelirala s prisutnošću T alela (266).

1.9.2. Povezanost niacinskog odgovora kože i sastava masnih kiselina eritrocita

Visok postotak bolesnika sa shizofrenijom pokazuje oslabljen odgovor kože na niacin (154,199). Deficit PUFA, napose LC-PUFA, poput AA i DHA u oboljelih, također je dobro opisan u znanstvenoj literaturi (70,71). Etiologija oslabljenog niacinskog odgovora kože u bolesnika sa shizofrenijom, međutim, još uvijek nije objašnjena, a rezultati malobrojnih studija koje su istraživale povezanost sadržaja masnih kiselina perifernih stanica (eritrocita) s jačinom niacinske reakcije u oboljelih nisu ujednačeni (172,174,175).

U studiji koju su proveli Glen i sur. (175) utvrđena je značajna povezanost između abnormalne reakcije na niacin evaluirane metodom vizualne inspekcije i smanjene koncentracije AA i DHA u membranama eritrocita oboljelih od shizofrenije. Maclean i sur. (174), međutim, nisu pronašli korelaciju između oslabljene niacinske reakcije detektirane metodom volumetrijskog niacinskog odgovora i deficita AA u membranama perifernih stanica oboljelih od shizofrenije. Naposljetku, u svojoj nedavnoj studiji, primjenom metode laserske doplerske floumetrije u evaluaciji jačine niacinske reakcije, Messamore i sur. (172) su uočili značajnu povezanost između jačine niacinskog odgovora i koncentracije adrenične kiseline (22:4n-6, ADA) u bolesnika, dok je u pripadnika kontrolne skupine, niacinski odgovor kože bio u korelaciji s koncentracijom AA.

2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Od shizofrenije boluje 0,5 – 1% svjetske populacije (1), zbog čega bolest predstavlja velik znanstveni interes, ali i izazov. Dosadašnja genetička i biokemijska istraživanja nisu uspjela rasvijetliti etiologiju shizofrenije niti dati rezultate primjenjive u široj kliničkoj praksi. Razjašnjenje etiologije shizofrenije otežava njezin poligeniski/multifaktorijski karakter i nepostojanje specifičnog biokemijskog testa koji bi omogućio dijagnozu bolesti.

Fosfolipidna membranska hipoteza mogla bi objediniti razne predložene hipoteze o nastanku ili podložnosti za pojavu shizofrenije, budući da poremećen sastav bioloških membrana implicira poremećaj neurorazvojnih procesa i različitih staničnih funkcija. Deficit membranskih PUFA i povišena aktivnost enzima iz superobitelji PLA2, impliciraju ulogu polimorfničkih varijanti gena uključenih u homeostazu PUFA i signalni put PLA2 kao mogućih čimbenika podložnosti za pojavu shizofrenije i/ili varijabilne kliničke ekspresije bolesti. S obzirom na poligeniski/multifaktorijski karakter shizofrenije, osobito bi zanimljiva mogla biti i njihova moguća interakcija. Rezultati dosadašnjih studija koje su ispitivale polimorfne varijante gena uključenih u navedene procese su kontradiktorni i, s izuzetkom polimorfizma BanI gena PLA2G4A, malobrojni. Nadalje, mali je broj studija istraživao povezanost polimorfizama gena PLA2 i PTGS2 s kliničkom ekspresijom bolesti. Iako je relativno često ispitivana vezano uz poremećaje metabolizma lipida i ugljikohidrata, polimorfna varijanta L162V gena PPAR α dosada nije istražena povezano s etiologijom shizofrenije. Inače, poremećen metabolizam lipida i ugljikohidrata, uočen je u bolesnika sa shizofrenijom, a posebice nakon terapije antipsihoticima. U skupini oboljelih tako je, uslijed spomenute terapije, utvrđena povišena koncentracija glukoze u krvi, veći rizik obolijevanja od dijabetesa, kao i veća sklonost razvoju dislipidemije (249). PPAR α ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma ugljikohidrata i lipida u organizmu, a od posebnog je značaja njegova uloga u

metabolizmu i homeostazi slobodnih masnih kiselina, posebice PUFA. Budući da su navedeni metabolički putevi poremećeni u shizofreniji, polimorfne varijante gena PPAR α , mogle bi, također, predstavljati čimbenik rizika za pojavu bolesti, ili modulirati njezinu kliničku ekspresiju.

U cilju otkrivanja specifičnih biokemijskih markera kojima bi se olakšala, upotpunila i poboljšala dijagnoza shizofrenog poremećaja, veliki broj istraživanja posvećen je ispitivanju oslabljene ili izostale kožne reakcije u bolesnika nakon aplikacije u vodi topivog vitamina B kompleksa - niacina (154,199). Širu kliničku primjenu niacinskog testa kožnog crvenila u dijagnozi shizofrenije, međutim, ograničava njegova nedostatna specifičnost, s obzirom da je oslabljen odgovor na niacin, uočen i u drugim neuropsihijatrijskim bolestima. Uzrok abnormalne kožne osjetljivosti na niacin još uvijek nije poznat. Sastav masnih kiselina perifernih stanica, posebice deficit PUFA, mogao bi pridonositi etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u bolesnika. Rezultati malobrojnih studija koje su istraživale povezanost niacinskog odgovora i sadržaja masnih kiselina perifernih stanica su kontradiktorni, a studije su prvenstveno usredotočene na masne kiseline obitelji n-6. Niti jedna novija studija nije istraživala povezanost niacinskog odgovora sa sadržajem masnih kiselina obitelji n-3, a osim toga, niti jedna dosadašnja studija nije ispitala povezanost kožne osjetljivosti na niacin s omjerima pojedinačnih i ukupnih masnih kiselina, te različitim indeksima, poput indeksa dvostrukih veza (engl. *double bond index* – DBI) i indeksa peroksidacije (engl. *peroxidisability index* – PI). Polimorfizmi gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 do sada nisu istraživani povezano s niacinskim odgovorom. S obzirom na spomenutu nasljednost abnormalnog niacinskog odgovora i činjenicu da abnormalna niacinska reakcija implicira abnormalno funkcioniranje metaboličke kaskade cPLA2/COX-2, polimorfne varijante gena navedene kaskade, mogle bi, između ostalog, pridonositi etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u bolesnika. Istraživanje etiologije abnormalnog niacinskog odgovora, stoga bi,

moglo doprinijeti daljnjem razumijevanju čimbenika uključenih u etiologiju shizofrenog poremećaja.

Nedvojbeno, daljnja istraživanja, kako s genetičkog, tako i s biokemijskog aspekta, kao i njihova poveznica, neophodni u rasvjetljavanju etiologije shizofrenije.

U okviru fosfolipidne membranske hipoteze u ovom je doktorskom radu istraživana signalni put PLA2 i testirano sljedeće:

1) polimorfizmi gena uključenih u signalni put PLA2 utječu na podložnost za razvoj shizofrenije i/ili moduliraju kliničku ekspresiju bolesti

2) polimorfizmi gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 i/ili sastav masnih kiselina perifernih stanica pridonose etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u bolesnika

Specifični ciljevi doktorskog rada bili su sljedeći:

1. A) analizirati učestalost genotipova i alela za polimorfne varijante gena:

- PLA2G4A (1q25) - cPLA2: rs10798059, polimorfizam A/G (BanI) u intronu 1
 - PLA2G6A (22q13.1) - iPLA2: rs4375, polimorfizam C/T u intronu 4
 - PLA2G4C (19q13.3) - cPLA2: rs1549637, polimorfizam A/T u intronu 16
 - PTGS2 (1q25.2-q25.3) - COX-2: rs689466, polimorfizam A/G u promotorskom mjestu
 - PPAR α (22q12-q13.1/22q13.31) - rs1800206, polimorfizam C/G (L162V) u egzonu 5
- u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem te kontrolnoj skupini

B) napraviti meta-analizu polimorfizma BanI gena PLA2G4A, s obzirom na veći broj studija koje su analizirale tu polimorfnu varijantu

C) ispitati utjecaj pojedinog polimorfizma i njihove moguće interakcije na dob prve hospitalizacije i ekspresiju bolesti mjerenu ocjenskim ljestvicama PANSS-a

2. istražiti etiologiju oslabljenog niacinskog odgovora kože u skupini bolesnika ispitivanjem njegove povezanosti sa:

A) polimorfnim varijantama gena metaboličke kaskade PLA2/COX-2 (BanI u PLA2G4A te rs689466 u PTGS2) i

B) sastavom masnih kiselina perifernih stanica (eritrocita)

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju su sudjelovali bolesnici s potvrđenom dijagnozom shizofrenije ili shizoafektivnog poremećaja utvrđenom prema DSM-IV klasifikaciji uz korištenje strukturiranog kliničkog intervjua (engl. *structured clinical interview* – SCID) i pripadnici zdrave kontrolne skupine. Shizoafektivni poremećaj spada u skupinu psihijatrijskih poremećaja srodnih shizofreniji u kojem se, uz psihotične simptome, poput onih prisutnih u shizofreniji, javljaju i poremećaji raspoloženja, kao što su depresija, manija te bipolarni afektivni poremećaj (267,268). Iako je prikupljen veći uzorak bolesnika, u istraživanje smo uključili samo one za koje smo posjedovali kompletne anamnestičke podatke o dijagnozi, dobi, dobi prve hospitalizacije i rezultatima ocjenске ljestvice PANSS psihopatologije.

Demografska i klinička obilježja ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju prikazana su u tablici 1. U istraživanje genetičke udruženosti uključena su 203 kronična bolesnika s dijagnozom shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja, kao i 191 pripadnik kontrolne skupine. Periferna krv bolesnika prikupljena je u razdoblju između 2007. i 2010. godine, a izolirana DNA je pohranjena na -20 °C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci sve do analize. Radi se o bolesnicima hospitaliziranim na Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka zbog ponovljene psihotične epizode (N = 110) ili u Psihijatrijskoj bolnici Rab (N = 93). Za kontrolu je korištena izolirana DNA dobrovoljnih davatelja krvi u dobi između 18 i 60 godina, koji ne uzimaju redovito lijekove te ih se, stoga, može smatrati zdravim predstavnicima opće populacije. Navedena DNA prikupljena je u ranijem vremenskom periodu i pohranjena u banci DNA na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci. Od ukupnog broja bolesnika (N = 203), formirana je skupina od njih 79 (ti su bolesnici uključivani sukcesivno), u kojoj je

Tablica 1. Demografske i kliničke značajke ispitanika¹

	Analize genetičke udruženosti		Niacinski test kožnog crvenila		Određivanje masnih kiselina eritrocita	
	Bolesnici (N = 203)	Kontrole (N = 191)	Bolesnici (N = 79)	Kontrole (N = 80)	Bolesnici (N = 20)	Kontrole (N = 20)
Spol^a (muškarci/žene)	111/92	87/104	45/34	31/49	8/12	9/11
Dob (godine)^{b, d}	43,3 ± 11,8	45,8 ± 12,7	43,2 ± 10,7	37,4 ± 13,3	45,5 ± 12,4	34,6 ± 6,5
Dob prve hospitalizacije (godine)	27,2 ± 8,3	-	28,2 ± 8,8	-	24,9 ± 8,3	-
Pušači/^c nepušači	-	-	51/28	26/54	11/20	6/14
Težina pozitivnih simptoma (zbroy bodova PANSS-a)	26,6 ± 5,3	-	26,9 ± 4,8	-	26,8 ± 5,4	-
Težina negativnih simptoma (zbroy bodova PANSS-a)	29,5 ± 6,1	-	30,9 ± 6,6	-	29,5 ± 6,0	-
Težina općih simptoma (zbroy bodova PANSS-a)	52,5 ± 6,7	-	54,1 ± 7,6	-	52,2 ± 6,9	-
Težina (ukupnih simptoma (zbroy bodova PANSS-a)	108,6 ± 13,2	-	111,9 ± 13,6	-	108,5 ± 13,7	-

¹ razlike između ispitanika su ispitane jednosmjernim ANOVA testom
 niacinski test kožnog crvenila: ^a F = 5,04, P < 0,05; ^b F = 8,55, P < 0,01; ^c F = 18,00, P < 0,001
 određivanje masnih kiselina eritrocita: ^d F = 11,04, P < 0,01

provedeno testiranje kožne osjetljivosti na niacin. S obzirom da pripadnike kontrolne skupine koji su sudjelovali u istraživanju genetičke udruženosti nije bilo moguće uključiti u testiranje kožne osjetljivosti na niacin, formirana je nova kontrolna skupina od 80 ispitanika, zaposlenika bolnice ili fakulteta, bez osobne ili obiteljske anamneze duševnih bolesti. Testiranje osjetljivosti na niacin u bolesnika i kontrolne skupine je provedeno u Klinici za psihijatriju KBC-a Rijeka, Psihijatrijskoj bolnici Rab i Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Analiza sadržaja masnih kiselina u membranama perifernih stanica (eritrocita) napravljena je na uzorku od 20 bolesnika, izabranih sukcesivno među 79 iz prethodne skupine. Prikupljeni su i novi uzorci periferne krvi 20 zdravih osoba, bez osobne ili obiteljske anamneze duševnih bolesti koje posjećuju liječnika opće/obiteljske medicine. Analiza masnih kiselina je napravljena na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Podatke o dobi nastupa bolesti pribavili su specijalisti psihijatri KBC-a Rijeka i Psihijatrijske bolnice Rab, pri čemu je dob prve hospitalizacije uzeta u obzir kao približna dob početka bolesti. Evaluacija PANSS psihopatologije provedena je u akutnoj fazi bolesti tijekom posljednje hospitalizacije, a proveli su je specijalisti psihijatri KBC-a Rijeka. Naime, klinička praksa je da se svi bolesnici najprije obrađuju u KBC-u Rijeka, a zatim se, prema potrebi produženoga liječenja, upućuju u Psihijatrijsku bolnicu Rab. Svi bolesnici koji su sudjelovali u našem istraživanju uzimali su antipsihotičnu farmakoterapiju.

Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta u Rijeci i KBC-a Rijeka odobrila su predloženo istraživanje 2006. godine prilikom prijave znanstveno-istraživačkog projekta, a odobrenje Povjerenstva za etička pitanja Psihijatrijske bolnice Rab ishodovano je 2009. godine. Cjelokupno je istraživanje provedeno u skladu s Nürnberškim kodeksom, kao i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Pri tome su poštovani temeljni etički i bioetički

principi, kao što su osobni integritet (autonomnost), pravednost, neškodljivost i dobročinstvo (269). Tijekom istraživanja bila je osigurana privatnost (medicinska tajna) svih ispitanika i zaštita tajnosti podataka. Ispitanici su se prethodno upoznali sa svrhom i metodologijom same studije, a njihov je pristanak za sudjelovanje u istraživanju potvrđen davanjem pismene suglasnosti.

Cjelokupno istraživanje je provedeno u okviru plana predloženog u znanstveno-istraživačkom projektu “Genetika metabolizma fosfolipida u shizofreniji” (br. 062-0982522-0369), prihvaćenog 2007. godine i financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, a izrađeno je na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku u suradnji sa Zavodom za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Klinikom za psihijatriju KBC-a Rijeka i Psihijatrijskom bolnicom Rab.

3.2. Metode

3.2.1. Molekularno genetička analiza

3.2.1.1. Izolacija DNA

Ispitanicima je izvađeno po 3 ml periferne krvi koja je do DNA izolacije zamrznuta u epruветama s antikoagulansom (EDTA) na -20 °C. Genomsku DNA izolirali smo iz dobivene periferne krvi pomoću kitova prema protokolima proizvođača (FlexiGene DNA kit 250; QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka), a uzorke DNA pohranili smo na -20 °C do provođenja analize.

3.2.1.2. Analiza polimorfizama gena PLA2 i PTGS2

Za identifikaciju ispitivanih polimorfniх varijanti u navedenim genima koristili smo metodu lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR), nakon koje je uslijedila restrikcija pomoću odgovarajućih restrikcijskih endonukleaza (engl. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP). PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl sadržavala je 1 x PCR pufer, 2 mM MgCl₂, 0,24 mM dNTP, 10 mM Tris, 12,5 pM svake početnice i 0,5 U Taq polimeraze. Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u uređaju za PCR (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Germany). Temperaturni uvjeti PCR reakcije uključivali su početnu denaturaciju (95 °C/5 minuta), nakon koje je uslijedilo 35 – 40 ciklusa denaturacije (50 sekundi/95 °C), spajanja početnica (50 sekundi/56 – 60°C) i produljivanja lanaca (60 sekundi/72 °C) te završni korak produljivanja lanaca (5 minuta/72 °C). Umnožene PCR produkte analizirali smo u serijama od po 20 – 60 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez prisustva DNA uzorka) i pozitivnu kontrolu (poznati DNA uzorak) metodom elektroforeze u trajanju od 25 – 30 minuta pri 80 V. Pri tome smo po 6 µl PCR produkta i 2 µl ksilen-cijanola nanosili na 1%-tni agarozni gel u koji smo

prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. UV-svjetlom transiluminatora vizualizirali smo umnoženi PCR produkt čiju smo veličinu utvrđivali primjenom DNA standarda od 100 pb. Nakon umnažanja, napravili smo restrikciju PCR produkta pomoću odgovarajućih restrikcijskih enzima. Restrikcijsku smjesu ukupnog volumena 20 μ l koja je sadržavala 10 μ l PCR produkta, 2 μ l odgovarajućeg pufera i 0,2 μ l restrikcijskog enzima zatim smo inkubirali 20 – 24 sata (preko noći) u vodenoj kupelji pri temperaturi 37 °C. Restrikcijske fragmente (8 μ l restrikcijskog fragmenta + 2 ksilen-cijanola) odvojili smo elektroforezom u trajanju od 45 minuta pri 80 V na 2%-tnom agaroznom gelu u koji smo dodali 0,1 mg/ml etidium bromida. Fragmente smo analizirali pod UV-svjetlom transiluminatora, a njihovu smo veličinu utvrdili primjenom DNA standarda od 100 pb. Početnice i restrikcijske enzime za analizu polimorfnih varijanti gena PLA2G4A, PLA2G6 i PTGS2 preuzeli smo iz literature (205,243).

3.2.1.3. Analiza polimorfizma gena PPAR α

Za identifikaciju ispitivane polimorfne varijante gena PPAR α koristili smo isključivo PCR metodu. PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μ l sadržavala je 1 x PCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 24 pM svake početnice i 0,5 U Taq polimeraze. Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u uređaju za PCR (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Germany). Uvjeti PCR reakcije uključivali su početnu denaturaciju (95 °C/15 minuta), nakon koje je uslijedilo 30 ciklusa denaturacije (45 sekundi/95 °C), spajanja početnica (45 sekundi/57 °C) i produljivanja lanaca (45 sekundi/72 °C) te završni korak produljivanja lanaca (10 minuta/72 °C). Umnoženi PCR produkti analizirani su u manjim serijama od po 10 – 20 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez prisustva DNA uzorka) i pozitivnu kontrolu (poznati DNA uzorak) metodom elektroforeze u trajanju od 30 – 35 minuta pri 80 V. Osam μ l umnoženog PCR produkta i 2 μ l ksilen-cijanola nanosili smo na 2%-tni

agarozni gel u koji smo prethodno dodali 0,1 mg/ml etidium bromida, a prilikom utvrđivanja veličine PCR produkta korišten je DNA standard od 100 pb.

Za analizu polimorfizma gena PPAR α pripremili smo dvije PCR reakcijske smjese, pri čemu je svaka od njih sadržavala COM-L162V početnicu. U prvu PCR reakcijsku smjesu dodana je A-L162 početnica (za identifikaciju L162 alela), dok je druga PCR reakcijska smjesa sadržavala B-V162 početnicu (za identifikaciju V162 alela). Provođenjem dviju PCR reakcija, a na temelju prisutnosti produkta (samo u PCR reakciji koja je sadržavala prvu reakcijsku smjesu, samo u PCR reakciji koja je sadržavala drugu reakcijsku smjesu te objema reakcijama) detektirale su se tri moguće genotipske varijante (L162L, L162V, V162V). Početnice i temperaturni uvjeti PCR reakcije za analizu ispitivanog polimorfizma gena PPAR α preuzeti su iz literature (245).

Slijedovi početnica za ispitivane polimorfne varijante, temperatura spajanja početnica, veličina PCR produkata, restrikcijski enzimi i veličina restrikcijskih fragmenata prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Osnovni podaci za genetičku analizu ispitivanih genskih polimorfizama gena PLA2, PTGS2 i PPAR α

polimorfna varijanta	polimorfni nukleotidi	početnice	Ts	PCR produkt	restrikcijski enzim	restrikcijski fragmenti
PLA2G4A - rs10798059	A/G	F: AAGGGATATTTGTAGAGGACT	56 °C	790 bp	<i>BanI</i>	453 bp
		R: TAGATGATTCGATTTTATGACT				337 bp
PLA2G6 - rs4375	C/T	F: GGGGTTTATTTGCTGGGTT	60 °C	380 bp	<i>BlnI</i>	197 bp
		R: CAAGGGTGATGGGGAGATC				183 bp
PLA2G4C - rs1549637	A/T	F: TCCTCCTGTGGAGCTCTTGT	58 °C	453 bp	<i>BglII</i>	268 bp
		R: AGGGAGGAAAGCACCAGTTT				185 bp
PTGS2 - rs689466	A/G	F: TCTCACCTCACATGCTCCT	60 °C	237 bp	<i>PvuII</i>	164 bp
		R: TCTTTTCTGTCCACTTTTCCAA				73 bp
PPARα - rs1800206 (L162V)	C/G	COM-L162V: TGA C TTCGAATGCTGCCTCAT	57 °C	684 bp	-	-
		A-L162: GACATCCCGACAGAAAG				
		B-V162: GACATCCCGACAGAAAC				

F = forward, R = reverse, Ts = temperatura spajanja početnica

3.2.2. Test kožnog crvenila nakon lokalne primjene niacina

Na kožu volarne strane podlaktice nanijeli smo četiri flastera približnih dimenzija 1 x 1 cm, pri čemu je svaki od njih sadržavao otopinu niacina (engl. *aqueous methyl nicotinate* – AMN) različite koncentracije (0,1 M, 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M) (177). Flastere smo uklonili nakon 5 minuta, a rezultate reakcije na niacin (pojava crvenila, odnosno edema) očitavali smo u 5-minutnim vremenskim intervalima tijekom 15 minuta. U vrednovanju jačine niacinske reakcije koristili smo prethodno opisanu skalu po Wardu (177): 0 = nema crvenila; 1 = minimalno crvenilo; 2 = umjereno crvenilo; 3 = maksimalno crvenilo praćeno edemom. Niacinski odgovor kože su procjenjivala dva nezavisna procjenitelja uz izračun srednje vrijednosti njihovih mjerenja i interoperverske pogreške. Prema VNR metodi evaluacije niacinskog odgovora (182), za svakog smo ispitanika zbrojili vizualne skorove procijenjene tijekom tri navedena vremenska intervala. Ovisno o koncentraciji niacinske otopine, izračunali smo VNR1 za 0,1 M koncentraciju, VNR2 za 0,01 M koncentraciju, VNR3 za 0,001 M koncentraciju i VNR4 za najslabiju, 0,0001 M koncentraciju niacina, kao i ukupni VNR za svakoga ispitanika. Ukupni VNR izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{VNR} = \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^3 r_{c_i t_j}; \text{ pri tome je: } c_i = (0,00001) 10^i \text{ M}; t_j = 300j \text{ s}$$

Navedena metoda je uključila kontinuirano praćenje odgovora na niacin kroz tri vremenska intervala za određenu AMN koncentraciju, i budući da je rezultirala jedinstvenim VNR skorom, omogućila je maksimalnu iskoristivost dobivenih/raspoloživih podataka u statističkim analizama. Otopine niacina pripravljene su neposredno prije provođenja testa i bile su dobro zaštićene od izlaganja sunčevoj svjetlosti. Prije provođenja testiranja osjetljivosti na niacin provedeni su pregled i anamnestička obrada ispitanika zbog evidentiranja oboljenja ili farmakoterapije koji bi mogli utjecati na rezultate niacinskog

testiranja. Svi bolesnici testirane skupine kontinuirano su uzimali antipsihotičnu farmakoterapiju. Ukoliko je ispitanik zadnjih tjedan dana uzimao aspirin ili druge protuupalne lijekove isključen je iz testiranja, budući da navedeni lijekovi, inhibicijom aktivnosti enzima COX-2, koče sintezu prostaglandina. Testiranju kožnog crvenila na niacin, također, nisu bili podvrgnuti ispitanici koji su bolovali od kožnih bolesti poput ekzema, psorijaze i sl.

3.2.3. Određivanje masnih kiselina eritrocita

Za određivanja masnih kiselina koristili smo eritrocite, budući da je dokazano da sadržaj masnih kiselina njihovih membrana odgovara sadržaju u membranama stanica središnjeg živčanog sustava (9).

Za potrebe određivanja sadržaja masnih kiselina ispitanicima je izvađeno po 3 ml periferne krvi koja je zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom (EDTA) na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja pune krvi i odvajanja seruma, iz sedimenta smo izdvojili eritrocite. Sediment smo trokratno ispirali 0,9%-tnom otopinom amonij klorida (NH_4Cl) da bi odvojili ostale krvne stanice, a eritrocite smo, s ciljem liziranja, sonificirali u ultrazvučnoj kupelji tijekom 5 minuta u 0,09%-tnoj otopini natrij klorida (NaCl).

Izdvajanje ukupnih lipida eritrocita proveli smo metodom po Folch-u (270) uz male modifikacije. Smjesu kloroform : metanol (2 : 1, v/v) koja je sadržavala 0,01%-tni butilhidroksitoluen i 0,9%-tnu otopinu NaCl , dodali smo u lizat eritrocita, nakon čega smo sve snažno izmučkali i pohranili u hladnjaku na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom sat vremena. Nakon ponovljenog postupka, Pasteurovom pipetom smo uklonili gornji sloj, a donji sloj (organski) ispustili kroz bezvodni natrij sulfat (Na_2SO_4) u prethodno izvaganu kruškoliku tikvicu. Eluat smo zatim uparili do suha pomoću rotacijskog uparivača. Ukupni lipidi su metanolizirani smjesom reagensa za metiliranje koja je sadržavala metanol/*n*-heksan/sumpornu kiselinu (75:21:1, v/v/v) pri temperaturi od $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon provedene metanolize, metilni esteri masnih kiselina

ekstrahirani su pomoću petroletera (271) i analizirani korištenjem metode plinske kromatografije (engl. *gas chromatography* – GC).

Plinsko-kromatografska analiza metilnih estera masnih kiselina provedena je na uređaju Autosystem XL (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) uz plameno-ionizacijski detektor (engl. *flame-ionization detector* – FID) i Perkin-Elmer Nelson (Turbochrom 4, rev.4.1.) softver. Vodik je dobiven Claind generatorom vodika. Po 3 µl metilnih estera masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters* – FAME) koji su prethodno otopljeni u kloroformu injektirali smo u plinski kromatograf. Korištena je SP-2330 kapilarna kolona (Supelco, Bellefonte, PA, USA) dimenzija 30 m x 0.32 mm x 0,2 µm, a plin nosilac bio je helij uz split injektiranje (100:1). Temperaturni uvjeti bili su od 140 °C do 220 °C, uz rast 5 °C min⁻¹ i nakon toga izotermno 25 minuta; temperatura detektora iznosila je 350 °C, a injektora 300 °C.

Relativna koncentracija pojedinačnih SFA, mononezasićenih masnih kiselina (engl. *monounsaturated fatty acid* – MUFA) i PUFA prikazana je kao postotak (%) od ukupnih masnih kiselina. U analizu su uključene glavne SFA, MUFA i PUFA reda n-3 i n-6 te sljedeći omjeri: AA/LA, EPA/AA, DHA/AA, ADA/AA, EPA/DHA, PUFA/SFA, PUFA/MUFA i n-3/n-6. Gustoća dvostrukih veza u membrani prikazana je formulom:

DBI = Σ % nezasićenih masnih kiselina x broj dvostrukih veza u svakoj od nezasićenih masnih kiselina. Osjetljivost membrana na peroksidaciju prikazana je formulom:

PI = [(0,025 × Σ mol % masnih kiselina s jednom dvostrukom vezom) + (1 × Σ mol % masnih kiselina s dvije dvostruke veze) + (2 × Σ mol % masnih kiselina s tri dvostruke veze) + (4 × Σ mol % masnih kiselina s četiri dvostruke veze) + (6 × Σ mol % masnih kiselina s pet dvostrukih veza) + (8 × Σ mol % masnih kiselina sa šest dvostrukih veza)].

3.2.4. Statistička obrada podataka

U statističkoj obradi podataka koristili smo računalne programe Statistica for Windows, inačica 9 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) i Comprehensive Meta-Analysis software, inačica 2.0 (Biostat International, Inc). P vrijednosti manje od 0,05 ($P < 0,05$) smatrane su statistički značajnima.

3.2.4.1. Analize genetičke udruženosti

3.2.4.1.1. Analiza frekvencija genotipova i alela ispitivanih genskih polimorfizama

Za usporedbu učestalosti ispitivanih genotipskih i alelnih varijanti između bolesnika i kontrolne skupine koristili smo χ^2 -test. Međusobna interakcija pojedinih alela analiziranih polimorfizama kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak shizofrenije i shizofektivnog poremećaja, ispitana je određivanjem čimbenika sinergije (272). Nadalje, omjer izgleda (engl. *odds ratio* – OR) i pripadajući 95%-tni raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval* – CI) izračunati su kako bi se procijenio učinak kombinacija različitih genotipova na podložnost za razvoj bolesti.

3.2.4.1.2. Meta-analiza polimorfizma *BanI* gena *PLA2G4A*

Glavnina literaturnih podataka za provedbu meta-analize navedene polimorfne varijante dobivena je pretraživanjem elektronske baze podataka Schizophrenia research forum (12). Nadalje, pregledane su i elektronske baze podataka Scopus i PubMed, pri čemu su kao ključne riječi korištene "schizophrenia + phospholipase A2, schizophrenia + *BanI* polymorphism". Zaključno s datumom 23. 12. 2011., pronašli smo sedam studija genetičke udruženosti te tri obiteljske studije koje su zadovoljavale potrebne kriterije za provedbu meta-analize. Kriteriji su uključivali: 1) ispitivanje povezanosti varijante *BanI* s etiologijom shizofrenije 2) objavljivanje originalnih rezultata u znanstvenim časopisima s recenzijskim

postupkom, 3) sudjelovanje više od pedeset ispitanika u istraživanju 4) objava dovoljne količine podataka za izračun veličine učinka. Nekoliko pronađenih studija isključili smo iz daljnje analize, budući da nisu sadržavale dovoljno podataka za izračun veličine učinka (273), jer su sadržavale podatke koji su objavljeni kao dio kasnijih, većih studija (99,201,202), ili su analizirale drugi polimorfizam (poli-A polimorfizam) (211).

Vrijednost OR-a $> 1,0$ u meta-analizi upućuje na pozitivnu povezanost ispitane varijable (G alela, odnosno GG genotipa polimorfne varijante BanI) s bolešću. Statistička značajnost zajedničkih OR vrijednosti ispitana je z-testom. Q-testom heterogenosti, koji se temelji na χ^2 -analizi, ispitana je heterogenost grupa koje su sudjelovale u istraživanju.

3.2.4.2. Povezanost kliničkih varijabli i istraženih genskih polimorfizama

Kliničke varijable su opisane deskriptivnom statistikom (srednje vrijednosti, standardne devijacije). Povezanost kliničkih varijabli s istraženim polimorfnim varijantama testirana je stupnjevitom multiplom regresijskom analizom. Klinička ekspresija bolesti evaluirana je kroz prosječnu dob prve hospitalizacije i težinu kliničkih simptoma bolesti mjerenu ocjenskim ljestvicama PANSS-a.

Prosječna dob prve hospitalizacije uzeta je kao približna dob početka bolesti i predstavljala je zavisnu varijablu u prvoj regresijskoj analizi. Zavisne varijable u drugoj regresijskoj analizi predstavljale su vrijednosti zbrojeva pozitivnih, negativnih, općih i ukupnih simptoma ocjenske ljestvice PANSS psihopatologije. Nezavisne varijable u obje analize bile su sljedeće: 1) genotipovi polimorfnih varijanti gena (rs10798059 za PLA2G4A, rs4375 za PLA2G6, rs1549637 za PLA2G4C, rs689466 za PTGS2 i rs1800206 za PPAR α ; ispitaniku smo ovisno o genotipu pridružili broj 1, 2 ili 3, pri čemu je broj 2 označavao heterozigotnu varijantu, a brojevi 1 i 3 označavali su homozigotne genotipske varijante), 2) prisutnost pojedinih alela u testiranim genotipovima (ispitaniku smo pridružili broj 1 ukoliko

je njegov genotip sadržavao određeni alel ili broj 0, ukoliko ga nije sadržavao, odnosno, ako je bio homozigot za drugi alel), 3) međusobne kombinacije PLA2G4A/PLA2G6, PLA2G4A/PLA2G4C, PLA2G4A/PTGS2 i PLA2G6/PLA2G4C genotipova i 4) kombinacije pojedinih alela dvaju polimorfizama (G i C alela u PLA2G4/PLA2G6 kombinaciji, G i T alela u PLA2G4A/PLA2G4C kombinaciji, G i G alela u PLA2G4A/PTGS2 te C i T alelnih varijanti u PLA2G6/PLA2G4C kombinaciji).

Zbog postojanja velikog broja nezavisnih varijabli, za svaku smo zavisnu varijablu proveli nekoliko regresijskih analiza. Rezultirajući prediktori zatim su uvršteni u završnu regresijsku analizu.

3.2.4.3. Povezanost istraženih genetičkih polimorfizama i sadržaja masnih kiselina eritrocita s volumetrijskim niacinskim odgovorom kože

Korištenjem stupnjevite multiple regresijske analize ispitali smo mogući učinak polimorfničkih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2 na srednju vrijednost ukupnog VNR-a u skupini bolesnika. Srednja vrijednost ukupnog VNR-a predstavljala je zavisnu varijablu, dok su nezavisne varijable bile sljedeće: 1) koncentracija otopine niacina, 2) prisutnost PLA2G4A-A alela, 3) prisutnost PLA2G4A-G alela, i 4) prisutnost PTGS2-G alela.

Jednosmjernim ANOVA testom analizirali smo osjetljivost na niacin (skorove VNR1-4) ovisno o alelnim varijantama gena PLA2G4A i PTGS2. Skorove VNR1-4 smo prikazali deskriptivnom statistikom (srednje vrijednosti, standardne devijacije). Podudarnost rezultata testiranja osjetljivosti na niacin između dvaju procjenitelja ispitali smo Weighted kappa testom.

Faktorskim ANOVA testom ispitali smo mogući učinak spola i konzumacije duhana na osjetljivost na niacin u bolesnika i kontroli, dok je učinak dobi ispitanika na jačinu niacinskog odgovora testiran Spearmanovim testom korelacije rangova. Faktorskim ANOVA

testom provjerili smo i moguću interakciju alelnih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2 na jačinu niacinske reakcije kože u bolesnika.

Razliku u sadržaju masnih kiselina eritrocita između bolesnika i pripadnika kontrolne skupine testirali smo Mann-Whitney *U*-testom. Pomoću stupnjevite multiple regresijske analize ispitali smo moguću povezanost oslabljenog niacinskog odgovora sa sadržajem masnih kiselina eritrocita bolesnika. Zavisne varijable u regresijskim analizama predstavljale su srednje vrijednosti skorova VNR1-4, dok su nezavisne varijable bile sljedeće: 1) sadržaj pojedinačnih glavnih masnih kiselina, 2) sadržaj ukupnih masnih kiselina (SFA, MUFA, PUFA), 3) indeksi DBI i PI i 4) omjeri masnih kiselina (navedeni u 3.2.3.).

4. REZULTATI

4.1. Učestalost genotipova i alela istraženih polimorfnih varijanti

Učestalost genotipova i alela ispitanih genskih polimorfizama prikazana je u tablici 3. Distribucije genotipova svih testiranih polimorfnih genskih varijanti podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi. Nismo utvrdili statistički značajnu razliku u frekvenciji ispitanih genotipova i alela između bolesnika i pripadnika kontrolne skupine ($P > 0,05$). Također, nismo utvrdili značajnu razliku u distribuciji genotipova i alela testiranih polimorfnih varijacija između spolova ($P > 0,05$) (podaci nisu prikazani).

Istraživanje je imalo dovoljnu statističku snagu (80%) za detekciju 1,3 puta veće promjene učestalosti PLA2G4A-A i PLA2G6-C alela, 1,7 puta veće promjene učestalosti PLA2G4C-T i PTGS2-G alela te 2,5 puta veće promjene učestalosti PPAR α -V162 alela (274).

Tablica 3. Učestalost genotipova i alela polimorfizama gena PLA2, PTGS2 i PPAR α

	Genotipovi			Aleli	
PLA2G4A^a - rs10798059	AA	AG	GG	A	G
bolesnici	31 (15,3%)	91 (44,8%)	81 (39,9%)	153 (37,7%)	253 (62,3%)
kontrole	30 (15,7%)	87 (45,6%)	74 (38,7%)	147 (38,5%)	235 (61,5%)
PLA2G6^b - rs4375	TT	CT	CC	T	C
bolesnici	65 (32,0%)	104 (51,2%)	34 (16,8%)	234 (57,6%)	172 (42,4%)
kontrole	66 (34,6%)	85 (44,5%)	40 (20,9%)	217 (56,8%)	165 (43,2%)
PLA2G4C^c - rs1549637	AA	AT	TT	A	T
bolesnici	146 (71,9%)	51 (25,1%)	6 (3,0%)	343 (84,5%)	63 (15,5%)
kontrole	141 (73,8%)	44 (23,0%)	6 (3,2%)	326 (85,3%)	56 (14,7%)
PTGS2^d - rs689466	AA	AG	GG	A	G
bolesnici	151 (74,4%)	50 (24,6%)	2 (1,0%)	352 (86,7%)	54 (13,3%)
kontrole	140 (73,3%)	43 (22,5%)	8 (4,2%)	323 (84,6%)	59 (15,4%)
PPARα^e - rs1800206	L162L	L162V	V162V	L162	V162
bolesnici	185 (91,1%)	18 (8,9%)	-	388 (95,6%)	18 (4,4%)
kontrole	173 (90,6%)	18 (9,4%)	-	364 (95,3%)	18 (4,7%)

^a Hardy-Weinberg: bolesnici $\chi^2 = 0,42$, P = 0,52; kontrole $\chi^2 = 0,28$, P = 0,60
 χ^2 test: genotipovi $\chi^2 = 0,06$, P = 0,97; aleli $\chi^2 = 0,05$, P = 0,82

^b Hardy-Weinberg: bolesnici $\chi^2 = 0,49$, P = 0,48; kontrole $\chi^2 = 1,66$, P = 0,20
 χ^2 test: genotipovi $\chi^2 = 2,04$, P = 0,36; aleli $\chi^2 = 0,06$, P = 0,81

^c Hardy-Weinberg: bolesnici $\chi^2 = 0,35$, P = 0,55; kontrole $\chi^2 = 1,20$, P = 0,27
 χ^2 test: genotipovi $\chi^2 = 0,24$, P = 0,89; aleli $\chi^2 = 0,11$, P = 0,74

^d Hardy-Weinberg: bolesnici $\chi^2 = 0,94$, P = 0,33; kontrole $\chi^2 = 3,64$, P = 0,06
 χ^2 test: genotipovi $\chi^2 = 4,18$, P = 0,12; aleli $\chi^2 = 0,74$, P = 0,39

^e Hardy-Weinberg: bolesnici $\chi^2 = 0,44$, P = 0,51; kontrole $\chi^2 = 0,47$, P = 0,49
 χ^2 test: genotipovi $\chi^2 = 0,04$, P = 0,85; aleli $\chi^2 = 0,04$, P = 0,85

4.2. Sinergija polimorfizama gena PLA2 i PTGS2

Moguću interakciju polimorfnihi varijanti gena PLA2 i PTGS2 u podložnosti za razvoj shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja testirali smo pomoću kombinacija genotipova i alela. Tri moguća genotipa varijante rs10798059 (polimorfizam BanI) gena PLA2G4A tako smo kombinirali s tri genotipske varijante svakog od sljedećih polimorfizama: rs4375 gena PLA2G6, rs1549637 gena PLA2G4C te rs689466 gena PTGS2, a osim toga, ispitali smo i učestalost kombinacija genotipova polimorfnihi varijanti rs4375 i rs1549637 (geni PLA2G6 i PLA2G4C) (tablice 4 - 7). Samo je kombinacija CT genotipa gena PLA2G6 i AT genotipa gena PLA2G4C bila statistički značajno češće prisutna u bolesnika (OR = 2,2, CI = 1,1 - 4,3, z = 2,30, P = 0,02) (tablica 7). Kombinacije svih ostalih genotipskih varijanti bile su podjednako zastupljene u obje skupine (P > 0,05). Analizom po spolu, također, nismo pronašli značajne razlike u učestalosti kombinacija genotipova (P > 0,05) (podaci nisu prikazani).

Tablica 4. Učestalost kombinacija genotipova polimorfnih varijanti rs10798059 i rs4375

PLA2G4A - rs10798059	PLA2G6 - rs4375	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR (95% CI)	z	P
Genotip						
AA	TT	12 (5,9%)	15 (7,9%)	0,7 (0,3 - 1,6)	0,76	0,45
AA	CT	14 (6,9%)	12 (6,3%)	1,1 (0,5 - 2,5)	0,25	0,81
AA	CC	5 (2,5%)	3 (1,6%)	1,6 (0,4 - 6,7)	0,62	0,53
AG	TT	28 (13,8%)	30 (15,7%)	0,9 (0,5 - 1,5)	0,54	0,59
AG	CT	45 (22,1%)	36 (18,9%)	1,2 (0,8 - 2,0)	0,81	0,42
AG	CC	18 (8,9%)	21 (11,0%)	0,8 (0,4 - 1,5)	0,71	0,48
GG	TT	25 (12,3%)	21 (11,0%)	1,1 (0,6 - 2,1)	0,41	0,68
GG	CT	45 (22,2%)	37 (19,3%)	1,2 (0,7 - 1,9)	0,68	0,50
GG	CC	11 (5,4%)	16 (8,3%)	0,6 (0,3 - 1,4)	1,15	0,25

OR – *engl. odds ratio* - omjer izgleda, CI – *engl. confidence interval* - raspon pouzdanosti

Tablica 5. Učestalost kombinacija genotipova polimorfnih varijanti rs10798059 i rs1549637

PLA2G4A - rs10798059	PLA2G4C - rs1549637	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR (95% CI)	z	P
Genotip						
AA	AA	23 (11,3%)	23 (12,1%)	0,9 (0,5 - 1,7)	0,22	0,83
AA	AT	8 (3,9%)	7 (3,7%)	1,1 (0,4 - 3,0)	0,14	0,89
AA	TT	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-	-	-
AG	AA	67 (33,0%)	68 (35,6%)	0,9 (0,6 - 1,4)	0,54	0,59
AG	AT	20 (9,9%)	17 (8,9%)	1,1 (0,6 - 2,2)	0,32	0,75
AG	TT	4 (2,0%)	2 (1,0%)	1,9 (0,3 - 10,5)	0,74	0,46
GG	AA	56 (27,6%)	50 (26,2%)	1,1 (0,7 - 1,7)	0,32	0,75
GG	AT	23 (11,3%)	20 (10,5%)	1,1 (0,6 - 2,1)	0,27	0,78
GG	TT	2 (1,0%)	4 (2,0%)	0,5 (0,1 - 2,6)	0,88	0,38

OR – *engl. odds ratio* - omjer izgleda, CI – *engl. confidence interval* - raspon pouzdanosti

Tablica 6. Učestalost kombinacija genotipova polimorfnih varijanti rs10798059 i rs689466

PLA2G4A - rs10798059	PTGS2 - rs689466	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR (95% CI)	z	P
Genotip						
AA	AA	18 (8,9%)	16 (8,4%)	1,1 (0,5 - 2,2)	0,17	0,86
AA	AG	13 (6,4%)	7 (3,7%)	1,8 (0,7 - 4,6)	1,22	0,22
AA	GG	0 (0,0%)	7 (3,7%)	0,1 (0,0 - 1,1)	1,92	0,06
AG	AA	61 (30,0%)	56 (29,3%)	1,0 (0,7 - 1,6)	0,16	0,87
AG	AG	28 (13,8%)	30 (15,7%)	0,9 (0,5 - 1,5)	0,54	0,59
AG	GG	2 (1,0%)	1 (0,5%)	1,9 (0,2 - 21,0)	0,52	0,60
GG	AA	72 (35,5%)	68 (35,6%)	1,0 (0,7 - 1,5)	0,03	0,98
GG	AG	9 (4,4%)	6 (3,1%)	1,4 (0,5 - 4,1)	0,67	0,51
GG	GG	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,9 (0,0 - 47,7)	0,03	0,98

OR – *engl. odds ratio* - omjer izgleda, CI – *engl. confidence interval* - raspon pouzdanosti

Tablica 7. Učestalost kombinacija genotipova polimorfnih varijanti rs4375 i rs1549637

PLA2G6 - rs4375	PLA2G4C - rs1549637	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR (95% CI)	z	P
Genotip						
TT	AA	50 (24,6%)	48 (25,1%)	1,0 (0,6 - 1,5)	0,12	0,91
TT	AT	15 (7,4%)	17 (8,9%)	0,8 (0,4 - 1,7)	0,55	0,58
TT	TT	0 (0,0%)	1 (0,5%)	0,3 (0,0 - 7,7)	0,71	0,48
CT	AA	69 (34,0%)	68 (35,6)	0,9 (0,6 - 1,4)	0,34	0,74
CT	AT	30 (14,7%)	14 (7,3%)	2,2 (1,1 - 4,3)	2,30	0,02
CT	TT	5 (2,5%)	3 (1,6%)	1,6 (0,4 - 6,7)	0,62	0,53
CC	AA	27 (13,3%)	25 (13,1%)	1,0 (0,6 - 1,8)	0,06	0,95
CC	AT	6 (3,0%)	13 (6,8%)	0,4 (0,2 - 1,1)	1,73	0,08
CC	TT	1 (0,5%)	2 (1,1%)	0,5 (0,0 - 5,2)	0,62	0,54

OR – *engl. odds ratio* - omjer izgleda, CI – *engl. confidence interval* - raspon pouzdanosti

Interakcija alelnih varijanti analiziranih polimorfizama kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak shizofrenije i shizofektivnog poremećaja ispitana je određivanjem čimbenika sinergije, a prema metodi koju su opisali Borja i sur. (272) (tablice 8 - 11). Kao referentni aleli odabrani su oni za koje prema literaturnim podacima nije utvrđena povezanost s bolešću (G negativan i C negativan za kombinacije rs10798059/rs4375, G negativan i T negativan u slučaju kombinacija rs10798059/rs1549637 te C negativan i T negativan za kombinacije rs4375/rs1549637) (12). Pregledavanjem znanstvene literature, nismo pronašli podatak o tome koji je od alela rs689466 polimorfne varijante (polimorfizam A/G) povezan s nastankom bolesti te smo najprije odabrali odsustvo jednog ili drugog alela navedene polimorfne varijante kao moguće referentne vrijednosti (G negativan ili A negativan) prilikom testiranja kombinacija rs10798059/rs689466. S obzirom da u skupini bolesnika niti jedan ispitanik nije posjedovao rs10798059/rs689466 kombinaciju AA/GG (tablica 6), u kojem slučaju nismo mogli izračunati čimbenik sinergije, kao referentnu vrijednost odabrali smo odsustvo G alela u obje polimorfne varijante (tablica 10). Analiza je pokazala da ne postoji sinergistički učinak istraženih alelnih varijacija ($P > 0,05$).

Tablica 8. Sinergija alelnih varijanti rs10798059 i rs4375

PLA2G4A - rs10798059	PLA2G6 - rs4375	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR	SF	z	P
Aleli							
G-	C-	12	15	Referentni aleli	0,66	-0,74	0,46
G+	C-	53	51	1,3			
G-	C+	19	15	1,6			
G+	C+	119	110	1,4			

(-) alel je odsutan, (+) alel je prisutan, SF – čimbenik sinergije

Tablica 9. Sinergija alelnih varijanti rs10798059 i rs1549637

PLA2G4A - rs10798059	PLA2G4C - rs1549637	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR	SF	z	P
Aleli							
G-	T-	23	23	Referentni aleli	0,96	-0,07	0,95
G+	T-	123	118	1,0			
G-	T+	8	7	1,1			
G+	T+	49	43	1,1			

(-) alel je odsutan, (+) alel je prisutan, SF – čimbenik sinergije

Tablica 10. Sinergija alelnih varijanti rs10798059 i rs689466

PLA2G4A - rs10798059	PTGS2 - rs689466	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR	SF	z	P
Aleli							
G-	G-	18	16	Referentni aleli	1,19	0,30	0,76
G+	G-	133	124	1,0			
G-	G+	13	14	0,8			
G+	G+	39	37	0,9			

(-) alel je odsutan, (+) alel je prisutan, SF – čimbenik sinergije

Tablica 11. Sinergija alelnih varijanti rs4375 i rs1549637

PLA2G6 - rs4375	PLA2G4C - rs1549637	Bolesnici (N=203)	Kontrole (N=191)	OR	SF	z	P
Aleli							
C-	T-	50	48	Referentni aleli	1,59	0,95	0,34
C+	T-	96	93	1,0			
C-	T+	15	18	0,8			
C+	T+	42	32	1,3			

(-) alel je odsutan, (+) alel je prisutan, SF – čimbenik sinergije

4.3. Meta-analiza studija genetičke udruženosti i obiteljskih studija polimorfizma BanI gena PLA2G4A

Povezano s etiologijom shizofrenije, veći je broj studija istraživao polimorfnu varijantu BanI gena PLA2G4A. Zbog neujednačenosti njihovih rezultata, proveli smo meta-analizu studija genetičke udruženosti (engl. *case-control association studies*) i obiteljskih studija za navedenu polimorfnu varijantu. Studije koje su pronašle povezanost polimorfne varijante BanI s etiologijom shizofrenije, povezale su prisutnost G alela i GG genotipa s većim rizikom za nastanak bolesti (112,114). Stoga smo, navedenu alelnu varijantu i genotip GG ispitali meta-analizom.

Meta-analizu studija genetičke udruženosti proveli smo na ukupno 3164 ispitanika (1573 bolesnika i 1591 pripadnika kontrolne skupine, uključujući i ispitanike iz našeg uzorka) (12). Zasebno smo analizirali studije koje su uključivale populacije bijelaca i azijske populacije zbog prethodno uočene genetičke heterogenosti ovih dviju skupina, nakon čega smo proveli meta-analizu cjelovitog uzorka. Podatke iz svake pojedine studije uvrstili smo u 2 x 2 tablicu u kojoj smo ispitanike podijelili ovisno o dijagnozi (bolesnici ili pripadnici kontrolne skupine) i broju događaja - varijabli (prisutnost G alela, odnosno GG genotipa).

Meta-analizom studija genetičke udruženosti nismo utvrdili statistički značajnu povezanost niti G alela, niti GG genotipa polimorfizma BanI gena PLA2G4A s etiologijom shizofrenije (tablica 12). Ukupne vrijednosti OR-a su iznosile: $OR_{G\ alel} = 1,1$ (CI = 0,9 - 1,2, $z = 0,78$, $P = 0,44$) i $OR_{GG\ genotip} = 1,1$ (CI = 0,8 - 1,3, $z = 0,50$, $P = 0,62$). Za G alel, kao i za GG genotip, ukupna heterogenost pokazala se statistički značajnom ($Q_{G\ alel} = 10,46$, $P = 0,02$; $Q_{GG\ genotip} = 10,70$, $P = 0,01$) u azijskim studijama, što nije bio slučaj u populaciji bijelaca i u cjelokupnom uzorku ($P > 0,05$). Stabilnost meta-analize potvrđena je isključivanjem svake pojedinačne studije iz ukupne meta-analize. Iako im je raspon bio uži, vrijednosti CI-a za OR vrijednosti i tada su uključivale vrijednost 1. Relativna statistička snaga meta-analize kod

modela slučajnog učinka (engl. *random effect model*) za G alel iznosila je od 3,3 – 19,1%, a za GG genotip od 4,5 – 18,6%.

Tablica 12. Meta-analiza studija genetičke udruženosti za G alel i GG genotip polimorfizma BanI gena PLA2G4A

Studija	Populacija	G alel		GG genotip	
		OR	95% CI	OR	95% CI
	<i>bijelci</i>	1,1 ^a	0,9 - 1,3	1,1 ^b	0,9 - 1,4
Wei i sur., 1998.	britanska	1,0	0,7 - 1,5	1,1	0,6 - 1,7
Chowdari i sur., 2001.	SAD - bijelci	1,1	0,7 - 1,7	0,9	0,5 - 1,8
Junqueira i sur., 2004.	braziliska	1,2	0,9 - 1,5	1,4	0,9 - 1,9
Nadalin i sur., 2012.	hrvatska	1,0	0,8 - 1,4	1,1	0,7 - 1,6
	<i>azijske</i>	1,0 ^c	0,8 - 1,4	1,0 ^d	0,6 - 1,7
Peet i sur., 1998.	indijska	0,7	0,4 - 1,6	0,4	0,2 - 1,2
Semwal i sur., 2002.	indijska	0,9	0,7 - 1,2	0,9	0,7 - 1,3
Pae i sur., 2004.	korejska	1,8	1,2 - 2,7	2,8	1,3 - 5,8
Li i sur., 2007.	kineska	0,9	0,7 - 1,1	0,9	0,6 - 1,3
ukupni OR		1.1 ^e	0,9 - 1,2	1,1 ^f	0,8 - 1,3

^a $z = 1,23$, $P = 0,22$; $Q = 0,65$, $df = 3$, $p = 0,89$ za heterogenost

^b $z = 1,17$, $P = 0,24$; $Q = 1,39$, $df = 3$, $p = 0,71$ za heterogenost

^c $z = 0,30$, $P = 0,76$; $Q = 10,46$, $df = 3$, $p = 0,02$ za heterogenost

^d $z = 0,06$, $P = 0,96$; $Q = 10,70$, $df = 3$, $p = 0,01$ za heterogenost

^e $z = 0,78$, $P = 0,44$; $Q = 12,11$, $df = 7$, $p = 1,00$ za heterogenost

^f $z = 0,50$, $P = 0,62$; $Q = 13,15$, $df = 7$, $p = 0,07$ za heterogenost

Obiteljske studije ispituju učestalost prenošenja alela koji se povezuje s nastankom bolesti s roditelja heterozigota na bolesno potomstvo. Do sada su tri obiteljske studije istražile povezanost polimorfizma BanI gena PLA2G4A s etiologijom shizofrenije, pri čemu su dvije studije provedene u azijskim populacijama, a jedna je uključila populaciju bijelaca (113,201,211). Jedino je studija Wei i Hemmingsa (201) u populaciji bijelaca utvrdila značajno veću učestalost prenošenja G alela s roditelja heterozigota na bolesne potomke.

Broj događaja - varijabli u 2 x 2 tablici u meta-analizi obiteljskih studija je odgovarao broju G alela koje su bolesnici naslijedili od roditelja heterozigota (AG genotipa). S obzirom da je vjerojatnost prenošenja pojedinog alela s određenog genskog lokusa od roditelja heterozigota na potomstvo 50%, u bolesnih smo potomaka trebali pronaći značajno veću učestalost G alela, budući da je taj alel povezivan s povećanim rizikom za nastanak bolesti. Međutim, meta-analiza obiteljskih studija nije potvrdila povezanost G alela polimorfizma BanI s etiologijom shizofrenije (tablica 13). Ukupna vrijednost OR-a iznosila je 1,1 (CI = 0,6 - 2,0, $z = 0,24$, $P = 0,81$). Zbog različitih učestalosti G alela u istraženim populacijama ukupna heterogenost je statistički značajna ($Q = 6,27$, $P = 0,04$). Relativna statistička snaga meta-analize kod modela slučajnog učinka iznosila je 29,9 – 37,9%.

Tablica 13. Meta-analiza obiteljskih studija za G alel polimorfizma BanI

Studija	Populacija	PLA2G4A - G alel	
		OR	95% CI
Chowdari i sur., 2001.	indijska	0,7	0,3 - 1,4
Wei i Hemmings, 2005.	britanska	2,1	1,1 - 3,9
Tao i sur., 2005.	kineska	0,9	0,5 - 1,4
ukupni OR ^a		1,1	0,6 - 2,0

^a $z = 0,24$, $P = 0,81$; $Q = 6,27$, $df = 2$, $p = 0,04$ za heterogenost

4.4. Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama i kliničke ekspresije bolesti

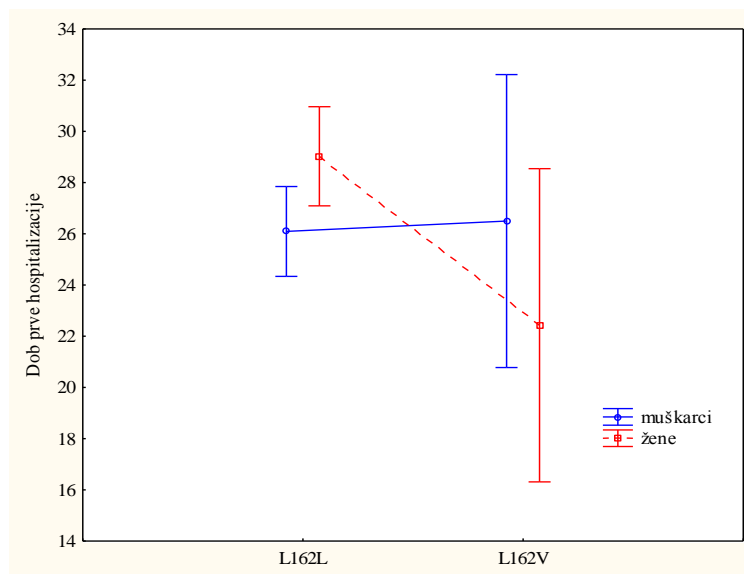
Kliničku ekspresiju shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja evaluirali smo kroz približnu dob prve hospitalizacije i težinu kliničkih simptoma bolesti mjerenih ocjenskim ljestvicama PANSS-a. S obzirom na različitu kliničku manifestaciju bolesti u osoba muškog i ženskog spola (1,275,276), analizu povezanosti kliničke ekspresije bolesti i polimorfničkih varijanti gena proveli smo na ukupnom uzorku bolesnika, ali i posebno u spolova. Ranija dob početka bolesti, teža klinička slika, lošija prognoza, slabiji odgovor na terapiju antipsihoticima, kao i veća učestalost negativnih simptoma shizofrenije u muškaraca, nedvojbeno svjedoče u prilog kliničkoj heterogenosti bolesti između spolova te podupiru ovakav pristup u istraživanju (63,276-278).

Iako literaturni podaci ukazuju na ranije javljanje bolesti u osoba muškog spola (6), razlika između muških i ženskih bolesnika u našem uzorku nije dostigla statističku značajnost ($26,1 \pm 7,6$ vs. $28,4 \pm 9,0$; jednosmjerni ANOVA test: $F = 3,28$, $P = 0,07$). Srednje vrijednosti dobi prve hospitalizacije u odnosu na ispitivane alelne varijante polimorfizama gena PLA2, PTGS2 i PPAR α prikazane su u tablici 14. Ispitani genski polimorfizmi nisu pokazali značajnu povezanost s dobom prve hospitalizacije ($P > 0,05$), ali je uočeno da žene heterozigoti za genotip PPAR α (L162V) obolijevaju približno 6,5 godina ranije u odnosu na homozigote (L162L) (tablica 14). Ipak, faktorski ANOVA test nije potvrdio statistički značajnu interakciju spola i PPAR α genotipa na prosječnu dob prve hospitalizacije ($P > 0,05$) (slika 4). Rezultati provedenih regresijskih analiza bili su, također, negativni čime smo potvrdili da ne postoji povezanost dobi javljanja bolesti i ispitanih genskih polimorfizama, odnosno, njihovih alelnih kombinacija ili kombinacija genotipova.

Tablica 14. Dobi prve hospitalizacije ispitanika u odnosu na polimorfne varijante gena PLA2, PTGS2 i PPAR α ^a

		svi bolesnici (N = 203)	muškarci (N = 111)	žene (N = 92)
		Srednja vrijednost \pm SD		
PLA2G4A - rs10798059	AA, AG	27,4 \pm 7,7	26,5 \pm 7,0	28,5 \pm 8,3
	GG	26,8 \pm 9,1	25,7 \pm 8,2	28,3 \pm 10,2
	GG, AG	27,2 \pm 8,3	26,3 \pm 7,5	28,4 \pm 9,1
	AA	27,0 \pm 8,7	24,9 \pm 8,2	28,7 \pm 9,0
PLA2G6 - rs4375	TT, CT	27,1 \pm 8,5	25,6 \pm 7,3	29,0 \pm 9,5
	CC	27,6 \pm 7,7	29,4 \pm 8,8	26,3 \pm 6,7
	CC, CT	27,4 \pm 8,6	26,6 \pm 7,8	28,4 \pm 9,5
	TT	26,7 \pm 7,6	25,2 \pm 7,0	28,6 \pm 8,0
PLA2G4C - rs1549637	AA, AT	27,2 \pm 8,4	26,0 \pm 7,7	28,6 \pm 9,0
	TT	26,7 \pm 5,6	28,2 \pm 4,7	19,0 \pm 0,0
	TT, AT	27,7 \pm 8,0	27,1 \pm 7,5	25,9 \pm 9,1
	AA	27,4 \pm 8,4	25,7 \pm 7,6	29,1 \pm 8,9
PTGS2 - rs689466	AA, AG	27,2 \pm 8,4	-	28,5 \pm 9,1
	GG	25,0 \pm 2,8	-	25,0 \pm 2,8
	GG, AG	28,2 \pm 7,7	25,3 \pm 6,6	31,2 \pm 7,7
	AA	26,9 \pm 8,5	26,4 \pm 7,8	27,5 \pm 9,3
PPARα - rs1800206 (L162V)	L162L	27,4 \pm 8,5	26,1 \pm 7,7	29,0 \pm 9,1
	L162V	24,6 \pm 5,5	26,5 \pm 5,6	22,4 \pm 5,0

^a jednosmjerni ANOVA test: P > 0,05



Slika 4. Dob prve hospitalizacije u odnosu na polimorfne varijante gena PPAR α po spolu ispitanika^a

^a Faktorski ANOVA test: F = 2,49, P = 0,12

Pod pretpostavkom da bi ispitivane polimorfne varijante gena PLA2, PTGS2 i PPAR α mogle modulirati kliničku ekspresiju bolesti, ispitili smo učinak pojedinačnih genskih polimorfizama, kao i njihove interakcije na vrijednosti negativnih, općih i ukupnih simptoma ocjenskih ljestvica PANSS-a. S obzirom da literaturni podaci upućuju na pojačavanje negativnih simptoma s trajanjem bolesti (279), u regresijsku analizu smo među prediktore uključili dob bolesnika. U našem smo uzorku prethodno potvrdili značajnu povezanost viših vrijednosti zbrojeva negativnih, općih te ukupnih simptoma PANSS-a i dobi ispitanika (Spearmanov $R_{\text{negativni simptomi}} = 0,32$, $P < 0,001$; Spearmanov $R_{\text{opći simptomi}} = 0,30$, $P < 0,01$; Spearmanov $R_{\text{ukupni simptomi}} = 0,32$, $P < 0,001$). Rezultati stupnjevite multiple regresijske analize uputili su na značajnu povezanost C alela varijante rs4375 (polimorfizam C/T) gena PLA2G6 s vrijednostima općih i ukupnih simptoma PANSS-a na ukupnom uzorku bolesnika

($\beta_{\text{opći}} = 0,21$, $F = 5,53$, $P < 0,05$; $\beta_{\text{ukupni}} = 0,25$, $F = 4,04$, $P < 0,05$) (tablica 15). Bolesnici koji su posjedovali C alel u svojem PLA2G6 genotipu (CC homozigoti, ili CT heterozigoti), imali su težu kliničku sliku. Polimorfizam C/T opisuje malen udio varijabilnosti PANSS psihopatologije u oba slučaja (promjena multiplog $R^2 = 3,1 - 4,2\%$). Zbrojevi općih i ukupnih simptoma u muškaraca pokazali su pozitivnu korelaciju s kombinacijom PLA2G6-C alela i T alela polimorfizma rs1549637 gena PLA2G4C ($\beta_{\text{opći}} = 0,27$, $F = 4,63$, $P < 0,05$; $\beta_{\text{ukupni}} = 0,34$, $F = 7,83$, $P < 0,01$) (tablica 16). Pri tome su opći i ukupni simptomi PANSS-a imali najviše vrijednosti u bolesnika koji su u kombiniranom PLA2G6/PLA2G4C genotipu posjedovali oba alela (C+, T+), najniže vrijednosti ukoliko su oba alela bila odsutna (C-, T-), a postojanje samo jednog od alela rezultiralo je intermedijarnim vrijednostima navedenih simptoma (tablica 17). Kombinacija PLA2G6-C i PLA2G4C-T alela opisuje relativno malen udio varijabilnosti opće simptomatologije PANSS-a (promjena multiplog R^2 iznosi približno 7%) te nešto veći udio varijabilnosti ukupne PANSS simptomatologije u muškaraca (promjena multiplog $R^2 = 11,3\%$). Polimorfne varijante pridonijele su negativnoj PANSS simptomatologiji samo u analizama po spolu, a njihov je učinak u spolova bio različit. U bolesnika su vrijednosti negativnih simptoma korelirale s PLA2G4C genotipom koji se pokazao jačim prediktorom od dobi ($\beta_{\text{PLA2G4C}} = 0,31$, $F = 7,37$, $P < 0,01$) (tablica 16). Najviše su vrijednosti negativnih simptoma utvrđene u muškaraca TT homozigota, a najniže u AA homozigota (tablica 17). A/T polimorfizam PLA2G4C genotipa pridonosi s približno 12% negativnoj PANSS psihopatologiji bolesnika. U žena je uočena značajna korelacija PPAR α genotipa ($\beta_{\text{PPAR}\alpha} = -0,25$, $F = 4,09$, $P < 0,05$) i težine negativnih simptoma PANSS-a (tablica 16). Bolesnice heterozigoti za PPAR α genotip (varijanta L162V) imale su značajno niže vrijednosti negativnih simptoma nego homozigoti (L162L) (jednosmjerni ANOVA test: $F = 5,46$, $P = 0,02$) (slika 5). Ipak, L162V genotip gena PPAR α opisuje relativno malen udio varijabilnosti negativnih simptoma u bolesnica (promjena multiplog R^2 iznosi približno 6%).

Tablica 15. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za simptome ocjenskih ljestvica PANSS-a

Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla (model) ^b	Srednja vrijednost ± SD		β	Promjena multiplog R ²	F ^a	P
težina negativnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	-	-	0,31	0,097	12,30	< 0,001
težina općih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	-	-	0,35	0,108	13,69	< 0,001
	PLA2G6 C alel (2)	prisutan	53,4 ± 6,7	0,21	0,042	5,53	< 0,05
odsutan	51,0 ± 6,6						
težina ukupnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	-	-	0,38	0,118	15,16	< 0,001
	PLA2G6 C alel (2)	prisutan	110,0 ± 12,9	0,25	0,031	4,04	< 0,05
odsutan	106,1 ± 13,5						

^a kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak = 4,0, F za izlazak 1,0

^b nezavisne varijable: dob bolesnika, PLA2G4A, PLA2G6, PLA2G4C, PTGS2 i PPARα genotipovi, prisutnost pojedinih alela u navedenim genotipovima (A i G alela u PLA2G4A, C i T alela u PLA2G6, A i T alela u PLA2G4C, A i G alela u PTGS2), kombinacije PLA2G4A/PLA2G6, PLA2G4A/PLA2G4C, PLA2G4A/PTGS2, PLA2G6/PLA2G4C genotipova i kombinacije prisutnosti određenih alela u navedenim genotipskim kombinacijama (G i C alela u PLA2G4A/PLA2G6 kombinaciji, G i T alela u PLA2G4A/PLA2G4C kombinaciji, G i G alela u PLA2G4A/PTGS2 kombinaciji te C i T alelnih varijanti u PLA2G6/PLA2G4C kombinaciji)

Tablica 16. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za težinu simptoma ovisno o spolu bolesnika

Muškarci (N =111)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla (model) ^b	β	Promjena multiplog R^2	F ^a	P
težina negativnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	PLA2G4C genotip (1)	0,31	0,120	7,37	< 0,01
	dob (2)	0,26	0,067	4,33	< 0,05
težina općih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	0,36	0,127	7,87	< 0,01
	PLA2G6 C alel/ PLA2G4C T alel kombinacija (2)	0,27	0,070	4,63	< 0,05
težina ukupnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	0,35	0,126	7,78	< 0,01
	PLA2G6 C alel/ PLA2G4C T alel kombinacija (2)	0,34	0,113	7,83	< 0,01
Žene (N = 92)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla (model)	β	Promjena multiplog R^2	F ^a	P
težina negativnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a)	dob (1)	0,29	0,109	7,09	< 0,05
	PPAR α genotip (2)	-0,25	0,060	4,09	< 0,05

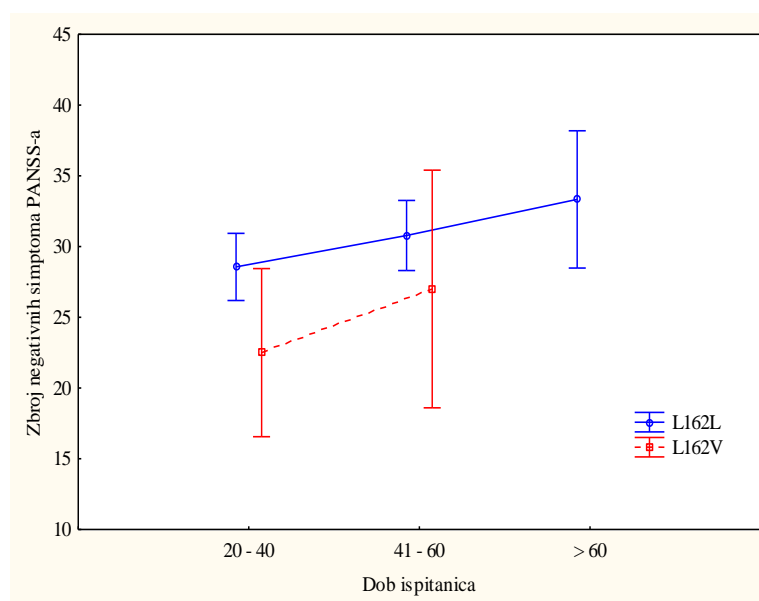
^a kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak = 4,0, F za izlazak 1,0

^b nezavisne varijable: dob bolesnika, PLA2G4A, PLA2G6, PLA2G4C, PTGS2 i PPAR α genotipovi, prisutnost pojedinih alela u navedenim genotipovima (A i G alela u PLA2G4A, C i T alela u PLA2G6, A i T alela u PLA2G4C, A i G alela u PTGS2), kombinacije PLA2G4A/PLA2G6, PLA2G4A/PLA2G4C, PLA2G4A/PTGS2, PLA2G6/PLA2G4C genotipova i kombinacije prisutnosti određenih alela u navedenim genotipskim kombinacijama (G i C alela u PLA2G4A/PLA2G6 kombinaciji, G i T alela u PLA2G4A/PLA2G4C kombinaciji, G i G alela u PLA2G4A/PTGS2 kombinaciji te C i T alelnih varijanti u PLA2G6/PLA2G4C kombinaciji)

Tablica 17. Težina simptoma u muškaraca (N = 111)
u odnosu na polimorfne varijante gena PLA2G4C i PLA2G6¹

težina negativnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a ^a)	PLA2G4C genotip	AA	28,5 ± 5,5
		AT	31,2 ± 6,3
		TT	39,5 ± 2,1
težina općih simptoma (zbroj bodova PANSS-a ^b)	PLA2G6-C alel/ PLA2G4C-T alel kombinacija	C-, T-	49,6 ± 6,0
		C-, T+	50,8 ± 10,9
		C+, T-	53,4 ± 6,5
		C+, T+	53,9 ± 7,1
težina ukupnih simptoma (zbroj bodova PANSS-a ^c)	PLA2G6-C alel/ PLA2G4C-T alel kombinacija	C-, T-	101,8 ± 13,3
		C-, T+	107,3 ± 19,9
		C+, T-	109,8 ± 12,6
		C+, T+	116,3 ± 11,1

¹ jednosmjerni ANOVA test: ^a F = 4,31, P = 0,02; ^b F = 1,34, P = 0,27; ^c F = 2,89, P = 0,04
(-) alel je odsutan, (+) alel je prisutan



Slika 5. Zbroj negativnih simptoma PANSS-a u odnosu na dob bolesnika i PPAR α genotip^a

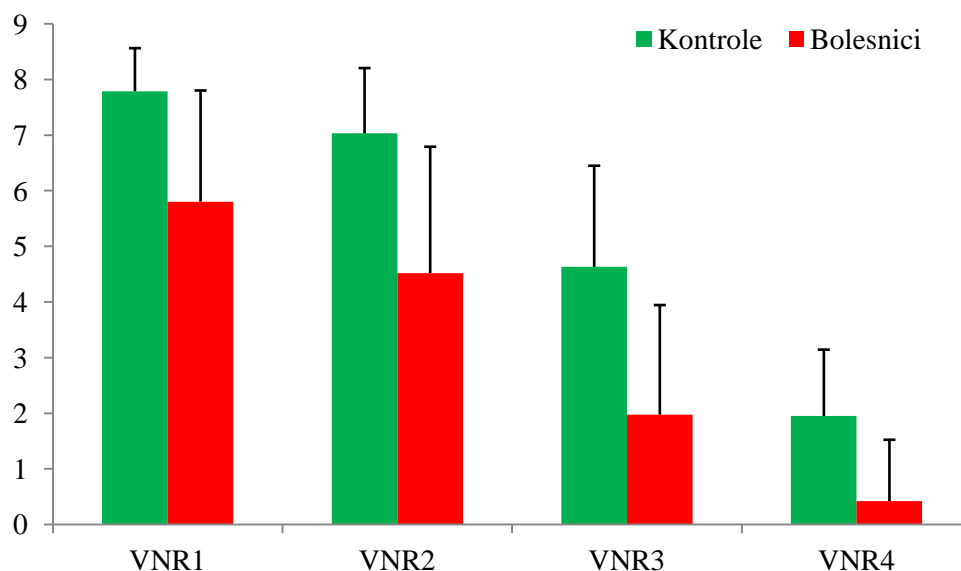
^a jednosmjerni ANOVA test: F = 5,46, P = 0,02

4.5. Volumetrijski niacinski odgovor

Cilj ovog dijela istraživanja bio je rasvijetliti etiologiju oslabljene niacinske reakcije u bolesnika ispitivanjem njene moguće povezanosti s polimorfnim varijantama gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 (geni PLA2G4A i PTGS2) i sastavom masnih kiselina membrana perifernih stanica (eritrocita).

Srednja vrijednost ukupnog VNR-a bila je statistički značajno viša u pripadnika kontrolne skupine u odnosu prema bolesnicima sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem ($21,4 \pm 3,8$ vs. $12,7 \pm 6,0$; jednosmjerni ANOVA test: $F = 119,19$, $df = 1$, $P < 0,001$). Očekivano, vrijednosti VNR1, VNR2, VNR3 i VNR4 (slika 6), također su bile značajno više u pripadnika kontrolne skupine (jednosmjerni ANOVA test: $P < 0,001$). VNR je bio najjači nakon aplikacije 0,1 M otopine niacina, a najslabiji kod aplikacije 0,0001 M otopine. Weighted kappa test pokazao je značajnu podudarnost procjene osjetljivosti na niacin dvaju nezavisnih procjenitelja ($kappa > 0,90$).

S obzirom da su se bolesnici i kontrolna skupina značajno razlikovali prema dobi, spolu i učestalosti konzumiranja duhanskog dima, testirali smo mogući učinak navedenih čimbenika na osjetljivost kože prema niacinu. Nije bilo značajne povezanost VNR-a s dobi (Spearmanov test korelacije rangova: $R_{\text{bolesnici}} = 0,08$, $t = 0,68$, $P = 0,50$; $R_{\text{kontrolne}} = -0,10$, $t = -0,84$, $P = 0,40$). Faktorskim ANOVA testom nije utvrđena interakcija spola i grupe ispitanika na jačinu niacinskog odgovora (spol x grupa: $F = 0,05$, $P = 0,82$), međutim, interakcija pušenja i grupe ispitanika pokazala se statistički značajnom (pušenje x grupa: $F = 5,25$, $P = 0,02$). Naime, u skupini bolesnika uočene su više vrijednosti ukupnog VNR-a u skupini pušača u odnosu na bolesnike nepušače ($14,0 \pm 5,6$ vs. $10,5 \pm 6,1$). Međutim, pomoću jednosmjernog ANOVA testa, utvrdili smo da je učinak konzumiranja duhana na jačinu odgovora na niacin izražen isključivo pri aplikaciji otopine najveće koncentracije (0,1 M) ($F = 5,09$, $df = 1$, $P = 0,03$).

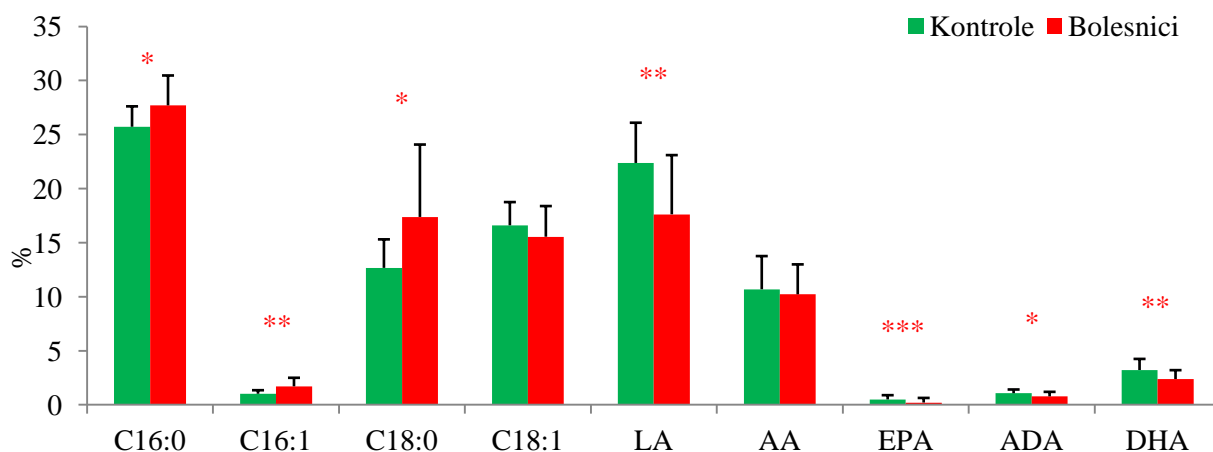


Slika 6. Srednje vrijednosti VNR1-4 u bolesnika i kontrolne skupine^a

^a jednosmjerni ANOVA test: $P_{VNR1-4} < 0,001$

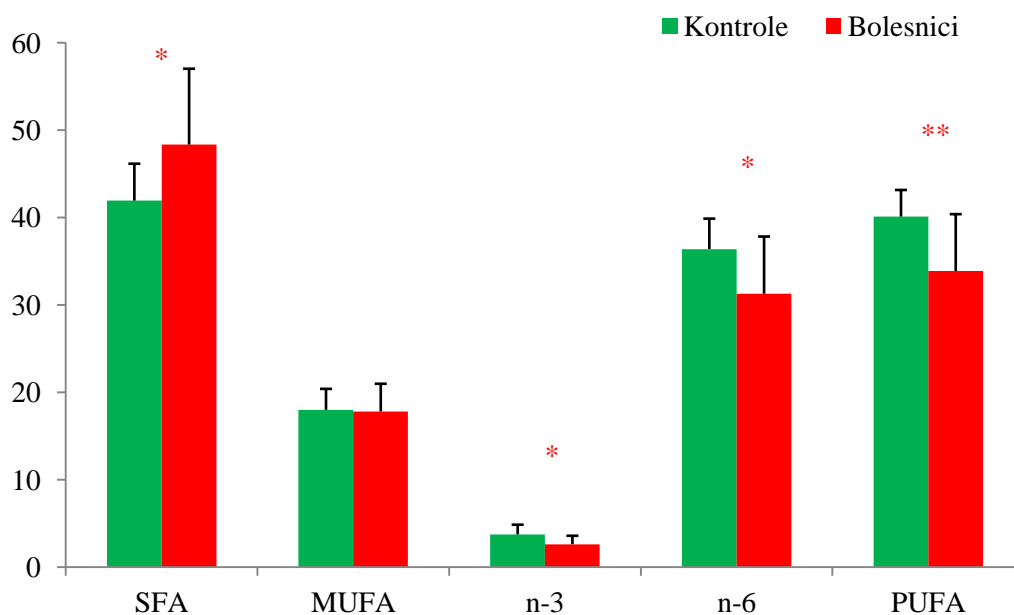
4.6. Analiza masnih kiselina membrana eritrocita

U bolesnika smo utvrdili statistički značajno više srednje vrijednosti ukupnih SFA ($z = -2,78$, $P < 0,01$), kao i značajan deficit PUFA iz obitelji n-3 i n-6 te ukupnih PUFA ($z_{n-3 \text{ PUFA}} = 3,07$, $z_{n-6 \text{ PUFA}} = 2,81$, $z_{\text{ukupne PUFA}} = 3,56$, $P < 0,01$). Višim vrijednostima ukupnih SFA najviše su doprinijele značajno više koncentracije palmitinske (16:0) i stearinske kiseline (18:0) ($z_{16:0} = -2,38$, $z_{18:0} = -2,38$, $P < 0,05$) (slika 7). Istovremeno, smanjene koncentracije LA ($z = 2,61$, $P < 0,01$), EPA ($z = 4,01$, $P < 0,001$), DHA ($z = 2,70$, $P < 0,01$) i u manjoj mjeri ADA ($z = 2,13$, $P < 0,05$) (slika 7), doprinijele su nižim vrijednostima obitelji n-3 i n-6 PUFA, kao i ukupnih PUFA (n-3 + n-6) (slika 8). Iako su srednje vrijednosti palmitoleinske kiseline (16:1n-7) iz obitelji MUFA bile značajno više u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem ($z = -3,01$, $P < 0,01$) (slika 7), vrijednosti ukupnih MUFA nisu se statistički značajno razlikovale između dvije skupine ispitanika ($P > 0,05$) (slika 8).



Slika 7. Sastav glavnih masnih kiselina membrana eritrocita^a

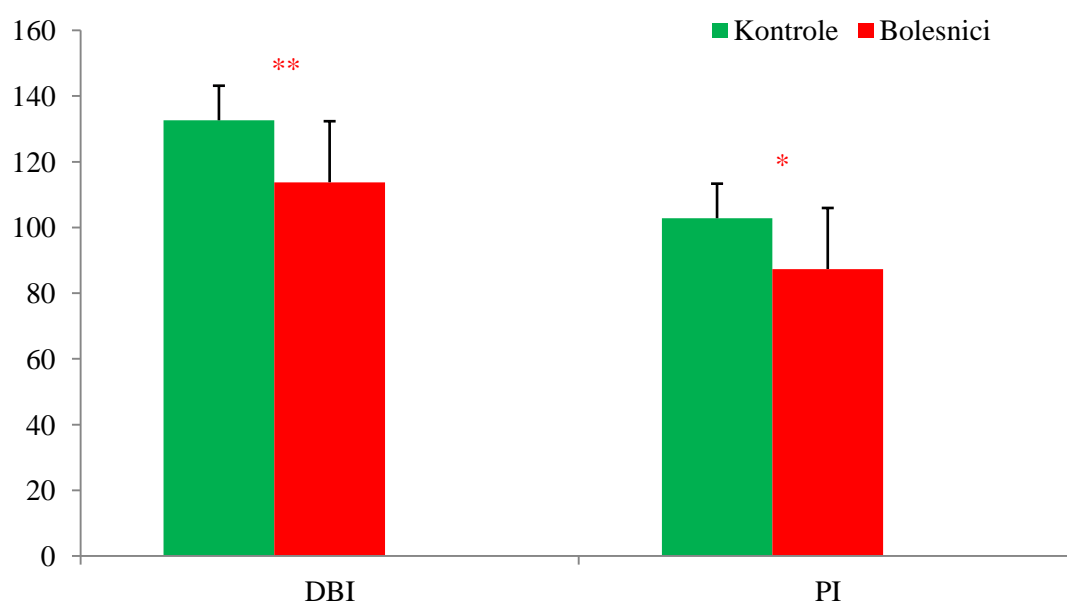
^a Mann-Whitney *U*-test: **P* < 0,05; ***P* < 0,01, ****P* < 0,001 prema odgovarajućoj kontroli;
 16:0 – palmitinska kiselina, 16:1 – palmitoleinska kiselina, 18:0 – stearinska kiselina, 18:1 – oleinska kiselina,
 LA – 18:2n-6, AA – 20:4n-6, EPA – 20:5n-3, ADA – 22:4n-6, DHA – 22:6n-3



Slika 8. Sastav ukupnih zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina membrana eritrocita^a

^a Mann-Whitney *U*-test: **P* < 0,01, ***P* < 0,001 prema odgovarajućoj kontroli;
 SFA – zasićena masna kiselina, MUFA – mononezasićena masna kiselina, PUFA – polinezasićena masna kiselina

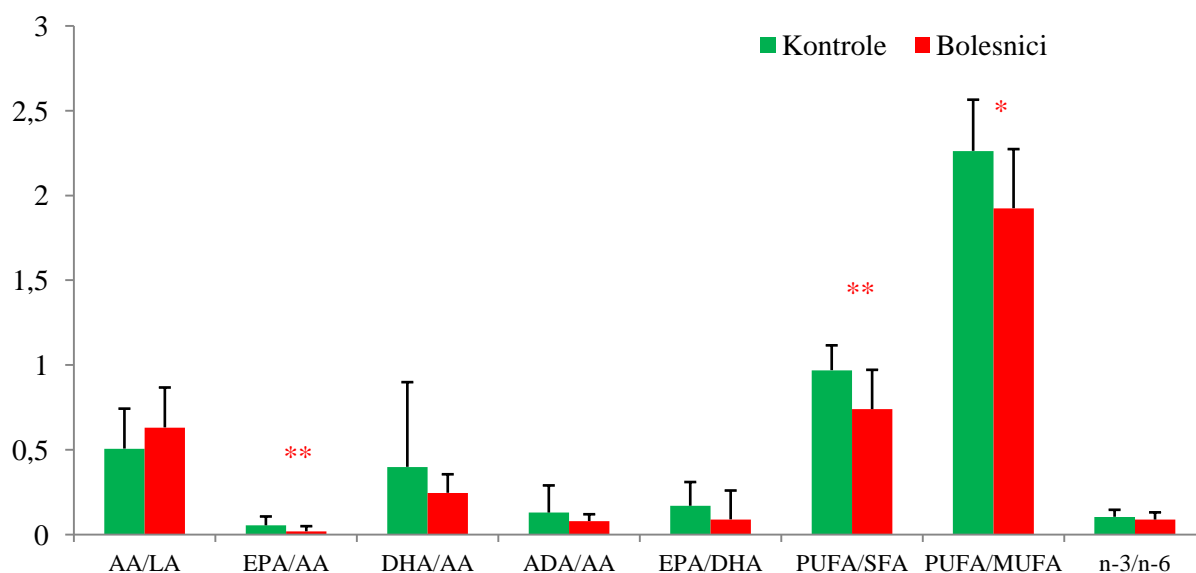
Nadalje, statistička analiza pokazala je da su broj dvostrukih veza kao pokazatelj koncentracije nezasićenih masnih kiselina, a prikazan kao DBI ($z = 3,41$, $P < 0,001$) i indeks peroksidacije, kao indikator koncentracije prvenstveno PUFA, a napose LC-PUFA ($z = 2,84$, $P < 0,01$), bili značajno niži u bolesnika u odnosu na pripadnike kontrolne skupine ispitanika (slika 9).



Slika 9. Vrijednosti indeksa dvostrukih veza i indeksa peroksidacije^a

^a Mann-Whitney *U*-test: * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ prema odgovarajućoj kontroli;
DBI – indeks dvostrukih veza, PI – indeks peroksidacije

Vrijednosti omjera EPA/AA ($z = 3,38$, $P < 0,001$), ukupne PUFA/ukupne SFA ($z = 3,27$, $P < 0,001$) te ukupne PUFA/ukupne MUFA ($z = 2,87$, $P < 0,01$), kao još jednog od pokazatelja deficita PUFA u oboljelih, također su se značajno razlikovale između dvije skupine ispitanika. Naposljetku, analiza omjera pojedinih PUFA, poput AA/LA, DHA/AA, ADA/AA, EPA/DHA te omjera obitelji n-3/n-6 PUFA, nije pokazala statistički značajnu razliku između bolesnika i kontrolne skupine ($P > 0,05$) (slika 10).



Slika 10. Omjeri pojedinačnih i ukupnih masnih kiselina^a

^a Mann-Whitney *U*-test: * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ prema odgovarajućoj kontroli; SFA – zasićena masna kiselina, MUFA – mononezasićena masna kiselina, PUFA – polinezasićena masna kiselina

4.7. Povezanost volumetrijskog niacinskog odgovora kože i polimorfnih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2

Distribucije genotipskih varijanti polimorfizama gena PLA2G4A i PTGS2 u skupini bolesnika testiranih na osjetljivost prema niacinu podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi (tablica 17). Nije bilo značajne razlike u odnosu na raspodjelu genotipova i alela na ukupnom uzorku bolesnika (tablica 3).

Tablica 17. Učestalost genotipova i alela polimorfnih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2 u bolesnika podvrgnutih niacinskom testu kožnog crvenila

	Genotipovi			Aleli	
	AA	AG	GG	A	G
PLA2G4A - rs10798059^a	13 (16,5%)	32 (40,5%)	34 (43,0%)	58 (36,7%)	100 (63,3%)
PTGS - rs689466^b	59 (74,7%)	19 (24,1%)	1 (1,2%)	137 (86,7%)	21 (13,3%)

^a Hardy-Weinberg: $\chi^2 = 1,30$, $P = 0,25$; ^b Hardy-Weinberg: $\chi^2 = 0,15$, $P = 0,70$

Mogući učinak polimorfnih varijanti gena PLA2G4A i PTGS2 na jačinu odgovora kože na niacin ispitali smo korištenjem stupnjevite multiple regresijske analize. Očekivano, koncentracija AMN-a pokazala se najjačim prediktorom vrijednosti ukupnog VNR-a ($\beta = 0,73$, $F = 353,23$, $P < 0,001$) (tablica 18), pri čemu opisuje približno polovicu njegove varijabilnosti (promjena multiplog $R^2 = 54\%$). Polimorfne varijante gena PLA2G4A i PTGS2 imale su statistički značajan, iako vrlo slab učinak na vrijednosti ukupnog VNR-a u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem (tablica 18). Negativna vrijednost $\beta_{\text{PLA2G4A-A}} = -0,17$ upućuje da bolesnici koji u svom PLA2G4A genotipu ne posjeduju A alel

(GG homozigoti) imaju značajno više vrijednosti VNR-a. Pozitivna $\beta_{PTGS2-G}$ vrijednost od 0,14 upućuje na višu vrijednost VNR-a u bolesnika koji u svom PTGS2 genotipu posjeduju G alel, odnosno u AG heterozigota ili GG homozigota. U svakom slučaju, obje polimorfne varijante doprinose vrlo malo, svaka s po 1,7%, varijabilnosti ukupnog VNR-a u grupi bolesnika.

Tablica 18. Stupnjevita multipla regresijska analiza za volumetrijski niacinski odgovor u bolesnika

Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla ^b (model)	β	Promjena multiplog R^2	F ^a	P
Volumetrijski niacinski odgovor (VNR)	koncentracija AMN-a	0,73	0,539	353,23	< 0,001
	PLA2G4A-A alel	-0,17	0,017	11,44	< 0,001
	PTGS2-G alel	0,14	0,017	12,12	< 0,001

^a kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak = 4,0, F za izlazak 1,0

^b nezavisne varijable: 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M i 0,0001 M koncentracije AMN-a, prisustvo PLA2G4A-A alela, PLA2G4A-G alela i PTGS2-G alela

Nadalje, pomoću jednosmjernog ANOVA testa, testirali smo učinak ispitivanih polimorfničkih varijacija na pojedinačne VNR1-4 vrijednosti u bolesnika (tablica 19). Učinak rs10798059 varijante (polimorfizam BanI) utvrđen je jedino pri najvećim koncentracijama niacinske otopine ($F_{0,1M} = 12,01$, $P < 0,001$; $F_{0,01M} = 7,56$, $P < 0,01$). Kao što je bilo i za očekivati, veće vrijednosti VNR1 i VNR2 imali su bolesnici koji u svom PLA2G4A genotipu nisu posjedovali A alel (GG homozigoti) (tablica 19). S obzirom da je svega jedan ispitanik po PTGS2 genotipu bio GG homozigot, bilo je moguće ispitati samo učinak G alela na VNR1-4 vrijednosti u bolesnika. Iako su srednje vrijednosti VNR1-4 bile više u ispitanika koji su u svojem PTGS2 genotipu imali G alel, statistički značajan učinak toga alela, međutim, nije pronađen.

Nismo pronašli sinergistički učinak dviju polimorfni varijanti na vrijednosti ukupnog VNR-a (PLA2G4A-A alel x PTGS2-G alel: $F = 0,77$, $P = 0,38$; PLA2G4A-G alel x PTGS2-G alel: $F = 0,48$, $P = 0,49$) u naših bolesnika.

Tablica 19. Volumetrijski niacinski odgovor u odnosu na polimorfne varijante gena PLA2G4A i PTGS2^a

	PLA2G4A- rs10798059	$x \pm SD$	F	P	PTGS2- rs689466	$x \pm SD$	F	P
VNR1	AA, AG	$5,1 \pm 2,3$	12,01	< 0,001	AG, GG	$6,2 \pm 2,2$	0,80	0,37
	GG	$6,6 \pm 1,3$			AA	$5,7 \pm 2,0$		
	GG, AG	$5,9 \pm 2,0$	1,55	0,22				
	AA	$5,1 \pm 2,5$						
VNR2	AA, AG	$3,9 \pm 2,6$	7,56	< 0,01	AG, GG	$4,9 \pm 2,7$	0,64	0,43
	GG	$5,3 \pm 1,7$			AA	$4,4 \pm 2,2$		
	GG, AG	$4,6 \pm 2,3$	0,49	0,48				
	AA	$4,1 \pm 2,4$						
VNR3	AA, AG	$1,8 \pm 2,2$	0,46	0,50	AG, GG	$2,6 \pm 2,3$	2,70	0,10
	GG	$2,1 \pm 1,8$			AA	$1,7 \pm 1,8$		
	GG, AG	$2,1 \pm 2,0$	1,98	0,16				
	AA	$1,2 \pm 2,2$						
VNR4	AA, AG	$0,6 \pm 1,4$	1,14	0,29	AG, GG	$0,8 \pm 1,5$	2,59	0,11
	GG	$0,3 \pm 0,7$			AA	$0,3 \pm 0,9$		
	GG, AG	$0,5 \pm 1,2$	0,26	0,61				
	AA	$0,3 \pm 0,6$						

^a povezanost je testirana jednosmjernim ANOVA testom

4.8. Povezanost volumetrijskog niacinskog odgovora kože i sastava masnih kiselina eritrocita

Korištenjem stupnjevite multiple regresijske analize ispitali smo doprinosi li, i u kojoj mjeri, sastav masnih kiselina membrana perifernih stanica, posebice značajan deficit PUFA, etiologiji oslabljenog odgovora kože na niacin u skupini bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Pri tome smo testirali moguću povezanost srednjih vrijednosti VNR-a 1-4 sa sastavom pojedinačnih i ukupnih masnih kiselina, zatim s DBI i PI indeksima i naposljetku s omjerima pojedinačnih, odnosno, ukupnih masnih kiselina. Rezultati svih provedenih regresijskih analiza bili su negativni, s obzirom da niti u jednoj od njih nismo pronašli statistički značajnu povezanost između vrijednosti VNR-a 1-4 i sadržaja masnih kiselina membrana eritrocita u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem.

5. RASPRAVA

Kao i kod mnogih drugih oboljenja multifaktorijalne etiologije, smatra se da u osnovi podložnosti za razvoj shizofrenije postoji neovisna interakcija velikog broja različitih genskih polimorfizama od kojih svaki daje mali doprinos konačnom učinku nastupa, ali i progresiji bolesti (16). Fosfolipidna membranska hipoteza, s obzirom na poligenski/multifaktorijalni karakter shizofrenije, implicira ulogu poremećenog metabolizma membranskih fosfolipida u etiologiji bolesti (64,65). Enzimi koji reguliraju metabolizam fosfolipida jasno su genetički određeni, a prehrana je važan okolišni čimbenik koji modulira kompoziciju masnih kiselina u biološkim membranama (9,67). U sastavu molekula membranskih fosfolipida nalazi se glavna esterificirane AA potrebne za sintezu prostaglandina i drugih eikozanoida u organizmu, ali i značajna količina drugih masnih kiselina (EPA, DHA), čiji su metaboliti, također, potentni medijatori upalnih procesa (55,143). Deficit membranskih PUFA, napose LC-PUFA, kao što su DHA i AA, mogao bi, narušavanjem homeostaze u središnjem živčanom sustavu, a u okviru različitih predloženih hipoteza shizofrenije (neurorazvojna, neuroprijenosna i dr.), biti povezan s nastankom bolesti (68-73). Povišena aktivnost enzima iz superobitelji PLA2 pronađena je u serumu, krvnim stanicama i moždanom tkivu bolesnika sa shizofrenijom (97-99), i mogla bi, između ostalog, pridonositi, spomenutom deficitu PUFA. Upravo stoga, geni direktno i indirektno uključeni u homeostazu PUFA i signalni put PLA2, predstavljaju neke od potencijalnih gena kandidata u etiologiji i/ili kliničkoj ekspresiji shizofrenog oboljenja (99,109,112,201).

Abnormalnosti niacinskog odgovora nedvojbeno upućuju na postojanje fosfolipidnog poremećaja, a nedavno utvrđena nasljednost oslabljene niacinske reakcije, predstavlja osnovu za daljnje istraživanje genetike tog biokemijskog puta (194,195). Etiologija oslabljenog

niacinskog odgovora u oboljelih od shizofrenije, ali i drugih neuropsihijatrijskih bolesti, međutim, još uvijek nije u potpunosti objašnjena.

5.1. Genski polimorfizmi i podložnost za pojavu shizofrenije ili shizoafektivnog poremećaja

Enzimi iz superobitelji PLA2 održavaju koncentraciju slobodnih lizofosfolipida potrebnih za ugradnju novih molekula masnih kiselina u biološke membrane, a otpuštanjem molekula masnih kiselina iz membranskih fosfolipida, reguliraju i procese stanične signalizacije (123). U okviru fosfolipidne membranske hipoteze shizofrenije, najviše je ispitan funkcijski polimorfizam BanI gena PLA2G4A za enzim cPLA2, čija je katalitička aktivnost ovisna o ionima Ca^{2+} i koji preferira otpuštanje AA iz membranskih fosfolipida, međutim, rezultati studija, provedenih u različitim populacijama, nisu ujednačeni (12). Ipak, meta-analiza azijskih populacija, populacija bijelaca i cjelovitog uzorka ispitanika, napravljena u ovom istraživanju, nije potvrdila niti G alel, niti GG genotip polimorfne varijante BanI, kao rizične čimbenike za nastanak shizofrenije (tablica 12). U našoj populaciji učestalost rizičnog G alela gena PLA2G4A se kreće oko 60% u bolesnika i kontrolne skupine (62,3%, odnosno, 61,5%) i ne razlikuje se značajno u odnosu na frekvenciju utvrđenu u britanskoj, sjevernoameričkoj i indijskoj populaciji (tablica 3). Zanimljivo je da su studije provedene u populacijama istočne Azije, poput korejske i kineske populacije, utvrdile gotovo dvostruko nižu učestalost G alela gena PLA2G4A (u kineskoj kontrolnoj skupini iznosi 37%, a u korejskoj skupini kontrolnih ispitanika 32%) (12). Moguće je da razlika u frekvenciji genotipova i alela u indijskoj populaciji u odnosu na populacije istočne Azije (kineska i korejska populacija) doprinosi statističkoj značajnosti ukupne heterogenosti u azijskim studijama koja je utvrđena u meta-analizi ($Q_{G \text{ alel}} = 10,46$, $Q_{GG \text{ genotip}} = 10,70$, $P < 0,05$) (tablica 12). Nadalje, niža učestalost G alela, koji se se pokazao rizičnim čimbenikom za

nastanak shizofrenog oboljenja u korejskoj populaciji (112), mogući je uzrok njegove statistički značajne akumulacije u bolesnika u korejskoj studiji.

Da bi istražili mogući sinergistički učinak G alela polimorfizma BanI i polimorfni varijanti drugih gena iz superobitelji PLA2 kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak shizofrenije, u našu smo analizu uključili još polimorfizam rs4375 gena PLA2G6 za iPLA2 te polimorfnu varijantu rs1549637 gena PLA2G4C koji kodira cPLA2. Povezanost između etiologije shizofrenije i polimorfizma rs4375 (PLA2G6) utvrđena je u brazilskoj populaciji, pri čemu je prisutnost C alela povezana s većim rizikom za razvoj bolesti (111). Povezanost između shizofrenog oboljenja i polimorfizma rs1549637 (PLA2G4C) pronađena je u samo jednoj studiji u kineskoj populaciji, pri čemu je T alel tog polimorfizma povezan s većim rizikom za razvoj bolesti pojedinačno i u kombinaciji s G alelom polimorfizma BanI gena PLA2G4A (113). Analizom pojedinačnih učestalosti nismo utvrdili statistički značajnu razliku za genotipove i alelne varijante dvaju polimorfizama (rs4375 i rs1549637) između bolesnika i kontrolne skupine (tablica 3). Učestalost C alela varijante rs4375 u našoj populaciji bila je približno jednaka u bolesnika (42,4%) i u pripadnika kontrolne skupine (43,2%), dok je u brazilskoj populaciji uočena povećana akumulacija rizičnog C alela u bolesnika (57%) u odnosu na kontrole (43%). Nadalje, frekvencija T alela polimorfizma rs1549637 (PLA2G4C) u našoj studiji bila je, također, približno jednaka u bolesnika (15,5%) i kontrolnih ispitanika (14,7%). Učestalost navedenog alela u kineskoj populaciji kontrolnih ispitanika nije se značajnije razlikovala u odnosu na podatke dobivene u našoj populaciji (15,5%), međutim, rezultati obiteljskih studija u kineskoj populaciji ukazuju da se T alel polimorfizma rs1549637 češće prenosio sa zdravih roditelja heterozigota na bolesno potomstvo (113). S obzirom da je naša genetička studija asocijacijskog tipa, a ne obiteljska (za provođenje obiteljske studije nismo raspolagali s dovoljno podataka), nismo bili u mogućnosti testirati rezultate kineske studije. Studija provedena u kineskoj populaciji utvrdila

je statistički značajnu interakciju G alela gena PLA2G4A i T alela gena PLA2G4C kao rizičnih čimbenika za razvoj shizofrenog poremećaja ($P = 0,02$) (113). U našoj studiji, međutim, rizični čimbenik za nastanak shizofrenije predstavlja kombinacija genotipa CT polimorfizma rs4375 (PLA2G6) i genotipa AT varijante rs1549637 (PLA2G4C) ($P = 0,02$) (tablica 7). Zanimljivo je da ostale kombinacije genotipova i alela ispitivanih polimorfizama ne možemo povezati s rizikom za nastanak bolesti. Nepostojanje statistički značajne sinergije C alela polimorfizma rs4375 (PLA2G6) i T alela varijante rs1549637 (PLA2G4C), indicira da se radi prvenstveno o učincima genotipova, a ne alela. Nadalje, potrebno je istaknuti da kombinacija CC genotipa polimorfizma rs4375 (PLA2G6) i AT genotipa varijante rs1549637 (PLA2G4C), također, pokazuje trend razlike u učestalosti između dvije skupine ispitanika ($P = 0,08$), što svjedoči u prilog učinku PLA2G6-C alela. Dvostruko niža frekvencija navedene kombinacije genotipova u bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu, naime, implicira moguću važnost prisutnosti C alela polimorfizma rs4375 (PLA2G6) u uočenoj statistički značajnoj interakciji genotipa CT polimorfizma rs4375 (PLA2G6) i genotipa AT varijante rs1549637 (PLA2G4C). Pregledavanjem znanstvene literature nismo pronašli niti jedno istraživanje koje je ispitivalo učestalost kombinacije navedenih polimorfničkih varijanti, iako je, doduše, jedna studija u kineskoj populaciji ispitivala povezanost kombinacija genotipskih i alelnih varijanti drugih polimorfizama gena PLA2G6, kao što su polimorfizmi rs2235346, rs2272831 i rs2284060, s rs1549637 polimorfnom varijantom gena PLA2G4C u etiologiji shizofrenije. Rezultati iste, međutim, bili su negativni (221).

Postojanje statistički značajne interakcije genotipova PLA2G6 i PLA2G4C moguće je objasniti funkcijom enzima koje kodiraju navedeni geni. Enzimi iPLA2 i cPLA2 (PLA2G4C) su vezani uz membrane, a budući da ne posjeduju C2 proteinsku domenu za vezanje iona Ca^{2+} , njihova katalitička aktivnost nije ovisna o prisutnosti iona Ca^{2+} u citosolu (280-282). Novije studije ukazuju da iPLA2 ima, najvjerojatnije, veći afinitet prema otpuštanju DHA iz

membranskih fosfolipida, nego drugih molekula PUFA (126,127,129), dok cPLA2 (PLA2G4C) ne preferira otpuštanje specifične vrste PUFA (282-284). Štoviše, *in vitro* studije uočile su podjednak afinitet cPLA2 (PLA2G4C) prema AA te molekulama MUFA, poput oleinske kiseline (18:1) i naposljetku, značajan afinitet prema otpuštanju molekula SFA, poput palmitinske kiseline (16:0) i stearinske kiseline (18:0) (283). Zbog svojeg afiniteta prema otpuštanju molekula DHA, iPLA2 ima važnu ulogu u regulaciji omjera PUFA/SFA koji je ključan za održavanje fluidnosti bioloških membrana (123). Nadalje, poseban se značaj pripisuje ulozi iPLA2 i cPLA2 (PLA2G4C) u pretvorbi molekula lizosfolipida u manje toksične lipide, pri čemu je otkriveno da cPLA2 (PLA2G4C) pokazuje čak 2 do 4 puta veću aktivnost prilikom hidrolize lizofosfolipida, nego hidrolize molekula fosfolipida (281,283). Poznato je da lizofosfolipidi, posebice u većim koncentracijama, posjeduju citotoksični učinak, narušavaju staničnu homeostazu, funkciju ionskih kanala, a njihova povećana akumulacija u srčanom mišiću u uvjetima ishemije povezuje se s poremećajem srčanog ritma (282,284). Visoka ekspresija cPLA2 (PLA2G4C) u srčanom mišiću, napose u uvjetima ishemije, također, svjedoči u prilog važnosti uloge navedenog enzima u hidrolizi lizofosfolipida i njihovoj pretvorbi u manje toksične varijante (282,284). Nadalje, enzimi iPLA2 i cPLA2 (PLA2G4C) sudjeluju u prijenosu različitih acilnih skupina na glicerolsku jezgru, a pri tome cPLA2 koju kodira gen PLA2G4C pokazuje najveći afinitet za prijenos LC-PUFA, poput AA i DHA (282,284,285). Ravnoteža između hidrolize molekula membranskih fosfolipida te ugradnje masnih kiselina u iste, posebice molekula LC-PUFA, neobično je važna u remodeliranju membranskih fosfolipida, održavanju njihove strukture i fluidnosti (123,282). Uočeno je da inhibicija aktivnosti iPLA2 može smanjiti ugradnju molekule AA u molekule membranskih fosfolipida (280,286). Budući da oba gena PLA2 kodiraju kućepaziteljske enzime (engl. *housekeeping enzymes*), moguće je da je upravo njihova interakcija ključna za strukturu i dinamiku fosfolipida bioloških membrana. Protein iPLA2 na

svom N-terminalnom kraju sadrži 7-8 ankirinskih ostataka važnih sa interakciju s drugim proteinima, što bi, između ostalog, moglo biti važno pri regulaciji procesa remodeliranja membranskih fosfolipida, ali i nekih drugih procesa, primjerice, regulacije apoptoze, upalnog odgovora stanice i sl. (101,280). Nadalje, enzim iPLA2 postoji u multiplim oblicima, a uočeno je da alternativno prekrajanje mRNA izravno utječe na aktivnost navedenog enzima (280).

Vezano uz prethodno utvrđenu nasljednu komponentu abnormalne niacinske reakcije u bolesnika sa shizofrenijom u kineskoj populaciji (194,195) i ulogu enzima cPLA2 i COX-2 u njenom nastanku, pretpostavili smo da bi polimorfne varijante gena PTGS2 koji kodira enzim COX-2, također, mogle predstavljati rizični čimbenik za nastanak shizofrenije. Osim toga, geni za cPLA2 (PLA2G4A) i COX-2 (PTGS2) su udaljeni svega 149 kb, pa bi i njihova interakcija mogla doprinositi riziku za razvoj bolesti. U istraživanje smo uključili funkcijsku polimorfnu varijantu rs689466 gena PTGS2, s obzirom da je povezanost između etiologije shizofrenije i navedenog polimorfizma utvrđena u obiteljskoj studiji provedenoj u britanskoj populaciji (201). Frekvencije genotipova i alela polimorfizma rs689466 nisu se značajno razlikovale između dviju skupina ispitanika (tablica 3) te navedenu polimorfnu varijantu ne možemo smatrati rizičnim čimbenikom za nastanak bolesti u našoj populaciji. Učestalost G alela polimorfizma rs689466 u našoj populaciji iznosi približno 15% i ne razlikuje se značajno u odnosu na frekvenciju utvrđenu u drugim europskim populacijama. Zanimljivo je da je u azijskim populacijama uočena mnogo viša učestalost G alela u odnosu na europske populacije (42% - 51%) (242). Moguće je da spomenute razlike u frekvenciji alela između azijskih i europskih populacija pridonose tome da u kineskoj populaciji nije utvrđena povezanost polimorfizma rs689466 i shizofrenog oboljenja (202). Neujednačenost rezultata između naše i britanske populacije mogla bi biti posljedica različitih vrsta istraživanja, s obzirom da se u našem slučaju radilo o asocijacijskoj, a ne obiteljskoj studiji. Naposljetku,

statistički značajna interakcija polimorfne varijante rs689466 i polimorfizma BanI (PLA2G4A), također, nije utvrđena (tablice 6 i 10).

Za razliku od gena PLA2 i PTGS2, gen PPAR α kodira transkripcijski čimbenik. PPAR α je indirektno uključen u signalni put PLA2, budući da prvenstveno regulira metabolizam i homeostazu slobodnih PUFA molekula (248,287). Vezano uz poremećeni metabolizam PUFA u bolesnika sa shizofrenijom, pretpostavili smo da bi polimorfne varijante gena PPAR α mogle predstavljati čimbenik rizika za nastanak shizofrenije. U našu analizu uključili smo funkcijski polimorfizam L162V gena PPAR α , s obzirom da je relativno veliki broj studija istraživao ulogu navedene polimorfne varijante u etiologiji poremećenog metabolizma lipida (244,255,256). Do sada niti jedno istraživanje nije ispitivalo povezanost polimorfne varijante L162V s nastankom shizofrenog oboljenja. Učestalosti genotipova i alela polimorfizma L162V gena PPAR α bile su približno jednake u bolesnika i kontrolne skupine (tablica 3), stoga, polimorfnu varijantu L162V, ne možemo smatrati rizičnim čimbenikom za nastanak shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja u našoj populaciji. Inače, učestalost mnogo rjeđeg V alela u bolesnika (4,4%), kao i u pripadnika kontrolne skupine (4,7%), također, nije značajno različita u odnosu na frekvenciju utvrđenu u ostalim europskim populacijama. Međutim, činjenica da polimorfizam L162V ne postoji u drugim populacijama osim europske, nažalost, uvelike ograničava daljnje mogućnosti istraživanja (263).

Preliminarni rezultati nisu pokazali značajnu interakciju polimorfizma L162V gena PPAR α s ispitivanim polimorfizmima gena PLA2 i PTGS2 (podaci nisu prikazani). Mogući razlozi su veličina našeg uzorka i niska učestalost 162V alela (tablica 3).

5.2. Genski polimorfizmi i klinička ekspresija bolesti

Pod pretpostavkom da polimorfizmi gena signalnog puta PLA2 mogu modulirati kliničku ekspresiju bolesti, ispitali smo utjecaj pojedinačnih polimorfničkih varijanti, ali i njihovu međusobnu interakciju na dob prve hospitalizacije u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem i kliničku simptomatologiju evaluiranu ocjenskim ljestvicama PANSS-a. Povezanost između težine kliničke slike bolesti i abnormalnog metabolizma fosfolipida u bolesnika sa shizofrenijom uočena je u relativno velikom broju studija (70,74,288). Glen i sur. (74) pronašli su povezanost između negativnih simptoma shizofrenije i povišene koncentracije SFA te smanjene koncentracije LC-PUFA, kao što su AA i DHA. Nadalje, Peet i sur. (75) su uočili povezanost između pozitivnih simptoma bolesti i smanjene koncentracije AA. Sumiyoshi i sur. (70) su, u svojem istraživanju, pozitivne simptome shizofrenije povezali sa smanjenom koncentracijom ukupnih, ali ne i pojedinačnih PUFA. Zanimljive rezultate dala je studija u izraelskoj populaciji u kojoj je predominacija negativnih simptoma shizofrenije značajno korelirala s povišenim vrijednostima omjera sfingomijelin/fosfatidiletanolamin, dok je predominacija pozitivnih simptoma pokazala inverznu korelaciju s tim omjerom (288). Visoke vrijednosti navedenog omjera, indiciraju nisku koncentraciju fosfatidiletanolamina, a koja bi mogla biti posljedica smanjene koncentracije AA i DHA u bolesnika sa shizofrenijom, s obzirom da na navedene PUFA otpada 30% ukupnih masnih kiselina koje se ugrađuju u taj fosfolipid. Ponizovsky i sur. (288), implicirali su moguću ulogu povišene aktivnosti enzima PLA2 u deficitu PUFA i etiologiji negativnih simptoma bolesti, međutim, nisu specificirali o kojoj bi se vrsti PLA2 moglo raditi.

Nedavno je utvrđeno da aktivnost enzima cPLA2 u bolesnika sa shizofrenijom, ali i u pripadnika kontrolne skupine ispitanika, značajno korelira s prisutnošću G alela polimorfizma BanI gena PLA2G4A, pri čemu je najveća aktivnost enzima cPLA2 zabilježena u GG

homozigota, a najmanja u AA homozigota (99). Naše prethodno istraživanje na manjem uzorku ispitanika (N = 80) pronašlo je povezanost između ranijeg nastupa bolesti (niže dobi prve hospitalizacije) u muškaraca sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem i odsustva A alela polimorfizma BanI gena PLA2G4A (GG homozigoti vs. AG heterozigoti + AA homozigoti: $21,4 \pm 5,5$ vs. $25,6 \pm 5,4$; $\beta_{A-alel} = 0,35$, $F = 5,77$, $P = 0,02$) (289). Nadalje, trend ranijeg javljanja bolesti u bolesnika ovisno o polimorfizmu BanI, uočen je i na ukupnom uzorku bolesnika (GG homozigoti vs. AG heterozigoti + AA homozigoti: $24,0 \pm 7,7$ vs. $27,1 \pm 6,9$; $\beta_{A-alel} = 0,20$, $F = 5,77$, $P = 0,07$). Međutim, rezultati istraživanja na većem uzorku (N = 203), nisu potvrdili prethodne rezultate, s obzirom da niti polimorfna varijanta BanI, niti ostali ispitivani genski polimorfizmi, pojedinačno, ili u kombinaciji, nisu značajno povezani s dobi prve hospitalizacije u naših bolesnika.

Izuzev našeg istraživanja, jedino je studija provedena u kineskoj populaciji ispitivala povezanost kliničkih simptoma shizofrenije s polimorfnim varijantama gena koji su uključeni u signalni put PLA2 (115). Među istraživanim polimorfizmima u navedenoj studiji, bili su, između ostalog, polimorfna varijanta BanI gena PLA2G4A te polimorfizam rs1549637 gena PLA2G4C za cPLA2. Nekoliko pojedinačnih simptoma ljestvice SANSS-a (engl. *scale for the assessment of negative symptoms*) pokazalo je značajnu povezanost s polimorfizmom BanI, dok ostale ispitivane polimorfne varijante nisu korelirale s kliničkom slikom. Značajna, ali slaba povezanost nekoliko pojedinačnih općih simptoma i polimorfne varijante BanI, uočena je, također, u našem prethodnom istraživanju, čiji je nedostatak bio testiranje velikog broja varijabli na manjem uzorku (289). U sadašnjoj smo studiji testirali povezanost genskih polimorfizama s težinom simptoma shizofrenije izraženih zbrojem pozitivnih, negativnih, općih i ukupnih bodova ocjenske ljestvice PANSS-a. Budući da je naše istraživanje uključilo skupinu kroničnih bolesnika u kojih su zabilježene višestruke epizode ponavljanja bolesti i s obzirom na činjenicu da se simptomi bolesti, napose negativni simptomi shizofrenije,

pojačavaju s trajanjem bolesti (279), dob bolesnika smo, također, uvrstili među nezavisne varijable u regresijske analize. Iako se dob ispitanika pokazala najjačim prediktorom težine općih i ukupnih simptoma PANSS-a, naša je analiza na ukupnom uzorku ispitanika pronašla i povezanost s prisutnošću C alela polimorfizma rs4375 (PLA2G6). Ipak, učinak ovog polimorfizma C/T bio je slab, s obzirom da je u oba slučaja opisao malen udio varijabilnosti PANSS psihopatologije (3,2 – 4,2%) (tablica 15). Izuzev navedene, ostale istražene polimorfne genske varijante, kao niti njihove međusobne kombinacije, nisu korelirale s težinom simptoma ocjenskih ljestvica PANSS-a na ukupnom uzorku bolesnika. Dodatna analiza po spolu pokazala je povezanost prisutnosti T alela PLA2G4C genotipa s težim simptomima (većim zbrojem negativnih simptoma PANSS-a), kao i statistički značajnu povezanost interakcije T alela polimorfizma rs1549637 (PLA2G4C) i C alela polimorfizma rs4375 (PLA2G6) s težinom simptoma (vrijednosti zbroja općih i ukupnih simptoma PANSS psihopatologije) u muškaraca (tablica 16). PLA2G4C genotip pridonosio je s 12% negativnoj simptomatologiji PANSS-a, dok interakcija T alela polimorfizma rs1549637 (PLA2G4C) i C alela polimorfizma rs4375 (PLA2G6) opisuje manji udio varijabilnosti opće i ukupne simptomatologije PANSS-a u bolesnika (7%, odnosno, 11,3%). Genske varijante su pokazale slab učinak na negativne simptome PANSS-a u bolesnika. Značajni prediktori težine negativnih simptoma bolesti su dob i genotip PPAR α , čiji je doprinos iznosio 6% (tablica 16). Činjenica da bolesnice koje su heterozigoti za PPAR α genotip (L162V) pokazuju značajno manju težinu negativnih simptoma PANSS-a u odnosu homozigote (L162L), ukazuje na moguću protektivnu ulogu 162V alela spram razvoja negativnih simptoma u žena. Zanimljivo je da je to jedini slučaj u ovom istraživanju koji upućuje na moguću protektivnu ulogu neke od istraženih polimorfni varijanti s obzirom na ekspresiju kliničkih simptoma bolesti. Naime, moguće je da PPAR α , u uvjetima manjka PUFA, kakvi su prisutni u shizofreniji i shizoafektivnom poremećaju, indukcijom aktivnosti Δ 6-desaturaza, Δ 5-desaturaza i elongaza,

potiče njihovu sintezu iz esencijalnih masnih kiselina. Polimorfna varijanta L162V, stoga bi, modulacijom aktivnosti PPAR α , mogla učinkovitije poticati aktivnost PPAR α u indukciji enzima koji sudjeluju u konverziji LA i α -LA u LC-PUFA. Nedavno istraživanje u tuniškoj populaciji bolesnika sa shizofrenijom ukazuje na značajnu povezanost niske koncentracije AA i DHA u membranama eritrocita i nekoliko negativnih simptoma ocjenske ljestvice SANSS-a (290). Nakon tri mjeseca antipsihotične terapije, u bolesnika su se normalizirale koncentracije navedenih PUFA, koje je, također, pratilo poboljšanje kliničkih simptoma shizofrenije. Spomenuti rezultati, između ostalog, upućuju da bi odgovor bolesnika na terapiju antipsihoticima, bilo zanimljivo pratiti u ovisnosti o PPAR α genotipu. U svakom slučaju, niska učestalost navedenog polimorfizma koja je utvrđena u svega 8,9% bolesnika i 9,4% pripadnika kontrolne skupine (tablica 3), predstavlja ograničavajući čimbenik u analizi i interpretaciji dobivenih rezultata. Polimorfna varijanta L162V se pokazala rizičnom za razvoj dislipidemija u velikom broju studija (244,255,256). U bolesnika s dijabetesom je, međutim, uočen njen protektivni učinak, i to s obzirom na dob nastupa bolesti (nosioci V162 alela obolijevaju u kasnijoj životnoj dobi) te na smanjeni rizik za nastanak srčanog infarkta (287). Nadalje, pronađeno je da navedena polimorfna varijanta smanjuje mogućnost razvoja pretilosti u zdravoj populaciji (248). Različit učinak polimorfizma L162V s obzirom na spol, između ostalog, uočen je na koncentraciju lipida u plazmi, pojavu rizika za obolijevanje od hipertenzije, razvoj pretilosti te odgovor na terapiju statinima (248,291,292). Postojanje interakcije spola i PPAR α genotipa, stoga, nedvojbeno implicira ulogu spolnih hormona na ekspresiju i/ili aktivnost PPAR α , a studije na animalnim modelima indiciraju da bi upravo estrogen mogao imati važnu ulogu u regulaciji aktivnosti PPAR α (292,293). Estrogen, naime, može aktivirati signalne puteve ERK-MAPK (engl. *extracellular receptor kinase-mitogen activated protein kinase*) i protein kinazu A, koji zatim fosforiliraju i aktiviraju PPAR α .

Nadalje, signalni putevi ERK-MAPK posreduju u aktivaciji cPLA2, što za posljedicu ima otpuštanje PUFA i nastanak eikozanoida, važnih prirodnih liganda PPAR α (293).

Činjenica da su ispitivane polimorfne varijante gena PLA2 pokazale najveći utjecaj na kliničke značajke bolesti u muškaraca, implicira, između ostalog, moguću ulogu spolnih hormona na ekspresiju i/ili aktivnost enzima PLA2 i transkripcijskog čimbenika PPAR α . Raniji početak bolesti, teža klinička slika, slabiji odgovor na terapiju antipsihoticima i lošija prognoza shizofrenije u muškaraca, svjedoče u prilog protektivnom djelovanju estrogena na kliničku ekspresiju shizofrenije (63,276-278). Nadalje, pogoršanje bolesti u žena češće je prije menstruacije, nakon poroda i postmenopausalno, kada je snižena koncentracija estrogena, dok su remisije psihotičnih epizoda nerijetko zabilježene tijekom trudnoće, kada su koncentracije navedenog hormona visoke (294). Receptori za estrogene su transkripcijski čimbenici koji pripadaju superobitelji jezgrinih steroidnih receptora, a u mozgu se, osim u neuronima, nalaze u astrocitima, oligodendrocitima i mikroglia stanicama (295). Poznato je da estrogen stimulira rast neurona, potiče neurogenezu i sinaptogenezu, a djeluje i neuroprotektivno, sprečavajući smrt neurona poslije moždanog udara ili mehaničke ozljede (296). Nadalje, estrogen povisuje ekspresiju antioksidativnih enzima, smanjuje ekspresiju NADPH oksidaze, neutralizira slobodne radikale i inhibira neurotoksični utok iona Ca²⁺ u stanicu (297-299). Osobita se važnost pripisuje ulozi estrogena u regulaciji procesa neurotransmisije koja uključuje regulaciju sinteze i oslobađanja pojedinih neurotransmitera, djelovanje na transportere za neurotransmitere, nadzor nad koncentracijom iona Ca²⁺ unutar stanice i sl. (297). Budući da je, katalitička aktivnost pojedinih enzima iz superobitelji PLA2 (cPLA2, ali i sPLA2), upravo ovisna o prisutvu iona Ca²⁺ u citosolu, (102), estrogen bi, putem regulacije homeostaze Ca²⁺, također, mogao utjecati na aktivnost navedenih enzima. Naime, dokazano je da estrogen, u okviru svojeg neuroprotektivnog učinka, može inhibirati neurotoksični utok iona Ca²⁺ u stanicu (299-301). U ovom je istraživanju, međutim, pronađena povezanost sa

polimorfnim varijantama gena PLA2G6 i PLA2G4C koji kodiraju enzime iPLA2 i cPLA2, čija katalitička aktivnost nije ovisna o koncentraciji iona Ca^{2+} u stanici. Ispitivane polimorfne varijante gena PLA2 pri tome su pokazale najveći utjecaj na kliničke značajke bolesti u muških bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Dobiveni rezultati, uz prethodno opisane, dobro poznate razlike u kliničkim značajkama shizofrenog oboljenja s obzirom na spol, upućuju na mogućnost postojanja interakcije ispitivanih polimorfnih varijanti gena PLA2G6 i PLA2G4C i spola bolesnika, a moguće je da navedena interakcija, između ostalog, modulira ekspresiju i/ili aktivnost enzima PLA2.

Iako je u našem istraživanju utvrđena značajna povezanost kliničke ekspresije bolesti s ispitivanim genskim polimorfizmima gena PLA2G6, PLA2G4C i PPAR α , ona je slaba, a opisuje 3,2 – 12% varijabilnosti simptomatologije PANSS-a u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem (tablice 15 i 16). To znači da niz drugih endogenih (genetičkih, hormonskih), ali i okolišnih čimbenika, u okviru abnormalnog metabolizma membranskih fosfolipida i narušene homeostaze PUFA, također, doprinosi varijabilnoj kliničkoj ekspresiji bolesti.

5.3. Genski polimorfizmi i volumetrijski niacinski odgovor

S obzirom da je uzrok oslabljene reakcije kože na niacin još uvijek nepoznat i da ga možemo tražiti na bilo kojem dijelu metaboličke kaskade cPLA2-COX-2 (172,199), pretpostavili smo da bi dva funkcijska polimorfizma navedene kaskade (gena PLA2G4A i PTGS2) mogla pridonositi etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Ovo je prva studija koje je ispitala povezanost oslabljene niacinske reakcije u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem s polimorfizmima gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2.

Oba istražena polimorfizma (varijanta BanI, polimorfizam rs689466) metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 pokazala su značajan, iako slab učinak na ukupni VNR u skupini bolesnika u našoj studiji (tablica 18). Pri tome je jača niacinska reakcija utvrđena u odsutnosti A alela u PLA2G4A genotipu (GG genotipska varijanta) i prisutnosti G alela u PTGS2 genotipu (AG genotip ili GG genotip). Analizom pojedinačnih VNR1-4 vrijednosti u bolesnika, učinak polimorfizma BanI se pokazao samo pri višim koncentracijama otopine niacina (0,1 M i 0,01 M), dok je učinak polimorfizma gena PTGS2 ostao izvan granica statističke značajnosti (tablica 19). Osim što kodiraju dva ključna enzima u mehanizmu niacinske reakcije, geni PLA2G4A i PTGS2 međusobno su udaljeni svega 149 kb (201) te smo, stoga, ispitali i njihovu moguću interakciju u etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora. Statistički značajna sinergija dvaju polimorfizama, međutim, nije utvrđena. U svakom slučaju, s obzirom da obje ispitivane polimorfne varijante opisuju približno svega 3,4% (svaka po 1,7%) varijabilnosti ukupnog VNR-a u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem, prilikom razjašnjavanja etiologije oslabljene niacinske reakcije, potrebno je razmotriti i druge moguće uzroke unutar metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 (154,172).

Niti jedna od studija koje su ispitivale mogući utjecaj uživanja duhana na jačinu odgovora kože na niacin (171,187,196,197) nije utvrdila povezanost između navike pušenja i kožne osjetljivosti na niacin. U našoj je studiji uočen manji, iako značajan, učinak konzumiranja duhana na vrijednost ukupnog VNR-a koji je bio izražen pri najvišoj koncentraciji otopine niacina.

Kao što je bilo za očekivati, pojedinačne VNR1-4 vrijednosti, kao i srednja vrijednosti ukupnog VNR-a, bile su značajno niže u bolesnika u odnosu prema kontrolnoj skupini. Koncentracija niacinske otopine najviše utječe na jačinu odgovora kože na niacin (154,187), što je bio slučaj i u našem istraživanju, pri čemu je koncentracija otopine opisala više od

polovice varijabilnosti ukupnog niacinskog odgovora. Više vrijednosti VNR-a u obje skupine ispitanika pozitivno su korelirale s koncentracijom otopine niacina (slika 6, tablica 18).

Smesny i sur. (183,200) su, u svojim studijama, pronašli značajnu razliku u odgovoru kože na niacin ovisno o dobi i spolu u zdravoj populaciji. U osoba ženskog spola uočen je značajno jači odgovor kože na niacin u odnosu na muškarce, posebice nakon aplikacije 0,001 M koncentracije AMN-a. Osim toga, niacinska reakcija kože pokazala se statistički značajno slabijom u osoba starije dobi, a razlika s obzirom na dob pri tome je bila bila izraženija u žena negoli u muškaraca ($P < 0,01$ vs. $P < 0,05$). Zanimljivo je da u našem istraživanju nije utvrđen učinak dobi i spola na jačinu VNR-a, niti u bolesnika, niti u pripadnika kontrolne skupine ispitanika. Estrogen, najvjerojatnije indukcijom sinteze prostaglandina, potiče vazomotornu funkciju i protok krvi, dok bi testosteron mogao imati inhibitoran učinak na navedene procese. Stoga se, jača niacinska reakcija u osoba ženskog spola, povezuje s većom koncentracijom estrogena, a slabiji odgovor kože na niacin u muškaraca, mogao bi, između ostalog, biti posljedica veće koncentracije testosterona (200,302). Nadalje, promjene u pigmentaciji kože u osoba starije dobi, a koje za posljedicu imaju i promjenu boje kože, mogle bi biti uzrokom slabije niacinske reakcije (171,200).

5.4. Sastav masnih kiselina eritrocita i volumetrijski niacinski odgovor

S obzirom na važnu ulogu masnih kiselina n-3 i n-6 obitelji PUFA u održavanju fluidnosti bioloških membrana, deficit n-3 PUFA, posebice LC-PUFA, poput EPA i DHA, mogao bi dovesti do poremećaja čitavog niza staničnih funkcija (148,303) te smo, stoga, u našem istraživanju ispitali povezanost odgovora kože na niacin u oboljelih s glavnim pojedinačnim i ukupnim masnim kiselinama obje obitelji PUFA. Nadalje, analizu smo upotpunili testiranjem sadržaja glavnih pojedinačnih i ukupnih SFA i MUFA, odgovarajućih omjera masnih kiselina (navedeni u 3.2.3.) te indeksa, poput DBI i PI. Meta-analiza sadržaja

masnih kiselina membrana eritrocita provedena na 429 bolesnika sa shizofrenijom, ukazuje na značajan deficit PUFA koji se najviše pripisuje smanjenoj koncentraciji LC-PUFA, kao što su AA i DHA (304). Rezultati analize sadržaja masnih kiselina u bolesnika i kontrolne skupine ispitanika u našem istraživanju (305) dobro se uklapaju u rezultate opisane u literaturi. U našem uzorku bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem tako je, također, uočen značajan deficit PUFA iz obitelji n-3 i n-6 te ukupnih PUFA (slika 8), a kojemu je najviše doprinijela smanjena koncentracija LA, EPA i DHA (slika 7). Nadalje, povišena koncentracija palmitinske kiseline (16:0) i stearinske kiseline (18:0) (slika 7), doprinijela je višim vrijednostima ukupnih SFA u skupini bolesnika (slika 8), dok se koncentracija AA i ukupnih MUFA nije statistički značajno razlikovala između dvije skupine ispitanika (slike 7 i 8). DBI je pokazatelj ukupne koncentracije nezasićenih masnih kiselina, dok je PI indikator koncentracije prvenstveno PUFA, posebice LC-PUFA te stoga, vrijednosti PI-a, puno specifičnije odražavaju koncentraciju LC-PUFA, primjerice AA, EPA i DHA. Kao što je bilo i za očekivati, vrijednosti obaju indeksa su bile značajno niže u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem (slika 9), s obzirom na značajno nižu koncentraciju PUFA iz obitelji n-6 i n-3 u oboljelih. Nadalje, smanjena koncentracija EPA u bolesnika i spomenuto nepostojanje značajne razlike u koncentraciji AA između bolesnika i kontrolne skupine, rezultirale su, očekivano, nižim vrijednostima omjera EPA/AA u oboljelih. Osim toga, vrijednosti omjera ukupne PUFA/ukupne SFA te ukupne PUFA/ukupne MUFA, kao još jednog indikatora deficita PUFA, bile su, također očekivano, značajno niže u skupini bolesnika (slika 10).

PUFA su biološki izrazito aktivne molekule, pri čemu LC-PUFA, poput AA i DHA čine 80 – 90% esencijalnih masnih kiselina u moždanom tkivu. Nakon unosa prehranom, navedene se molekule vrlo brzo ugrađuju u molekule membranskih fosfolipida (67). Prisutnost PUFA, napose LC-PUFA, u sastavu bioloških membrana, održava membranu

fluidnom, budući da dvostruke kovalentne veze između dvaju ugljikovih atoma u navedenim molekulama stvaraju pregibe u lancu masnih kiselina i tako omogućavaju njihovu bolju bočnu pokretljivost (148,149). Odgovarajući omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u membranama je, između ostalog, od iznimne važnosti za uredno funkcioniranje membranskih receptora i za odvijanje brojnih signalnih procesa u stanici (55,148). Molekula DHA sa svojih šest dvostrukih kovalentnih veza predstavlja najviše nezasićenu masnu kiselinu u biološkim membranama i moguće, najviše pridonosi održavanju njihove fluidnosti. S obzirom na značajno izražen deficit DHA, ali i drugih LC-PUFA, poput EPA, koja sa svojih pet dvostrukih kovalentnih veza, također, pokazuje visoki stupanj nezasićenosti, rezultati analize sadržaja masnih kiselina u našem istraživanju, impliciraju smanjenu fluidnost bioloških membrana u bolesnika. Ugradnjom u lipidne splavi i posljedičnom regulacijom njihove dinamike, LC-PUFA, i to prvenstveno DHA, mogu, također, utjecati na procese stanične signalizacije (306,307). Lipidne splavi su male (10 – 200 nm), visoko-organizirane heterogene strukture bioloških membrana koje se sastoje od kolesterola, sfingolipida i specifičnih proteina (150,303). S obzirom da se veliki broj receptora i G-proteina uključenih u staničnu signalizaciju nalazi upravo na lipidnim splavima, lipidnim se splavima pripisuje važna uloga u procesu prijenosa signala u stanici. Potrebno je istaknuti da je molekula DHA, zbog velikog broja dvostrukih kovalentnih veza te posljedične iznimno fleksibilne konformacije, sterički nekompatibilna s kolesterolom, kojim su lipidne splavi osobito bogate (303,308). Upravo stoga, nije isključivo da smještaj DHA unutar lipidnih splavi dovodi do nastanka dviju različitih vrsta domena, od kojih jedne sadrže DHA, a druge regije bogate kolesterolom (308,309). Ugradnja DHA u lipidne splavi, naime, dovodi do povećanja njihove veličine, uzrokuje njihovu reorganizaciju te premještanje brojnih proteina koji su usidreni u lipidne splavi, a što može modulirati signalni odgovor stanice (303,308). S obzirom na vrlo nisku koncentraciju sfingolipida i kolesterola, u unutarnjoj membrani mitohondrija,

najvjerojatnije, ne dolazi do formiranja lipidnih splavi (310,311). Ipak, novija istraživanja impliciraju ulogu DHA u regulaciji dinamike unutarnje membrane mitohondrija, a koja bi prvenstveno mogla biti posredovana njenom ugradnjom u molekulu kardiolipina, važnog fosfolipida u membrani mitohondrija. Ugradnja fleksibilne DHA u molekulu kardiolipina tako modulira njegovu interakciju s brojnim lipidima i proteinima, što posljedično utječe na različita zbivanja u unutarnjoj membrani mitohondrija, poput transporta elektrona, oksidative fosforilacije i sl. (311).

S obzirom na opisanu važnu ulogu LC-PUFA u regulaciji stanične signalizacije, održavanjem fluidnosti, kao i regulacijom dinamike bioloških membrana, pretpostavili smo da bi abnormalna kompozicija membrane, uslijed deficita LC-PUFA, mogla implicirati poremećenu funkciju niacinskih receptora, ali i drugih receptora povezanih s G-proteinima i predstavljati jedan od mogućih uzroka oslabljenog odgovora na niacin u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Štoviše, abnormalnosti receptora povezanih s G-proteinima za neurotransmitere, poput dopamina, serotonina i glutamata u oboljelih od shizofrenije dobro su poznate u znanstvenoj literaturi (312-314), a nedavno je, također, uočena smanjena ekspresija niacinskih receptora u mozgu umrlih bolesnika (315). Messamore i sur. (172,184) su, u svojim su studijama, ispitivali osjetljivost kože na niacin mjerenjem EC_{50} vrijednosti za niacin (EC_{50} označava koncentraciju agonista, tj. niacina koja uzrokuje učinak jednak polovici svojeg maksimalnog učinka). Uočene značajno više EC_{50} vrijednosti u bolesnika sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu skupinu, autori pripisuju smanjenoj osjetljivosti kože na niacin u oboljelih, a koja bi, između ostalog, također mogla svjedočiti u prilog mogućoj smanjenoj ekspresiji niacinskih receptora. Ipak, u našem istraživanju nismo potvrdili hipotezu o utjecaju deficita membranskih PUFA na oslabljen odgovor kože na niacin u bolesnika sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Iznenadujuće, značajno niže VNR1-4 vrijednosti u skupini bolesnika, nisu korelirale sa sastavom niti ukupnih, niti

pojedinačnih masnih kiselina obitelji n-6 i n-3 PUFA. Nadalje, ispitivani omjeri ukupnih i pojedinačnih masnih kiselina te indeksi, također, nisu pokazali povezanost s oslabljenom reakcijom kože na niacin u oboljelih. Zanimljivo je da je u našoj studiji, kao i u dva prethodna istraživanja (172,174), oslabljena reakcija kože na niacin uočena u bolesnika u čijim membranama nije bilo deficita AA, a što ukazuje da smanjena koncentracija AA nije glavni razlog abnormalne niacinske reakcije, kao što se donedavno smatralo.

Naposljetku, moguće je da upravo neki drugi, za sada nepoznati čimbenici, više doprinose etiologiji abnormalne niacinske reakcije u oboljelih. Novija studija, smanjenu ekspresiju niacinskih receptora utvrđenu u moždanom tkivu umrlih bolesnika sa shizofrenijom pripisuje, između ostalog, mogućoj pretjeranoj degradaciji proteina za niacinski receptor, ili pak abnormalnostima u mehanizmu alternativnog prekrajanja (315). Istraživanja na animalnim modelima ukazuju na važnu ulogu multifunkcijskih adaptorskih proteina beta arestina 1 (β -arestina 1) u nastanku niacinskog odgovora kože. Navedene molekule, naime, tvore komplekse s receptorima povezanim s G-proteinima, poput receptora za niacin, te nakon vezanja niacina, aktiviraju signalni put cPLA2. Oslabljena niacinsku reakcija kože nedavno je uočena u miševa sa smanjenom ekspresijom molekula β -arestina 1 (316).

Ograničenje istraživanja etiologije oslabljene niacinske reakcije u našoj studiji, nedvojbeno predstavlja činjenica da je povezanost VNR-a s polimorfizmima gena PLA2G4A i PTGS2, kao i sastavom masnih kiselina membrana perifernih stanica, provedena isključivo u skupini bolesnika. Nadalje, istraživanje bi se moglo proširiti na veći uzorak ispitanika, a s obzirom da oslabljena niacinska reakcija, kao i deficit PUFA, nisu isključiva značajka shizofrenije, od posebnog će značaja biti studije koje će u istraživanje etiologije abnormalnog niacinskog odgovora uključiti ispitanike oboljele od drugih neuropsihijatrijskih bolesti, poput bipolarnog afektivnog poremećaja, depresije i sl.

Iako u ovom istraživanju nisu uzeti u obzir, okolišni čimbenici, poput prehrane i uživanja duhanskog dima mogli bi, uz genotip, utjecati na aktivnost enzima PLA2 i transkripcijskog čimbenika PPAR α , kao i na sastav masnih kiselina u membranama i/ili njegovu korelaciju s jačinom niacinskog odgovora. Sinteza LC-PUFA, ključnih sastavnica membranskih fosfolipida, ovisi o unosu LA i α -LA putem prehrane te procesu konverzije pomoću Δ 6-desaturaza, Δ 5-desaturaza i elongaza (80,81). Poznato je da je proces pretvorbe LA i α -LA u LC-PUFA manje učinkovit u muškaraca (84) i u osoba starije dobi (67). U konverziji LA i α -LA u n-6 i n-3 LC-PUFA sudjeluju isti enzimi, stoga, veće koncentracije LA, uslijed njihovog većeg unosa prehranom, mogu inhibirati pretvorbu α -LA u LC-PUFA (82). Studije na animalnim modelima pronalaze zanimljive posljedice dugotrajnog deficita n-3 PUFA u prehrani na metabolizam ukupnih PUFA i aktivnost enzima PLA2 u moždanom tkivu. Petnaest tjedana deprivacije unosa n-3 PUFA, dovelo je do smanjenja koncentracije DHA, povećanja koncentracije n-6 PUFA, napose AA, povišenja aktivnosti enzima cPLA2 i sPLA2 te smanjenja aktivnosti iPLA2 (317,318). Učestalost uživanja duhanskog dima značajno je veća u bolesnika sa shizofrenijom u odnosu na zdravu populaciju (89,90), što je, također, uočeno i u našem uzorku bolesnika (tablica 1). Predloženi su različiti mehanizmi kojima bi pušenje moglo utjecati na sastav membranskih PUFA, poput redukcije njihove koncentracije uslijed pojačanog stanja oksidacijskog stresa, moduliranjem ekspresije/aktivnosti enzima PLA2 i sl. (9,91,92,319,320). Hibbeln i sur. (321) pronalaze vrlo zanimljivu povezanost između navike pušenja i prehrane u bolesnika sa shizofrenijom, pri čemu uočavaju da bolesnici koji uživaju duhan unose u organizam mnogo manje LA nego bolesnici nepušači. U svojoj su studiji, također, opazili da bolesnice koje ne puše, konzumiraju više DHA u odnosu na oboljele muškarce, neovisno o tome da li su oni pušači ili nepušači. Naposljetku, učinci duhanskog dima na koncentraciju membranskih PUFA mogli bi

ovisiti i o trajanju konzumacije duhanskog dima, stadiju bolesti (akutni ili kronični) te vrsti terapije (69). Nadalje, dokazano je da interakcija gena i nutritijenata može regulirati i aktivnost transkripcijskog čimbenika PPAR α . Naime, studija koja je proučavala učinak polimorfizma L162V gena PPAR α na koncentraciju lipida u plazmi, pronalazi značajnu interakciju navedene polimorfne varijante i unosa PUFA u organizam (322). Pri tome manjak PUFA u prehrani povećava koncentraciju triglicerida i apolipoproteina C3 u plazmi u ispitanika s varijantom 162V, dok visoki unos PUFA, reda n-3, kao i n-6, snizuje njihovu koncentraciju. Zanimljivo je da u ispitanika s L162L genotipom vrijednosti koncentracije lipida u plazmi nisu pokazivale varijacije ovisno o količini unosa PUFA u organizam.

Na temelju navedenog, a s obzirom na multifaktorijalni karakter shizofrenije, razvidno je da bi preciznija kontrola doprinosa različitih čimbenika (prehrana, uživanje duhanskog dima, spol, dob ispitanika i sl.) u etiologiji i/ili kliničkoj ekspresiji shizofrenije, uz sustavno, multidisciplinarno i standardizirano istraživanje interakcije gena i okolišnih čimbenika, mogla imati poseban značaj u razjašnjavanju etiopatogeneze bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Istraživanjem uloge polimorfničkih varijanti gena uključenih u signalni put PLA2 na podložnost za razvoj shizofrenije i shizoafektivnog poremećaja, kao i na kliničku ekspresiju bolesti, došli smo do sljedećih zaključaka:

1) ispitivani genski polimorfizmi, kao zasebni čimbenici, ne pridonose podložnosti za razvoj bolesti

2) značajno veća učestalost kombinacije CT genotipa gena PLA2G6 i AT genotipa gena PLA2G4C u bolesnika, upućuje da bi navedena kombinacija mogla biti povezana s većim rizikom za razvoj bolesti

3) polimorfizmi gena uključenih u signalni put PLA2, pojedinačno ili u kombinaciji, ne utječu na dob nastupa bolesti

4) istražene polimorfne varijante gena PLA2G6, PLA2G4C i PPAR α , u interakciji sa spolom bolesnika, moduliraju ekspresiju kliničkih simptoma PANSS-a (3,2 – 12%)

Iz ispitivanja moguće uloge polimorfizama gena metaboličke kaskade cPLA2/COX-2 (BanI u PLA2G4A te rs689466 u PTGS2) i sastava masnih kiselina perifernih stanica (eritrocita) u etiologiji oslabljenog niacinskog odgovora u bolesnika, proizlazi:

5) oba polimorfizma neznatno doprinose etiologiji oslabljene niacinske reakcije (svaki s po 1,7%), dok deficit n-3 i n-6 PUFA u membranama eritrocita nije uzrok oslabljenog niacinskog odgovora kože

7. LITERATURA

1. Jakovljević M. Suvremena farmakoterapija shizofrenije. Zagreb: Medicinska naklada; 2001, str. 2-24.
2. Menezes NM, Arenovich T, Zipursky RB. A systematic review of longitudinal outcome studies of first-episode psychosis. *Psychol Med* 2006;36:1349-62.
3. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* 2009;374:635-45.
4. Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:1123-31.
5. Ustün TB, Rehm J, Chatterji S i sur. Multiple-informant ranking of the disabling effects of different health conditions in 14 countries. WHO/NIH Joint Project CAR Study Group. *Lancet* 1999;354:111-5.
6. Shi J, Levinson DF, Duan J i sur. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 2009;460:753-7.
7. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 2008;30:67-76.
8. Picchioni MM, Murray RM. Schizophrenia. *BMJ* 2007;335:91-5.
9. Skosnik PD, Yao JK. From membrane phospholipid defects to altered neurotransmission: is arachidonic acid a nexus in the pathophysiology of schizophrenia? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:367-84.
10. Valdes AM, Spector TD. The genetic epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:139-43.
11. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502-17.
12. Allen NC, Bagade S, McQueen MB i sur. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 2008;40:827-34.

13. Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 2003;361:417-9.
14. Sripichai O, Fucharoen S. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *J Med Assoc Thai* 2007;90:394-8.
15. Buretić-Tomljanović A, Tomljanović D. Human genome variation in health and in neuropsychiatric disorders. *Psychiatr Danub* 2009;4:562-9.
16. Gogos JA, Gerber DJ. Schizophrenia susceptibility genes: emergence of positional candidates and future directions. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:226-33.
17. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet* 2007;38:37-42.
18. Wain LV, Armour JAL, Tobin MD. Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet* 2009;374:340-50.
19. St Clair D. Copy number variation and schizophrenia. *Sch Bull* 2009;35:9-12.
20. Singh SM, Castellani CA, O'Reilly RL. Copy number variation showers in schizophrenia: an emerging hypothesis. *Mol Psychiatry* 2009;14:356-8.
21. Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15:319-29.
22. Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2011;198:173-5.
23. Weinberg SM, Jenkins EA, Marazita ML, Maher BS. Minor physical anomalies in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 2007;89:72-85.
24. Lloyd T, Dazzan P, Dean K i sur. Minor physical anomalies in patients with first episode psychosis: their frequency and diagnostic specificity. *Psychol Med* 2008;38:71-7.

25. Compton MT, Walker E. Physical manifestation of neurodevelopmental disruption: are minor physical anomalies part of the syndrome of schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 2009;35:425-36.
26. Franco JG, Valero J, Labad A. Minor physical anomalies and schizophrenia: literature review. *Actas Esp Psiquiatr* 2010;38:365-71.
27. Gassab L, Aissi M, Slama H, Gaha L, Mechri A. Prevalence and score of Minor Physical Anomalies in patients with schizophrenia and their first degree relatives: a Tunisian study. *Compr Psychiatry* 2013;doi: 10.1016/j.comppsy.2012.11.007.
28. Bersani G, Iannitelli A, Maselli P i sur. Low nerve growth factor plasma levels in schizophrenic patients: a preliminary study. *Schizophr Res* 1999;37:201-3.
29. Durany N, Michel T, Zöchling R i sur. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res* 2001;52:79-86.
30. Iritani S, Niizato K, Nawa H, Ikeda K, Emson PC. Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:801-7.
31. Csernansky JG. Neurodegeneration in schizophrenia: evidence from in vivo neuroimaging studies. *ScientificWorldJournal* 2007;7:135-43.
32. Andreasen NC, Olsen SA, Dennert JW, Smith MR. Ventricular enlargement in schizophrenia: relationship to positive and negative symptoms. *Am J Psychiatry* 1982;139:297-302.
33. Kasai K, Shenton ME, Salisbury DF i sur. Progressive decrease of left Heschl gyrus and planum temporale gray matter volume in first-episode schizophrenia: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60:766-75.
34. Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry* 1999;729-39.

35. Weinberger DR, McClure RK. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:553-8.
36. Gross G, Huber G. Schizophrenia: neurodevelopmental disorder or degenerative brain process? *Fortschr Neurol Psychiatr* 2008;76 Suppl 1:S57-62. doi: 10.1055/s-2008-1038153.
37. Jarskog LF, Gilmore JH, Selinger ES, Lieberman JA. Cortical bcl-2 protein expression and apoptotic regulation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000;48:641-50.
38. Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *Am J Psychiatry* 2004;161:109-15.
39. Farber NB, Hanslick J, Kirby C, McWilliams L, Olney JW. Serotonergic agents that activate 5HT_{2A} receptors prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 1998;18:57-62.
40. Perrone-Bizzozero NI, Sower AC, Bird ED, Benowitz LI, Ivins KJ, Neve RL. Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14182-7.
41. Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res* 1982-1983;17:319-34.
42. Pogue-Geile MF. Developmental processes and schizophrenia. Waddington J, Buckley P, ur. *The neurodevelopmental basis of schizophrenia*. Georgetown: R.G. Landes; 1996, str. 167-78.
43. Hayashi-Takagi A, Barker PB, Sawa A. Readdressing synaptic pruning theory for schizophrenia: Combination of brain imaging and cell biology. *Commun Integr Biol* 2011;4:211-2.
44. Rosso IM, Cannon TD, Huttunen T, Huttunen MO, Lönqvist J, Gasperoni TL. Obstetric

risk factors for early-onset schizophrenia in a Finnish birth cohort. *Am J Psychiatry* 2000;157:801-7.

45. Fendri C, Mechri A, Khiari G, Othman A, Kerkeni A, Gaha L. Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review. *Encephale* 2006;32:244-52.

46. Bitanhirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:878-93.

47. Wallach JV. Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception. *Med Hypotheses* 2009;72:91-4.

48. Gaur N, Gautam S, Gaur M, Sharma P, Dadheech G, Mishra S. The biochemical womb of schizophrenia: A review. *Indian J Clin Biochem* 2008;23:307-27.

49. Lembregts M, Anseau M. Biological markers in schizophrenia. *Encephale* 1993;19:501-23.

50. Duncan GE, Sheitman BB, Lieberman JA. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;29:250-64.

51. Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G i sur. Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998;44:1099-117.

52. Kristensen JD, Svensson B, Gordh T Jr. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain* 1992;51:249-53.

53. Breier A, Adler CM, Weisenfeld N i sur. Effects of NMDA antagonism on striatal dopamine release in healthy subjects: application of a novel PET approach. *Synapse* 1998;29:142-7.

54. Vollenweider FX, Vontobel P, Oye I, Hell D, Leenders KL. Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a [¹¹C]raclopride PET study of a model psychosis in humans. *J Psychiatr Res* 2000;34:35-43.

55. Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000;47:8-21.
56. Henneberg AE, Horter S, Ruffert S. Increased prevalence of antibrain antibodies in the sera from schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1994;14:15-22.
57. Das UN. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in the pathobiology of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;42:122-34.
58. Hanson DR, Gottesman II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet* 2005;6:7.
59. Saetre P, Emilsson L, Axelsson E, Kreuger J, Lindholm E, Jazin E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry* 2007;7:46.
60. Elman I, Adler CM, Malhotra AK, Bir C, Pickar D, Breier A. Effect of acute metabolic stress on pituitary-adrenal axis activation in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1998;155:979-81.
61. Newcomer JW, Faustman WO, Whiteford HA, Moses Jr JA, Csernansky JG. Symptomatology and cognitive impairment associate independently with post-dexamethasone cortisol concentrations in unmedicated schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991;29:855-64.
62. Walder DJ, Walker EF, Lewine RJ. Cognitive functioning, cortisol release, and symptom severity in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000;48:1121-32.
63. Canuso CM, Pandina G. Gender and schizophrenia. *Psychopharmacol Bull* 2007;40:178-90.
64. Feldberg W. Possible association of schizophrenia with a disturbance in prostaglandin metabolism: a physiological hypothesis. *Psychiatr Med* 1976;6:359-69.
65. Horrobin, DF. Schizophrenia as a prostaglandin deficiency disease. *Lancet* 1977;1:936-7.
66. Horrobin DF. Schizophrenia: a biochemical disorder. *Biomedicine* 1980;32:54-5.

67. Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res* 1998;30:193-208.
68. Yao JK, Leonard S, Reddy RD. Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2000;42:7-17.
69. Reddy RD, Keshavan MS, Yao JK. Reduced red blood cell membrane essential polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia at neuroleptic-naive baseline. *Schizophr Bull* 2004;30:901-11.
70. Sumiyoshi T, Matsui M, Itoh H i sur. Essential polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. *Psychiatry Res* 2008;157:87-93.
71. McNamara RK, Jandacek R, Rider T i sur. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: gender differences and partial normalization with antipsychotic medications. *Schizophr Res* 2007;91:37-50.
72. Kale A, Joshi S, Naphade N i sur. Opposite changes in predominantly docosahexaenoic acid (DHA) in cerebrospinal fluid and red blood cells from never-medicated first-episode psychotic patients. *Schizophr Res* 2008;98:295-301.
73. Bentsen H, Solberg DK, Refsum H i sur. Bimodal distribution of polyunsaturated fatty acids in schizophrenia suggests two endophenotypes of the disorder. *Biol Psychiatry* 2011;70:97-105.
74. Glen AI, Glen EM, Horrobin DF i sur. A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr Res* 1994;12:53-61.
75. Peet M, Laugharne J, Rangarajan N, Horrobin D, Reynolds G. Depleted red cell membrane essential fatty acids in drug-treated schizophrenic patients. *J Psychiatr Res* 1995;29:227-32.
76. Chiu CC, Huang SY, Su KP i sur. Polyunsaturated fatty acid deficit in patients with bipolar mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003;13:99-103.

77. Richardson AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids in childhood developmental and psychiatric disorders. *Lipids* 2004;39:1215-22.
78. Plourde M, Fortier M, Vandal M i sur. Unresolved issues in the link between docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77:301-8.
79. Su KP. Mind-body interface: the role of n-3 fatty acids in psychoneuroimmunology, somatic presentation, and medical illness comorbidity of depression. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17:151-7.
80. Peet M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2008;45:19-25.
81. Liu Y, Jandacek R, Rider T, Tso P, McNamara RK. Elevated delta-6 desaturase (FADS2) expression in the postmortem prefrontal cortex of schizophrenic patients: relationship with fatty acid composition. *Schizophr Res* 2009;109:113-20.
82. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:674-88.
83. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 2011;44:203-15.
84. Burdge GC. Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:161-8.
85. Strassnig M, Singh Brar J, Ganguli R. Dietary fatty acid and antioxidant intake in community-dwelling patients suffering from schizophrenia. *Schizophr Res* 2005;76:343-51.
86. Henderson DC, Borba CP, Daley TB i sur. Dietary intake profile of patients with schizophrenia. *Ann Clin Psychiatry* 2006;18:99-105.

87. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* 2002;58:1-10.
88. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V i sur. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatr* 2003;53:56-64.
89. Leonard S, Mexal S, Freedman R. Smoking, genetics and schizophrenia: Evidence for Self Medication. *J Dual Diagn* 2007;3:43-59.
90. Kohnomi S, Suemaru K, Kawasaki H, Choshi T, Hibino S, Araki H. Nicotinic acetylcholine receptors are possible therapeutic targets for schizophrenia. *Yakugaku Zasshi* 2009;129:197-201.
91. Sastry BV, Hemontolor ME: Influence of nicotine and cotinine on retinal phospholipase A2 and its significance to macular function. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998;14:447-58.
92. Marin P, Hamon B, Glowinski J, Premont J. Nicotine-induced inhibition of neuronal phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1277-83.
93. Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79:85-91.
94. Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006;59:401-7.
95. Chang MC, Contreras MA, Rosenberger TA i sur. Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of moodstabilizers. *J Neurochem* 2001;77:796-803.

96. Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine upregulates activity, protein and mRNA levels of cytosolic phospholipase A2 in rat frontal cortex. *Pharmacogenomics J* 2006;6:413–20.
97. Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res* 1999;821:407-13.
98. Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A2 activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res* 2003;61:1-6.
99. Barbosa NR, Junqueira RM, Vallada HP, Gattaz WF. Association between BanI genotype and increased phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2007;257:340-3.
100. Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 2002;531:2-6.
101. Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. The role of phospholipase A2 in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2007;114:231-8.
102. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 2009;Suppl:S237-42.
103. Yao JK, van Kammen DP. Membrane phospholipids and cytokine interaction in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 2004;59:297-326.
104. Gattaz WF, Köllisch M, Thuren T, Virtanen JA, Kinnunen PK. Increased plasma phospholipase-A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry* 1987;22:421-6.

105. Schmitt A, Maras A, Petroianu G, Braus DF, Scheuer L, Gattaz WF. Effects of antipsychotic treatment on membrane phospholipid metabolism in schizophrenia. *J Neural Transm* 2001;108:1081-91.
106. Glen ACA, MacDonald DJ, Boyle RM. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in red cells in schizophrenia and other psychiatric disorders. Peet M, Glen AIM, Horrobin DF, ur. *Phospholipid Spectrum Disorders in Psychiatry and Neurology*. Carnforth: Marius Press, 2003; str. 183-92.
107. Gattaz WF, Valente KD, Raposo NR, Vincentiis S, Talib LL. Increased PLA2 activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. *J Psychiatr Res* 2011;45:1617-20.
108. Brown CM, Austin DW. Autistic disorder and phospholipids: A review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;84:25-30.
109. Frieboes RM, Moises HW, Gattaz WF i sur. Lack of association between schizophrenia and the phospholipase-A₂ genes cPLA2 and sPLA2. *Am J Med Genet* 2001;105:246-9.
110. Peet M, Ramchand CN, Lee J i sur. Association of the BanI dimorphic site at the human cytosolic phospholipase A2 gene with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 1998;8:191-2.
111. Junqueira R, Cordeiro Q, Meira-Lima I, Gattaz WF, Vallada H. Allelic association analysis of phospholipase A2 genes with schizophrenia, *Psychiatr Genet* 2004;14:157-60.
112. Pae CU, Yu HS, Lee KU i sur. BanI polymorphism of the cytosolic phospholipase A2 gene may confer susceptibility to the development of schizophrenia, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:739-41.
113. Tao R, Yu Y, Zhang X i sur. Cytosolic PLA2 gene possibly contribute to the etiology of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;137B:56-8.

114. Barbosa NR, Junqueira RM, Vallada HP, Gattaz WF. Association between BanI genotype and increased phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2007;257:340-3.
115. Tao R, Wei J, Guo Y i sur. The PLA2G4A gene and negative symptoms in a Chinese population. *Schizophr Res* 2006;86:326-8.
116. Yao JK, van Kammen DP, Gurklis JA. Abnormal incorporation of arachidonic acid into platelets of drug-free patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 1996;60:11-21.
117. Nwankwo JO, Spector AA, Domann FE. A nucleotide insertion in the transcriptional regulatory region of FADS2 gives rise to human fatty acid delta-6-desaturase deficiency. *J Lipid Res* 2003;44:2311-9.
118. Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L i sur. SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* 2008;43:289-99.
119. Glaser C, Heinrich J, Koletzko B. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism* 2010;59:993-9.
120. Zhang Z, Lee YC, Kim SJ i sur. Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration. *Hum Mol Genet* 2007;16:837-47.
121. Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem* 1997;69:889-901.
122. Farooqui AA, Horrocks LA. Brain phospholipases A2: a perspective on the history. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71:161-9.
123. Law MH , Cotton RGH, Berger GE. The role of phospholipases A2 in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2006;11:547-56.

124. Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim biophys acta*. 2002;1585:72-6.
125. Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett* 1997;410:49-53.
126. Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br J Pharmacol* 2003;139:1014-22.
127. Lee JC, Simonyi A, Sun AY, Sun GY. Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011;116:813-9.
128. Tanaka H, Takeya R, Sumimoto H. A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:320-6.
129. Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 2004;45:205-13.
130. Guo Z, Su W, Ma Z, Smith GM, Gong MC. Ca²⁺-independent phospholipase A2 is required for agonist-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2003;278:1856-63.
131. Bao S, Miller DJ, Ma Z i sur. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem* 2004;279:38194-200.
132. Bao S, Song H, Wohltmann M i sur. Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis. *J Biol Chem* 2006;281:20958-73.
133. Bao S, Li Y, Lei X i sur. Attenuated free cholesterol loading-induced apoptosis but preserved phospholipid composition of peritoneal macrophages from mice that do not express group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem* 2007;282:27100-14.

134. Ramanadham S, Yarasheski KE, Silva MJ i sur. Age-related changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta)-null mice. *Am J Pathol* 2008;172:868-81.
135. Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease* Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:197-210.
136. Phillis JW, O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;44:13-47.
137. Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007;855-9.
138. Calderon F, Kim HY. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2004;90:979-88.
139. Bousquet M, Gibrat C, Saint-Pierre M, Julien C, Calon F, Cicchetti F. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:1401-8.
140. Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC i sur. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:692-703.
141. Mejia RO, Mucke L. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:784-90.
142. Yoshihara Y, Yamaji M, Kawasaki M, Watanabe Y. Ontogeny of cytosolic phospholipase A2 activity in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:350-5.

143. Yavin E. Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:203-11.
144. Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* 2005;15:159-66.
145. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalin S i sur. Phospholipid membrane abnormalities and reduced niacin skin flush response in schizophrenia. *Psychiatr Danub* 2008;20:372-83.
146. Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 2006;52:201-43.
147. Tassoni D, Kaur G, Weisinger RS, Sinclair AJ. The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;1:220-8.
148. Kidd PM, Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev* 2007;12:207-27.
149. Rogers PJ, Appleton KM, Kessler D i sur. No effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) supplementation on depressed mood and cognitive function: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2008;99:421-31.
150. Pike LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 2004;378:281-92.
151. Puri BK, Ross BM, Treasaden IH. Increased levels of ethane, a non-invasive, quantitative, direct marker of n-3 lipid peroxidation, in the breath of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:858-62.
152. Yang J, Chen T, Sun L i sur. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2013;18:67-78.

153. Light GA, Swerdlow NR, Rissling AJ i sur. Characterization of neurophysiologic and neurocognitive biomarkers for use in genomic and clinical outcome studies of schizophrenia. *PLoS One* 2012;7:e39434.
154. Nadalin S, Buretić-Tomljanović A, Rubeša G i sur. Niacin skin flush test: a research tool for studying schizophrenia *Psychiatr Danub* 2010;22:14-27.
155. Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003;160:284-9.
156. Spelman LM, Walsh PI, Sharifi N, Collins P, Thakore JH. Impaired glucose tolerance in first-episode drug-naive patients with schizophrenia *Diabet Med* 2007;24:481-5.
157. Fernandez-Egea E, Bernardo M, Donner T i sur. Metabolic profile of antipsychotic-naïve individuals with non-affective psychosis. *Br J Psychiatry* 2009;194:434-8.
158. Hazlett EA, Buchsbaum MS, Kemether E i sur. Abnormal glucose metabolism in the mediodorsal nucleus of the thalamus in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004;161:305-14.
159. Martins-de-Souza D, Harris LW, Guest PC, Bahn S. The role of energy metabolism dysfunction and oxidative stress in schizophrenia revealed by proteomics. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:2067-79.
160. McBean GJ. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:299-302.
161. Braff DL, Light GA. The use of neurophysiological endophenotypes to understand the genetic basis of schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 2005;7:125-35.
162. Gur RE, Calkins ME, Gur RC. i sur The Consortium on the Genetics of Schizophrenia: neurocognitive endophenotypes. *Schizophr Bull* 2007;33:49-68.
163. <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/niacin/>, pristupljeno 21. rujna 2012.
164. Wan P, Moat S, Anstey A. Pellagra: a review with emphasis on photosensitivity. *Br J Dermatol* 2011;164:1188-200.

165. Capuzzi DM, Morgan JM, Brusco OA Jr, Intenzo CM. Niacin dosing: relationship to benefits and adverse effects. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:64-71.
166. Gass JD. Nicotinic acid maculopathy. 1973. *Retina* 2003;23:500-10.
167. Murrell TW Jr, Taylor WM. The cutaneous reaction to nicotinic acid (niacin)-furfuryl. *AMA Arch Derm* 1959;79:545-50.
168. Bosveld-van Haandel L, Kneegtering R, Kluiters H, van den Bosch RJ. Niacin skin flushing in schizophrenic and depressed patients and healthy controls. *Psychiatry Res* 2006;143:303-6.
169. Smesny S, Klemm S, Stockebrand M i sur. Endophenotype properties of niacin sensitivity as marker of impaired prostaglandin signalling in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77:79-85.
170. Jacobson TA. A "hot" topic in dyslipidemia management--"how to beat a flush": optimizing niacin tolerability to promote long-term treatment adherence and coronary disease prevention. *Mayo Clin Proc* 2010;85:365-79.
171. Smesny S, Rosburg T, Riemann S i sur. Impaired niacin sensitivity in acute first-episode but non in multi-episode schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;72:393-402.
172. Messamore E, Hoffman WF, Yao JK. Niacin sensitivity and the arachidonic acid pathway in schizophrenia. *Schizophr Res* 2010;122:248-56.
173. Nilsson BM, Hultman CM, Wiesel FA. Niacin skin-flush response and electrodermal activity in patients with schizophrenia and healthy controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;74:339-46.
174. Maclean R, Ward PE, Glen I, Roberts SJ, Ross BM. On the relationship between methylnicotinate-induced skin flush and fatty acids levels in acute psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:927-33.

175. Glen AI, Cooper SJ, Rybakowski J, Vaddadi K, Brayshaw N, Horrobin DF. Membrane fatty acids, niacin flushing and clinical parameters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55:9-15.
176. Fiedler P, Wolkin, Rotrosen J. Niacin-induced flush as a measure of prostaglandin activity in alcoholics and schizophrenics. *Biol Psychiatry* 1986;21:1347-50.
177. Ward PE, Sutherland J, Glen EM, Glen AI. Niacin skin flush in schizophrenia: a preliminary report. *Schizophr Res* 1998;29:269-74.
178. Rybakowski J, Weterle R. Niacin test in schizophrenia and affective illness. *Biol Psychiatry* 1991;29:834-6.
179. Wilson DW, Douglass AB. Niacin skin flush is not diagnostic of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1986;21:974-7.
180. Hudson CJ, Lin A, Cogan S, Cashman F, Warsh JJ. The niacin challenge test: clinical manifestation of altered transmembrane signal transduction in schizophrenia? *Biol Psychiatry* 1997;41:507-13.
181. Berger GB, McGorry P. The topical niacin flush test-a new assessment scale. *World journal of biological psychiatry* 2001;2:134-5.
182. Puri BK, Hirsch SR, Easton T, Richardson AJ. A volumetric biochemical niacin flush-based index that noninvasively detects fatty acid deficiency in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:49-52.
183. Smesny S, Riemann S, Riehemann S, Bellemann ME, Sauer H. Quantitative measurement of induced skin reddening using optical reflection spectroscopy-methodology and clinical application. *Biomed Tech (Berl)* 2001;46:280-6.
184. Messamore E, Hoffman WF, Janowsky A. The niacin skin flush abnormality in schizophrenia: a quantitative dose-response study. *Schizophr Res* 2003;62:251-8.

185. Ross BM, Hughes B, Turenne S, Seeman M, Warsh JJ. Reduced vasodilatory response to methylnicotinate in schizophrenia as assessed by laser Doppler flowmetry. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:191-7.
186. Smesny S, Berger G, Rosburg T i sur. Potential use of the topical niacin skin test in early psychosis -- a combined approach using optical reflectionspectroscopy and a descriptive rating scale. *J Psychiatr Res* 2003;37:237-47.
187. Liu CM, Chang SS, Liao SC i sur. Absent response to niacin skin patch is specific to schizophrenia and independent of smoking. *Psychiatry Res* 2007;152:181-7.
188. Hoffer A. Niacin therapy in psychiatry. Springfield, IL: Charles S. Thomas; 1962.
189. Puri BK. Impaired phospholipid-related signal transduction in advanced Huntington's disease. *Exp Physiol* 2001;86:683-5.
190. Katzman M, Cornacchi S, Coonerty-Femiano A i sur. Methyl nicotinate-induced vasodilation in generalized social phobia. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1846-51.
191. Cyhlarova E, Montgomery P, Ross MA, Richardson AJ. Niacin skin test response in dyslexia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77:123-8.
192. Waldo MC. Co-distribution of sensory gating and impaired niacin flush response in the parents of schizophrenics. *Schizophr Res* 1999;40:49-53.
193. Shah SH, Ramchand CM, Peet M. The niacin skin flush test: first-degree relatives show responses intermediate between patients and controls. *Schizophrenia Res* 1999;36:314.
194. Lin SH, Liu CM, Chang SS i sur. Familial aggregation in skin flush response to niacin patch among schizophrenic patients and their nonpsychotic relatives. *Schizophrenia Bull* 2007;33:174-82.
195. Chang SS, Liu CM, Lin SH i sur. Impaired flush response to niacin skin patch among schizophrenia patients and their nonpsychotic relatives: The effect of genetic loading. *Schizophr Bull* 2009;35:213-21.

196. Mills CM, Hill SA, Marks R. Transdermal nicotine suppresses cutaneous inflammation. *Arch Dermatol* 1997;133:823-5.
197. Shah SH, Vankar GK, Peet M, Ramchand CN. Unmedicated schizophrenic patients have a reduced skin flush in response to topical niacin. *Schizophr Res* 2000;43:163-4.
198. Smesny S, Rosburg T, Baur K, Rudolph N, Sauer H. Cannabinoids influence lipid-arachidonic pathways in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 2007;32:2067-73.
199. Messamore E. Relationship between the niacin skin flush response and essential fatty acids in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:413-9.
200. Smesny S, Rosburg T, Klemm S i sur. The influence of age and gender on niacin skin test results - implications for the use as a biochemical marker in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2004; 38:537-43.
201. Wei J, Hemmings GP. A study of a genetic association between the PTGS2/PLA2G4A locus and schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:413-5.
202. Yu YQ, Tao R, Wei J i sur. No association between the PTGS2/PLA2G4A locus and schizophrenia in a Chinese population. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71:405-8.
203. Mathur A, Law MH, Hamzehloei T, Megson IL, Shaw DJ, Wei J. No association between the PPARG gene and schizophrenia in a British population. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009;81:273-7.
204. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol* 2006;7 Suppl 1:S12.1-14.
205. Meira-Lima I, Jardim D, Junqueira R, Ikenaga E, Vallada H. Allelic association study between phospholipase A2 genes and bipolar affective disorder. *Bipolar Disord* 2003;5:295-9.
206. Pae CU, Yu HS, Kim JJ i sur. BanI polymorphism of the cytosolic phospholipase A2 gene and mood disorders in the Korean population. *Neuropsychobiology* 2004;49:185-8.

207. Cordeiro Q, Noguti R, Bottino CM, Vallada H. Study of association between genetic polymorphisms of phospholipase A2 enzymes and Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68:189-93.
208. Valdes AM, Loughlin J, Timms KM i sur. Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2008;82:1231-40.
209. Sokolowska M, Borowiec M, Ptasinska A i sur. 85-kDa cytosolic phospholipase A2 group IValpha gene promoter polymorphisms in patients with severe asthma: a gene expression and case-control study. *Clin Exp Immunol* 2007;150:124-31.
210. Klotsman M, York TP, Pillai SG i sur. Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase biosynthetic pathway and variable clinical response to montelukast. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:189-96.
211. Chowdari KV, Brandstaetter B, Semwal P i sur. Association studies of cytosolic phospholipase A2 polymorphisms and schizophrenia among two independent family-based samples. *Psychiatr Genet* 2001;11:207-12.
212. Wei J, Lee KH, Hemmings GP. Is the cPLA2 gene associated with schizophrenia? *Mol Psychiatry* 1998;3:480-1.
213. Li H, Zhang X, Guo Y i sur. A case-control study of genetic association of the PLA2G4A gene with schizophrenia in a Chinese population. *Psychiatr Genet* 2007;17:205.
214. Semwal P, Prasad S, Varma PG, Bhagwat AM, Deshpande SN, Thelma BK. Candidate gene polymorphisms among North Indians and their association with schizophrenia in a case-control study. *J Genet* 2002;81:65-71.
215. Kauther KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC. The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26:2415-7.

216. Shi CH, Tang BS, Wang L i sur. PLA2G6 gene mutation in autosomal recessive early-onset parkinsonism in a Chinese cohort. *Neurology* 2011;77:75-81.
217. Engel LA, Jing Z, O'Brien DE, Sun M, Kotzbauer PT. Catalytic function of PLA2G6 is impaired by mutations associated with infantile neuroaxonal dystrophy but not dystonia-parkinsonism. *PLoS One* 2010;5:e12897.
218. Hosgood HD 3rd, Menashe I, Shen M i sur. Pathway-based evaluation of 380 candidate genes and lung cancer susceptibility suggests the importance of the cell cycle pathway. *Carcinogenesis* 2008;29:1938-43.
219. Kvaskoff M, Whiteman DC, Zhao ZZ i sur. Polymorphisms in nevus-associated genes MTAP, PLA2G6, and IRF4 and the risk of invasive cutaneous melanoma. *Twin Res Hum Genet* 2011;14:422-32.
220. Junqueira R, Cordeiro Q, Meira-Lima I, Gattaz WF, Vallada H. Allelic association analysis of phospholipase A2 genes with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2004;14:157-60.
221. Yu Y, Tao R, Shi J i sur. A genetic study of two calcium-independent cytosolic PLA2 genes in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:351-4.
222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs4375>, pristupljeno 17. rujna 2012.
223. Hartmann C, Johnk L, Sasaki H, Jenkins RB, Louis DN. Novel PLA2G4C polymorphism as a molecular diagnostic assay for 19q loss in human gliomas. *Brain Pathol* 2002;12:178-82.
224. Plunkett J, Doniger S, Morgan T i sur. Primate-specific evolution of noncoding element insertion into PLA2G4C and human preterm birth. *BMC Med Genomics* 2010;3:62.
225. Bickford JS, Newsom KJ, Herlihy JD i sur. Induction of group IVC phospholipase A2 in allergic asthma: transcriptional regulation by TNF α in bronchoepithelial cells. *Biochem J* 2012;442:127-37.

226. Tews B, Felsberg J, Hartmann C i sur. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer* 2006;119:792-800.
227. Wei J, Hemmings GP. A study of the combined effect of the CLDN5 locus and the genes for the phospholipid metabolism pathway in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:441-5.
228. Tao R, Yu Y, Zhang X, Shi J, Wei J. Lack of genetic association of the PLA2G4C locus with schizophrenia in case-control samples. *Psychiatr Genet* 2010;20:46.
229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs1549637>, pristupljeno 17. rujna 2012.
230. Imada T, Matsuoka J, Nobuhisa T i sur. COX-2 induction by heparanase in the progression of breast cancer. *Int J Mol Med* 2006;17:221-8.
231. Yang WT, Lewis MT, Hess K i sur. Decreased TGFbeta signaling and increased COX2 expression in high risk women with increased mammographic breast density. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:305-14.
232. Agachan Cakmakoglu B, Attar R, Kahraman OT i sur. Cyclooxygenase-2 gene and epithelial ovarian carcinoma risk. *Mol Biol Rep* 2011;38:3481-6.
233. Liu F, He Y, Peng X, Wang W, Yang X. Association of the 8473T>C cyclooxygenase-2 (COX-2) gene polymorphism with lung cancer risk in Asians. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:1257-62.
234. Pereira C, Pimentel-Nunes P, Brandão C, Moreira-Dias L, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. COX-2 polymorphisms and colorectal cancer risk: a strategy for chemoprevention. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:607-13.
235. Ivanov VN, Hei TK. Dual treatment with COX-2 inhibitor and sodium arsenite leads to induction of surface Fas Ligand expression and Fas-Ligand-mediated apoptosis in human melanoma cells. *Exp Cell Res* 2006;312:1401-17.

236. Chan IH, Tang NL, Leung TF i sur. Association of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene polymorphisms with asthma and atopy in Chinese children. *Allergy* 2007;62:802-9.
237. Leung TF, Wong GW. The Asian side of asthma and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:384-90.
238. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M i sur. COX-2 is associated with periodontitis in Europeans. *J Dent Res* 2010;89:384-8.
239. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res* 2010;89:133-7.
240. Listì F, Caruso C, Lio D i sur. Role of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase polymorphisms in Alzheimer's disease in a population from northern Italy: implication for pharmacogenomics. *J Alzheimers Dis* 2010;19:551-7.
241. Teismann P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Biofactors* 2012;doi: 10.1002/biof.1035.
242. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=689466>, pristupljeno 17. rujna 2012.
243. Li M, Gao Y, Li C i sur. Association of COX2 functional polymorphisms and the risk of vitiligo in Chinese populations. *J Dermatol Sci* 2009;53:176-81.
244. Robitaille J, Brouillette C, Houde A i sur. Association between the PPARalpha-L162V polymorphism and components of the metabolic syndrome. *J Hum Genet* 2004;49:482-9.
245. Garenc C, Aubert S, Laroche J i sur. Population prevalence of APOE, APOC3 and PPAR-alpha mutations associated to hypertriglyceridemia in French Canadians. *J Hum Genet* 2004;49:691-70.
246. Arnaiz SL, Travacio M, Monserrat AJ i sur. Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:175-80.

247. Sapone A, Peters JM, Sakai S i sur. The human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene: identification and functional characterization of two natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 2000;10:321-33.
248. Bossé Y, Després JP, Bouchard C, Pérusse L, Vohl MC. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha L162V mutation is associated with reduced adiposity. *Obes Res* 2003;11:809-16.
249. Arulmozhi DK, Dwyer DS, Bodhankar SL. Antipsychotic induced metabolic abnormalities: an interaction study with various PPAR modulators in mice. *Life Sci* 2006;79:1865-72.
250. Tang C, Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. Regulation of human delta-6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *J Lipid Res* 2003;44:686-95.
251. Li Y, Nara TY, Nakamura MT. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis. *J Lipid Res* 2005;46:2432-40.
252. Wang Y, Botolin D, Xu J i sur. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 2006;47:2028-41.
253. Peet M. Essential fatty acids: theoretical aspects and treatment implications for schizophrenia and depression. *Advances in psychiatric treatment* 2002;8:223-9.
254. Ishiguro H, Okubo Y, Ohtsuki T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. Mutation analysis of the retinoid X receptor beta, nuclear-related receptor 1, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha genes in schizophrenia and alcohol dependence: possible haplotype association of nuclear-related receptor 1 gene to alcohol dependence. *Am J Med Genet* 2002;114:15-23.

255. Vohl MC, Lepage P, Gaudet D i sur. Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162v mutation with hyperapobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2000;41:945-52.
256. Tai ES, Demissie S, Cupples LA i sur. Association between the PPARA L162V polymorphism and plasma lipid levels: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:805-10.
257. Sparsø T, Hussain MS, Andersen G i sur. Relationships between the functional PPAR α Leu162Val polymorphism and obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia, and related quantitative traits in studies of 5799 middle-aged white people. *Mol Genet Metab* 2007;90:205-9.
258. Lacquemant C, Lepretre F, Pineda Torra I i sur. Mutation screening of the PPAR α gene in type 2 diabetes associated with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2000;26:393-401.
259. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA i sur. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog* 2002;34:165-71.
260. Nickkho-Amiry M, McVey R, Holland C. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate proliferation and angiogenesis in human endometrial carcinoma. *Mol Cancer Res* 2012;10:441-53.
261. Peet M. The metabolic syndrome, omega-3 fatty acids and inflammatory processes in relation to schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:323-7.
262. Enger C, Jones ME, Kryzhanovskaya L, Doherty M, Mc Afee AT. Risk of developing diabetes and dyslipidemia among adolescents with bipolar disorder or schizophrenia. *Int J Adolesc Med Health* 2013;22:1-9.
263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=1800206>, pristupljeno 17. rujna 2012.

264. Jamshidi Y, Flavell DM, Hawe E i sur. Genetic determinants of the response to bezafibrate treatment in the lower extremity arterial disease event reduction (LEADER) trial. *Atherosclerosis* 2002;163:183-92.
265. Flavell DM, Pineda Torra I, Jamshidi Y i sur. Variation in the PPARalpha gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in Type II diabetic subjects. *Diabetologia* 2000;43:673-80.
266. Covault J, Pettinati H, Moak D, Mueller T, Kranzler HR. Association of a long-chain fatty acid-CoA ligase 4 gene polymorphism with depression and with enhanced niacin-induced dermal erythema. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;127:42-7.
267. Torgersen S, Edvardsen J, Øien PA i sur. Schizotypal personality disorder inside and outside the schizophrenic spectrum. *Schizophr Res* 2002;54:33-8.
268. Abrams DJ, Rojas DC, Arciniegas DB. Is schizoaffective disorder a distinct categorical diagnosis? A critical review of the literature. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4:1089-109.
269. Hussein GM. When Ethics Survive Where People Do Not. *Public Health Ethics* 2010; 3:72-7.
270. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
271. Giacometti J, Milošević A, Milin Č. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2002;976:47-54.
272. Cortina-Borja M, Smith AD, Combarros O, Lehmann DJ. The synergy factor: a statistic to measure interactions in complex diseases. *BMC Res Notes* 2009;2:105.
273. Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Dmitrzak-Weglarz M, Hauser J. The study of cytosolic phospholipase A2 gene polymorphism in schizophrenia using eye movement disturbances as an endophenotypic marker. *Neuropsychobiology* 2003;47:115-9.

274.

<http://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.asp>,
pristupljeno 19. veljače 2012.

275. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 2008;30:67-76.

276. Ochoa S, Usall J, Cobo J, Labad X, Kulkarni J. Gender differences in schizophrenia and first-episode psychosis: a comprehensive literature review. *Schizophr Res Treatment* 2012; doi: 10.1155/2012/916198.

277. Rao ML, Kölsch H. Effects of estrogen on brain development and neuroprotection-- implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28 Suppl 2:83-96.

278. Buretić-Tomljanović A. Pharmacogenomics of mental illnesses: do sex-specific differences matter? *Psychiatr Danub* 2007;19:222-30.

279. Karim S, Overshott R, Burns A. Older people with chronic schizophrenia. *Aging and Mental Health* 2005;9:315-324.

280. Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:28-39.

281. Lucas KK, Dennis EA. The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 2004;1636:213-8.

282. Yamashita A, Tanaka K, Kamata R i sur. Subcellular localization and lysophospholipase/transacylation activities of human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:1011-22.

283. Stewart A, Ghosh M, Spencer DM, Leslie CC. Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A(2)gamma. *J Biol Chem* 2002;277:29526-36.

284. Yamashita A, Kamata R, Kawagishi N i sur. Roles of C-terminal processing, and involvement in transacylation reaction of human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). *J Biochem* 2005;137:557-67.
285. Ramanadham S, Hsu FF, Bohrer A, Ma Z, Turk J. Studies of the role of group VI phospholipase A2 in fatty acid incorporation, phospholipid remodeling, lysophosphatidylcholine generation, and secretagogue-induced arachidonic acid release in pancreatic islets and insulinoma cells. *J Biol Chem* 1999;274:13915-27.
286. Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 1997;272:29317-21.
287. Doney AS, Fischer B, Lee SP, Morris AD, Leese G, Palmer CN. Association of common variation in the PPARA gene with incident myocardial infarction in individuals with type 2 diabetes: a Go-DARTS study. *Nucl Recept* 2005;3:4.
288. Ponizovsky AM, Modai I, Nechamkin Y i sur. Phospholipid patterns of erythrocytes in schizophrenia: relationships to symptomatology. *Schizophr Res* 2001;52:121-6.
289. Nadalin S, Rubeša G, Giacometti J i sur. BanI polymorphism of cytosolic phospholipase A2 gene is associated with age at onset in male patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;78:351-60.
290. Sethom MM, Fares S, Bouaziz N i sur. Polyunsaturated fatty acids deficits are associated with psychotic state and negative symptoms in patients with schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;83:131-6.
291. Khan QH, Pontefract DE, Iyengar S, Ye S. Evidence of differing genotypic effects of PPARalpha in women and men. *J Med Genet* 2004;41:e79.

292. Uthurralt J, Gordish-Dressman H, Bradbury M i sur. PPARalpha L162V underlies variation in serum triglycerides and subcutaneous fat volume in young males. *BMC Med Genet* 2007;8:55.
293. Kitson AP, Stroud CK, Stark KD. Elevated production of docosahexaenoic acid in females: potential molecular mechanisms. *Lipids* 2010;45:209-24.
294. Martorell L, Costas J, Valero J i sur. Analyses of variants located in estrogen metabolism genes (ESR1, ESR2, COMT and APOE) and schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;100:308-15.
295. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:273-86.
296. Pernar M, Frančišković T, ur. Psihološki razvoj čovjeka. Rijeka: Sveučilište u Rijeci-Medicinski fakultet 2008; str. 13-26.
297. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 2001;63:29-60.
298. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S i sur. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003;93:170-7.
299. Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. *J Toxicol* 2011; doi: 10.1155/2011/405194.
300. Wang X, Dykens JA, Perez E i sur. Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:395-404.
301. Sribnick EA, Del Re AM, Ray SK, Woodward JJ, Banik NL. Estrogen attenuates glutamate-induced cell death by inhibiting Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. *Brain Res* 2009;1276:159-70.

302. McCredie RJ, McCrohon JA, Turner L, Griffiths KA, Handelsman DJ, Celermajer DS. Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1331-5.
303. Turk HF, Chapkin RS. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:43-7.
304. van der Kemp WJ, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE. A meta-analysis of the polyunsaturated fatty acid composition of erythrocyte membranes in schizophrenia. *Schizophr Res* 2012;141:153-61.
305. Nadalin S, Giacometti J, Jonovska S, Tomljanović D, Buretić-Tomljanović A. The impact of PLA2G4A and PTGS2 gene polymorphisms, and red blood cell PUFAs deficit on niacin skin flush response in schizophrenia patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:185-90.
306. Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:559-79.
307. Calder PC, Yaqoob P. Lipid rafts--composition, characterization, and controversies. *J Nutr* 2007;137:545-7.
308. Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M, Carraway K. Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *J Nutr* 2009;139:1632-9.
309. Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M i sur. Molecular organization of cholesterol in unsaturated phosphatidylethanolamines: X-ray diffraction and solid state ²H NMR reveal differences with phosphatidylcholines. *J Am Chem Soc* 2006;128:5375-83.
310. Zheng YZ, Berg KB, Foster LJ. Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins. *J Lipid Res* 2009;50:988-98.

311. Raza Shaikh S, Brown DA. Models of plasma membrane organization can be applied to mitochondrial membranes to target human health and disease with polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:21-5.
312. Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;31:288-94.
313. Wang G, Hu C, Jiang T i sur. Overexpression of serotonin receptor and transporter mRNA in blood leukocytes of antipsychotic-free and antipsychotic-naïve schizophrenic patients: gender differences. *Schizophr Res* 2010;121:160-71.
314. Abi-Dargham A, Xu X, Thompson JL i sur. Increased prefrontal cortical D1 receptors in drug naive patients with schizophrenia: a PET study with [¹¹C]NNC112. *J Psychopharmacol* 2012;26:794-805.
315. Miller CL, Dulay JR. The high-affinity niacin receptor HM74A is decreased in the anterior cingulate cortex of individuals with schizophrenia. *Brain Res Bull* 2008;77:33-41.
316. Walters RW, Shukla AK, Kovacs JJ i sur. beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1312-21.
317. Rao JS, Ertley RN, DeMar JC Jr, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 2007;12:151-7.
318. Rapoport SI. Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79:153-6.
319. Singh IN, Sorrentino G, Sitar DS, Kanfer JN. (-)Nicotine inhibits the activations of phospholipases A2 and D by amyloid beta peptide. *Brain Res* 1998;800:275-81.
320. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000;16:716-8.

321. Hibbeln JR, Makino KK, Martin CE, Dickerson F, Boronow J, Fenton WS. Smoking, gender, and dietary influences on erythrocyte essential fatty acid composition among patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Biol Psychiatry* 2003;53:431-41.
322. Tai ES, Corella D, Demissie S i sur. Polyunsaturated fatty acids interact with the PPARA-L162V polymorphism to affect plasma triglyceride and apolipoprotein C-III concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 2005;135:397-403.

8. POPIS SKRAĆENICA

α -LA, 18:3n-3 – alfa-linolenska kiselina

AA, 20:4n-6 – arahidonska kiselina

ADA, 22:4n-6 – adrenična kiselina

ADHD – deficit pažnje/hiperaktivni poremećaj (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*)

AMN – engl. *aqueous methyl nicotinate*

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain derived neurotrophic factor*)

CI – raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

CNV – varijacije broja kopija (engl. *copy number variations*)

COX-2 – ciklooksigenaza-2

cPLA2 – citosolna fosfolipaza A2

DBI – indeks dvostrukih veza (engl. *double bond index*)

DHA, 22:6n-3 – dokozaheksaenska kiselina

DSM-IV – engl. *Diagnostic and statistical manual for mental disorders*

EPA, 20:5n-3 – eikozapentaenska kiselina

ERK-MAPK – engl. *extracellular receptor kinase-mitogen activated protein kinase*

FA – masna kiselina (engl. *fatty acid*)

GAP-43 – engl. *growth-associated protein-43*

IL-2 – interleukin-2

IL-6 – interleukin

iPLA2 – citosolna, kalcij-neovisna PLA2 (engl. *calcium-independent PLA2*)

LA, 18:2n-6 – linolna kiselina

LC-PUFA – dugolančana PUFA (engl. *long-chain PUFA*)

MUFA – mononezasićena masna kiselina (engl. *monounsaturated fatty acid*)

NADP(H) – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NGF – čimbenik rasta neurona (engl. *nerve growth factor*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

NPD1 – neuroprotektin D1

NT-3 – neurotrofin-3 (engl. *neurotrophin-3*)

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PANSS – engl. *Positive and negative symptom scale*

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
PET – pozitronska emisijska tomografija (engl. *positron emission tomography*)
PGD2 – prostaglandin D2
PGE2 – prostaglandin E2
PI – indeks peroksidacije (engl. *peroxidisability index*)
PPAR α – peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor alfa (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*)
PTGS2 – prostaglandin-endoperoksid sintetaza 2 (engl. *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*)
PUFA – polinezasićena masna kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid*)
RBCs – eritrociti (engl. *red blood cells*)
RFLP – engl. *restriction fragment length polymorphism*
RXR – engl. *retinoid X receptor*
SANSS – engl. *scale for the assessment of negative symptoms*
SFA – zasićena masne kiselina (engl. *saturated fatty acid*)
SNP – polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*)
sPLA2 – sekretorna PLA2
VNR – volumetrijski niacinski odgovor (engl. *volumetric niacin response*)

9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime	Sergej Nadalin
Adresa	Šetalište 13. divizije 57, Rijeka, Croatia
Telefon	00385 51 651 246
Telefaks	00385 51 678 896
Elektronička pošta	snadalin@medri.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	13. srpnja 1979.
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	296593

RADNO ISKUSTVO

	Ožujak, 2005. – Ožujak, 2006.
Ustanova zaposlenja	Klinički Bolnički Centar, Rijeka
Naziv radnog mjesta	Doktor medicine
Funkcija	Stażist
	Ožujak, 2006. – Srpanj, 2007.
Ustanova zaposlenja	Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Naziv radnog mjesta	Stručni suradnik
Funkcija	Stručni suradnik
Područje rada	Molekularna genetika, nastava iz citologije, molekularne biologije i medicinske genetike
	Srpanj, 2007. –
Ustanova zaposlenja	Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Naziv radnog mjesta	Znanstveni novak-asistent
Funkcija	Znanstveni novak-asistent
Područje rada	Molekularna genetika, nastava iz citologije, molekularne biologije i medicinske genetike

ŠKOLOVANJE

	Prosinac, 2004.
Mjesto	Rijeka, Republika Hrvatska
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Zvanje	Doktor medicine
	Veljača, 2007.–
Mjesto	Rijeka, Republika Hrvatska
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Zvanje	Poslijediplomski doktorski studij “Biomedicina”

	Srpanj, 2007.
Mjesto	Zagreb, Republika Hrvatska
Ustanova	Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske
	Državni ispit; dozvola za samostalan rad
USAVRŠAVANJE	
	Kolovoz, 2003.
Mjesto	Paris, France, Centre Hospitalier Universitaire de Bicetre, Department of Gastroenterology
Ustanova	The international federation of medical students' association
Područje	Professional exchange programme
	Srpanj, 2004.
Mjesto	Sevilla, Spain, University of Seville, Laboratory of Biomedical Research
Ustanova	The international federation of medical students' association
Područje	Research exchange programme - Basic techniques of Molecular Biology
	Srpanj, 2005.
Mjesto	Monterrey, Mexico, Hospital Universitario Jose Eleuterio Gonzalez, Department of Endocrinology
Ustanova	The international federation of medical students' association
Područje	Professional exchange programme
	Svibanj 7-11, 2007.
Mjesto	Zagreb, Republika Hrvatska
Ustanova	Institut "Ruđer Bošković"
Područje	Metodološki tečajevi u biologiji i medicini: "DNA and RNA"
	Svibanj, 25-26, 2007.
Mjesto	Rijeka, Republika Hrvatska
Ustanova	Medicinski fakultet u Sveučilišta u Rijeci
Područje	Metodološki tečaj: "Kako oblikovati i napisati znanstveno djelo"
	2008.
Mjesto	Zagreb, Republika Hrvatska
Ustanova	Institut "Ruđer Bošković"
Područje	Seminar: "Open genomics: a total solution for research on Systems Biology"
	Studeni, 5-6, 2009.
Mjesto	Rab, Republika Hrvatska
Ustanova	Psihijatrijska bolnica Rab
Područje	Međunarodna škola iz psihijatrije i neuroznanosti

**OSOBNJE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Materinji jezik Hrvatski

Strani jezici

Jezik Engleski

Govori Vrlo dobro

Piše Vrlo dobro

Čita Odlično

Jezik Španjolski

Govori Vrlo dobro

Piše Vrlo dobro

Čita Odlično

**SOCIJALNE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Pozitivan stav prema radnim zadacima; kolegijalan odnos prema kolegama i suradnicima; sposobnost oblikovanja ideja u pisanom i usmenom obliku; kontinuirano učenje; sposobnost prezentiranja informacija grupi; sposobnost rada u grupi

**ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE
I KOMPETENCIJE**

Učinkovito rješavanje radnih zadataka; sposobnost poticanja suradnika na rad

**TEHNIČKE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Vještine rada u molekularno-genetičkom laboratoriju; kompjutorske vještine; sposobnost služenja kompjutorom i različitim kompjutorskim programima

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija, 1998.

DODATNI PODACI

2007. – znanstveni novak na projektu «Genetika metabolizma fosfolipida u shizofreniji» (voditelj projekta prof. dr. sc. Alena Buretić-Tomljanović, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske, 062-0982522-0369)

Originalni znanstveni članci citirani u CC/SCIE bazi podataka

1. Nadalín S., Rubeša G, Giacometti J, Vulin M, Tomljanović D, Vraneković J, Kapović M, Buretić-Tomljanović A. BanI polymorphism of cytosolic phospholipase A2 gene is associated with age at onset in male patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;78:351-60, 2008.
2. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Radojčić Badovinac A, Starčević Čizmarević N, Nadalín S., Ristić, S. The impact of hemochromatosis mutations and transferrin genotype on gonadotropin serum levels in infertile men. *Fertil Steril*;91:1793-800, 2009.
3. Kirin I, Jurišić D, Grebić D, Nadalín S. The advantages of humeral anteromedial plate osteosynthesis in the middle third shaft fractures. *Wien Klin Wochenschr* 123;83-7, 2011.
4. Mlinarić A, Popović Grle S, Nadalín S., Skurla B, Munivrana H, Milosević M. Passive smoking and respiratory allergies in adolescents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*;15:973-7, 2011.
5. Nadalín S., Buretić-Tomljanović A, Rubeša G, Jonovska S, Tomljanović D, Ristić S. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism is not associated with schizophrenia in a Croatian population. *Psychiatr Genet*;22:267-8, 2012.
6. Nadalín S., Giacometti J, Jonovska S, Tomljanović D, Buretić Tomljanović A. The impact of PLA2G4A and PTGS2 gene polymorphisms, and red blood cell PUFAs deficit on niacin skin flush response in schizophrenia patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 88:185-90, 2013.

Pregledni znanstveni članci citirani u CC/SCIE bazi podataka

1. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalín S, Rubeša G, Vulin M, Tomljanović D. Phospholipid membrane abnormalities and reduced niacin skin flush response in schizophrenia. *Psychiatr Danub*;20:372-83, 2008.
2. Nadalín S, Buretić-Tomljanović A, Rubeša G, Tomljanović D, Gudelj L. Niacin skin flush test: a research tool for studying schizophrenia. *Psychiatr Danub*;22:14-27, 2010.

Originalni znanstveni članci citirani u Scopus bazi podataka

1. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Nadalín S, Radojčić Badovinac A. The role of polymorphisms in genes for the cytosolic and calcium-independent phospholipase A2 in the reproductive fitness of men. *Medicina*;44:49-59, 2008.
2. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Marić N, Nadalín S, Radojčić Badovinac A. Low frequency of Y-chromosome microdeletions among infertile men from North-Adriatic region of Croatia. *Medicina*;44:255-66, 2008.
3. Buretić-Tomljanović A, Petaros A, Nadalín S, Rubeša G, Tomljanović D, Žauhar G. An association between minor physical anomalies in schizophrenia and polymorphisms in phospholipase A2 genes. *Medicina*;46:219-24, 2010.

Ostali originalni članci

1. Škurla B, Mlinarić A, Nadalín S, Katičić M, Naumovski-Mihalić S. Esophageal metastases of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *IJCRI*;1:7-11, 2010.

Sudjelovanja na međunarodnim skupovima

1. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalín S, Rubeša G, Vulin M, Tomljanović D. Red blood cell membrane fatty acid analysis in never-medicated first-episode and chronic medicated-schizophrenic patients (*poster prezentacija*). Ehrlich II - 2nd World Conference on Magic Bullets, Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich, Nurnberg, Njemačka, 2008.

2. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalín S, Rubeša G, Vulin M, Tomljanović D. Phospholipid membrane abnormalities and reduced niacin skin flush response in schizophrenia (*poster prezentacija*). 23rd Danube Symposium of Psychiatry; Final program and Abstract Book, Medicinska naklada, Zagreb; Mostar, Bosna i Hercegovina, 2008.

3. Nadalín S, Buretić-Tomljanović A, Rubeša G, Giacometti J, Jonovska S, Šendula Jengiđ V, Kapović M. Impact of PLA2 gene polymorphisms on onset of schizophrenia and illness severity (*poster prezentacija*). Abstracts from the Annual Meeting of the Society of Biological Psychiatry - Sixty-fifth Annual Scientific Convention and Meeting/Krystal, John H (ur.), Philadelphia, Sjedinjene Američke Države, 2010.

Sudjelovanja na domaćim skupovima

1. Nadalín S, Rubeša G, Kapović M, Buretić-Tomljanović A. Gen PLA2G4A za citosolnu fosfolipazu kao gen podložnosti za pojavu shizofrenije (*oralna prezentacija*). IV. hrvatski kongres iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem; *Pediatrics Croatica*, vol. 51 (3)/Barišić, Ingeborg; Mardešić, Duško (ur.), Zagreb, 2007.

2. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Radojčić Badovinac A, Starčević Čizmarević N, Nadalín S, Kapović M, Ristić S. Analiza gena za transferin i hemokromatozu u idiopatskoj neplodnosti muškaraca (*poster prezentacija*). IV. hrvatski kongres iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem; *Pediatrics Croatica*, vol. 51 (3)/Barišić, Ingeborg; Mardešić, Duško (ur.), Zagreb, 2007.

3. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalín S, Rubeša G, Vulin M, Tomljanović D. Red blood cell membrane fatty acid analysis in never-medicated first-episode and chronic medicated-schizophrenic patients (*poster prezentacija*). 10th Congress of the Croatian society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation "The secret life of biomolecules"; Book of Abstracts of the 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with the international participation "The secret life of biomolecules", HDBMB 2010/Kovarik, Zrinka; Varljen, Jadranka (ur.), Rijeka, 2010.

4. Nadalín S., Jonovska S, Rubeša G, Dević S, Buretić-Tomljanović A. Učinak polimorfizama u genima za cPLA2 i COX-2 na oslabljenu niacinsku reakciju kože u bolesnika sa shizofrenijom (*oralna prezentacija*). V. hrvatski kongres iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem, The Seventh ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine; Final program and Abstracts/Schanfield, Moses; Primorac, Dragan; Vuk-Pavlović, Stanimir (ur.), ISABS, Zagreb, 2011.

5. Nadalín S., Giacometti J, Jonovska S, Buretić-Tomljanović A. Impact of PLA2G4A and PTGS2 gene polymorphisms and red blood cell PUFAs deficit on niacin skin-flush response in patients with schizophrenia (*oralna prezentacija*). FEBS 3+ Meeting From Molecule to Life and Back; Book of Abstracts of the FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, Dumić, Jerka; Kovarik, Zrinka; Varljen, Jadranka (ur.), Fintrade&Tours d.o.o, Rijeka, 2012.

Sudjelovanje u izvođenju nastave iz kolegija

1. MEDICINSKA BIOLOGIJA na sveučilišnom studiju MEDICINE
2. MEDICINSKA GENETIKA na sveučilišnom studiju MEDICINE
3. STANIČNA BIOLOGIJA S GENETIKOM na sveučilišnom studiju STOMATOLOGIJE
4. HUMANA GENETIKA na stručnom studiju MEDICINSKO-LABORATORIJSKE
DIJAGNOSTIKE
5. PRIRODOSLOVLJE na sveučilišnom UČITELJSKOM studiju

Suautorstvo skripata

1. Kapović M, Radojčić A, Brajenović-Milić B, Ristić S, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Babić I, Nadalín S. Medicinska biologija - sažeci vježbi i seminara za studente medicine. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2006.

2. Kapović M, Radojčić A, Brajenović- Milić B, Ristić S, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Babić I, Nadalín S. Stanična biologija s genetikom - sažeci vježbi i seminara za studente stomatologije. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2006.

Članstva

1. Hrvatska liječnička komora
2. Hrvatski liječnički zbor
3. Hrvatsko društvo za humanu genetiku

Nagrade i priznanja

1. Nadalin S, Jonovska S, Rubeša G, Dević S, Buretić-Tomljanović, A. Učinak polimorfizama u genima za cPLA2 i COX-2 na oslabljenu niacinsku reakciju kože u bolesnika sa shizofrenijom. Peti Hrvatski kongres iz humane genetike; Nagrada "Ljiljana Zergollern Čupak" za najbolji rad (*oralna prezentacija*) znanstvenika mlađeg od 35 godina, Bol, Hrvatska, 2011.