

**MEDICINSKI
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb
81000 PODGORICA
CRNA GORA
Tel: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
url: www.ucg.ac.me/med
E-mail: infomedf@ac.me



**MEDICAL
FACULTY**

Address: Krusevac bb
81000 PODGORICA
MONTENEGRO
Phone: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
url: www.ucg.ac.me/med
E-mail: infomedf@ac.me

Broj: 2024/11-1
Podgorica, 07.12.2020. godine

**Univerzitet Crne Gore
Odbor za doktorske studije**

Poštovani,

U skladu sa članom 35 stav 3 Pravila doktorskih studija, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izvještaja Komisije za ocjenu podobnosti teme doktorske disertacije i kandidata dr med Milene Petrović.

S poštovanjem,

**MEDICINSKI FAKULTET
D E K A N,**
Prof. dr Miodrag Radunović

**UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET**

Broj: 2024/111
Podgorica, 04.12.2020 godine

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 Pravila doktorskih studija broj: 08-583 od 26.02.2015.godine Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj dana 03-04.12.2020. godine donijelo je

ODLUKU

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu podobnosti teme doktorske disertacije i kandidata dr med Milene Petrović, broj:1892 od 10.11.2020. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „Ispitivanje uticaja polimorfizama u genima COMT, DRD2 i APOE na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije“ i kandidata dr med Milene Petrović.
3. Odluka Vijeća i Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i novi obrazac prijave radnog naziva doktorske teze (obrazac PD), broj: 1892 od 10.11.2020. godine, dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

OBRAZLOŽENJE

Dr med Milena Petrović podnijela je prijavu radnog naziva doktorske teze pod nazivom “Genetski faktori: uticaj na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije” dana 18.05.2020. godine (Broj prijave: 698).

Senat Univerziteta Crne Gore na sjednici održanoj 10-11.09.2020. godine imenovao je Komisiju za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidatkinje dr med Milene Petrović u sastavu prof. dr Olivera Miljanović, prof. dr Lidija Injac Stevović i prof. dr Nataša Duborija Kovačević.

Kandidatkinja je pred navedenom Komisijom javno obrazložila ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložila istraživački program doktorske teze, dana 02.10.2020. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:1892 od 10.11.2020. godine i predložila izmjenu naslova i to: „Ispitivanje uticaja polimorfizama u genima COMT, DRD2 i APOE na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije“, koju je kandidatkinja prihvatila i dostavila novi obrazac prijave teme broj: 1892/1 od 10.11.2020. godine.(obrazac PD)

Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj dana 03-04.12.2020. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 1892 od 10.11.2020. godine i nove prijave broj: 1892/1 od 10.11.2020. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

**VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTETA
PREDSJEDAVAJUĆI,**

Prof. dr Miodrag Radunović, dekan



OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr med. Milena Petrović
Fakultet	Medicinski fakultet Univerzitet Crne Gore
Studijski program	Doktorske studije
Broj indeksa	4/2018
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„ Ispitivanje uticaja polimorfizama u genima COMT, DRD2 i APOE na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije “
Na engleskom jeziku	“Examining the effect of polymorphisms in COMT, DRD2 and APOE genes on therapeutic response to antipsychotics among patients suffering from psychotic disorders in the schizophrenia spectrum”
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	04. 12. 2020.
Naučna oblast doktorske disertacije	Psihijatrija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore (studijski program Medicina)	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
<p>Javna odbrana polaznih istraživanja doktorske disertacije kandidatkinje dr med. Milena Petrović održana je 2. 10. 2020.godine, sa početkom u 10:00 časova, u Sali za sastanke (dekanat) na Medicinskom fakultetu u Univerzitetu Crne Gore, pred Komisijom u sastavu:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. prof. dr Olivera Miljanović – vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG (predsjednica Komisije), 2. prof. dr Lidija Injac Stevović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG (mentor) i 3. prof. dr Nataša Duborija Kovačević, redovni profesor Medicinskog fakulteta UCG (član Komisije) <p>U uvodnom dijelu tridesetominutnog izlaganja kandidatkinja je obrazlagala predloženu temu i izložila do sada najvažnije rezultate koji su ostvareni u oblasti istraživanja. Nakon toga, kandidatkinja je Komisiju upoznala sa planiranim pravcima istraživanja u nastavku rada na disertaciji, definisala ciljeve, hipoteze koje će biti provjerene tokom rada na izradi disertacije, izložila metodologiju rada, istraživački program, kao i očekivane rezultate i naučni doprinos.</p> <p>Po završetku izlaganja kandidatkinje, članovi Komisije su postavili pitanja na koja je kandidatkinja uspješno odgovorila i dali komentare i sugestije za nastavak rada na tezi. Na kraju odbrane, Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidatkinja uspješno odbranila</p>	

podobnost teme doktorske disertacije.

B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. Obrazloženje teme

Liječenje shizofrenije predstavlja izazov s obzirom na to da 20 – 45% pacijenata pokazuje samo djelimičnu redukciju simptoma prilikom uzimanja antipsihotika, dok kod 5 – 10% ne dolazi do poboljšanja uopšte (1). Farmakogenetska istraživanja kod shizofrenije koja je rezistentna na terapiju pokazala su povezanost određenih „single nucleotide“ polimorfizama (SNP) i njihove međusobne interakcije sa težinom kliničke slike, kao i sa odgovorom na terapiju (2, 3, 4). Ovakva saznanja omogućavaju predviđanje individualnih odgovora na terapiju, te se to u kliničkoj praksi može iskoristiti kako bi se što prije pristupilo davanju personalizovane terapije, koja će za najkraće vrijeme pacijenta uvesti u remisiju, te spriječiti nastanak neželjenih događaja prouzrokovanih oboljenjem, kao što su patnja pacijenta, auto i heterodestruktivno ponašanje(5).

„Dopaminska hipoteza“ se odnosi na izmjenu aktivnosti u dopaminskoj neurotransmisiji koja dovodi do shizofrenih simptoma (6). Smatra se da pacijenti sa terapijskom rezistencijom (TR) imaju izrazite promjene u dopaminergičkoj neurotransmisiji, kao što su niža sinteza dopamina u strijatumu, manja gustina dopaminskih sinapsi u nukleusu kaudatusu i snižen nivo ekspresije dopaminskih transportera u poređenju sa pacijentima koji daju odgovor na antipsihotike (7).

Zbog značaja dopamina za nastanak ove grupe oboljenja često su vršena istraživanja polimorfizama koji utiču na njegov metabolizam i dejstvo.

Iako etiologija shizofrenije još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, genetičkim studijama pronađeni su određeni geni kandidati za koje se smatra da, na osnovu svojih funkcija u organizmu, kao i na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, predstavljaju značajne faktore rizika za nastanak ovog oboljenja (7 - 9). To su geni koji utiču na nastanak enzima koji metaboliše dopamin i geni odgovorni za sintezu receptora za koje se vezuje dopamin.

Iako su brojni geni potencijalni kandidati za nastanak ovog oboljenja, ovim istraživanjem predviđeno je ispitati najznačajnije gene pronađene u literaturi koji se dovode u vezu za nastankom terapijske rezistencije kod shizofrenije (COMT, DRD2), ali i gen koji se smatra izuzetno važnim za nastanak neurodegenerativnih oboljenja (demencije), koja se srijeće kod velikog broja pacijenata oboljelih od shizofrenije prilikom progresije bolesti (8).

Ovim istraživanjem predviđeno je ispitivanje povezanosti polimorfizama u genima za Katehol-O-metil transferazu - rs4680 i rs4818 (Catehol-O-methyltransferase – COMT, enzima koji utiče na razgradnju dopamina) (7), polimorfizama u genima DRD2 (koji je odgovoran za sintezu D2 receptora) - rs 1799732 i rs1800497 (9, 10) i polimorfizama u genima za Apolipoprotein E (APOE) - ε2,ε3 i ε4 (11) sa nastankom terapijske rezistencije kod pacijenata sa dijagnozom iz spektra shizofrenije. Takođe je predviđeno ispitivanje njihove povezanosti sa težinom kliničke slike i biohemijskim parametrima od značaja za nastanak metaboličkih neželjenih dejstava lijekova. Gore navedeni polimorfizmi u genima biće određivani metodama molekularne genetike.

Kako je u literaturi za navedene polimorfizme u genima, osim povezanosti sa nastankom terapijske rezistencije kod psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, pronađeno da su povezani sa nastankom metaboličkog sindroma prilikom dugotrajnog uzimanja antipsihotika (12 – 16), njihovim istraživanjem u ovoj studiji možemo doprijeti kako izučavanju terapijske

rezistencije kod crnogorskih pacijenata koji se liječe od navedenih oboljenja, tako i u praćenju metaboličkih neželjenih dejstava, što se takođe, po prvi put radi u našoj zemlji.

Istraživanjem je predviđeno praćenje biohemijskih parametara kod pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije. Ovo je važno zbog brojnih metaboličkih neželjenih dejstava koje ovi lijekovi izazivaju, odnosno procjenjivanja bezbjednosti njihove primjene, jer je dokazano da je ova populacija u značajnom riziku u odnosu na opštu populaciju za nastanak iznenadne smrti zbog kardio-metaboličkih efekata (12 - 16). Biohemijski parametri koji će se pratiti su: koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree i kreatinina, kao i lipidnog statusa. Ti rezultati će se korelirati sa antipsihoticima i dozama koje su propisane pacijentu ali i sa polimorfizmima u genima COMT rs4680 i rs4818, DRD2 rs1799732 i rs1800497 i polimorfizama u genima za Apolipoprotein E (APOE) - ε2, ε3 i ε4.

Imajući u vidu populacijsku heterogenost u frekvenci SNP-ova, očekuje se da će populacija u Crnoj Gori imati specifičnosti u smislu frekvencije polimorfizama u genima, dakle, populaciono specifične genetske faktore rizika, te je stoga značajno da se utvrdi postojeće stanje kod navedene populacije u našoj zemlji. Ovakva saznanja daće doprinos razvoju personalizovanog pristupa liječenja psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, koja u našoj zemlji još uvijek nije zastupljena.

B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrditi prevalencu polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2,ε3 i ε4) i njihovih kombinacija kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije i kod učesnika kontrolne grupe u crnogorskoj populaciji
- Utvrditi povezanost prisutnih polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2,ε3 i ε4) i njihovih kombinacija sa težinom kliničke slike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi da li postoji povezanost navedenih polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2,ε3 i ε4) i njihovih kombinacija i rezistencije na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2,ε3 i ε4) i njihovih kombinacija i terapijske rezistencije u odnosu na pol ispitanika kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2,ε3 i ε4) i biohemijskih parametara koji su pokazatelji uticaja na metabolizam i nastanak neželjenih efekata kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi da li postoji značajan uticaj ispitivanih polimorfizama u genima na terapijski odgovor na antipsihotike i tok bolesti (multifaktorska analiza)
- Utvrditi povezanost biohemijskih faktora od značaja za metabolizam i bezbjednost primjene antipsihotika i propisanih antipsihotika i njihovih doza kod pacijenata oboljelih

od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- H01: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa nastankom psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- H02: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa težinom kliničke slike kod psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- H03: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa nastankom terapijske rezistencije prilikom primjene antipsihotika, kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije
- H04: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa pojavom terapijske rezistencije u odnosu na pol ispitanika, kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije
- H05: Postoji povezanost između polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i izmjerenih biohemijskih parametara od značaja za metabolizam i bezbjednost primjene antipsihotika kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije, koji se liječe antipsihoticima

B3. Metode i plan istraživanja

Ovim istraživanjem biće obuhvaćeni pacijenti koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije. Obuhvatanjem populacije pacijenata koji se liječe od shizofrenije u sjevernoj, centralnoj i južnoj regiji naše zemlje obezbjeđuje se heterogenost uzorka. Takođe, time što se obuhvataju pacijenti koji su liječeni ambulantno i bolnički, omogućava se upoređivanje rezultata dobijenih ispitivanjem ove dvije subpopulacije.

Prije početka istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj:872/2, od 06.07.2020.godine), Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore (broj:03/01-33033/1, od 17.2.2020.godine), Etičkog komiteta Specijalne psihijatrijske bolnice Dobrota (broj:1691, od 27.04.2020.godine) i Etičkog komiteta Doma zdravlja Berane (broj:01-118, od 27.2.2020.godine)

Kriterijumi za uključenje u istraživanje su pacijenti starosti od 18-65 godina, sa dijagnozom psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, koju je postavio ljekar specijalista psihijatrije prema MKB 10 klasifikacionom sistemu; pacijenti koji na Mini mental state examination testu (MMSE) imaju rezultat >25 i i University of California - San Diego Brief Assessment of Capacity to Capacity (UBACC) testu imaju rezultat >15 , i koji daju dobrovoljan pristanak za učešće u istraživanju.

Kriterijumi isključenja su intelektualni i kognitivni deficit, pacijenti koji koriste terapiju antipsihoticima manje od 12 nedjelja, nekomplijantni pacijenti, pacijenti koji zloupotrebljavaju psihoaktivne supstance u prethodna tri mjeseca, pacijenti koji zloupotrebljavaju alkohol, pacijenti sa ozbiljnim somatskim komorbiditetima koji se uz pomoć lijekova ne mogu održavati pod kontrolom, pacijenti sa neurološkim oboljenjima, pacijenti sa autoimunim oboljenjima, pacijenti sa onkološkim oboljenjima, trudnice, pacijenti sa nepotpunom medicinskom psihijatrijskom

dokumentacijom, pacijenti kojima je oduzeta poslovna sposobnost, pacijenti koji na Mini mental state examination testu (MMSE) imaju rezultat <25 i University of California - San Diego Brief Assessment of Capacity to Capacity (UBACC) testu imaju rezultat <15 .

Planirano je istraživanjem obuhvatiti uzorak koji broji između 120 i 150 pacijenata koji su liječeni na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Crne Gore, Specijalnoj psihijatrijskoj bolnici Dobrota i Centru za mentalno zdravlje Berane. Kontrolnu grupu za istraživanje jednonukleotidnih polimorfizama (Single nucleotide polymorphisms - SNP) u definisanim genima će sačinjavati između 60 i 80 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi. Veličina uzorka u literaturi prilikom sprovođenja sličnih istraživanja značajno varira i zavisi od različitih faktora, mogućnosti istraživača da regrutuje određeni broj pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, s obzirom da je neophodno ispoštovati etičke kriterijume prilikom regrutovanja pacijenata (oduzeta poslovna sposobnost, dekompenzovani somatski komorbiditeti, neposjedovanje kapaciteta za davanje dobrovoljnog pristanka za uključanje u istraživanje – kriterijumi za isključenje iz istraživanja). Tako je, na primjer, sprovedeno istraživanje u hrvatskoj populaciji je obuhvatalo 981 pacijenta sa dijagnozom shizofrenije (7), u Saudijskoj Arabiji 180 pacijenata (11), u Španiji 165 (17), Sloveniji 198 (18), a u meksičkoj populaciji 218 pacijenata (19). Za uzorak veličine između 120 i 150 pacijenata prilikom ovog istraživanja, odlučeno je na osnovu veličine uzorka najveće studije u našoj zemlji rađenoj sa pacijentima koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, a koje se sprovodi u IMPULSE projektu, Horizont 2020, pri čemu je u Crnoj Gori regrutovano 122 pacijenta (20), kao i na osnovu veličine populacije stanovnika Crne Gore.

Na osnovu medicinske dokumentacije, uvidom u bolničke i ambulantne protokole prethodno navedenih ustanova prikupiće se uzorak pacijenata koji su, prema MKB10 klasifikacionom sistemu (ICD 10-International Classification of Disease, 10th Revision), ispunili kriterijum za dijagnozu psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije a koji obuhvata spektar od F20 do F29 (21). Pacijentima koji odgovaraju kriterijumima za uključivanje u istraživanje biće usmeno i pismeno saopšteni ciljevi i svrha istraživanja, trajanje i rizici, biće informisani o svojim pravima da mogu u bilo kojoj fazi istraživanja odustati od učešća, kao i o tome da će se podaci čuvati i prikupljati na način da niko neće moći da ih dovede u vezu sa ispitanikom, te će anonimnost biti zagarantovana.

Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje proći će ocjenjivanje za procjenu sposobnosti potpisivanja saglasnosti za uključanje u studiju (MMSE, UBACC). Potom će se u istraživanje uključiti pacijenti koji budu imali očuvanu sposobnost za davanje saglasnosti (MMSE >25 ; UBACC >15) i potpišu Pristanak informisanog ispitanika.

Nakon toga će se pristupiti potvrđivanju dijagnoze koju pacijent ima prema medicinskoj dokumentaciji, na osnovu MKB 10 klasifikacionog sistema i Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) skale.

Nakon potvrđene dijagnoze pristupiće se procjeni stanja pacijenata uz pomoć sledećih skala: Strukturisani upitnik za prikupljanje socio-demografskih podataka i podataka koji se odnose na liječenje pacijenta, Clinical Global Impression Severity scale (CGI-S), Global Assessment of Functioning skalu (GAF), Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS), Intervju za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS), Childhood Traumatic Events Scale (CTES).

Na osnovu kriterijuma za terapijsku rezistenciju predloženih od strane Suzukija 2012. godine (22) pacijenti će biti podijeljeni u 2 podgrupe: grupa pacijenata rezistentnih na terapiju antipsihoticima (TR) i grupa pacijenata sa zadovoljavajućim odgovorom na antipsihotike (TO).

Suzukijevi kriterijumi podrazumijevaju izostanak terapijskog odgovora prilikom korišćenja najmanje dva antipsihotika, koji su dati u dozama ekvivalentnim ≥ 600 mg hlorpromazina, u uzastopnom periodu od 6 nedjelja, što će se procjenjivati retrospektivno. Ovaj kriterijum

zahtijeva skor ≥ 4 na Clinical Global Impression (CGI)-Severity skali i skor ≤ 49 na Functional Assessment for Comprehensive Treatment of Schizophrenia (FACT-Sz) ili ≤ 50 na Global Assessment of Functioning (GAF) skali (22).

Pratiće se antipsihotici i doze koje pacijenti uzimaju. Antipsihotici koje pacijenti koriste biće procjenjivani prema hlorpromazin ekvivalentnim dozama. Hlorpromazin-ekvivalentne doze se definišu kao doze lijekova čiji je efekat ekvivalentan efektu 100mg hlorpromazina *per os*. Za minimalnu efektivnu dozu se podrazumijevaju doze ekvivalentne 200-300mg hlorpromazina, a doze iznad 1000mg se smatraju visokim (23).

100mg hlorpromazina dnevno je ekvivalentno sa (23):

- 2mg haloperidola na dan
- 2mg flufenazina na dan
- 2mg risperidona na dan
- 5mg olanzapina na dan
- 75mg kvetiapina na dan
- 50mg klozapina na dan
- 7,5mg aripiprazola na dan.

Biohemijski dio istraživanja će se sprovesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore. Genetske analize će biti sprovedene u laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta, smjer Biologija (dobijena pismena saglasnost za korišćenje laboratorije, djelovodni broj:1396, od 25.06.2020.godine).

Uzorkovanje krvi se radi iz kubitalne vene u epruvetama od 5 ml za biohemijske analize i EDTA epruvetama 2 ml za genetske analize. Radiće se neposredno prije uzimanja doze lijeka, 12 sati od uzimanja posljednjeg obroka. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Standardni uzorak za genetske analize je 2 ml krvi, ali ukoliko ne postoji mogućnost da se dobije ta količina, dovoljno je izvaditi krv u vakutejnere od 0,5 ml. Nakon uzorkovanja, krv se će se odmah poslati u ovlašćenu laboratoriju za potrebnu molekularnu analizu. Ukoliko se transport izvrši u roku od 24 sata, nije potrebno čak ni obezbjeđivanje uslova hladnog lanca prilikom transporta. Ukoliko se uzorak ne šalje odmah na analizu, onda se drži na hladnom (do 7 dana može u frižideru, a za duže deponovanje treba zamrznuti uzorak). Serum za biohemijske analize će se dobiti centrifugiranjem pune krvi pri brzini od 3000 obrta/min, a zatim obraditi spektrofotometrijskom metodom, ili zamrzavati ukoliko bude potrebno duže čuvanje uzorka.

Genetske metode: DNK izolacija i genotipizacija

Sakupljeni uzorci za genetske analize biće obrađeni korišćenjem molekularnih metoda. Svi uzorci će biti obilježeni tako da štite anonimnost učesnika istraživanja i da identitet ispitanika ostane u potpunosti zaštićen.

DNK će biti izolovana iz pune krvi pacijenata korišćenjem dostupnih komercijalnih kitova (Quigaen Inc, Hilden, Germany).

DRD2 - TaqIA (rs1800497) and -141C InsDel (rs1799732)

DRD2/ANKK1 TaqIA (rs1800497) i -141C InsDel (rs1799732) polimorfizmi će biti detektovani uz pomoć PCR –RFLP analize koristeći prajmerske sekvence opisane od Grandy i sar.(24) i Ohara i sar. (25). Sekvence prajmera (IDT Coraville, IA, USA) će biti:TaqIA, prajmer 5'- CACCTTCCTGAGTGTCAT CAA -3', reverzni prajmer 5'-AGACAACCTTGGCCAG CCGTG-3'; -141C InsDel, prajmer 5'-ACTGGC GAGCAGACGGTGAGG i reverzni prajmer 5'-TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGT. PCR produkti će se obrađivati zasebno na TaqI (za TaqIA polimorfizam) ili MvaI (-141C InsDel polimorfizam) enzimima (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) prema uputstvima proizvođača. Genotipovi će biti određeni nakon gel elektroforeze (2 ili 3% agaroznog gela) sa Cyber Green TM . Za DRD/ANKK1 TaqIA polimorfizam C alel sadrži TaqI restrikciono mjesto koje će specifičnom restrikcionom aktivnosti

TaqI enzima biti "izrezano" i prepoznato kao A2 alel na gelu, dok će T alel biti biti "izrezan" na drugom mjestu i prepoznato kao A1 alel drugačije dužine na gelu. Za 141C InsDel polimorfizam, -141C*Ins alel sadrži restrikciono mjesto za MvaI, dok -141C*Del alel ne sadrži.

COMT rs4680 i rs4818

Genotipizacija će se odraditi uz pomoć prajmera i proba iz TaqMan R Drug Metabolizam Genotyping Assays, na ABI Prizmi 7300 Real time PCR System apparatus, prema proceduri Applied Biosystems. 10 µL volumen za reakciju će sadržati oko 30-100nf DNK. Oko 10% nasumično izabranih uzoraka će služiti da se genotipovanje ponovi radi kontrole procesa. Rs4680 (A > G supstitucija) ili Val108/158Met je česti funkcionalni polimorfizam COMT-a, u kome supstitucija G/C a rezultira u zamjenu valina u metionin na kodonu 158, za membranski vezan (membrane-bound - MB) COMT, i na kodonu 108 za solubilni (S) COMT. Rs4818, sa C/G supstitucijom (Leu/Leu) na kodonu 86 S-COMT-a ili kodonu 136 MB-COMT(6). Za rs4680 koristiće se prajmeri 5'-ACT GTG GCT ACT CAG CTG TG i 5'CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA. PCR produkti će biti digestovani uz pomoć Nla III 2 sata na temperaturi 37°C i identifikovani i razdvojeni na elektroforezi koristeći 4% agarozu gel elektroforezu. Za COMT rs4818 C>G koristiće se prajmeri ACCAGCGTGAGCATAGAGGC i reverzni GGTTTTC AGTGAACGTGGTGTG. Za identifikaciju fragmenata i njihovo razdvajanje koristiće se 4% agarozu gel elektroforeza. Provjera amplifikata će se vršiti i na samoj mašini upotrebom fluoroscentno obolježenih nukleotida tj. upotrebom PRC kita Cyber™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

APOE ε2, ε3 i ε4

PCR amplifikacija će se izvesti sa ABI termocycler 7300 Applied Biosystems, Foster City, CA) u finalnom volumenu od 15 µl sadržeći 1x PCR pufer (10-mM Tris-HCl pH8.8, 50-mM KCl, 0.08% P40, Fermentas, Germany); 1.5-mM MgCl₂; 200-µM dNTPs svaki; 0.13-U/µl Taq polymerase (Fermentas, Germany); 1-µM F4 i F6 prajmeri (Hixson & Vernier, 1990); i 50 ng DNA. PCR metoda će se odvijati na sljedeći način: inicijalna denaturacija će se odvijati na 95 ° C 3 minuta, zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C po 1 minut, topljenje i vezivanje prajmera na 65 ° C 1 minut, i ekstenzija (elongacija) na 72°C jedan minut. Sve alikvote (10 µl) amplificiranih fragmenata biće digestovane na 37°C uz pomoć restrikcionih enzima HhaI korišćenjem pufera predloženih od strane proizvođača- (Fermentas, Germany). HhaI restrikcioni obrazac je rezultat dva SNP-a APOE gena na nukleotidnoj poziciji 334 i 472. Kombinacija 334T/472T (112 Cys/158 Cys), 334T/472C (112 Cys/158 Arg), i 334C/472C (112 Arg/158 Arg) poznati su kao s ε2, ε3 i ε4 aleli, i ovi aleli daju 6 genotipova. PCR obrađeni produkti se puštaju na 20% poliakrilamid gela i aleli se vizualizuju uz pomoć srebra (26). Genotipovi će se determinisati prema različitosti restrikcionih obrazaca za svaku kombinaciju alela. Dodatno, provjera amplifikata će se vršiti i na samoj mašini upotrebom fluoroscentno obolježenih nukleotida tj. upotrebom PRC kita Cyber™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Biohemijske analize biće odradene u laboratoriji Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore spektrofotometrijskom metodom. Od biohemijskih analiza planirano je mjerenje koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, mjerenje koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree, kreatinina, kao i procjena lipidnog statusa.

Statističke metode obrade podataka

Pristupice se statističkoj obradi i analizi dobijenih podataka i utvrđivanju statističke značajnosti povezanosti polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2 (rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2, ε3 i ε4) i njihovih kombinacija sa utvrđenom kliničkom slikom i odgovorom na terapiju i navedenim biohemijskim parametara.

Statističkom obradom biće izračunate deskriptivne statističke vrijednosti (mjere centralne

tendencije i disperzije podataka, odnosno rezultata na skalama procjene).

Planirano je primijeniti jednovarijantnu analizu varijanse (ANOVA) za svako alelsko stanje i genotipove kao i multivarijantnu analizu varijanse (MANOVA) za sva alelska stana. Nakon toga je planirano uraditi za svaku ANOVA analizu post hoc testiranje statističke značajnosti uočenih razlika koristeći Fisher LSD testom. Za upoređivanje frekvencije alela i genotipova koristiće se Hi hvadrat test.

U svrhu komparacije grupa po varijablama koje su uključene u analizu, koristiće se t-test za nezavisne uzorke. U slučaju da distribucije podataka i rezultata budu statistički značajno odstupale od normalne krive, kao alternativna tehnika koristiće se Mann-Whitney U test. Za uporedbe tipa pretest-posttest koristiće se t-test za ponovljena mjerenja (zavisne uzorke) ili njegov neparametrijski pandan Wilcoxonov test (pod već opisanim uslovima).

U svrhu procjene asocijacije među ispitivanim varijablama, koristiće se Pearsonov (produkt-moment) koeficijent korelacije (r). Alternativno, ukoliko raspodjela podataka/rezultata bude statistički značajno odstupala od normalne, koristiće se Spearmanov koeficijent rang korelacije (r_s).

Ukoliko se pokaže da postoji određeni broj varijabli na osnovu kojih bi se mogla anticipirati pripadnost učesnika istraživanja grupi teraporezistentnih i onih koji adekvatno reaguju na terapiju (kriterijumska varijabla), ove prediktorske varijable će biti uključene u logističku analizu.

Podaci će biti prikazani tabelarno i grafički, uz korištenje MS Excela, a statističke analize biće provedene uz pomoć SPSS softvera.

Istraživanje će biti sprovedeno kroz sljedeće aktivnosti:

- Dobijene su saglasnosti Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj:872/2, od 06.07.2020.godine), Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore (broj:03/01-33033/1, od 17.2.2020.godine), Etičkog komiteta Specijalne psihijatrijske bolnice Dobrota (broj:1691, od 27.04.2020.godine) i Etičkog komiteta Doma zdravlja Berane (broj:01-118, od 27.2.2020.godine), te će se pristupiti detaljnom pregledu medicinske dokumentacije, da bi se prikupio uzorak pacijenata iz grupe psihotičnih poremećaja dijagnostičkog spektra shizofrenije.
- Pacijentima koji odgovaraju kriterijumima za uključenje u istraživanje biće predočen cilj i svrha sprovođenja istraživanja, kao i njihova prava. Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje proći će ocjenjivanje za procjenu sposobnosti potpisivanja saglasnosti za uključenje u studiju (MMSE, UBACC). Potom će se u studiju uključiti pacijenti koji budu imali očuvanu sposobnost za davanje saglasnosti (MMSE >25; UBACC>15) i potpišu Pristanak informisanog ispitanika.
- Uvidom u medicinsku dokumentaciju pacijenata dobiće se informacije o početku nastanka bolesti, dužini liječenja, propisanim antipsihoticima, dozama, i redukciji i povlačenju simptomatologije (remisiji) ili periodima trajanja simptoma bolesti (recidivima), broju i dužini trajanja hospitalizacija, kao i psihijatrijskim komorbiditetima.
- Nakon toga će se pristupiti potvrđivanju dijagnoze koju pacijent ima prema medicinskoj dokumentaciji, na osnovu MKB10 klasifikacionog sistema i Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) skale.
- Nakon potvrđene dijagnoze pristupiće se procjeni stanja pacijenata uz pomoć sljedećih skala: Strukturisani upitnik za prikupljanje socio-demografskih podataka i podataka koji se odnose na liječenje pacijenta. Clinical Global Impression Severity scale (CGI-S), Global Assessment of Functioning skalu (GAF), Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS), Intervju za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS), Childhood Traumatic Events Scale (CTES).
- Dobijeni podaci biće unošeni u protokol vođenja (Excel), koji će pružati prethodno navedene informacije i korelirati ih sa rezultatima skala.

- Ispitivana grupa će po završetku procjene pacijenata biti podijeljena na grupu pacijenata sa terapijskom rezistencijom (TR), grupu pacijenata sa dobrim odgovorom (TO) na terapiju antipsihoticima u odnosu na za to predviđene kriterijume (22) i kontrolnu grupu (KG).
- Pristupiće se uzorkovanju krvi i određivanju alelskih stanja i genotipova COMT gen (rs4680 i rs4818), DRD2 gen (rs1799792 i rs1800497) i APOE gen (ε2, ε3 i ε4) molekularnim tehnikama koje su opisane u protokolu.
- Pristupiće se i biohemijskim analizama i to: mjerenju koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, mjerenju koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree, kreatinina, kao i procjeni lipidnog statusa. Navedeni biohemijski parametri poslužiće za korelaciju sa propisanom terapijom i alelskim stanjima i genotipovima koji se istražuju kod ispitanika, u cilju praćenja terapijskog odgovora na antipsihotike. Navedeni biohemijski markeri biće određivani u laboratoriji za medicinsku biohemiju na Medicinskom fakultetu, Univerziteta Crne Gore, spektrofotometrijskom metodom.
- Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program).
- Promocija rezultata doktorske disertacije predviđena je kroz objavljivanje radova u časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i prezentaciju rukovodiocima institucija od značaja (Kliničkog centra Crne Gore, Republičkog fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja) u cilju uvođenja individualizovanog pristupa u liječenju ovih pacijenata, ali i cilju planiranja stručnog kadra i pokrivanja troškova liječenja.

B4. Naučni doprinos

- Kako su dosadašnja istraživanja pokazala kontroverzne rezultate, i potrebu za daljim izučavanjem terapijske rezistencije i genetskih faktora rizika, primjena genetskih analiza kod pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije dovešće do produblivanja razumijevanja ovog oboljenja, ali i do saznanja o specifičnostima prevalencije navedenih polimorfizama kod ove populacije pacijenata u Crnoj Gori i njihove povezanosti sa kliničkom slikom i terapijskom rezistencijom.
- U odnosu na dobijene rezultate predložiće se primjena genetskih i biohemijskih analiza u oblasti psihijatrije kako bi se procijenio rizik nastanka psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije kod posebno vulnerabilnih pojedinaca, ali i omogućio dobar terapijski odgovor, sa što manje metaboličkih neželjenih efekata, kod onih pacijenata kod kojih to nije postignuto uprkos primjenjivanju više različitih antipsihotika (predložiće se primjena personalizovane medicine).
- Praćenjem biohemijskih parametara kod ovih pacijenata i njihovim koreliranjem sa polimorfizmima u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2, ε3 i ε4), ali i antipsihoticima i dozama koje uzimaju, pružiće nam više informacija o najčešćim metaboličkim neželjenim efektima pojedinih grupa lijekova, ali i njihovoj povezanosti sa ispitivanim polimorfizmima u genima, što može doprinijeti prevenciji posljedica neželjenih efekata lijekova.
- Osnajivanje multidisciplinarnog pristupa u daljem istraživanju psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije i saradnjom sa Prirodno-matematičkim fakultetom Univerziteta

Crne Gore, Institutom Inserm u Parizu i drugim institucijama od značaja u cilju predlaganja strategija za profilaksu, ranu dijagnostiku i personalizovani terapijski pristup u cilju povoljnijeg odnosa koristi i rizika primjene antipsihotika, brzog dostizanja očekivanog terapijskog odgovora, bolje komplijanse, unaprijeđenja kvaliteta života i smanjenja troškova liječenja pacijenata oboljelih od shizofrenije u Crnoj Gori.

B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja

Sredstva za realizaciju predložene doktorske disertacije obezbijedena su Stipendijom za doktorska istraživanja Ministarstva nauke Crne Gore, te je istraživanje finansijski i organizaciono izvodljivo.

Popis literature:

1. Pantelis C, Lambert TJ. Managing patients with “treatment – resistant” schizophrenia. *Medical Journal of Australia*. 2003 May 5;178(9):S62-66.
2. Huang E, Zai CC, Lisoway A, Maciukiewicz M, Felsky D, Tiwari AK, Bishop JR, Ikeda M, Molero P, Ortuno F, Porcelli S. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical response to antipsychotic treatment in schizophrenia and schizo-affective disorder patients: a meta-analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016 May 1;19(5):1-12.
3. Shi Y, Li M, Song C, Xu Q, Huo R, Shen L, Xing Q, Cui D, Li W, Zhao J, He L. Combined study of genetic and epigenetic biomarker risperidone treatment efficacy in Chinese Han schizophrenia patients. *Translational psychiatry*. 2017 Jul;7(7):e1170-.
4. Arranz MJ, Gallego C, Salazar J, Arias B. Pharmacogenetic studies of drug response in schizophrenia. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2016 Jan 2;1(1):79-91.
5. Perkovic MN, Erjavec GN, Strac DS, Uzun S, Kozumplik O, Pivac N. Theranostic biomarkers for schizophrenia. *International journal of molecular sciences*. 2017 Apr;18(4):733.
6. Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Biela H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun K, Jankowski Z, Kumaratilake J, Henneberg M. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Frontiers in psychiatry*. 2014 May 19;5:47.
7. Sagud M, Tudor L, Uzun S, Perkovic MN, Zivkovic M, Konjevod M, Kozumplik O, Vuksan Cusa B, Svob Strac D, Rados I, Mimica N. Haplotypic and genotypic association of catechol-o-methyltransferase rs4680 and rs4818 polymorphisms and treatment resistance in schizophrenia. *Frontiers in pharmacology*. 2018 Jul 3;9:705.
8. Anttila S. Genetic factors in schizophrenia-studies on treatment response to typical neuroleptics and age at onset. Tampere University Press; 2004.
9. He H, Wu H, Yang L, Gao F, Fan Y, Feng J, Ma X. Associations between dopamine D2 receptor gene polymorphisms and schizophrenia risk: a PRISMA compliant meta-analysis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016;12:3129.
10. Cho M, Contreras A, Garza A, Olvera S, Castillo D. The impact of drug and gene interaction on the antipsychotic medication for schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2017;3(117):2472-1077.
11. Al-Asmary SM, Kadasah S, Arfin M, Tariq M, Al-Asmari A. Apolipoprotein E polymorphism is associated with susceptibility to schizophrenia among Saudis. *Archives of medical science: AMS*. 2015 Aug 12;11(4):869-876.
12. De Hert M, Schreurs V, Vancampfort D, Van Winkel R. Metabolic syndrome in people with schizophrenia: a review. *World psychiatry*. 2009 Feb;8(1):15-22.
13. Malhotra N, Grover S, Chakrabarti S, Kulhara P. Metabolic syndrome in schizophrenia. *Indian journal of psychological medicine*. 2013 Jul;35(3):227-240.
14. Ellingrod VL, Taylor SF, Dalack G, Grove TB, Bly MJ, Brook RD, Zöllner SK, Pop-Busui R. Risk factors associated with metabolic syndrome in bipolar and schizophrenia subjects treated with antipsychotics: the role of folate pharmacogenetics. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2012 Apr;32(2):261-265.

15. Pinto JA, Freitas PH, Nunes FD, Granjeiro PA, Santos LL, Machado RM. Prevalence of polymorphisms in the ANKK1, DRD2, DRD3 genes and metabolic syndrome in refractory schizophrenia. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2018;26.
16. Ban C, Zhang Q, Feng J, Li H, Qiu Q, Tian Y, Li X. Low prevalence of lipid metabolism abnormalities in APOE ε2-genotype and male patients 60 years or older with schizophrenia. *BMC psychiatry*. 2017 Dec 1;17(1):399.
17. Zumárraga M, Arrúe A, Basterreche N, Macías I, Catalán A, Madrazo A, Bustamante S, Zamalloa MI, Erkoreka L, Gordo E, Arnaiz A. COMT haplotypes, catecholamine metabolites in plasma and clinical response in schizophrenic and bipolar patients. *Pharmacogenomics*. 2016 Jun;17(8):837-51.
18. Terzic T, Kastelic M, Dolžan V, Kores Plesnicar B. Genetic polymorphisms in dopaminergic system and treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatria Danubina*. 2016 Jun 7;28(2):127-31.
19. Escamilla R, Camarena B, Saracco-Alvarez R, Fresán A, Hernández S, Aguilar-García A. Association study between COMT, DRD2, and DRD3 gene variants and antipsychotic treatment response in Mexican patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2018;14:2981.
20. Stevovic LI, Radojicic T, Repisti S, Raznatovic A, Barac-Otasevic Z, Perunovic-Jovanovic T, Ljutica I, Kalac S, Brajkovic I, Purisic A, Petrovic M. Psychometric validation of the clinical assessment interview for negative symptoms (CAINS) on a sample of people with psychotic disorder in Montenegro. *Psihijatrija*. 2019 Sep; 1:68-78.
21. World Health Organisation. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems. World Health Organisation, Geneva, 2004.
22. Suzuki T, Remington G, Mulsant BH, Uchida H, Rajji TK, Graff-Guerrero A, Mimura M, Mamo DC. Defining treatment-resistant schizophrenia and response to antipsychotics: a review and recommendation. *Psychiatry research*. 2012 May 15;197(1-2):1-6.
23. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *The Journal of clinical psychiatry*. 2003 Jun; 64(6):663-7.
24. Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Human molecular genetics*. 1993;2(12):2197-.
25. Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. Functional polymorphism of- 141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry research*. 1998 Nov 16;81(2):117-23.
26. Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature protocols*. 2007 Nov;2(11):2649.

Mišljenje i prijedlog komisije

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, izlaganja kandidatkinje, diskusije i implementacije datih sugestija, Komisija je zaključila da:

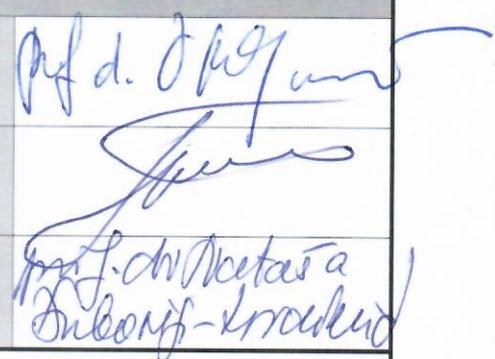
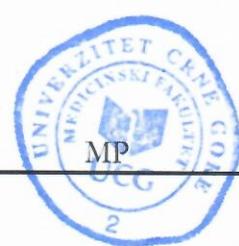
- predložena je predložena tema aktualna i zadovoljava nivo doktorske disertacije,
- su ciljevi i hipoteze jasno definisani,
- su metodologija i plan istraživanja detaljno opisani,
- je prepoznatljiv naučni doprinos istraživanja u razjašnjavanju etiologije kompleksnih, multifaktorskih oboljenja iz spektra shizofrenije,
- su ispunjene sve etičke norme istraživanja, s obzirom da se radi o osjetljivoj populaciji osoba sa mentalnim bolestima.

Imajući u vidu navedeno, Komisija je dala pozitivnu ocjenu o podobnosti teme doktorske disertacije kandidatkinje Milene Petrović.

Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izvještaj i odobre nastavak rada na doktorskoj disertaciji.

Prijedlog izmjene naslova

Komisija predlaže da se naslov doktorske disertacije izmijeni iz „Genetski faktori: uticaj na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra

shizofrenije“ u „ Ispitivanje uticaja polimorfizama u genima COMT, DRD2 i APOE na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije.“ Izmjena naslova teme predlaže se u cilju jasnije povezanosti naslova sa sadržajem istraživanja i definisanja genetičkih faktora koji će biti ispitivani u toku istraživanja.		
Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora		
Planirana odbrana doktorske disertacije		
Drugi kvartal 2022. godine		
Izdvojeno mišljenje		
Napomena		
ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.	DA	NE
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
prof. dr Olivera Miljanović, Medicinski fakultet Univerzitet Crne Gore, Crna Gora		
prof. dr Lidija Injac Stevović, Medicinski fakultet Univerzitet Crne Gore, Crna Gora		
prof. dr Nataša Duborija Kovačević, Medicinski fakultet Univerzitet Crne Gore, Crna Gora		
U Podgorici, (navesti datum)		
		

PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
prof. dr Olivera Miljanović Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore	1. Obrazložiti na koji način se procjenjuje sposobnost pacijenta za davanje informisanog pristanka, s obzirom na vulnerabilnu kategoriju pacijenata sa mentalnim oboljenjima. 2. Na koji način je potpisivanje saglasnosti za učešće u istraživanju u skladu sa Zakonom o zaštiti i ostvarivanju prava mentalno oboljelih lica? 3. Obrazložiti hipotezu povezanosti SNP-ova sa poremećajima iz spektra shizofrenije, kao multifaktorskim oboljenjima.
prof. dr Lidija Injac Stevović Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore	1. Prokomentarisati povezanost metaboličkih neželjenih dejstava i temom definisanih polimorfizama u literaturi. 2. Obrazložiti izbor standardizovanih upitnika čija je primjena planirana ovim istraživanjem.
prof. dr Nataša Duborija Kovačević Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore	1. Prokomentarisati izbor gena koji su definisani ovim istraživanjem. 2. Na koji način je određena veličina uzorka ispitivane populacije i koja je veličina uzorka bila u istraživanjima opisanim u literaturi?
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr med. Milena Petrović
Fakultet	Medicinski fakultet Univerzitet Crne Gore
Studijski program	Doktorske studije
Broj indeksa	4/2018
Ime i prezime roditelja	Dragan Petrović
Datum i mjesto rođenja	23.07.1991, Cetinje, Crna Gora
Adresa prebivališta	Bajova 73, Cetinje
Telefon	00382 66 138-545
E-mail	91milena.petrovic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	<ul style="list-style-type: none"> - 2018 – i dalje: Student doktorskih studija Medicinskog fakulteta Univerzitet Crne Gore, studijski program Medicina - 2018 – i dalje: Specijalizant psihijatrije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu - 2010 – 2016: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Dobila zvanje doktor medicine, prosječna ocjena 9,21. - 2006 - 2009: Gimnazija Cetinje; Diploma „Luča“, proglašena za đaka generacije
Radno iskustvo	<ul style="list-style-type: none"> - 2019 – i dalje: Stipendista Ministarstva nauke Crne Gore za doktorska istraživanja - 2018 – 2019: Klinika za psihijatriju, Klinički centar Crne Gore – specijalizant psihijatrije (radni odnos u mirovanju u dužini trajanja stipendije) - 2017 – 2018: Zavod za hitnu medicinsku pomoć Crne Gore – Doktor u timu za HMP PJ Kolašin
Popis radova	<ul style="list-style-type: none"> • Petrović M, Injac Stevović L, Pantović S. Uticaj genetskih faktora na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od poremećaja iz spektra shizofernije. "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2020:2(2), str. 110 – 119. • Injac Stevović L, Petrović M, Brandmajer T, Radojčić T. Genetski i porodični faktori u etiologiji suicidnosti. "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2020:2(1), str. 38 – 47. • Stevović LI, Radojčić T, Repišti S, Ražnatović A, Barac-Otašević Z, Perunović-Jovanović T, Ljutica I, Kalač S,

	<p>Brajković I, Purišić A, Petrović M. Psihometrijska validacija intervjua za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS) na uzorku osoba sa psihotičnim poremećajima u Crnoj Gori. Časopis "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2019 Sep; 1:68-78.</p> <ul style="list-style-type: none"> Injac Stevović L, Petrović M, Pantović S. Karakteristike porodične istorije suicida i stresnih životnih događaja kod osoba koje su realizovale suicid: zaključci psihološke autopsije u Crnoj Gori. Časopis "Psihijatrija" Udruženja psihijatara Crne Gore – I:5 – 10, 2018.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„ Ispitivanje uticaja polimorfizama u genima COMT, DRD2 i APOE na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije “
Na engleskom jeziku	“Examining the effect of polymorphisms in COMT, DRD2 and APOE genes on therapeutic response to antipsychotics among patients suffering from psychotic disorders in the schizophrenia spectrum”
Obrazloženje teme	
<p>Liječenje shizofrenije predstavlja izazov s obzirom na to da 20 – 45% pacijenata pokazuje samo djelimičnu redukciju simptoma prilikom uzimanja antipsihotika, dok kod 5 – 10% ne dolazi do poboljšanja uopšte (1). Farmakogenetska istraživanja kod shizofrenije koja je rezistentna na terapiju pokazala su povezanost određenih „single nucleotide“ polimorfizama (SNP) i njihove međusobne interakcije sa težinom kliničke slike, kao i sa odgovorom na terapiju (2, 3, 4). Ovakva saznanja omogućavaju predviđanje individualnih odgovora na terapiju, te se to u kliničkoj praksi može iskoristiti kako bi se što prije pristupilo davanju personalizovane terapije, koja će za najkraće vrijeme pacijenta uvesti u remisiju, te spriječiti nastanak neželjenih događaja prouzrokovanih oboljenjem, kao što su patnja pacijenta, auto i heterodestruktivno ponašanje(5).</p> <p>„Dopaminska hipoteza“ se odnosi na izmjenu aktivnosti u dopaminskoj neurotransmisiji koja dovodi do shizofrenih simptoma (6). Smatra se da pacijenti sa terapijskom rezistencijom (TR) imaju izrazite promjene u dopaminergičkoj neurotransmisiji, kao što su niža sinteza dopamina u strijatumu, manja gustina dopaminskih sinapsi u nukleusu kaudatusu i snižen nivo ekspresije dopaminskih transportera u poređenju sa pacijentima koji daju odgovor na antipsihotike (7).</p> <p>Zbog značaja dopamina za nastanak ove grupe oboljenja često su vršena istraživanja polimorfizama koji utiču na njegov metabolizam i dejstvo.</p> <p>Iako etiologija shizofrenije još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, genetičkim studijama pronađeni su određeni geni kandidati za koje se smatra da, na osnovu svojih funkcija u organizmu, kao i na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, predstavljaju značajne faktore rizika za nastanak ovog oboljenja (7 - 9). To su geni koji utiču na nastanak enzima koji metaboliše dopamin i geni odgovorni za sintezu receptora za koje se vezuje dopamin.</p> <p>Iako su brojni geni potencijalni kandidati za nastanak ovog oboljenja, ovim istraživanjem predviđeno je ispitati najznačajnije gene pronađene u literaturi koji se dovode u vezu za</p>	

nastankom terapijske rezistencije kod shizofrenije (COMT, DRD2), ali i gen koji se smatra izuzetno važnim za nastanak neurodegenerativnih oboljenja (demencije), koja se srijeće kod velikog broja pacijenata oboljelih od shizofrenije prilikom progresije bolesti (8).

Ovim istraživanjem predviđeno je ispitivanje povezanosti polimorfizama u genima za Katehol-O-metil transferazu - rs4680 i rs4818 (Catehol-O-methyltransferase – COMT, enzima koji utiče na razgradnju dopamina) (7), polimorfizama u genima DRD2 (koji je odgovoran za sintezu D2 receptora) - rs 1799732 i rs1800497 (9, 10) i polimorfizama u genima za Apolipoprotein E (APOE) - ε2, ε3 i ε4 (11) sa nastankom terapijske rezistencije kod pacijenata sa dijagnozom iz spektra shizofrenije. Takođe je predviđeno ispitivanje njihove povezanosti sa težinom kliničke slike i biohemijskim parametrima od značaja za nastanak metaboličkih neželjenih dejstava lijekova. Gore navedeni polimorfizmi u genima biće određivani metodama molekularne genetike.

Kako je u literaturi za navedene polimorfizme u genima, osim povezanosti sa nastankom terapijske rezistencije kod psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, pronađeno da su povezani sa nastankom metaboličkog sindroma prilikom dugotrajnog uzimanja antipsihotika (12 – 16), njihovim istraživanjem u ovoj studiji možemo doprijeti kako izučavanju terapijske rezistencije kod crnogorskih pacijenata koji se liječe od navedenih oboljenja, tako i u praćenju metaboličkih neželjenih dejstava, što se takođe, po prvi put radi u našoj zemlji.

Istraživanjem je predviđeno praćenje biohemijskih parametara kod pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije. Ovo je važno zbog brojnih metaboličkih neželjenih dejstava koje ovi lijekovi izazivaju, odnosno procjenjivanja bezbjednosti njihove primjene, jer je dokazano da je ova populacija u značajnom riziku u odnosu na opštu populaciju za nastanak iznenadne smrti zbog kardio-metaboličkih efekata (12 - 16). Biohemijski parametri koji će se pratiti su: koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree i kreatinina, kao i lipidnog statusa. Ti rezultati će se korelirati sa antipsihoticima i dozama koje su propisane pacijentu ali i sa polimorfizmima u genima COMT rs4680 i rs4818, DRD2 rs1799732 i rs1800497 i polimorfizama u genima za Apolipoprotein E (APOE) - ε2, ε3 i ε4.

Imajući u vidu populacijsku heterogenost u frekvenci SNP-ova, očekuje se da će populacija u Crnoj Gori imati specifičnosti u smislu frekvencije polimorfizama u genima, dakle, populaciono specifične genetske faktore rizika, te je stoga značajno da se utvrdi postojeće stanje kod navedene populacije u našoj zemlji. Ovakva saznanja daće doprinos razvoju personalizovanog pristupa liječenja psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, koja u našoj zemlji još uvijek nije zastupljena.

Pregled istraživanja

Shizofrenija predstavlja teško i hronično psihijatrijsko oboljenje, za koje se procjenjuje da pogađa oko 1% populacije širom svijeta (5,17). Karakteriše se pojavom “pozitivnih” simptoma koji uključuju halucinacije i deluzije, a takođe i “negativnih” simptoma kao što su socijalno povlačenje, nemogućnost obraćanja pažnje na događaje oko sebe, anhedonije (17).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je nastanak ovog oboljenja značajno uslovljen

nasljeđivanjem (9). Liječenje shizofrenije predstavlja izazov, s obzirom na to da terapijski odgovor značajno varira (1). Brojne studije su ukazale na značajnu ulogu "dopaminergičkih gena kandidata" na efikasnost antipsihotika (2, 5, 7, 17, 18, 19).

Originalna „dopaminska hipoteza“ se odnosi na to da hiperaktivnost u dopaminskoj neurotransmisiji dovodi do shizofrenih simptoma. Uvođenjem lijekova čiji je mehanizam dejstva blokada dopaminskih receptora (hlorpromazin, haloperidol) došlo je do preokreta u psihijatriji. Pozitivni simptomi shizofrenije uključuju halucinacije i deluzije, koje nastaju uslijed povišenog oslobađanja dopamina subkortikalno. Takvo stanje prouzrokuje povećavanu aktivnost D2 receptora, i narušavanje biohemijškog puta u nukleusu akumbensu, što je uzrok nastanka pozitivne simptomatologije u kliničkoj slici. Revidirana „dopaminska hipoteza“ ukazuje da do nastanka shizofrenije dolazi zbog hiperaktivnosti dopaminske transmisije u mezolimbickom području i hipoaktivnosti dopaminergičke transmisije u prefrontalnom korteksu (4, 6).

Katehol-O-metil transferaza (COMT) je enzim zadužen za razgradnju kateholamina, uključujući i dopamin. COMT reguliše nivo dopamina primarno u prefrontalnom korteksu, gdje postoji mali broj dopaminskih transporterata. Od brojnih polimorfizama COMT gena, pokazalo se da su za dopaminsku aktivnost u prefrontalnom korteksu važni polimorfizmi rs4680 i rs4818 (5).

U literaturi se mogu pronaći i istraživanja koja ukazuju da je Val158Met polimorfizam u genu COMT povezan sa nastankom metaboličkog sindroma, što ukazuje da se na osnovu genotipova pacijenata može procijeniti rizik od nastanka neželjenih efekata antipsihotika (14, 20).

„Single nucleotide polimorfizmi“ (SNP) gena za Katehol-O-metil transferazu (COMT) su već duže vrijeme izučavani kao značajan faktor rizika za nastanak shizofrenije. COMT Val158Met (rs4680, A>G) funkcionalni polimorfizam utiče na metabolizam dopamina, tako što Val/Val homozigoti imaju pojačanu aktivnost za 40% u odnosu na Met/Met homozigote u prefrontalnom korteksu, te stoga i niže nivoe dopamina u ovoj regiji (21). Drugi značajan polimorfizam COMT gena je rs4818 (C>G supstitucija), za koji se smatra da doprinosi izmjeni funkcije COMT enzima više od rs4680 polimorfizma. Dosadašnji rezultati istraživanja bili su kontroverzni, i zahtijevaju dodatna ispitivanja. Takođe, pojedine studije su ukazale na razliku u distribuciji polimorfizama među polovima, koja je povezana sa nastankom terapijske rezistencije (7, 18).

Iako je COMT polimorfizam dugo ispitivan kao potencijalni uzrok nastanka oboljenja i induktor nastanka teže kliničke slike kod shizofrenih pacijenata, ograničen broj studija se bavio uticajem polimorfizama u genima na nastanak oboljenja rezistentnog na terapiju (7).

Istraživanje ovih polimorfizama u genima u španskoj populaciji ukazalo je da bi haplotipovi mogli biti dobri indikatori kliničkog statusa, ali i terapijskog odgovora (19), dok je meta-analiza sprovedena iste godine (2016.) ukazala je da je COMT Val158Met polimorfizam povezan sa odgovorom na antipsihotike kod shizofrenije, i da je ovaj efekat izraženiji kod primjene atipičnih antipsihotika (2). Istraživanje rađeno na hrvatskoj populaciji koja se liječi od shizofrenije, a koje je ispitivalo povezanost COMT rs4680 i rs4818 polimorfizama u genima sa pojavom terapijske rezistencije, došlo je do rezultata koji su ukazali na polno zavisnu povezanost navedenih

polimorfizama u genima sa nastankom terapijske rezistencije, te ukazali na potencijalnu mogućnost predviđanja terapijske rezistencije kod pacijentkinja oboljelih od shizofrenije (7).

U slovenačkoj populaciji pacijenata koji se liječe od shizofrenije rađeno je ispitivanje povezanosti genetskih polimorfizama u dopaminergičkom sistemu i nastanka terapijske rezistencije kod pacijenata oboljelih od shizofrenije. Ispitivani polimorfizmi u genima za DRD2 (rs1801028 i rs1799732) i COMT rs4680, prilikom čega nije pronađena značajna povezanost između polimorfizama i terapijskog odgovora, kao ni kliničke slike u slovenačkoj populaciji (21).

Primjeri ovih istraživanja pokazuju da su potrebni dalji napori i istraživanja na ovu temu, kako bi se došlo do konzistentnih zaključaka.

Postoje brojni dokazi o tome da je gen za dopaminski D2 receptor jedan od glavnih kandidata za rizik za nastanak shizofrenije. Rs1799732 SNP je lociran u promotorskoj regiji DRD2, i dokazano je da utiče na gensku ekspresiju in vitro. Rs1800497 SNP smatra se odgovornim za izmjene u vezivanju supstrata za receptor (9). Kroz brojne studije pokazano je da su ovi SNP-ovi značajno povezani sa terapijskim odgovorom na antipsihotike i nastankom terapijske rezistencije (10, 23, 24).

Istraživanje koje je rađeno u meksičkoj populaciji, a koje je ispitivalo povezanost COMT i DRD2 gena sa terapijskim odgovorom, je ukazalo na moguću povezanost dobrog terapijskog odgovora kod pacijenata sa Val alelom (COMT/Val158Met). Ovaj tip studije ukazuje na moguću individualnu genetsku procjenu prije početka uvođenja nove terapije antipsihoticima, što bi dugoročno posmatrano smanjilo troškove liječenja a omogućilo bolji terapijski odgovor za kraće vrijeme (25). U japanskoj populaciji koja se liječi od shizofrenije pronađena je značajna povezanost između SNP-ova rs4680 (COMT) i rs1800497 (DRD2) sa shizofrenijom. Primijećeno je da je rizik kod kombinacija navedenih alela značajan i smatra se da mogu ukazati na patološke karakteristike u dopaminergičkoj transmisiji. Rezultati upućuju da bi identifikacija genetskog rizika mogla doprinijeti razvoju profilaktičkih intervencija, a ukoliko bi se mogao detektovati povećan genetski rizik, bilo bi moguće pristupiti nefarmakološkim tretmanima kao što je kognitivno-bihevioralna terapija, koja bi doprinijela prevenciji i liječenju oboljenja, jačajući individualne kapacitete adaptacije pacijenata na stresore. Takođe, bolje razumijevanje genetske osnove oboljenja iz spektra shizofrenije pruža mogućnost boljeg razumijevanja bolesti ali i novog pristupa subkategorizaciji. Sve navedeno se može primijeniti u kliničkoj praksi i time istu unaprijediti (23).

Apolipoprotein E gen koji kodira APOE ima 3 polimorfizma: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$. Ovi polimorfizmi su odgovorni za prisustvo različitih APOE izoformi, koje se značajno razlikuju po strukturi ali i funkcionalosti u smislu kapaciteta receptorskog vezivanja i lipidnog metabolizma. Pojedine studije su pokazale povezanost APOE genotipova sa fenotipovima neuropsihijatrijskih oboljenja (8, 11, 26).

Studija sprovedena u populaciji Saudijske Arabije, kod pacijenata koji se liječe od shizofrenije je pokazala da je frekvencija APOE alela $\epsilon 2$ i genotipova $\epsilon 2/\epsilon 3$ i $\epsilon 2/\epsilon 4$ bila značajno veća kod pacijenata oboljelih od shizofrenije u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na mogućnost da $\epsilon 2$ alel i njegov heterozigotni genotip povećavaju vjerovatnoću obolijevanja od shizofrenije. Nasuprot tome frekvencije alela $\epsilon 3$ i $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipova bile su niže kod grupe pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom, sugerišući protektivni efekat APOE $\epsilon 3$ na nastanak

shizofrenije. Pronađena je povezanost u javljanju $\epsilon 4$ alela sa simptomima shizofrenije, ukazujući da je $\epsilon 4$ znatno češći kod pacijenata sa pozitivnom simptomatologijom. Nasuprot tome, nije bilo značajne povezanosti sa APOE $\epsilon 4$ i negativne simptomatologije kod shizofrenih pacijenata. Nije pronađena značajna povezanost između frekvence alela i genotipova između muških i ženskih pacijenata oboljelih od shizofrenije (11).

Istraživanje koje je sprovedeno na srbijanskoj populaciji pacijenata liječenih od shizofrenije ukazalo je da ne postoji značajna razlika u frekvenciji APOE alela i genotipova između grupe srbijanskih pacijenata oboljelih od shizofrenije u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ljudi. Ipak, pronađena je moguća povezanost između određenih subtipova shizofrenije i APOE $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipova i $\epsilon 4$ alela, što ukazuje na moguću pozitivnu povezanost sa terapijskim odgovorom na tipične antipsihotike (26).

Kao što se može vidjeti iz prethodno navedenih istraživanja, frekvence javljanja alela u različitim populacijama variraju, što značajno utiče na njihove predispozicije za nastanak oboljenja, varijabilnost kliničke slike ali i na terapijski odgovor na antipsihotike. Od važnosti je prepoznati alele od značaja u našoj populaciji pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, te na osnovu tih rezultata predložiti uvođenje personalizovane terapije, ali i predlaganju novih smjernica za dijagnostiku, liječenje i praćenje ovog oboljenja. Uključivanjem terapije prema individualnom genetskom profilu pacijenta može dovesti do bržeg postizanja remisije, smanjenja broja hospitalizacija, broja bolničkih dana kao i smanjenja troškova liječenja pacijenata.

Primjena antipsihotika indikovana je kod pacijenata oboljelih od shizofrenije, kako zbog simptomatologije koja onemogućava pacijentovu funkcionalnost, tako i zbog rizika od auto i heterodestruktivnog ponašanja. Međutim, ne smiju se zaboraviti značajne metaboličke posljedice uslijed dugotrajne primjene navedenih lijekova. Pacijenti koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije imaju značajno veći broj kardio-metaboličkih komorbiditeta u odnosu na opštu populaciju, što ukazuje i na povećan rizik od prerane smrti. Kako se posledice ovih neželjenih efekata u velikoj mjeri mogu prevenirati, važno je pratiti biohemijske parametre koji mogu ukazati na njihov nastanak, te time smanjiti mortalitet i poboljšati psihofizički kvalitet života. Najznačajniji neželjeni efekti koji ukazuju da je došlo do metaboličkog sindroma su insulinska rezistencija, povećana koncentracija glukoze u krvi, povećan nivo holesterola i triglicerida. Kako navedeni biohemijski poremećaji utiču na funkcionalnost organa koji imaju najveći značaj u metabolisanju i nastanku neželjenih dejstava antipsihotika zaključak je da je potrebno pratiti biohemijske markere jetre, pankreasa i bubrega (enzimi, proteini, insulin, HbA1c, urea, kreatinin, HMVA, acidum uricum) (12,13,27,28)

Cilj i hipoteze

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrditi prevalencu polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE ($\epsilon 2, \epsilon 3$ i $\epsilon 4$) i njihovih kombinacija kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije i kod učesnika kontrolne grupe u crnogorskoj populaciji
- Utvrditi povezanost prisutnih polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818),

DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i njihovih kombinacija sa težinom kliničke slike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije

- Utvrditi da li postoji povezanost navedenih polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i njihovih kombinacija i rezistencije na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i njihovih kombinacija i terapijske rezistencije u odnosu na pol ispitanika kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i biohemijskih parametara koji su pokazatelji uticaja na metabolizam i nastanak neželjenih efekata kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- Utvrditi da li postoji značajan uticaj ispitivanih polimorfizama u genima na terapijski odgovor na antipsihotike i tok bolesti (multifaktorska analiza)
- Utvrditi povezanost biohemijskih faktora od značaja za metabolizam i bezbjednost primjene antipsihotika i propisanih antipsihotika i njihovih doza kod pacijenata oboljelih od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

- H01: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa nastankom psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- H02: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa težinom kliničke slike kod psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije
- H03: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa nastankom terapijske rezistencije prilikom primjene antipsihotika, kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije
- H04: Postoji povezanost polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) sa pojavom terapijske rezistencije u odnosu na pol ispitanika, kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije
- H05: Postoji povezanost između polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4) i izmjerenih biohemijskih parametara od značaja za metabolizam i bezbjednost primjene antipsihotika kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije, koji se liječe antipsihoticima

Materijali, metode i plan istraživanja

Ovim istraživanjem biće obuhvaćeni pacijenti koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije. Obuhvatanjem populacije pacijenata koji se liječe od shizofrenije u sjevernoj,

centralnoj i južnoj regiji naše zemlje obezbjeđuje se heterogenost uzorka. Takođe, time što se obuhvataju pacijenti koji su liječeni ambulantno i bolnički, omogućava se upoređivanje rezultata dobijenih ispitivanjem ove dvije subpopulacije.

Prije početka istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj:872/2, od 06.07.2020.godine), Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore (broj:03/01-33033/1, od 17.2.2020.godine), Etičkog komiteta Specijalne psihijatrijske bolnice Dobrota (broj:1691, od 27.04.2020.godine) i Etičkog komiteta Doma zdravlja Berane (broj:01-118, od 27.2.2020.godine)

Kriterijumi za uključenje u istraživanje su pacijenti starosti od 18-65 godina, sa dijagnozom psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, koju je postavio lekar specijalista psihijatrije prema MKB 10 klasifikacionom sistemu; pacijenti koji na Mini mental state examination testu (MMSE) imaju rezultat >25 i i University of California - San Diego Brief Assessment of Capacity to Capacity (UBACC) testu imaju rezultat >15 , i koji daju dobrovoljan pristanak za učešće u istraživanju.

Kriterijumi isključenja su intelektualni i kognitivni deficit, pacijenti koji koriste terapiju antipsihoticima manje od 12 nedjelja, nekomplijantni pacijenti, pacijenti koji zloupotrebljavaju psihoaktivne supstance u prethodna tri mjeseca, pacijenti koji zloupotrebljavaju alkohol, pacijenti sa ozbiljnim somatskim komorbiditetima koji se uz pomoć lijekova ne mogu održavati pod kontrolom, pacijenti sa neurološkim oboljenjima, pacijenti sa autoimunim oboljenjima, pacijenti sa onkološkim oboljenjima, trudnice, pacijenti sa nepotpunom medicinskom psihijatrijskom dokumentacijom, pacijenti kojima je oduzeta poslovna sposobnost, pacijenti koji na Mini mental state examination testu (MMSE) imaju rezultat <25 i i University of California - San Diego Brief Assessment of Capacity to Capacity (UBACC) testu imaju rezultat <15 .

Planirano je istraživanjem obuhvatiti uzorak koji broji između 120 i 150 pacijenata koji su liječeni na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Crne Gore, Specijalnoj psihijatrijskoj bolnici Dobrota i Centru za mentalno zdravlje Berane. Kontrolnu grupu za istraživanje jednonukleotidnih polimorfizama (Single nucleotide polymorphisms - SNP) u definisanim genima će sačinjavati između 60 i 80 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi. Veličina uzorka u literaturi prilikom sprovođenja sličnih istraživanja značajno varira i zavisi od različitih faktora, mogućnosti istraživača da regrutuje određeni broj pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, s obzirom da je neophodno ispoštovati etičke kriterijume prilikom regrutovanja pacijenata (oduzeta poslovna sposobnost, dekompenzovani somatski komorbiditeti, neposjedovanje kapaciteta za davanje dobrovoljnog pristanka za uključenje u istraživanje – kriterijumi za isključenje iz istraživanja). Tako je, na primjer, sprovedeno istraživanje u hrvatskoj populaciji je obuhvatalo 981 pacijenta sa dijagnozom shizofrenije (7), u Saudijskoj Arabiji 180 pacijenata (11), u Španiji 165 (19), Sloveniji 198 (22), a u meksičkoj populaciji 218 pacijenata (25). Za uzorak veličine između 120 i 150 pacijenata prilikom ovog istraživanja, odlučeno je na osnovu veličine uzorka najveće studije u našoj zemlji rađenoj sa pacijentima koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije, a koje se sprovodi u IMPULSE projektu, Horizont 2020, pri čemu je u Crnoj Gori regrutovano 122 pacijenta (29), kao i na osnovu veličine populacije

stanovnika Crne Gore.

Na osnovu medicinske dokumentacije, uvidom u bolničke i ambulantne protokole prethodno navedenih ustanova prikupiće se uzorak pacijenata koji su, prema MKB10 klasifikacionom sistemu (ICD 10-International Classification of Disease, 10th Revision), ispunili kriterijum za dijagnozu psihotičnog poremećaja iz spektra shizofrenije a koji obuhvata spektar od F20 do F29 (30). Pacijentima koji odgovaraju kriterijumima za uključivanje u istraživanje biće usmeno i pismeno saopšteni ciljevi i svrha istraživanja, trajanje i rizici, biće informisani o svojim pravima da mogu u bilo kojoj fazi istraživanja odustati od učešća, kao i o tome da će se podaci čuvati i prikupljati na način da niko neće moći da ih dovede u vezu sa ispitanikom, te će anonimnost biti zagarantovana.

Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje proći će ocjenjivanje za procjenu sposobnosti potpisivanja saglasnosti za uključenje u studiju (MMSE, UBACC). Potom će se u istraživanje uključiti pacijenti koji budu imali očuvanu sposobnost za davanje saglasnosti (MMSE >25; UBACC>15) i potpišu Pristanak informisanog ispitanika.

Nakon toga će se pristupiti potvrđivanju dijagnoze koju pacijent ima prema medicinskoj dokumentaciji, na osnovu MKB 10 klasifikacionog sistema i Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) skale.

Nakon potvrđene dijagnoze pristupiće se procjeni stanja pacijenata uz pomoć sledećih skala: Strukturisani upitnik za prikupljanje socio-demografskih podataka i podataka koji se odnose na liječenje pacijenta, Clinical Global Impression Severity scale (CGI-S), Global Assessment of Functioning skalu (GAF), Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS), Intervju za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS), Childhood Traumatic Events Scale (CTES).

Na osnovu kriterijuma za terapijsku rezistenciju predloženih od strane Suzukija 2012. godine (31) pacijenti će biti podijeljeni u 2 podgrupe: grupa pacijenata rezistentnih na terapiju antipsihoticima (TR) i grupa pacijenata sa zadovoljavajućim odgovorom na antipsihotike (TO).

Suzukijevi kriterijumi podrazumijevaju izostanak terapijskog odgovora prilikom korišćenja najmanje dva antipsihotika, koji su dati u dozama ekvivalentnim ≥ 600 mg hlorpromazina, u uzastopnom periodu od 6 nedjelja, što će se procjenjivati retrospektivno. Ovaj kriterijum zahtijeva skor ≥ 4 na Clinical Global Impression (CGI)-Severity skali i skor ≤ 49 na Functional Assessment for Comprehensive Treatment of Schizophrenia (FACT-Sz) ili ≤ 50 na Global Assessment of Functioning (GAF) skali (31).

Pratiće se antipsihotici i doze koje pacijenti uzimaju. Antipsihotici koje pacijenti koriste biće procjenjivani prema hlorpromazin ekvivalentnim dozama. Hlorpromazin-ekvivalentne doze se definišu kao doze lijekova čiji je efekat ekvivalentan efektu 100mg hlorpromazina *per os*. Za minimalnu efektivnu dozu se podrazumijevaju doze ekvivalentne 200-300mg hlorpromazina, a doze iznad 1000mg se smatraju visokim (32).

100mg hlorpromazina dnevno je ekvivalentno sa (32):

- 2mg haloperidola na dan
- 2mg flufenazina na dan
- 2mg risperidona na dan
- 5mg olanzapina na dan
- 75mg kvetiapina na dan
- 50mg klozapina na dan
- 7,5mg aripiprazola na dan.

Biohemijski dio istraživanja će se sprovesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore. Genetske analize će biti sprovedene u laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta, smjer Biologija (dobijena pismena saglasnost za korišćenje laboratorije, djelovodni broj:1396, od 25.06.2020.godine).

Uzorkovanje krvi se radi iz kubitalne vene u epruvetama od 5 ml za biohemijske analize i EDTA epruvetama 2 ml za genetske analize. Radiće se neposredno prije uzimanja doze lijeka, 12 sati od uzimanja posljednjeg obroka. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Standardni uzorak za genetske analize je 2 ml krvi, ali ukoliko ne postoji mogućnost da se dobije ta količina, dovoljno je izvaditi krv u vakutejnere od 0,5 ml. Nakon uzorkovanja, krv se će se odmah poslati u ovlašćenu laboratoriju za potrebnu molekularnu analizu. Ukoliko se transport izvrši u roku od 24 sata, nije potrebno čak ni obezbjeđivanje uslova hladnog lanca prilikom transporta. Ukoliko se uzorak ne šalje odmah na analizu, onda se drži na hladnom (do 7 dana može u frižideru, a za duže deponovanje treba zamrznuti uzorak). Serum za biohemijske analize će se dobiti centrifugiranjem pune krvi pri brzini od 3000 obrta/min, a zatim obraditi spektrofotometrijskom metodom, ili zamrzavati ukoliko bude potrebno duže čuvanje uzorka.

Genetske metode: DNK izolacija i genotipizacija

Sakupljeni uzorci za genetske analize biće obrađeni korišćenjem molekularnih metoda. Svi uzorci će biti obilježeni tako da štite anonimnost učesnika istraživanja i da identitet ispitanika ostane u potpunosti zaštićen.

DNK će biti izolovana iz pune krvi pacijenata korišćenjem dostupnih komercijalnih kitova (Quigaen Inc, Hilden, Germany).

DRD2 - TaqIA (rs1800497) and -141C InsDel (rs1799732)

DRD2/ANKK1 TaqIA (rs1800497) i -141C InsDel (rs1799732) polimorfizmi će biti detektovani uz pomoć PCR –RFLP analize koristeći prajmerske sekvence opisane od Grandy i sar.(33) i Ohara i sar. (34). Sekvence prajmera (IDT Coraville, IA, USA) će biti: TaqIA, prajmer

5'-CACCTTCCTGAGTGTCAT CAA -3', reverzni prajmer 5'-AGACAACCTTGGCCAG CCGTG-3'; -141C InsDel, prajmer 5'-ACTGGC GAGCAGACGGTGAGG i reverzni prajmer 5'-TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGT. PCR produkti će se obrađivati zasebno na TaqI (za TaqIA polimorfizam) ili MvaI (-141C InsDel polimorfizam) enzimima (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) prema uputstvima proizvođača. Genotipovi će biti određeni nakon gel elektroforeze (2 ili 3% agaroznog gela) sa Cyber Green TM. Za DRD/ANKK1 TaqIA polimorfizam C alel sadrži TaqI restrikciono mjesto koje će specifičnom restrikcijom aktivnosti TaqI enzima biti "izrezano" i prepoznato kao A2 alel na gelu, dok će T alel biti "izrezan" na drugom mjestu i prepoznato kao A1 alel drugačije dužine na gelu. Za 141C InsDel polimorfizam, -141C*Ins alel sadrži restrikciono mjesto za MvaI, dok -141C*Del alel ne sadrži.

COMT rs4680 i rs4818

Genotipizacija će se odraditi uz pomoć prajmera i proba iz TaqMan R Drug Metabolizam Genotyping Assays, na ABI Prizmi 7300 Real time PCR System apparatus, prema proceduri Applied Biosystems. 10 µL volumen za reakciju će sadržati oko 30-100nf DNK. Oko 10% nasumično izabranih uzoraka će služiti da se genotipovanje ponovi radi kontrole procesa. Rs4680 (A > G supstitucija) ili Val108/158Met je česti funkcionalni polimorfizam COMT-a, u kome supstitucija G/C a rezultira u zamjenu valina u metionin na kodonu 158, za membranski vezan (membrane-bound - MB) COMT, i na kodonu 108 za solubilni (S) COMT. Rs4818, sa C/G supstitucijom (Leu/Leu) na kodonu 86 S-COMT-a ili kodonu 136 MB-COMT(6). Za rs4680 koristiće se prajmeri 5'-ACT GTG GCT ACT CAG CTG TG i 5'CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA. PCR produkti će biti digestovani uz pomoć Nla III 2 sata na temperaturi 37°C i identifikovani i razdvojeni na elektroforezi koristeći 4% agarozu gel elektroforezu. Za COMT rs4818 C>G koristiće se prajmeri ACCAGCGTGAGCATAGAGGC i reverzni GGTTTTC AGTGAACGTGGTGTG. Za identifikaciju fragmenata i njihovo razdvajanje koristiće se 4% agarozu gel elektroforeza. Provjera amplifikata će se vršiti i na samoj mašini upotrebom fluorescentno obolježenih nukleotida tj. upotrebom PRC kita Cybertm Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

APOE ε2, ε3 i ε4

PCR amplifikacija će se izvesti sa ABI termocycler 7300 Applied Biosystems, Foster City, CA) u finalnom volumenu od 15 µl sadržeći 1x PCR pufer (10-mM Tris-HCl pH8.8, 50-mM KCl, 0.08% P40, Fermentas, Germany); 1.5-mM MgCl₂; 200-µM dNTPs svaki; 0.13-U/µl Taq polymerase (Fermentas, Germany); 1-µM F4 i F6 prajmeri (Hixson & Vernier, 1990); i 50 ng DNA. PCR metoda će se odvijati na sljedeći način: inicijalna denaturacija će se odvijati na 95 ° C 3 minuta, zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C po 1 minut, topljenje i vezivanje prajmera na 65 ° C 1 minut, i ekstenzija (elongacija) na 72°C jedan minut. Sve alikvote (10 µl) amplificiranih fragmenata biće digestovane na 37°C uz pomoć restrikcijonih enzima HhaI korišćenjem pufera predloženih od strane proizvođača- (Fermentas, Germany). HhaI restrikcioni obrazac je rezultat dva SNP-a APOE gena na nukleotidnoj poziciji 334 i 472. Kombinacija 334T/472T (112

Cys/158 Cys), 334T/472C (112 Cys/158 Arg), i 334C/472C (112 Arg/158 Arg) poznati su kao $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$ aleli, i ovi aleli daju 6 genotipova. PCR obrađeni produkti se puštaju na 20% poliakrilamid gela i aleli se vizualiziraju uz pomoć srebra (35). Genotipovi će se determinirati prema različitosti restrikcionih obrazaca za svaku kombinaciju alela. Dodatno, provjera amplifikata će se vršiti i na samoj mašini upotrebom fluorescentno obolježenih nukleotida tj. upotrebom PRC kita Cyber[™] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Biohemijske analize biće odrađene u laboratoriji Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore spektrofotometrijskom metodom. Od biohemijskih analiza planirano je mjerenje koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, mjerenje koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree, kreatinina, kao i procjena lipidnog statusa.

Statističke metode obrade podataka

Pristupice se statističkoj obradi i analizi dobijenih podataka i utvrđivanju statističke značajnosti povezanosti polimorfizama u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2 (rs1799732 i rs1800497) i APOE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$) i njihovih kombinacija sa utvrđenom kliničkom slikom i odgovorom na terapiju i navedenim biohemijskim parametara.

Statističkom obradom biće izračunate deskriptivne statističke vrijednosti (mjere centralne tendencije i disperzije podataka, odnosno rezultata na skalama procjene).

Planirano je primijeniti jednovarijantnu analizu varijanse (ANOVA) za svako alelsko stanje i genotipove kao i multivarijantnu analizu varijanse (MANOVA) za sva alelska stana. Nakon toga je planirano uraditi za svaku ANOVA analizu post hoc testiranje statističke značajnosti uočenih razlika koristeći Fisher LSD testom. Za upoređivanje frekvencije alela i genotipova koristiće se Hi kvadrat test.

U svrhu komparacije grupa po varijablama koje su uključene u analizu, koristiće se t-test za nezavisne uzorke. U slučaju da distribucije podataka i rezultata budu statistički značajno odstupale od normalne krive, kao alternativna tehnika koristiće se Mann-Whitney U test. Za uporedbe tipa pretest-posttest koristiće se t-test za ponovljena mjerenja (zavisne uzorke) ili njegov neparametrijski pandan Wilcoxonov test (pod već opisanim uslovima).

U svrhu procjene asocijacije među ispitivanim varijablama, koristiće se Pearsonov (produkt-moment) koeficijent korelacije (r). Alternativno, ukoliko raspodjela podataka/rezultata bude statistički značajno odstupala od normalne, koristiće se Spearmanov koeficijent rang korelacije (r).

Ukoliko se pokaže da postoji određeni broj varijabli na osnovu kojih bi se mogla anticipirati pripadnost učesnika istraživanja grupi teraporezistentnih i onih koji adekvatno reaguju na terapiju (kriterijumska varijabla), ove prediktorske varijable će biti uključene u logističku analizu.

Podaci će biti prikazani tabelarno i grafički, uz korištenje MS Excela, a statističke analize biće

provedene uz pomoć SPSS softvera.

Istraživanje će biti sprovedeno kroz sljedeće aktivnosti:

- Dobijene su saglasnosti Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj:872/2, od 06.07.2020.godine), Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore (broj:03/01-33033/1, od 17.2.2020.godine), Etičkog komiteta Specijalne psihijatrijske bolnice Dobrota (broj:1691, od 27.04.2020.godine) i Etičkog komiteta Doma zdravlja Berane (broj:01-118, od 27.2.2020.godine), te će se pristupiti detaljnom pregledu medicinske dokumentacije, da bi se prikupio uzorak pacijenata iz grupe psihotičnih poremećaja dijagnostičkog spektra shizofrenije.
- Pacijentima koji odgovaraju kriterijumima za uključanje u istraživanje biće predložen cilj i svrha sprovođenja istraživanja, kao i njihova prava. Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje proći će ocjenjivanje za procjenu sposobnosti potpisivanja saglasnosti za uključanje u studiju (MMSE, UBACC). Potom će se u studiju uključiti pacijenti koji budu imali očuvanu sposobnost za davanje saglasnosti (MMSE >25; UBACC>15) i potpišu Pristanak informisanog ispitanika.
- Uvidom u medicinsku dokumentaciju pacijenata dobiće se informacije o početku nastanka bolesti, dužini liječenja, propisanim antipsihoticima, dozama, i redukciji i povlačenju simptomatologije (remisiji) ili periodima trajanja simptoma bolesti (recidivima), broju i dužini trajanja hospitalizacija, kao i psihijatrijskim komorbiditetima.
- Nakon toga će se pristupiti potvrđivanju dijagnoze koju pacijent ima prema medicinskoj dokumentaciji, na osnovu MKB10 klasifikacionog sistema i Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) skale.
- Nakon potvrđene dijagnoze pristupiće se procjeni stanja pacijenata uz pomoć sljedećih skala: Strukturisani upitnik za prikupljanje socio-demografskih podataka i podataka koji se odnose na liječenje pacijenta. Clinical Global Impression Severity scale (CGI-S), Global Assessment of Functioning skalu (GAF), Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS), Intervju za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS), Childhood Traumatic Events Scale (CTES).
- Dobijeni podaci biće unošeni u protokol vođenja (Excel), koji će pružati prethodno navedene informacije i korelirati ih sa rezultatima skala.
- Ispitivana grupa će po završetku procjene pacijenata biti podijeljena na grupu pacijenata sa terapijskom rezistencijom (TR), grupu pacijenata sa dobrim odgovorom (TO) na terapiju antipsihoticima u odnosu na za to predviđene kriterijume (31) i kontrolnu grupu (KG).
- Pristupiće se uzorkovanju krvi i određivanju alelskih stanja i genotipova COMT gen (rs4680 i rs4818), DRD2 gen (rs1799792 i rs1800497) i APOE gen (ε2, ε3 i ε4)

molekularnim tehnikama koje su opisane u protokolu.

- Pristupiće se i biohemijskim analizama i to: mjerenju koncentracije enzima ALT-a, AST-a, GGT-a, mjerenju koncentracije ukupnih proteina i albumina, mokraćne kiseline, bilirubina, glukoze, HbA1c, insulina, amilaze, homovanil mandelične kiseline, uree, kreatinina, kao i procjeni lipidnog statusa. Navedeni biohemijski parametri poslužiće za korelaciju sa propisanom terapijom i alelskim stanjima i genotipovima koji se istražuju kod ispitanika, u cilju praćenja terapijskog odgovora na antipsihotike. Navedeni biohemijski markeri biće određivani u laboratoriji za medicinsku biohemiju na Medicinskom fakultetu, Univerziteta Crne Gore, spektrofotometrijskom metodom.
- Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program).
- Promocija rezultata doktorske disertacije predviđena je kroz objavljivanje radova u časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i prezentaciju rukovodiocima institucija od značaja (Kliničkog centra Crne Gore, Republičkog fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja) u cilju uvođenja individualizovanog pristupa u liječenju ovih pacijenata, ali i cilju planiranja stručnog kadra i pokrivanja troškova liječenja.

Očekivani naučni doprinos

- Kako su dosadašnja istraživanja pokazala kontroverzne rezultate, i potrebu za daljim izučavanjem terapijske rezistencije i genetskih faktora rizika, primjena genetskih analiza kod pacijenata koji se liječe od psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije dovešće do produblivanja razumijevanja ovog oboljenja, ali i do saznanja o specifičnostima prevalencije navedenih polimorfizama kod ove populacije pacijenata u Crnoj Gori i njihove povezanosti sa kliničkom slikom i terapijskom rezistencijom.
- U odnosu na dobijene rezultate predložiće se primjena genetskih i biohemijskih analiza u oblasti psihijatrije kako bi se procijenio rizik nastanka psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije kod posebno vulnerabilnih pojedinaca, ali i omogućio dobar terapijski odgovor, sa što manje metaboličkih neželjenih efekata, kod onih pacijenata kod kojih to nije postignuto uprkos primjenjivanju više različitih antipsihotika (predložiće se primjena personalizovane medicine).
- Praćenjem biohemijskih parametara kod ovih pacijenata i njihovim koreliranjem sa polimorfizmima u genima COMT (rs4680 i rs4818), DRD2(rs1799732 i rs1800497) i APOE (ε2, ε3 i ε4), ali i antipsihoticima i dozama koje uzimaju, pružiće nam više informacija o najčešćim metaboličkim neželjenim efektima pojedinih grupa lijekova, ali i njihovoj povezanosti sa ispitivanim polimorfizmima u genima, što može doprinijeti prevenciji posljedica neželjenih efekata lijekova.
- Osnaživanje multidisciplinarnog pristupa u daljem istraživanju psihotičnih poremećaja iz spektra shizofrenije i saradnjom sa Prirodno-matematičkim fakultetom Univerziteta Crne Gore, Institutom Inserm u Parizu i drugim institucijama od značaja u cilju

predlaganja strategija za profilaksu, ranu dijagnostiku i personalizovani terapijski pristup u cilju povoljnijeg odnosa koristi i rizika primjene antipsihotika, brzog dostizanja očekivanog terapijskog odgovora, bolje komplijanse, unaprijeđenja kvaliteta života i smanjenja troškova liječenja pacijenata oboljelih od shizofrenije u Crnoj Gori.

Spisak objavljenih radova kandidata

- **Petrović M**, Injac Stevović L, Pantović S. Uticaj genetskih faktora na terapijski odgovor na antipsihotike kod pacijenata oboljelih od poremećaja iz spektra shizofrenije. "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2020:2(2), str. 110 – 119.
- Injac Stevović L, **Petrović M**, Brandmajer T, Radojičić T. Genetski i porodični faktori u etiologiji suicidnosti. "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2020:2(1), str. 38 – 47.
- Stevović LI, Radojičić T, Repišti S, Ražnatović A, Barac-Otašević Z, Perunović-Jovanović T, Ljutica I, Kalač S, Brajković I, Purišić A, **Petrović M**. Psihometrijska validacija intervjua za kliničku procjenu negativnih simptoma (CAINS) na uzorku osoba sa psihotičnim poremećajima u Crnoj Gori. Časopis "Psihijatrija" Udruženje psihijatara Crne Gore, 2019 Sep; 1:68-78.
- Injac Stevović L, **Petrović M**, Pantović S. Karakteristike porodične istorije suicida i stresnih životnih događaja kod osoba koje su realizovale suicid: zaključci psihološke autopsije u Crnoj Gori. Časopis "Psihijatrija" Udruženja psihijatara Crne Gore – I:5 – 10, 2018.

Popis literature

1. Pantelis C, Lambert TJ. Managing patients with "treatment – resistant" schizophrenia. Medical Journal of Australia. 2003 May 5;178(9):S62-66.
2. Huang E, Zai CC, Lisoway A, Maciukiewicz M, Felsky D, Tiwari AK, Bishop JR, Ikeda M, Molero P, Ortuno F, Porcelli S. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical response to antipsychotic treatment in schizophrenia and schizo-affective disorder patients: a meta-analysis. International Journal of Neuropsychopharmacology. 2016 May 1;19(5):1-12.
3. Shi Y, Li M, Song C, Xu Q, Huo R, Shen L, Xing Q, Cui D, Li W, Zhao J, He L. Combined study of genetic and epigenetic biomarker risperidone treatment efficacy in Chinese Han schizophrenia patients. Translational psychiatry. 2017 Jul;7(7):e1170-.
4. Arranz MJ, Gallego C, Salazar J, Arias B. Pharmacogenetic studies of drug response in schizophrenia. Expert Review of Precision Medicine and Drug Development. 2016 Jan 2;1(1):79-91.
5. Perkovic MN, Erjavec GN, Strac DS, Uzun S, Kozumplik O, Pivac N. Theranostic biomarkers for schizophrenia. International journal of molecular sciences. 2017 Apr;18(4):733.
6. Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Bielau H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun K, Jankowski Z, Kumaratilake J, Henneberg M. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. Frontiers in psychiatry. 2014 May 19;5:47.
7. Sagud M, Tudor L, Uzun S, Perkovic MN, Zivkovic M, Konjevod M, Kozumplik O, Vuksan Cusa B, Svob Strac D, Rados I, Mimica N. Haplotypic and genotypic association of catechol-o-

- methyltransferase rs4680 and rs4818 polymorphisms and treatment resistance in schizophrenia. *Frontiers in pharmacology*. 2018 Jul 3;9:705.
8. Anttila S. Genetic factors in schizophrenia-studies on treatment response to typical neuroleptics and age at onset. Tampere University Press; 2004.
 9. He H, Wu H, Yang L, Gao F, Fan Y, Feng J, Ma X. Associations between dopamine D2 receptor gene polymorphisms and schizophrenia risk: a PRISMA compliant meta-analysis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016;12:3129.
 10. Cho M, Contreras A, Garza A, Olvera S, Castillo D. The impact of drug and gene interaction on the antipsychotic medication for schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2017;3(117):2472-1077.
 11. Al-Asmary SM, Kadasah S, Arfin M, Tariq M, Al-Asmari A. Apolipoprotein E polymorphism is associated with susceptibility to schizophrenia among Saudis. *Archives of medical science: AMS*. 2015 Aug 12;11(4):869-876.
 12. De Hert M, Schreurs V, Vancampfort D, Van Winkel R. Metabolic syndrome in people with schizophrenia: a review. *World psychiatry*. 2009 Feb;8(1):15-22.
 13. Malhotra N, Grover S, Chakrabarti S, Kulhara P. Metabolic syndrome in schizophrenia. *Indian journal of psychological medicine*. 2013 Jul;35(3):227-240.
 14. Ellingrod VL, Taylor SF, Dalack G, Grove TB, Bly MJ, Brook RD, Zöllner SK, Pop-Busui R. Risk factors associated with metabolic syndrome in bipolar and schizophrenia subjects treated with antipsychotics: the role of folate pharmacogenetics. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2012 Apr;32(2):261-265.
 15. Pinto JA, Freitas PH, Nunes FD, Granjeiro PA, Santos LL, Machado RM. Prevalence of polymorphisms in the ANKK1, DRD2, DRD3 genes and metabolic syndrome in refractory schizophrenia. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2018;26.
 16. Ban C, Zhang Q, Feng J, Li H, Qiu Q, Tian Y, Li X. Low prevalence of lipid metabolism abnormalities in APOE ϵ 2-genotype and male patients 60 years or older with schizophrenia. *BMC psychiatry*. 2017 Dec 1;17(1):399.
 17. Maron E., Lan CC., Nutt D. Genetic Factors Underlying Treatment Resistance in Psychiatry. In: Kim YK. (eds) *Treatment Resistance in Psychiatry*. Springer, Singapore. 2019; p.33-63.
 18. Hajj A, Obeid S, Sahyoun S, Haddad C, Azar J, Rabbaa Khabbaz L, Hallit S. Clinical and genetic factors associated with resistance to treatment in patients with schizophrenia: a case-control study. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jan;20(19):4753.
 19. Zumárraga M, Arrúe A, Basterreche N, Macías I, Catalán A, Madrazo A, Bustamante S, Zamalloa MI, Erkoreka L, Gordo E, Arnaiz A. COMT haplotypes, catecholamine metabolites in plasma and clinical response in schizophrenic and bipolar patients. *Pharmacogenomics*. 2016 Jun;17(8):837-51.
 20. Lott SA, Burghardt PR, Burghardt KJ, Bly MJ, Grove TB, Ellingrod VL. The influence of

- metabolic syndrome, physical activity and genotype on catechol-O-methyl transferase promoter-region methylation in schizophrenia. *The pharmacogenomics journal*. 2013 Jun;13(3):264-71.
21. Corral-Frías NS, Pizzagalli DA, Carré JM, Michalski LJ, Nikolova YS, Perlis RH, Fagerness J, Lee MR, Conley ED, Lancaster TM, Haddad S. COMT Val158Met genotype is associated with reward learning: a replication study and meta-analysis. *Genes, Brain and Behavior*. 2016 Jun;15(5):503-13.
22. Terzić T, Kastelic M, Dolžan V, Kores Plesnicar B. Genetic polymorphisms in dopaminergic system and treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatria Danubina*. 2016 Jun 7;28(2):127-31.
23. Oishi K, Niitsu T, Kanahara N, Sato Y, Iwayama Y, Toyota T, Hashimoto T, Sasaki T, Takase M, Shiina A, Yoshikawa T. Genetic risks of schizophrenia identified in a matched case-control study. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2020 Jul 4:1-7.
24. Oda Y, Kanahara N, Iyo M. Alterations of dopamine D2 receptors and related receptor-interacting proteins in schizophrenia: the pivotal position of dopamine supersensitivity psychosis in treatment-resistant schizophrenia. *International journal of molecular sciences*. 2015 Dec;16(12):30144-63.
25. Escamilla R, Camarena B, Saracco-Alvarez R, Fresán A, Hernández S, Aguilar-García A. Association study between COMT, DRD2, and DRD3 gene variants and antipsychotic treatment response in Mexican patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2018;14:2981.
26. Kecmanović M, Dobričić V, Dimitrijević R, Keckarević D, Savić-Pavićević D, Keckarević-Marković M, Ivković M, Romac S. Schizophrenia and apolipoprotein E gene polymorphism in Serbian population. *International Journal of Neuroscience*. 2010 May 1;120(7):502-6.
27. Ventriglio A, Gentile A, Stella E, Bellomo A. Metabolic issues in patients affected by schizophrenia: clinical characteristics and medical management. *Frontiers in neuroscience*. 2015 Sep 3;9:297.
28. Carrier P, Debette-Gratien M, Girard M, Jacques J, Nubukpo P, Loustaud-Ratti V. Liver illness and psychiatric patients. *Hepatitis monthly*. 2016 Dec;16(12).
29. Stevović LI, Radojčić T, Repisti S, Raznatović A, Barac-Otasević Z, Perunović-Jovanović T, Ljutica I, Kalac S, Brajković I, Purisic A, Petrović M. Psychometric validation of the clinical assessment interview for negative symptoms (CAINS) on a sample of people with psychotic disorder in Montenegro. *Psihijatrija*. 2019 Sep; 1:68-78.
30. World Health Organisation. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems. World Health Organisation, Geneva, 2004.
31. Suzuki T, Remington G, Mulsant BH, Uchida H, Rajji TK, Graff-Guerrero A, Mimura M, Mamo DC. Defining treatment-resistant schizophrenia and response to antipsychotics: a review

and recommendation. Psychiatry research. 2012 May 15;197(1-2):1-6.

32. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. The Journal of clinical psychiatry. 2003 Jun; 64(6):663-7.

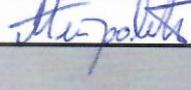
33. Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. Human molecular genetics. 1993;2(12):2197-.

34. Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. Functional polymorphism of-141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. Psychiatry research. 1998 Nov 16;81(2):117-23.

35. Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. Nature protocols. 2007 Nov;2(11):2649.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

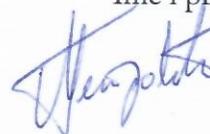
Prvi mentor	Prof. Dr Lidija Injac Stevović	(Potpis)	
Drugi mentor	Doc. Dr Snežana Pantović	(Potpis)	
Doktorand	Dr med. Milena Petrović	(Potpis)	

IZJAVA

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavila ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,
10.11.2020.

Ime i prezime doktoranda



Milena Petrović

Prilozak	14.09.2020
Broj	
med	698/2

Na osnovu člana 32 stav 1 tačka 14 Statuta Univerziteta Crne Gore, u vezi sa članom 34 Pravila doktorskih studija, Senat Univerziteta Crne Gore, u postupku razmatranja prijedloga Vijeća Medicinskog fakulteta i na prijedlog Centra za doktorske studije, na sjednici održanoj 10-11.09.2020. godine, donio je sljedeću

ODLUKU

I

Imenuje se Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidatkinje Milene Petrović, u sastavu:

1. Dr Olivera Miljanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore
2. Dr Lidija Injac Stevović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore
3. Dr Nataša Duborija Kovačević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore

II

Zadatak Komisije je da, u roku od 45 dana od dana javnog izlaganja studenta podnese Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske teze i kandidata.

III

Odluka stupa na snagu danom donošenja.

Broj: 03-2573/1-1
Podgorica, 11.09.2020. godine



PREDSJEDNIK SENATA

Prof. dr Danilo Nikolić, rektor

W

Na osnovu člana 165 stava 1 Zakona o opštem upravnom postupku ("Službeni list RCG", broj 60/03.), člana 115 stava 2 Zakona o visokom obrazovanju ("Službeni list CG", broj 44/14.) i službene evidencije, a po zahtjevu studenta Petrović Dragan Milena, izdaje se

UVJERENJE O POLOŽENIM ISPITIMA

Student **Petrović Dragan Milena**, rođena 23-07-1991 godine u mjestu **Cetinje**, opština **Cetinje**, Republika **Crna Gora**, upisana je studijske 2018/2019 godine, u I godinu studija, kao student koji se **samofinansira na doktorske akademske studije**, studijski program **MEDICINA**, koji realizuje **MEDICINSKI FAKULTET - Podgorica** Univerziteta Crne Gore u trajanju od **3 (tri)** godine sa obimom **180 ECTS** kredita.

Student je položio ispite iz sljedećih predmeta:

Redni broj	Semestar	Naziv predmeta	Ocjena	Uspjeh	Broj ECTS kredita
1.	1	BIOSTATISTIKA	"A"	(odličan)	10.00
2.	1	MEDICINSKA INFORMATIKA	"B"	(vrlodobar)	10.00
3.	1	METODOLOGIJA NAUČNOG ISTRAŽIVANJA	"A"	(odličan)	10.00
4.	2	OSNOVI ČELIJSKE BIOLOGIJE	"A"	(odličan)	5.00
5.	2	OSNOVI MOLEKULARNE GENETIKE	"B"	(vrlodobar)	5.00

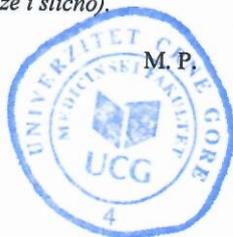
Zaključno sa rednim brojem 5.

Ostvareni uspjeh u toku dosadašnjih studija je:

- srednja ocjena položenih ispita "A" (9.63)
- ukupan broj osvojenih ECTS kredita 40.00 ili 66.67%
- indeks uspjeha 6.42.

Uvjerenje se izdaje na osnovu službene evidencije, a u svrhu ostvarivanja prava na: (dječji dodatak, porodičnu penziju, invalidski dodatak, zdravstvenu legitimaciju, povlašćenu vožnju za gradski saobraćaj, studentski dom, studentski kredit, stipendiju, regulisanje vojne obaveze i slično).

Broj:
Podgorica, 07.12.2020 godine



M. P.

SEKRETAR

[Handwritten signature]