

SEROTONINSKI SUSTAV POSTELJICE: MEĐUODNOS REGULATORNIH GENA I MAJČINOŠ METABOLIČKOG STANJA U TRUDNOŠĆI

Perić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj
Strossmayer University of Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:236:080388>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University
in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Maja Perić

**SEROTONINSKI SUSTAV POSTELJICE:
MEĐUODNOS REGULATORNIH GENA I
MAJČINOG METABOLIČKOG STANJA U
TRUDNOĆI**

DOKTORSKI RAD

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija, Temeljne medicinske znanosti

SEROTONINSKI SUSTAV POSTELJICE: MEĐUODNOS REGULATORNIH GENA I MAJČINOG METABOLIČKOG STANJA U TRUDNOĆI

Maja Perić

Doktorski rad je izrađen u: Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Mentor: prof. dr. sc. Jasminka Štefulj, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković

Kratki sažetak doktorskog rada:

Serotonin je multifunkcionalna signalna molekula s važnom ulogom u regulaciji razvoja i funkcija posteljice. Cilj ovog rada bio je doprinijeti boljem razumijevanju homeostaze serotoninskog sustava posteljice u majčinoj pretilosti i gestacijskom dijabetesu melitusu (GDM). Istraživanja na kliničkim uzorcima posteljice na kraju trudnoće pokazala su povezanost majčine debljine i GDM-a s promjenama ekspresije gena *SERT* i funkcije enzima MAOA. Koncentracije pojedinih lipida u krvi majke bile su povezane s razinama mRNA *SERT*, *OCT3* i *HTR2A*, ali ne *TPHI* i *MAOA* u posteljici. Pokazano je da u regulaciji gena *SERT* i *MAOA* dominiraju epigenetički mehanizmi, dok je razina mRNA *HTR2A* povezana s rijetkom varijantom gena. Istraživanja *in vitro*, na modelu stanica posteljice iz prvog tromjesečja trudnoće upućuju da razine glukoze, inzulina i kisika tijekom rane trudnoće mogu biti okidač promjena homeostaze serotonina u posteljici. Dobiveni rezultati doprinose boljem razumijevanju molekularnih mehanizama povezanih s majčinom debljinom i GDM-om, što je posebno važno s obzirom na sve veću učestalost ovih poremećaja u svijetu.

Broj stranica: 140

Broj slika: 33

Broj tablica: 32

Broj literaturnih navoda: 213

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: 5-HT; placenta; trudnoća; debljina; gestacijski dijabetes melitus; kolesterol; trigliceridi; metilacija molekule DNA; genotip; trofoblasti; hiperglikemija; hiperinzulinemija; hipoksija

Datum javne obrane: 12.06.2024.

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković, predsjednica;
2. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, redovita profesorica, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, članica;
3. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović, redovita profesorica, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, članica;
4. izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, zamjena;
5. doc. dr. sc. Matea Nikolac Perković, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, zamjena.

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek; Institutu Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: Biology, Basic Medical Sciences

PLACENTAL SEROTONIN SYSTEM: RELATIONSHIP BETWEEN REGULATORY GENES AND MATERNAL METABOLIC STATE DURING PREGNANCY

Maja Perić

Thesis performed at: Laboratory for Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia
Supervisor: prof. dr. sc. Jasminka Štefulj, senior scientist, Ruđer Bošković Institute

Short abstract:

Serotonin is a multifunctional signaling molecule important in regulating placental development and functions. The aim of this work was to contribute to a better understanding of the placental serotonin system homeostasis in maternal obesity and gestational diabetes mellitus (GDM). Research on clinical samples of the term placenta showed an association between maternal obesity and GDM with changes in the *SERT* gene expression and MAOA enzyme function. Maternal blood lipid concentrations were associated with placental *SERT*, *OCT3* and *HTR2A*, but not *TPH1* and *MAOA* mRNA levels. Epigenetic mechanisms dominated in the regulation of *SERT* and *MAOA*, while *HTR2A* mRNA levels were associated with a rare gene variant. *In vitro* studies on a first trimester trophoblast cell line suggested that glucose, insulin and oxygen levels during early pregnancy may trigger changes in the placental serotonin homeostasis. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms related to maternal obesity and GDM, which is especially important considering the increasing rates of these disorders worldwide.

Number of pages: 140

Number of figures: 33

Number of tables: 32

Number of references: 213

Original in: croatian

Key words: 5-HT; placenta; pregnancy; obesity; gestational diabetes mellitus; cholesterol; triglycerides; DNA methylation; genotype; trophoblasts; hyperglycemia; hyperinsulinemia; hypoxia

Date of the thesis defense: 12.06.2024.

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, senior scientist, Ruđer Bošković Institute, president;
2. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, full professor, Faculty of Science, University of Zagreb, member;
3. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović, full professor, Faculty of Medicine Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member;
4. assoc. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, substitute;
5. asst. prof. dr. sc. Matea Nikolac Perković, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, substitute.

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek; Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasminke Štefulj, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina“ (HRZZ: IP-2018-01-6547).

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Jasminki Štefulj, na prilici da se pridružim radu laboratorija, na stručnom vodstvu kroz sve faze mog istraživačkog rada i na neprocjenjivom iskustvu koje sam stekla.

Zahvaljujem dr. sc. Lipi Čičin-Šain na savjetima prilikom planiranja i izvedbe eksperimenata te analize rezultata i kritičkom čitanju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem svim sadašnjim i bivšim članovima Laboratorija za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, dr. sc. Marini Horvatiček, dr. sc. Ivoni Bečeheli, dr. sc. Maji Kesić, dr. sc. Petri Baković, dr. sc. Marini Kukolj, Paoli Šimac i Zvonimiru Ercegovcu, na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, analizama i statističkoj obradi podataka, na moralnoj podršci i odličnoj atmosferi.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Gernotu Desoyeu što me velikodušno primio u svoj laboratorij i pružio uvjete za provedbu istraživanja na kulturi stanica.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marini Ivanišević na podršci u kliničkom dijelu istraživanja, liječnicima i djelatnicima Odjela za dijabetes i fetalni rast Klinike za ženske bolesti i porođaje te djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb na suradnji.

Zahvaljujem svim sudionicama na pristanku za sudjelovanje u istraživanju.

Zahvaljujem svojim roditeljima, Katarini i Neni, te sestri Nini i njezinoj obitelji, na neizmjerljivoj ljubavi, podršci i razumijevanju. Posebno ističem zahvale mami koja mi je omogućila potporu za sav dodatan trud i sate uložene u izradu ove disertacije.

Zahvaljujem suprugu Frani na podršci, ljubavi i ohrabrenju da krenem u ovaj pothvat te Tomi i Dori što su mi svakodnevno pružali radost, snagu i volju da se lakše suočim s profesionalnim izazovima.

1	UVOD.....	1
1.1	Posteljica čovjeka	2
1.1.1	Razvoj	2
1.1.2	Građa	4
1.1.3	Funkcije.....	4
1.2	Majčina debljina i gestacijski dijabetes melitus (GDM)	6
1.2.1	Prevalencija majčine debljine i GDM-a	7
1.2.2	Patofiziologija i posljedice majčine debljine i GDM-a.....	8
1.2.3	Posteljica u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om.....	10
1.3	Serotoninski sustav posteljice.....	12
1.3.1	Funkcije serotoninskog sustava posteljice	13
1.3.2	Komponente serotoninskog sustava posteljice.....	14
1.3.2.1	Serotonin u posteljici	14
1.3.2.2	Sintetski enzimi serotonina u posteljici	15
1.3.2.3	Enzimi za razgradnju serotonina u posteljici	16
1.3.2.4	Transmembranski prijenosnici serotonina u posteljici	18
1.3.2.5	Receptori serotonina u posteljici.....	19
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3	MATERIJALI I METODE.....	23
3.1	Koncept istraživanja	24
3.2	Sudionici.....	25
3.3	Uzorci tkiva posteljice	26
3.4	Uzorci seruma iz majčine krvi.....	26
3.5	Stanična linija	26
3.6	Osnovne kemikalije, otopine i kompleti pribora i kemikalija	27

3.7	Tehnička oprema i pribor	32
3.8	Programski paketi.....	33
3.9	Izdvajanje nukleinskih kiselina	34
3.10	Analiza ekspresije mRNA	35
3.10.1	Reverzna transkripcija.....	35
3.10.2	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	36
3.11	Određivanje razine proteina SERT u tkivu posteljice	37
3.12	Određivanje aktivnosti enzima MAOA u tkivu posteljice	38
3.13	Određivanje koncentracije lipida u uzorcima krvi sudionica.....	39
3.14	Genotipizacija.....	39
3.14.1	<i>SERT</i>	39
3.14.2	<i>MAOA</i>	42
3.14.3	<i>HTR2A</i>	43
3.15	Analiza metilacije molekule DNA	43
3.15.1	Tretiranje genomske DNA bisulfitom.....	46
3.15.2	Umnažanje ciljnih odsječaka DNA izložene bisulfitu	46
3.15.3	Pirosekvenciranje i obrada rezultata	47
3.16	Eksperimenti na kulturi stanica	48
3.16.1	Uzgoj stanica.....	48
3.16.2	Tretman stanica glukozom i inzulinom.....	48
3.17	Statistička obrada podataka	50
4	REZULTATI.....	52
4.1	Podaci o sudionicima u istraživanju	53
4.2	Povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninskog sustava posteljice.....	54
4.2.1	Razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici u različitim metaboličkim skupinama	55

4.2.2	Povezanost pITM-a i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici	.57
4.2.3	Povezanost koncentracija lipida u krvi i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici57
4.2.4	Razina proteina SERT u posteljici59
4.2.5	Enzimaska aktivnost MAOA u posteljici61
4.3	Povezanost polimorfizama i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici	..63
4.3.1	Polimorfizmi gena <i>SERT</i>63
4.3.2	Polimorfizam gena <i>MAOA</i>67
4.3.3	Polimorfizmi gena <i>HTR2A</i>69
4.4	Povezanost metilacije i razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici71
4.4.1	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>SERT</i>71
4.4.2	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>MAOA</i>74
4.4.3	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>HTR2A</i>77
4.5	Povezanost razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici i antropometrijskih karakteristika novorođenčeta79
4.5.1	Bivarijatne analize79
4.5.2	Multipla linearna regresijska analiza79
4.6	Istraživanja <i>in vitro</i> učinaka metaboličkih abnormalnosti na serotoniniski sustav posteljice80
4.6.1	Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri razini kisika od 21 %80
4.6.2	Učinci glukoze na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%82
4.6.3	Učinci inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%85
5	RASPRAVA87
5.1	Istraživanje na skupini trudnica i novorođenčadi88

5.1.1	Serotoninski prijenosnik – SERT.....	89
5.1.2	Monoaminoksidaza A – MAOA.....	95
5.1.3	Receptor serotonina tipa 2A – HTR2A.....	98
5.1.4	Ostali regulatorni geni serotonina u posteljici – <i>OCT3</i> , <i>TPHI</i> i <i>MAOB</i>	100
5.2	Istraživanje na kulturi stanica.....	102
5.2.1	Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri atmosferskoj razini kisika.....	103
5.2.2	Učinci glukoze i inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5 % i 2,5 %.....	103
5.3	Prednosti, ograničenja i buduća istraživanja.....	107
5.4	Doprinosi istraživanja.....	109
6	ZAKLJUČAK.....	111
7	POPIS LITERATURE.....	113
8	SAŽETAK.....	133
9	SUMMARY.....	135
	Popis kratica.....	137
	Životopis.....	139

1 UVOD

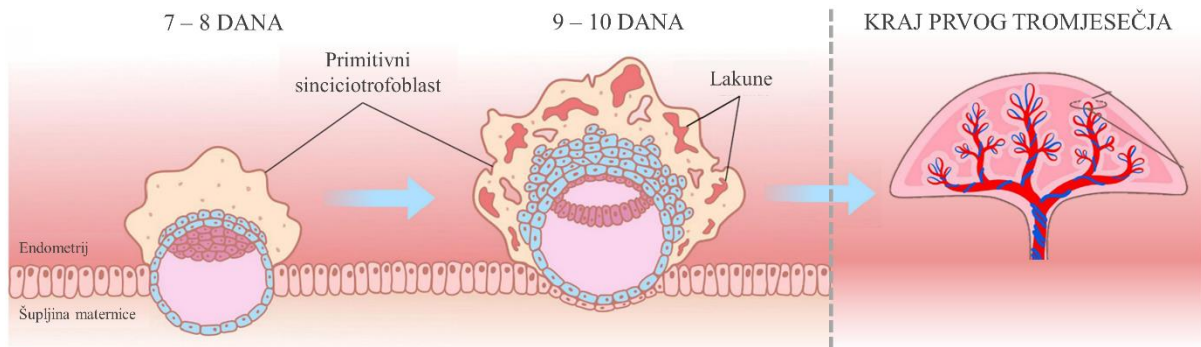
1.1 Posteljica čovjeka

Posteljica (placenta, od lat. *placenta*) je privremeni fetalni organ neophodan za održavanje trudnoće i normalan razvoj embrija/fetusa u svih placentalnih organizama. Razvoj posteljice započinje ubrzo nakon začeća, karakterističan oblik nalik jastuku uspostavlja se krajem prvog tromjesečja trudnoće, a rast se nastavlja sve do kraja trudnoće, kako bi se pratile potrebe rastućeg fetusa. Važnost posteljice prepoznata je još u davnoj prošlosti te su se i do danas zadržali ritualni običaji i obredi posvećeni ovom ogranu kojeg imamo vrlo kratko, a omogućava nam život (Buckley, 2006). Međutim, fiziologija posteljice u zdravlju i bolesti još uvijek se ne razumije dovoljno i predmet je brojnih znanstvenih istraživanja.

1.1.1 Razvoj

Razvoj posteljice čovjeka (**Slika 1.1.**) započinje približno sedmog dana nakon začeća kada se blastocista implantira u stijenku maternice (Turco i Moffett, 2019). Posteljica se razvija iz trofoektoderma i izvanembrionalnog mezoderma blastociste, što je čini organom genetički istovjetnom fetusu. Iz trofoektoderma blastociste diferenciraju se citotrofoblasti. Dijeljenjem citotrofoblasta, na vanjskim dijelovima strukture dolazi do njihovog spajanja u višejezgreni sinciotrofoblast. Već oko devetog dana nakon začeća, unutar rastućeg sinciotrofoblasta, dolazi do stvaranja praznina (lakuna) u koje se ispušta sadržaj žlijezda endometrija majke. One sadrže nutrijente i mitogene čimbenike rasta koji potiču daljnji razvoj posteljice (Burton i sur., 2002; Hempstock i sur., 2004). Istovremeno, citotrofoblasti nastavljaju urastati u stijenku maternice, stvaraju se izbočine unutar kojih se iz izvanembrionalnog mezoderma razvija stromalna srž posteljice. Pri tom se endometrij maternice pretvara u specijalizirano tkivo koje se naziva decidua (Cindrova-Davies i Sferruzzi-Perri, 2022). Iz stromalne srži, približno 18. dana nakon začeća, razvijaju se fetalne krvne žile te fibroblasti i makrofazi, koji zajedno s površinskim slojem citotrofoblasta i sinciotrofoblasta, naposljetku stvaraju korionske resice (Burton i Fowden, 2015; Turco i Moffett, 2019). Na mjestima gdje se korionske resice sjedinjuju s majčinom deciduom (sidrišne resice), ekstravilozni citotrofoblasti koloniziraju unutarnje slojeve miometrija te remodeliraju majčine spiralne arterije na način da privremeno i djelomično zamjenjuju endotelne stanice koje oblažu arterije (Bulmer i sur., 2020; Burton i Fowden, 2015). Od invazije majčinih arterija pa do kraja prvog tromjesečja, ekstravilozni trofoblasti stvaraju endovaskularni čep na ulazu majčinih spiralnih arterija u intervillozne prostore, čime sprječavaju prolazak majčine krvi. Na kraju prvog tromjesečja trudnoće,

remodeliranje majčinih spiralnih arterija preobražava ih u krvne žile visoke protočnosti, rezistentne na vazokonstrikciju, što omogućava uspostavu protoka velikog volumena potpuno oksigenirane majčine krvi pod niskim tlakom kroz intervilozne prostore (Jaremek i sur., 2021; Turco i Moffett, 2019). Tada način prehrane fetusa prelazi s histiotrofičnog (putem sadržaja žlijezda endometrija) na hemotrofični (putem krvi).



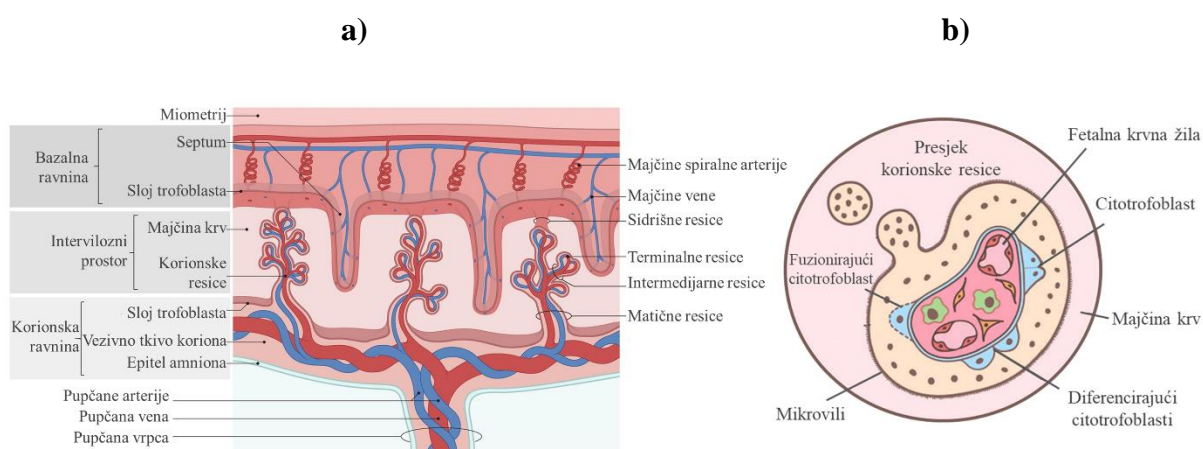
Slika 1.1 Razvoj posteljice čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz (Jaremek i sur., 2021)

Tijekom razdoblja uspostave majčine cirkulacije, posteljica je fiziološki izložena progresivnom povećanju razine kisika, od vrlo niske (2-3% O₂) do normoksične (oko 6-10% O₂) (Rodesch i sur., 1992). Niska razina kisika u prvom tromjesečju osigurava fetusu okruženje sigurno od teratogenih učinaka reaktivnih kisikovih vrsta, pomaže održavanju stanja pluripotentnosti embrionalnih matičnih stanica te potiče razvoj korionskih resica (Cindrova-Davies i Sferruzzi-Perri, 2022). Promjena u razini kisika te uspostava krvotoka u interviloznom prostoru povezani su s povećanim oksidacijskim stresom i smičnim naprezanjem te induciraju stanične signale ključne za regulaciju angiogeneze te proliferacije, migracije i spajanja citotrofoblasta (Genbacev i sur., 1996; Jauniaux i sur., 2000).

Krajem prvog tromjesečja, posteljična barijera sastoji se od endotelnih stanica fetalnih kapilara, mezenhimalne jezgre (Hofbauerove stanice, fibroblasti i kolagena stroma) i stanica citotrofoblasta prekrivenih kontinuiranim slojem sinciotrofoblasta (Jones i Fox, 1991). Kako trudnoća napreduje, broj citotrofoblasta se smanjuje, a sloj sinciotrofoblasta i mezenhimalna jezgra se stanjuju. Zbog toga fetalna i majčina krv dolaze u bliski kontakt preko vaskulo-sincicijalne membrane - izrazito tanke barijere koju čine isključivo endotel kapilara fetusa i sloj sinciotrofoblasta (<2 μm) (Burton i Tham, 1992; Jones i Fox, 1991).

1.1.2 Građa

Posteljica je organ u obliku diska. Pri kraju trudnoće, prosječnog je promjera 22 cm, debljine 2,5 cm pri sredini te mase od približno 500 g. Dijeli se na tri osnovna dijela: bazalna ravnina, intervilozni prostor s korionskim resicama te korionska ravnina (**Slika 1.2.**). Bazalna ravnina prislonjena je na majčin endometrij gdje kroz majčine spiralne arterije krv dolazi u intervilozne prostore koje napušta kroz otvore majčinih uterinih vena (Burton i Fowden, 2015). Korionska ravnina je orijentirana prema fetusu te se iz nje pruža pupčana vrpca. Osnovna funkcionalna jedinica posteljice je korionska resica (Kaufmann i sur., 1979). Korionske resice se prema stupnju grananja dijele na matične (engl. *stem villi*), intermedijarne (engl. *intermediate villi*) i terminalne (engl. *terminal villi*) resice (**Slika 1.2.a**). Resice koje su pričvršćene u bazalnu ravninu nazivaju se sidrišne resice (engl. *anchoring villi*) (Đelmiš, 2019). U zreloj (terminskoj) posteljici, terminalne resice su izrazito vaskularizirane fetalnim kapilarama, što ih čini najznačajnijim posrednicima za razmjenu tvari između majčinog i fetalnog krvotoka. U presjeku, korionsku resicu čine sloj sinciciotrofoblasta i citotorofoblasta, mezenhimalna jezgra i fetalne kapilare (**Slika 1.2.b**).



Slika 1.2. Građa posteljice. **a)** Osnovni dijelovi posteljice: bazalna ravnina, intervilozni prostor s korionskim resicama i korionska ravnina (“Amboss,” 2022). **b)** Presjek korionske resice. (Jaremek i sur., 2021).

1.1.3 Funkcije

Posteljica posjeduje višestruke funkcije koje nakon rođenja preuzimaju pluća, bubrezi, jetra, crijeva, endokrine žlijezde i ostali organi. Najpoznatija funkcija posteljice je posredovanje u razmjeni plinova, hranjivih tvari i otpadnih produkata fetalnog metabolizma

između majčinog i fetalnog krvotoka (Mossman, 1937). Specifično, prijenos preko posteljice uključuje dopremanje kisika, vode, glukoze, aminokiselina, proteina, masnih kiselina, iona, vitamina, hormona i čimbenika rasta fetusu te iznošenje ugljičnog dioksida i otpadnih produkata fetalnog metabolizma. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima pojedine molekule, prijenos tvari preko posteljice može se odvijati difuzijom, prijenosom posredovanim prijenosnicima ili endocitozom/egzocitozom (Burton i Fowden, 2015).

Osim o koncentracijskom gradijentu pojedine tvari između majčine i fetalne cirkulacije, stopa prijenosa tvari preko posteljice ovisi o protoku krvi kroz posteljicu, samoj strukturi posteljične barijere te o ekspresiji/aktivnosti specifičnih prijenosnika (Jones i sur., 2007). Aktivnost/ekspresija specifičnih prijenosnika nutrijenata mijenja se kroz trudnoću (Cindrova-Davies i Sferruzzi-Perri, 2022), a općenito ovisi o majčinom hormonalnom statusu, energetsom statusu unutar trofoblasta, oksigenaciji posteljice i koncentraciji nutrijenata (Jones i sur., 2007).

Posteljica je i vrlo važan endokrini organ koji sintetizira brojne hormone, čimbenike rasta i citokine, neophodne za prilagodbu majčinog organizma na trudnoću, porođaj i dojenje te za regulaciju razvoja embrija/fetusa i same posteljice. Glavno mjesto sinteze hormona posteljice koji se otpuštaju u majčin krvotok je sinciciotrofoblast (Costa, 2016). Posteljica izlučuje steroidne hormone (npr. progesteron, estradiol, estriol) i brojne peptidne hormone (npr. korionski gonadotropin (HCG, engl. *Human Chorionic Gonadotrophin*), laktogen posteljice (HPL, engl. *Human Placental Lactogen*), hormon rasta posteljice (HPGH, engl. *Human Placental Growth Hormone*), leptin, adiponektin, rezistin, visfatin, kisleptin i dr.). Pokazano je da signalne molekule koje sintetizira posteljica imaju važnu ulogu u regulaciji decidualizacije, angiogeneze endometrija i posteljice, receptivnosti endometrija i implantacije embrija (Costa, 2016). Nadalje, hormoni posteljice reguliraju prilagodbu majčinih metaboličkih, kardiovaskularnih, imunoloških i drugih fizioloških funkcija i ponašanja na trudnoću, porođaj i dojenje (Napso i sur., 2018). Konačno, posteljica sintetizira čimbenike rasta koji reguliraju razvoj embrija/fetusa, uključujući i neke neurotransmitere koji sudjeluju u regulaciji razvoja fetalnog mozga (Rosenfeld, 2021).

Pored izmjene tvari između majčinog i fetalnog krvotoka i endokrinih funkcija, posteljica je odgovorna i za zaštitu ploda od hormona i različitih ksenobiotika koji su prisutni u majčinom krvotoku. Zbog toga, sinciciotrofoblast eksprimira nekoliko enzima i transportera

koji sudjeluju u razgradnji i iznošenju hormona i ksenobiotika (Burton i Fowden, 2015). Posteljica također predstavlja barijeru koja štiti fetus od vertikalnog prijenosa patogena, pri čemu se pretpostavlja da važnu ulogu imaju Hofbauerove stanice, jedine stanice imunološkog sustava dosad pronađene u posteljici (Turco i Moffett, 2019).

1.2 Majčina debljina i gestacijski dijabetes melitus (GDM)

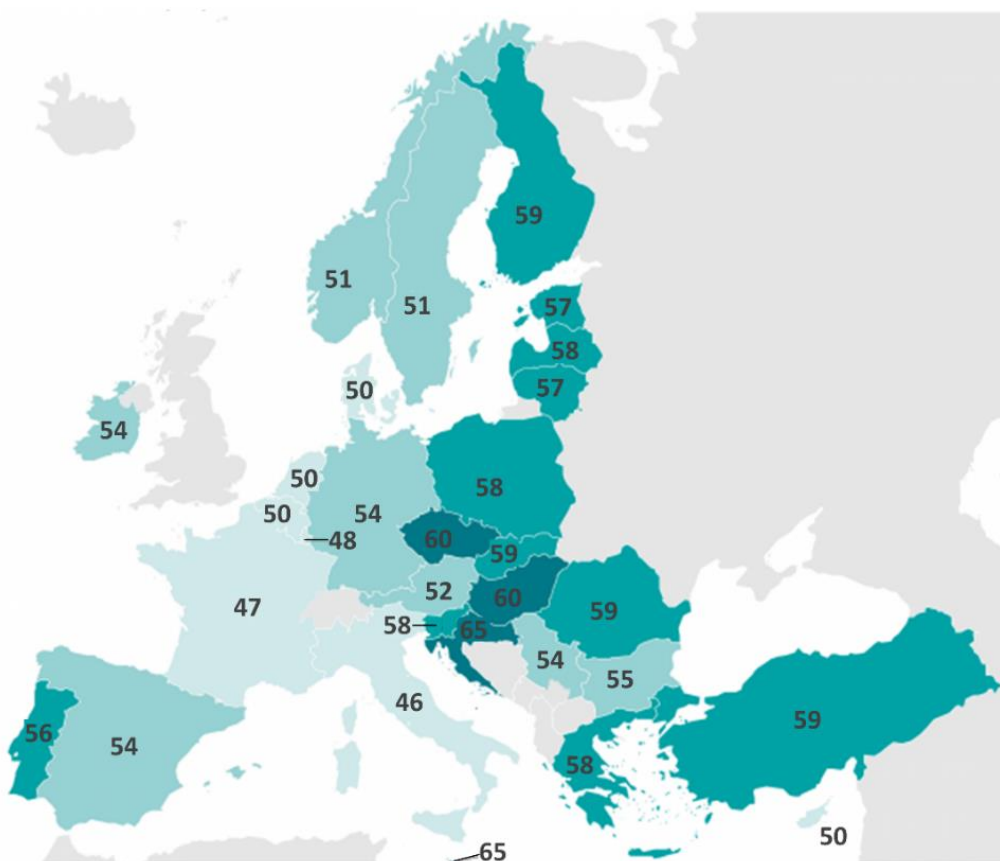
Trudnoća je razdoblje velikih fizioloških promjena u gotovo svim tjelesnim sustavima žene. Metaboličko stanje trudnice vrlo je važan čimbenik za normalan razvoj trudnoće. Stanja narušenog metaboličkog zdravlja poput prekomjerne tjelesne mase, pretilosti i gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM), danas se smatraju u najčešćim komplikacijama trudnoće.

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost su metabolički poremećaji karakterizirani povećanim nakupljanjem masnog tkiva. Ova stanja predstavljaju značajan rizik za razvoj različitih zdravstvenih problema poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pojedinih tipova raka te muskuloskeletalnih poremećaja (Di Cesare i sur., 2016). Mjera kojom se najčešće klasificiraju je indeks tjelesne mase (ITM), koji se izračunava kao omjer tjelesne mase (kg) i kvadrata tjelesne visine (m^2). Prekomjerna tjelesna masa definirana je ITM-om u rasponu od 25,0 do 29,9 kg/m^2 , a pretilost ITM-om jednakim ili većim od 30,0 kg/m^2 ("Eurostat - BMI statistics," 2019). Za potrebe jednostavnosti izražavanja, u nastavku će se prekomjerna tjelesna masa i pretilost zajedno navoditi pod izrazom „debljina“.

Povišeni ITM prije trudnoće (pITM) je najznačajniji čimbenik rizika za razvoj GDM-a. GDM je najčešći uzrok hiperglikemije u trudnoći, a definira se kao poremećaj tolerancije glukoze prvi put prepoznat tijekom trudnoće (Metzger i sur., 2010). Dijagnostički protokoli i kriteriji za prepoznavanje GDM-a se razlikuju među državama svijeta. Prema smjernicama Međunarodnog udruženja studijskih grupa za dijabetes u trudnoći (IADPSG, engl. *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*), koje je 2013. godine prihvatila Svjetska zdravstvena organizacija i koje su na snazi i u Hrvatskoj (Lovrenčić i sur., 2013), dijagnoza GDM-a se postavlja korištenjem oralnog testa tolerancije na glukozu (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) koji se provodi u drugom tromjesečju trudnoće. Dijagnoza se postavlja na temelju povišene vrijednosti koncentracije glukoze u krvi natašte te jedan i dva sata nakon oralne primjene glukoze (75 g) (Metzger i sur., 2010).

1.2.1 Prevalencija majčine debljine i GDM-a

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost su u kontinuiranom porastu u suvremenom svijetu. Između 1975. i 2014. godine prosječni ITM na globalnoj razini, standardiziran prema godinama starosti, porastao je s 21,7 kg/m² na 24,2 kg/m² među muškarcima te s 22,1 kg/m² na 24,4 kg/m² među ženama (Di Cesare i sur., 2016). U tom periodu, udio pretilih osoba, standardiziran prema godinama starosti, porastao je s 3,2% na 10,8% među muškarcima te s 6,4% na 14,9% među ženama. Prema posljednjim objavljenim podacima EUROSTAT-a iz 2019. godine, udio osoba starijih od 18 godina s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću u Hrvatskoj je bio 65%, najviši među zemljama Europske unije (**Slika 1.3.**) (“Eurostat - BMI statistics,” 2019).



Slika 1.3. Udio (%) odraslih osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću (ITM \geq 25) u zemljama Europske unije 2019. godine. Preuzeto i prilagođeno iz (“Eurostat - BMI statistics,” 2019).

Porast prevalencije debljine neminovno zahvaća i žene reproduktivne dobi (Chen i sur., 2018). Najnovije istraživanje je pokazalo da je u populaciji Hrvatske udio žena koje ulaze u

trudnoću s prekomjernom tjelesnom masom približno 30%, dok je među njima približno 9% pretilo (Štefulj i sur., 2023a; Vince i sur., 2021).

Učestalost GDM-a u svijetu varira između 1% i 30%, ovisno o etnicitetu, geografskom području, ali i dijagnostičkim kriterijima. Među stanovništvom Europe bilježi se prosječna učestalost GDM-a od 6,1% (1,8% - 31,0%) (McIntyre i sur., 2019). U Hrvatskoj je učestalost GDM-a prema podacima do 2014. godine varirala od 2,2% - 23,1% ovisno o dijagnostičkim kriterijima (Paulo i sur., 2021). Prema novijem istraživanju, u Republici Hrvatskoj se bilježi prevalencija GDM-a od 10,7% kada se za definiciju dijagnoze koriste smjernice IADPSG-a (Štefulj i sur., 2023b).

1.2.2 Patofiziologija i posljedice majčine debljine i GDM-a

Debljina je multifaktorijski metabolički poremećaj i smatra se da se razvija kao rezultat interakcije rizičnih socioekonomskih, kulturoloških, bihevioralnih i genetičkih čimbenika (Adults (US), 1998). GDM je također složeni metabolički poremećaj, čijem nastanku, osim debljine, doprinose brojni drugi čimbenici rizika poput starije dobi, etniciteta (ne-bjelačkog), obiteljske sklonosti dijabetesu tipa 2 te prethodne dijagnoze GDM-a, višeg pariteta, pušenja u trudnoći, određenih genetičkih čimbenika te prehrambenih navika (McIntyre i sur., 2019).

Majčina debljina popraćena je metaboličkim promjenama među kojima se ističe povišena rezistencija na inzulin te hiperinzulinemija (Bandres-Meriz i sur., 2020). Osim toga, majčina debljina povezana je s povišenim razinama slobodnih masnih kiselina u serumu, povišenim izlučivanjem adipokina, poput leptina te nakupljanjem masnih naslaga u ne-adipoznim tkivima (Jin i sur., 2023). Pojačano nakupljanje masnih naslaga u različitim tkivima povezano je s povišenim biljezima oksidacijskog stresa na razini cijelog organizma (Furukawa i sur., 2004). Majčina debljina povezana je i s imunološkim promjenama poput kronične blage upale na razini cijelog organizma i pojačanog izlučivanja pro-upalnih citokina (Jin i sur., 2023; Pantham i sur., 2015).

Molekularna podloga razvoja GDM-a je povišena rezistencija na inzulin te neadekvatna funkcija β -stanica gušterače. Naime, tijekom trudnoće, bazalna endogena proizvodnja glukoze povećava se za 30%, a periferna osjetljivost na inzulin povećava se za približno 50%, kako bi se zadovoljili rastući energetske zahtjevi potaknuti trudnoćom. Organizam tada odgovara dva

do tri puta većim izlučivanjem inzulina kako bi se održala normalna razina glukoze u krvi (euglikemija) (McIntyre i sur., 2019). Međutim, kada je funkcija β -stanica poremećena, odgovor stanica na inzulin postaje neadekvatan što rezultira hiperglikemijom, odnosno GDM-om. Vjeruje se da u mnogim slučajevima poremećena funkcija β -stanica postoji i prije trudnoće, ali se klinički očituje tek povećanjem rezistencije na inzulin koja nastaje u trudnoći (McIntyre i sur., 2019).

Majčina debljina i GDM povezani su s nizom kratkotrajnih i dugotrajnih posljedica kako za majku, tako i za dijete. Već i prije trudnoće, debljina utječe na oocyte putem promijenjene hormonalne ravnoteže osi hipotalamus-hipofiza-jajnici, a potencijalno i na endometriju maternice, što zajedno rezultira smanjenjem plodnosti te povećanim rizikom od spontanih pobačaja i preuranjenog poroda (Catalano i Shankar, 2017). Povećanjem ITM-a povećava se i rizik za perinatalnu, neonatalnu ili dojenačku smrt djeteta (Catalano i Shankar, 2017). Nadalje, debljina u trudnoći povezana je i s povećanim rizikom od nastanka kongenitalnih anomalija poput rascijepa kralježnice (lat. *spina bifida*), kardiovaskularnih anomalija i rascijepa usne i nepca (Catalano i Shankar, 2017). Povećana dostupnost hranjivih tvari, poput glukoze i lipida, u krvi majki s prekomjernom tjelesnom masom pridonosi također fetalnoj i neonatalnoj adipoznosti (Catalano i Shankar, 2017). Brojnim istraživanjima je utvrđeno da majčina debljina u trudnoći ima i dugoročne posljedice na potomstvo u vidu povećanog rizika od debljine i metaboličkih poremećaja (Boney i sur., 2005; Catalano, 2010) te neurorazvojnih i drugih mentalnih poremećaja (Tong i Kalish, 2021; Wang i sur., 2016) u djetinjstvu i odrasloj dobi.

Kao što je spomenuto, debljina je čimbenik rizika za razvoj GDM-a, koji donosi dodatne kratkoročne i dugoročne rizike za zdravlje majke i djeteta. Žene s GDM-om imaju veći rizik od razvoja povišenog tlaka u trudnoći, a čak 50 – 60% razvije dijabetes tipa 2 tijekom 10 godina nakon dijagnoze GDM-a (Catalano, 2010).

Istraživanja na animalnim modelima upućuju na to da izloženost dijabetesu *in utero* remeti razvoj i funkciju hipotalamusa, stvarajući sklonost za pretilost u potomaka (Chu i Godfrey, 2020). Sukladno tome, novorođenčad majki s GDM-om često su prevelika za gestacijsku dob ili makrosomna što kratkoročno dovodi do komplikacija pri porodu. Nakon poroda, novorođenčad ima povećani rizik od hipoglikemije (zbog hiperinzulinemije kojoj su bili izloženi *in utero*) te hipokalcemije, hiperbilirubinemije i respiratornog stresa (Catalano,

2010). Dugoročno, djeca majki s dijagnosticiranim GDM-om imaju povećan rizik od debljine i povezanih metaboličkih poremećaja kao što su intolerancija glukoze i dijabetes (Andersson-Hall i sur., 2019; Catalano, 2010). Osim toga, prenatalna izloženost GDM-u potencijalno povećava rizik za razvoj imunoloških poremećaja, poput astme, alergija i atopijskog dermatitisa te neurorazvojnih poremećaja poput poremećaja fine kontrole pokreta, poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) te poremećaja iz spektra autizma (Chu i Godfrey, 2020). Smatra se da, pored genetičke podloge te sličnosti u okolini i životnom stilu majke i djeteta, epigenetičke promjene imaju ključnu ulogu u mehanizmima u podlozi posljedica majčine debljine i GDM-a na potomstvo (Catalano i Shankar, 2017; Godfrey i sur., 2015).

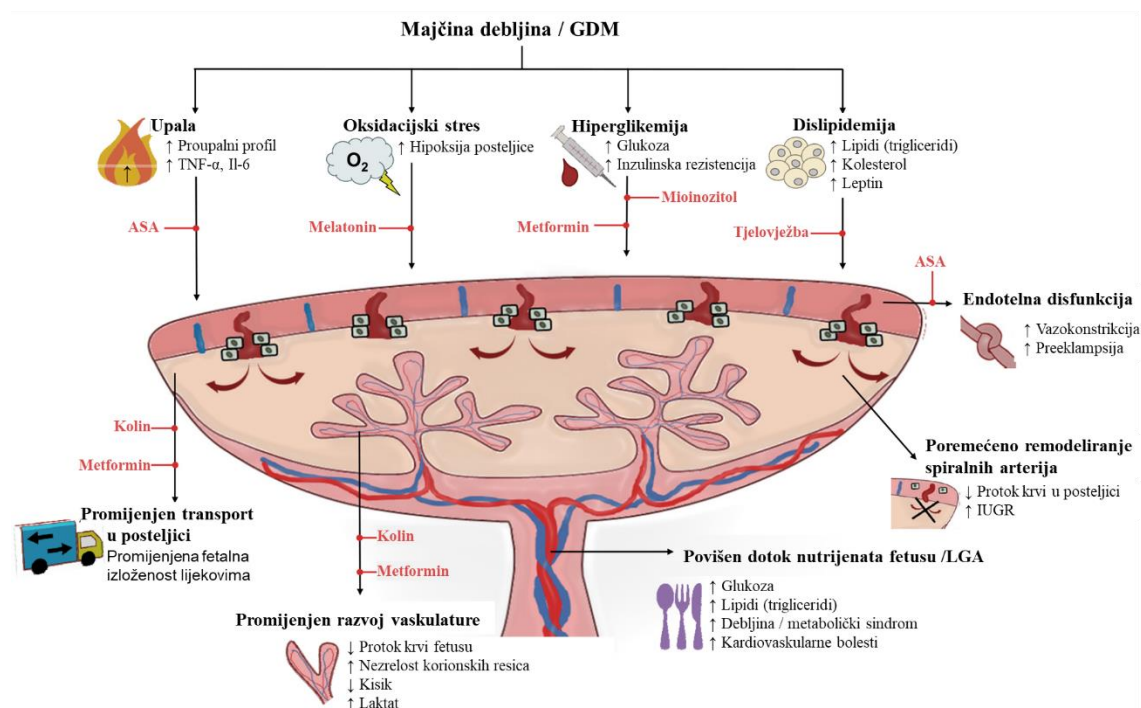
1.2.3 Posteljica u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om

U trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om, posteljica je izložena metaboličkim i endokrinim abnormalnostima (Bedell i sur., 2021). Čimbenici iz majčine cirkulacije kumulativno djeluju na veći broj staničnih i molekularnih procesa u posteljici te uzrokuju spektar promjena u njezinoj morfologiji i funkciji (**Slika 1.4**) (Bedell i sur., 2021).

Zbog epidemiološke povezanosti majčine debljine i GDM-a, te brojnih patofizioloških sličnosti, teško je razlikovati promjene u posteljici koje su povezane specifično s majčinom debljinom odnosno GDM-om (Catalano, 2010; Hoch i sur., 2019; McIntyre i sur., 2019). Posteljica je najosjetljivija na promjene i poremećaje u svojoj okolini u fazi ubrzanog rasta, tj. na samom početku trudnoće (Desoye, 2018). Istraživanja upućuju da su hiperglikemija i hiperinzulinemija neovisno povezane s promjenama u razvoju posteljice tijekom rane trudnoće. Specifično, hiperglikemija je povezana sa smanjenom proliferacijom trofoblasta *in vitro* (Fröhlich i sur., 2012; Weiss i sur., 2001), dok je hiperinzulinemija povezana s povećanim rastom posteljice (O'Tierney-Ginn i sur., 2015).

Majčina debljina i GDM povezuju se s promjenama sinteze nekoliko čimbenika rasta u posteljici, koji reguliraju angiogenezu krvnih žila maternice i posteljice (Bedell i sur., 2021). Posljedično dolazi do promjena u vaskulaturi posteljice – konkretno, do slabijeg grananja terminalnih korionskih resica i povećanog broja kapilara u pojedinoj resici (Bedell i sur., 2021), smanjenog broja i zadebljanja vaskulo-sincicijalnih membrana, pojave područja mikroinfarkta u korionskim resicama, ugrušaka u interviloznom prostoru te ugrušaka, upalnih i morfoloških

abnormalnosti krvnih žila maternice (Fowden i sur., 2021). Sve spomenute promjene mijenjaju efikasnost prijenosa hranjivih tvari i ostalih čimbenika preko posteljice. Isto tako, majčina debljina i GDM povezuju se s poremećenom endokrinom funkcijom posteljice, konkretno, smanjenim lučenjem hormona rasta posteljice (Bedell i sur., 2021).



Slika 1.4. Učinci majčine debljine i gestacijskog dijabetesa na posteljicu. GDM – gestacijski dijabetes melitus, ASA – acetilsalicilna kiselina, IUGR – intrauterini zastoj rasta (engl. *Intrauterine Growth Restriction*), LGA – novorođenče preveliko za gestacijsku dob (engl. *Large for Gestational Age*). Preuzeto i prilagođeno iz (Bedell i sur., 2021)

Majčina debljina i GDM povezuju se i s promjenama u ekspresiji raznih prijenosnika u posteljici, uključujući nekoliko prijenosnika masnih kiselina, glukoze, aminokiselina, vitamina/kofaktora te lijekova/ksenobiotika (Bedell i sur., 2021; Fowden i sur., 2021). Promjene ekspresije ovih prijenosnika moduliraju dostupnost hranjivih tvari fetusu te izloženost štetnim tvarima same posteljice i fetusa.

Nadalje, istraživanja na animalnim modelima upućuju da su i GDM (Li i sur., 2013) i debljina (Fernandez-Twinn i sur., 2017) povezani s hipoksijom u posteljici na kraju trudnoće, što može negativno utjecati na razvoj i funkciju posteljice, dodatno pridonoseći nepovoljnim ishodima trudnoće (Fröhlich i sur., 2012; Li i sur., 2013).

Posteljica ima sposobnost prilagodbe promjenama u majčinom okruženju, posebno kao odgovor na promijenjeni majčin metabolizam, kako bi se embrij/fetus u razvoju zaštitio od potencijalnih štetnih posljedica (Desoye i Wells, 2021). Primjerice, povećanjem mase posteljice, povećava se i površina za izmjenu hranjivih tvari, no smanjuje se učinkovitost posteljice (tj. omjer porođajne mase novorođenčeta i mase posteljice kao indikator učinkovitosti posteljice (Wilson i Ford, 2001)), za što je pretpostavljeno da je adaptivni mehanizam posteljice u svrhu regulacije rasta fetusa (Bedell i sur., 2021). Međutim, ako utjecaji iz okoline nadilaze sposobnost prilagodbe posteljice, izmijenjeno majčino okruženje može dovesti do nepovoljnih ishoda za rast i razvoj fetusa, kao i za dugoročno zdravlje djeteta. Predloženo je da posteljica ima ulogu u posredovanju učinaka majčine debljine na udio masnog tkiva u fetusa. Naime, u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom dolazi do pojačanog lučenja inzulina u ranoj trudnoći zbog povećane rezistencije na inzulin, što povećava rani rast posteljice (O'Tierney-Ginn i sur., 2015) i utječe na ekspresiju velikog broja gena u posteljici, između ostalih i gena uključenih u regulaciju funkcije mitohondrija i metabolizma (Lassance i sur., 2015). To nadalje rezultira otpuštanjem različitih čimbenika iz posteljice, na primjer citokina i laktogena, koji dodatno smanjuju osjetljivost na inzulin u tkivima majke. Kao posljedica, povećava se dostupnost hranjivih tvari za rast posteljice i fetusa (Catalano i Shankar, 2017).

1.3 Serotoninski sustav posteljice

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je biogeni monoamin najpoznatiji po svojoj ulozi neurotransmitera u mozgu, no također ima važnu ulogu hormona i autokrinog/parakrinog glasnika u raznim drugim organima (Berger i sur., 2009). Serotonin je prvi put izdvojen 1937. godine, iz enterokromafinih stanica crijeva, zbog čega je izvorno nazvan enteramin te je prepoznata njegova funkcija induciranja intestinalnih kontrakcija (Vialli i Erspamer, 1937). Kasnije je je ista tvar identificirana u serumu kao "modifikator tonusa" i stoga je nazvana serotonin (Rapport i sur., 1948).

Mnoge uloge serotonina evolucijski su očuvane u raznim životinjskim i biljnim vrstama (Azmitia, 2010). U kralježnjaka, serotonin modulira moždane funkcije kao što su raspoloženje, emocije, kognicija, ritam spavanja/buđenja, apetit, seksualno ponašanje, percepcija boli i odgovor na stres (Jacobs i Azmitia, 1992). Osim toga, regulira i fino podešava brojne druge fiziološke procese, uključujući hemostazu i vaskularni tonus, gastrointestinalne funkcije,

imunološki odgovor, reproduktivne funkcije, remodeliranje kostiju i energetska ravnotežu (Berger i sur., 2009; Lv i Liu, 2017; Whitaker-Azmitia i sur., 1996; Yabut i sur., 2020). Serotonin sudjeluje u regulaciji razvoja i regeneracije organa modulacijom osnovnih staničnih procesa kao što su proliferacija, apoptoza, diferencijacija i migracija stanica (Papadimas i sur., 2012; Whitaker-Azmitia i sur., 1996). Tijekom embrionalnog/fetalnog razvoja, serotonin djeluje kao čimbenik rasta i regulira različite razvojne procese, uključujući i razvoj živčanog sustava.

Serotoninski sustav obuhvaća različite regulatorne gene/proteine, kao što su enzimi potrebni za sintezu i razgradnju serotonina, njegovi transmembranski prijenosnici te receptori za serotonin. Njihovim složenim međudjelovanjem održava se homeostaza ovog monoamina i osigurava nesmetano odvijanje signalizacije posredovane serotoninom. Serotoninski sustav je najbolje istražen u mozgu, gdje su zastupljene sve vrste proteina uključene u regulaciju signalizacije putem serotonina. Na periferiji, serotoninski sustav se tradicionalno smatrao prisutnim u probavnom traktu i trombocitima (Spohn i Mawe, 2017). Međutim, novijim istraživanjima pokazano je da je postojanje serotoninskog sustava i u različitim drugim perifernim organima, uključujući i posteljicu (Berger i sur., 2009; Perić i sur., 2022).

1.3.1 Funkcije serotoninskog sustava posteljice

Dokazi dobiveni u kliničkim studijama, studijama na modelima posteljice *in vitro* te studijama na animalnim modelima zajednički pokazuju da serotoninski sustav posteljice regulira razvoj i različite funkcije posteljice te igra važnu ulogu u regulaciji embrionalnog i fetalnog razvoja (Perić i sur., 2022).

Specifično, studije na animalnim modelima (Hadden i sur., 2017) i modelima posteljice čovjeka *in vitro* (Oufkir i sur., 2010; Oufkir i Vaillancourt, 2011; Sonier i sur., 2005) pokazale su da serotoninski sustav posteljice sudjeluje u molekularnim mehanizmima koji reguliraju stanične procese uključene u razvoj posteljice, kao što su proliferacija, diferencijacija i preživljavanje trofoblasta. Eksperimentalna manipulacija homeostazom serotoninskog sustava rezultira značajnim strukturnim promjenama posteljice (Hadden i sur., 2017). Nadalje, istraživanja na eksplantatima pupčanih i posteljičnih krvnih žila čovjeka pokazala su da je serotoninski sustav posteljice uključen u mehanizme koji reguliraju umbilikalno-posteljični protok krvi (Bertrand i St-Louis, 1999; Reviriego i sur., 1990; Ugun-Klusek i sur., 2011), dok

su istraživanja na primarnim trofoblastima i staničnim linijama trofoblasta uputila na njegovu uključenost u regulaciju endokrinih funkcija posteljice, specifično, u regulaciju sinteze estrogena u posteljici (Hudon Thibeault i sur., 2017; Klempan i sur., 2011; Thibeault i sur., 2019). Novija istraživanja na animalnim modelima upućuju na važnu ulogu serotoninskog sustava posteljice u regulaciji prijenosa hranjivih tvari kroz posteljicu (Mao i sur., 2021).

Serotoninski sustav posteljice ima važnu ulogu i u snabdijevanju embrija/fetusa serotoninom potrebnim za regulaciju ranih razvojnih procesa, osobito u kontekstu neurorazvoja i sazrijevanja serotonergičkih neurona (Chan i sur., 2024; Rosenfeld, 2020). Receptori za serotonin pojavljuju se u ranom fetalnom mozgu prije nego što se pojave sintetski enzimi serotonina, što upućuje na izvanembrionalni izvor serotonina u periodu dok se ne organiziraju serotonergički neuroni u jezgrama rafe i započne sinteza serotonina *in situ* (Bonnin i sur., 2011; Takahashi i sur., 1986), što se u čovjeka događa krajem prvog/početakom drugog tromjesečja trudnoće. Eksperimentalna istraživanja na animalnim modelima pokazuju da serotoninski sustav posteljice opskrbljuje embrij/fetus serotoninom koji dolazi iz krvotoka majke (Côté i sur., 2007) i/ili se sintetizira u samoj posteljici (Bonnin i sur., 2011). Konačno, epidemiološka istraživanja na ljudima pokazuju povezanost između promijenjene razine serotonina u majčinoj krvi tijekom trudnoće i povećanog rizika za pojavu neurorazvojnih poremećaja potomstva, poput ADHD-a (Halmøy i sur., 2010) i autizma (Leboyer i sur., 1999). Sve navedeno upućuje na važnu ulogu serotoninskog sustava posteljice u regulaciji embrionalnog/fetalnog (neuro)razvoja.

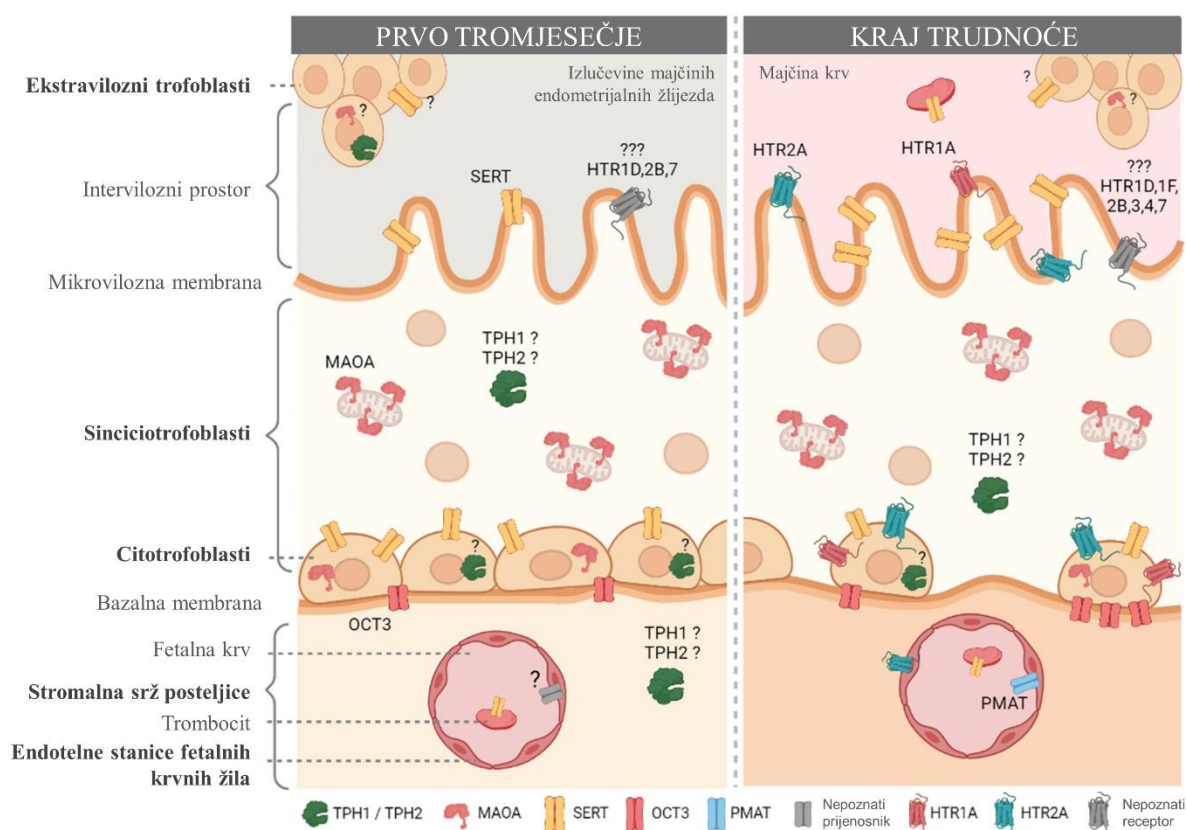
1.3.2 Komponente serotoninskog sustava posteljice

Posteljica eksprimira veći broj gena koji sudjeluju u regulaciji serotoninske homeostaze. Njihova ekspresija razlikuje se u raznim fazama trudnoće i specifična je za različite tipove stanica posteljice (**Slika 1.5.**). Pojedini dijelovi tog dinamičnog procesa još uvijek nisu nerazjašnjeni (Perić i sur., 2022).

1.3.2.1 Serotonin u posteljici

Dokazi o prisutnosti i unutarstaničnom smještaju molekule serotonina u posteljici čovjeka nisu usuglašeni. Prvo istraživanje lokalizacije serotonina u terminskoj posteljici čovjeka metodom imunohistokemije pokazalo je da je serotonin prisutan u sinciotrofoblastu,

stromalnim stanicama i endotelu fetalnih krvnih žila (Huang i sur., 1998). U novijem istraživanju posteljice čovjeka istom metodom, uočeni su tek tragovi serotonina, i to samo u prvom i drugom tromjesečju (Kliman i sur., 2018). Međutim, u prisutnosti egzogeno dodanog serotonina te nakon farmakološke blokade katabolizma serotonina u eksplantatima posteljice, dokazana je prisutnost serotonina u različitim staničnim odjeljcima citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta (Kliman i sur., 2018), što upućuje na prisutnost serotonina u posteljici, u kojoj su njegove razine strogo kontrolirane brzom enzimskom razgradnjom.



Slika 1.5. Serotoninski sustav u posteljici čovjeka ovisno o gestacijskoj dobi. Na slici je prikazana prisutnost i lokalizacija pojedinih komponenti serotoninskog sustava u posteljici u prvom tromjesečju i na kraju trudnoće prema dostupnoj literaturi. Komponente za koje se rezultati različitih studija ne slažu ili koje su prikazane samo na razini mRNA označene su upitnikom (?). Vrste stanica koje do danas nisu proučavane, kao što su mastociti, Hofbauerove stanice i druge stromalne stanice nisu prikazane. (Preuzeto i prilagođeno iz (Perić i sur., 2022).

1.3.2.2 Sintetski enzimi serotonina u posteljici

Biosinteza serotonina započinje iz esencijalne aminokiseline L-triptofan (L-trp) te uključuje dva enzimska koraka. Prvi korak, koji ograničava brzinu čitavog puta sinteze (engl.

rate-limiting step), je pretvorba L-trp u 5-hidroksitriptofan (5-HTP), a katalizira ga enzim triptofan hidroksilaza (TPH). Sljedeći korak, dekarboksilaciju 5-hidroksitriptofana u serotonin, katalizira dekarboksilaza aromatskih aminokiselina. Postoje dvije izoforme enzima TPH, TPH1 i TPH2, koje su kodirane genima koji se nalaze na kromosomima 11, odnosno 12 u čovjeka. Dvije izoforme enzima TPH imaju različitu tkivnu ekspresiju – TPH1 (primarno periferna forma) je prisutna u enterokromafinim stanicama crijeva i u drugim perifernim tkivima, dok se TPH2 (primarno neuronalna forma) nalazi uglavnom u serotonergičkim neuronima mozga (Walther i sur., 2003).

Unatoč rezultatima prvog istraživanja kojim je pokazan nedostatak sinteze serotonina u posteljici miša (Yavarone i sur., 1993), daljnjim istraživanjima je pokazana sinteza serotonina u posteljici miša (Bonnin i sur., 2011) i čovjeka iz prvog tromjesečja, ali i u terminskoj posteljici (Bonnin i sur., 2011; Karahoda i sur., 2020a; Laurent i sur., 2017; Ranzil i sur., 2019). Rezultatima većeg broja istraživanja pokazano je da posteljica čovjeka eksprimira jedan ili oba sintetska enzima serotonina (Laurent i sur., 2017; Ranzil i sur., 2019), pri čemu je mRNA *TPH1* dominantna izoforma ekspimirana tijekom cijele trudnoće (Karahoda i sur., 2020a). Suprotno spomenutim istraživanjima, jedno istraživanje metodom imunohistokemije nije dokazalo protein TPH1 u posteljici čovjeka iz prvog i drugog tromjesečja trudnoće, dok su rijetki signali primijećeni u terminskim posteljicama (Kliman i sur., 2018). U skladu s ovim rezultatima, analizom transkriptoma pojedinačnih stanica (engl. *single-cell transcriptomics*) sekvenciranjem RNA (RNA-seq) nije detektirana mRNA *TPH1* u terminskoj posteljici, a mRNA *TPH2* je bila prisutna u vrlo niskim razinama (Pavličev i sur., 2017).

1.3.2.3 Enzimi za razgradnju serotonina u posteljici

Serotonin se katabolizira uglavnom do konačnog metabolita 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA), koji se može izlučiti putem bubrega. Prvi korak u ovom kataboličkom putu, oksidacijsku deaminaciju koja ograničava brzinu čitavog kataboličkog puta, katalizira enzim vanjske mitohondrijske membrane, monoaminoksidaza (MAO). Njegove dvije izoforme, MAOA i MAOB, kodirane su različitim genima na kratkom kraku kromosoma X čovjeka (Xp11.3) (Sivasubramaniam i sur., 2002). Obje izoforme kataliziraju oksidacijsku deaminaciju serotonina i raznih drugih endogenih i egzogenih monoamina (iz hrane), pri čemu MAOA ima najviši afinitet za serotonin u odnosu na druge supstrate (Ramsay i Albrecht, 2018).

Izoenzim MAOA prisutan je u posteljici čovjeka tijekom cijele trudnoće, što je dokazano studijama temeljenim na metodi imunohistokemije (Kliman i sur., 2018) i studijama temeljenim na određivanju aktivnosti enzima (Karahoda i sur., 2020a). Gen *MAOA* se u posteljici čovjeka eksprimira u sinciotrofoblastu (Auda i sur., 1998; Gujrati i sur., 1996; Kliman i sur., 2018; Sivasubramaniam i sur., 2002), citotrofoblastima (Auda i sur., 1998; Pavličev i sur., 2017; Suryawanshi i sur., 2018) i endotelnim stanicama fetalnih krvnih žila posteljice (Baković i sur., 2021). Prema studijama transkriptoma pojedinačnih stanica, sinciotrofoblast sadrži mnogo više razine mRNA *MAOA* u odnosu na citotrofoblaste (približno 10 puta više u prvom tromjesečju i približno dva puta više na kraju trudnoće) (Pavličev i sur., 2017; Suryawanshi i sur., 2018). mRNA *MAOB*, koja kodira izoformu s nižim afinitetom za serotonin, otkrivena je u vrlo niskim razinama u terminskoj posteljici (Karahoda i sur., 2020b; Pavličev i sur., 2017) dok u posteljici iz prvog tromjesečja nije pronađena (Suryawanshi i sur., 2018).

Ekspresija gena *MAOA* regulirana je polimorfizmom varijabilnog broja tandemskih ponavljanja koji se nalazi uzvodno od kodirajuće regije *MAOA* (*uVNTR*), a sastoji se od slijeda nukleotida duljine 30 pb prisutnog u 2, 3, 3,5, 4 ili 4,5 kopija (Sabol i sur., 1998). Dosadašnja istraživanja na staničnoj liniji trofoblasta, JAR (Sabol i sur., 1998) te na terminskoj posteljici čovjeka (Zhang i sur., 2010) upućuju na važnost polimorfizma *uVNTR* u regulaciji ekspresije gena *MAOA*.

Gen *MAOA* također sadrži dva područja obogaćena dinukleotidima CpG (CpG-otoci) (Shumay i Fowler, 2010), u kojima su citozini često metilirani. CpG-otoci su područja molekule DNA koja u svom slijedu sadrže više od 50% nukleotida C i G, dulji su od 200 parova baza (pb) te imaju omjer broja prisutnih CpG-dinukleotida u odnosu na očekivani (temeljen na broju gvanozina i citozina u danom segmentu) veći od 0,6 (Gardiner-Garden i Frommer, 1987). Povišena metilacija CpG-otoka u promotoru gena *MAOA* povezuje se sa sniženom razinom mRNA *MAOA* (Huang i sur., 2012) te sniženom enzimskom aktivnošću MAOA (Checknita i sur., 2015; Shumay i sur., 2012). Uloga metilacije gena *MAOA* u regulaciji njegove transkripcije u posteljici još nije istražena.

1.3.2.4 Transmembranski prijenosnici serotonina u posteljici

Unos izvanstaničnog serotonina u stanice posredovan je specijaliziranim transmembranskim prijenosnicima. Postoje dva sustava prijenosa serotonina posredstvom transmembranskih prijenosnika, koji imaju značajno različita kinetička svojstva: sustav visokog afiniteta/niskog kapaciteta (sustav unosa-1, engl. *uptake 1*) i sustav niskog afiniteta/visokog kapaciteta (sustav unosa-2, engl. *uptake 2*). Sustav unosa-1 sadrži samo jednog člana, serotoninski prijenosnik ili SERT (također poznat kao 5-HTT) (Ramamoorthy i sur., 1998), koji je vrlo selektivan za serotonin. Sustav unosa-2 uključuje prijenosnik monoamina plazmatske membrane (PMAT, engl. *Plasma Membrane Monoamine Transporter*) i prijenosnike organskih kationa (OCT, engl. *Organic Cation Transporter*) 1, 2 i 3, koji prenose serotonin i razne druge monoamine (Duan i Wang, 2010).

Posteljica čovjeka eksprimira nekoliko transmembranskih prijenosnika serotonina. Aktivnost transmembranskog prijenosnika SERT pokazana je u membranskim vezikulama (Balkovetz i sur., 1989; Karahoda i sur., 2020b) te u primarnim trofoblastima (Baković i sur., 2021) izdvojenima iz terminske posteljice čovjeka. mRNA *SERT* je imala višu razinu ekspresije na kraju trudnoće nego u prvom tromjesečju, dok je za razinu proteina SERT vrijedilo suprotno (Karahoda i sur., 2020a). Imunohistokemijskim obilježavanjem, prisutnost proteina SERT pronađena je i na sinciciotrofoblastu i na citotrofoblastima (Kliman i sur., 2018; Viau i sur., 2009), a analiza transkriptoma pojedinačne stanice pokazala je višu ekspresiju mRNA *SERT* u citotrofoblastima nego u sinciciotrofoblastu, kako u prvom tromjesečju (Suryawanshi i sur., 2018), tako i na kraju trudnoće (Pavličev i sur., 2017). Niske razine mRNA *SERT* te proteina SERT također su otkrivene u endotelnim stanicama fetalnih krvnih žila (Baković i sur., 2021; Kliman i sur., 2018; Viau i sur., 2009), ali funkcionalna analiza nije potvrdila značajnu aktivnost proteina SERT u tim stanicama (Baković i sur., 2021).

Gen *SERT* nalazi se na kromosomu 17 u čovjeka. U regulaciju ekspresije gena *SERT* uključena su dva različita polimorfizmima varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (VNTR) u promotoru (*5HTTLPR*) i intronu 2 (*Stin2*) te polimorfizmima pojedinačnih nukleotida (SNP) kao što je *rs25531* (Murphy i Moya, 2011). Uz genetičke varijante, epigenetički mehanizmi igraju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena *SERT*. Naime, promotor gena *SERT* sadrži CpG-otok čija pojačana metilacija korelira sa smanjenom ekspresijom gena *SERT* (Philibert i sur., 2007).

Osim SERT-a, u posteljici je obilno eksprimiran polispecifični prijenosnik niskog afiniteta za serotonin, OCT3 (Hasegawa i sur., 2020; Karahoda i sur., 2020b; Kliman i sur., 2018; Lee i sur., 2018; Sata i sur., 2005), a nešto niže razine mRNA i proteina pronađene su u prvom tromjesečju nego na kraju trudnoće (Karahoda i sur., 2020a; Lee i sur., 2013). Druge dvije izoforme prijenosnika organskih kationa, OCT1 i OCT2, nisu prisutne (Sata i sur., 2005) ili su eksprimirane u vrlo niskim razinama (Ahmadimoghaddam i sur., 2013; Baković i sur., 2021; Hasegawa i sur., 2020; Lee i sur., 2013; Sonier i sur., 2005) u ljudskim posteljicama u prvom tromjesečju i na kraju trudnoće. Detaljan pregled ekspresije regulatornih gena serotonina u posteljici čovjeka kroz trudnoću prikazan je u Perić i sur. (2022).

Niske razine mRNA gena *PMAT*, još jednog prijenosnika serotonina niskog afiniteta, otkrivene su u tkivu posteljice čovjeka (Lee i sur., 2013). U ljudi, mRNA gena *PMAT* nije pronađena u trofoblastima u prvom tromjesečju (Suryawanshi i sur., 2018) i na kraju trudnoće (Baković i sur., 2021; Pavličev i sur., 2017), ali je pronađena u endotelnim stanicama fetalnih krvnih žila čovjeka (Baković i sur., 2021). U endotelnim stanicama fetalnih krvnih žila otkrivena je i aktivnost unosa serotonina niskog afiniteta, najvjerojatnije posredovana proteinom PMAT (Baković i sur., 2021).

1.3.2.5 Receptori serotonina u posteljici

Serotonin izvršava signalne funkcije primarno putem vezanja na svoje receptore smještene na plazmatskoj membrani. U ljudi je identificirano 14 različitih podtipova receptora za serotonin, razvrstanih u sedam obitelji (HTR1 do HTR7) na temelju strukturnih i farmakoloških svojstava te mehanizma unutarstaničnog prijenosa signala. Uz izuzetak HTR3, transmembranskog kationskog kanala, svi ostali podtipovi su receptori povezani s proteinom G, koji aktiviraju različite unutarstanične signalne putove (Celli i sur., 2017; Sharp i Barnes, 2020).

U posteljici čovjeka pronađena je ekspresija deset podtipova receptora serotonina: HTR1A, HTR1D, HTR1E, HTR1F, HTR2A, HTR2B, HTR3 (podjedinica HTR3A), HTR4, HTR5A i HTR5B (Huang i sur., 1998; Pavličev i sur., 2017; Ranzil i sur., 2019; Sonier i sur., 2005; Thébault-Dagher i sur., 2021; Vaillancourt i sur., 1994; Viau i sur., 2009). Međutim, ekspresija ostalih podtipova, s izuzetkom HTR2A (Sonier i sur., 2005; Vaillancourt i sur., 1994; Viau i sur., 2009) i HTR1A (Huang i sur., 1998), pokazana je samo na razini mRNA.

Receptor HTR2A je pronađen u sinciciotrofoblastu, citotrofoblastu i endotelu fetalnih krvnih žila terminskih posteljica čovjeka (Viau i sur., 2009).

Receptor HTR2A je kodiran genom *HTR2A* na kromosomu 13 u čovjeka (Ruble i sur., 2016). Pokazano je da nekoliko učestalih genetičkih varijanti gena *HTR2A*, uključujući *rs6311*, regulira ekspresiju gena *HTR2A* (Abdolmaleky i sur., 2011; Smith i sur., 2013; Turecki i sur., 1999) u različitim eksperimentalnim sustavima. U svom nukleotidnom slijedu, gen *HTR2A* ima i nekoliko potencijalno značajnih rijetkih genetičkih varijanti, uključujući *rs6306*, s neistraženom regulatornom ulogom ("dbSNP - NCBI," n.d.). Osim regulacije genetičkim varijantama, transkripcijska aktivnost gena *HTR2A* je modulirana metilacijom nekoliko citozina u promotorskoj regiji gena (Abdolmaleky i sur., 2011; Cheah i sur., 2017; Falkenberg i sur., 2011; Polesskaya i sur., 2006).

Istraživanja pokazuju da receptor HTR2A posreduje vazokonstriksijske učinke serotonina i na taj način sudjeluje u regulaciji umbilikalno-posteljičnog protoka krvi (Bertrand i St-Louis, 1999; Reviriego i sur., 1990; Ugun-Klusek i sur., 2011), učinke serotonina na proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju, migraciju i invaziju trofoblasta, regulirajući tako razvoj i strukturu posteljice (Oufkir i sur., 2010; Oufkir i Vaillancourt, 2011; Sonier i sur., 2005) te učinke serotonina na sintetske puteve estrogena u trofoblastima, sudjelujući tako u regulaciji endokrinih funkcija posteljice (Hudon Thibeault i sur., 2017; Klempan i sur., 2011).

Unatoč pokazanoj ulozi serotoninskog sustava posteljice u mehanizmima koji reguliraju razvoj i funkcije posteljice, vrlo se malo zna o potencijalnim promjenama homeostaze serotonina u posteljici čovjeka pri različitim komplikacijama trudnoće povezanim s nepravilnostima u razvoju i funkciji posteljice, uključujući majčinu pretilost i GDM.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Serotoninski sustav posteljice sudjeluje u mehanizmima koji reguliraju razvoj i funkcije posteljice. Majčina debljina i gestacijski dijabetes melitus (GDM) su povezani s nepravilnostima u razvoju, strukturi i funkcijama posteljice. Stoga je hipoteza ovog doktorskog rada da su majčina debljina i GDM povezani s promijenjenom homeostazom serotonina u posteljici. Nadalje, pretpostavljamo da je homeostaza serotonina u posteljici regulirana genetičkim i/ili epigenetičkim mehanizmima. S obzirom na pokazanu ulogu serotonina u regulaciji prijenosa nutrijenata preko posteljice, pretpostavljamo također da bi indikatori funkcije serotoninskog sustava u posteljici mogli pridonositi varijabilnosti u antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta.

Opći cilj ovog doktorskog rada je doprinijeti boljem razumijevanju homeostaze serotoninskog sustava posteljice u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om te doprinijeti boljem razumijevanju molekularnih mehanizama regulacije ključnih komponenti homeostaze serotonina u posteljici čovjeka.

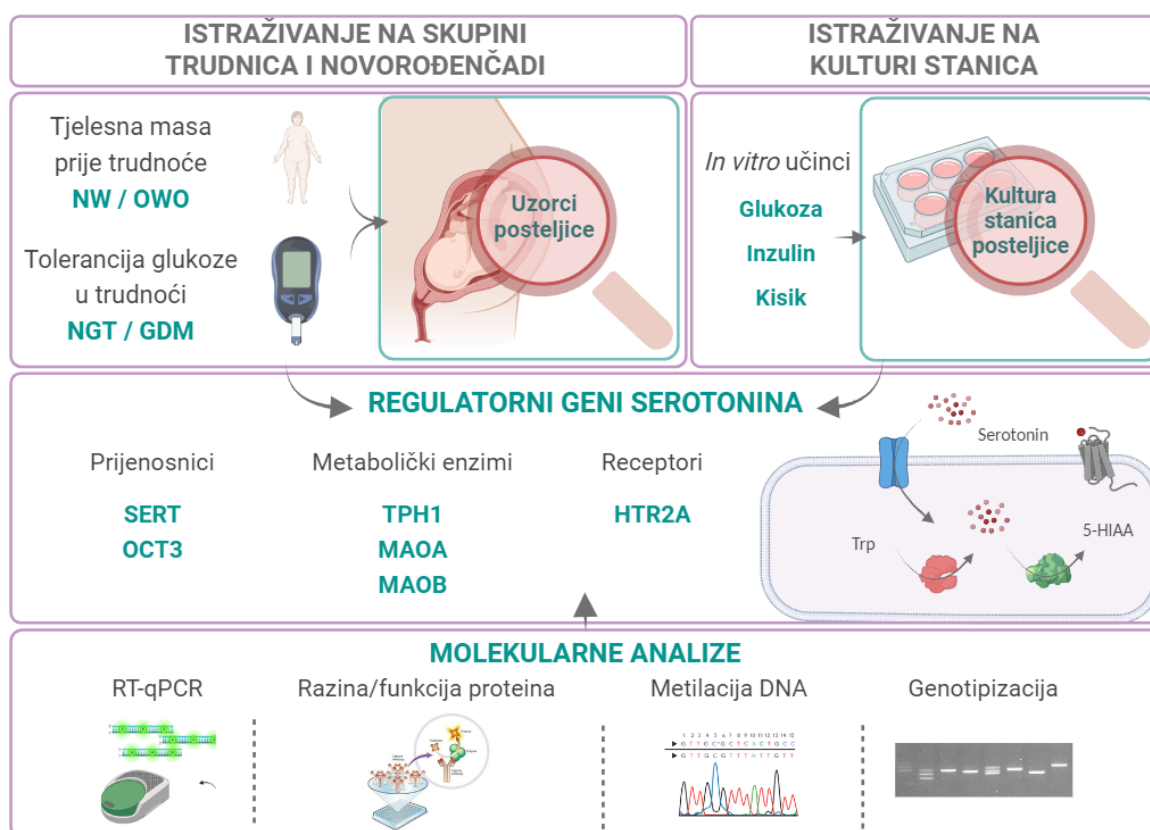
Specifični ciljevi doktorskog rada su:

- 1) odrediti odnos između metaboličkih parametara majke (debljine i GDM-a) i ekspresije odabranih regulatornih gena serotonina u posteljici;
- 2) istražiti odnos između polimorfizama, metilacije i ekspresije odabranih regulatornih gena serotonina u posteljici;
- 3) istražiti povezanost ekspresije regulatornih gena serotonina u posteljici i antropometrijskih karakteristika novorođenčeta;
- 4) istražiti učinke glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju odabranih regulatornih gena serotonina u staničnoj liniji trofoblasta čovjeka.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Koncept istraživanja

Osnovni koncept istraživanja prikazan je na **Slici 3.1**. Međuodnos majčine debljine i tolerancije glukoze s ekspresijom regulatornih gena serotonina (enzima, prijenosnika, receptora) u posteljici te odnos polimorfizama i metilacije odabranih regulatornih gena serotonina s njihovom ekspresijom u posteljici istražen je **na skupini trudnica i novorođenčadi**. Paralelno, učinak razine glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina istražen je **na kulturi stanica in vitro**, specifično, na liniji trofoblasta čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće. Dodatno, istražena je korelacija ekspresije regulatornih gena serotonina u posteljici s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi (porođajnom masom, duljinom i ponderalnim indeksom; nije prikazano na Slici 3.1).



Slika 3.1. Shematski prikaz koncepta istraživanja. NGT – normalna tolerancija glukoze (engl. *Normal Glucose Tolerance*), GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – predgestacijska normalna tjelesna masa (engl. *Normal Weight*), OWO – predgestacijska prekomjerna tjelesna masa ili pretilost (engl. *Overweight – Obesity*), SERT – serotonininski transporter, OCT3 – prijenosnik organskih kationa tipa 3, TPH1 – triptofan hidrosilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, MAOB – monoaminoksidaza B, HTR2A – receptor serotonina tipa 2A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina. Izrađeno korištenjem računalnog programa Biorender.com

3.2 Sudionici

Sudionici u istraživanju su majke i novorođenčad koji su dio kohorte PlaNS, uspostavljene u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina“ (HRZZ: IP-2018-01-6547). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišnog bolničkog centra u Zagrebu (Klasa:8.1–18/162-2, Broj: 02/21 AG) i Bioetičko povjerenstvo Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (BEP-8761/2-2018). Sudionice su se u istraživanje uključivale u Klinici za ženske bolesti i porođaje Sveučilišnog bolničkog centra Zagreb. Sve sudionice istraživanja dale su informirani pismeni pristanak te su osobno primile jedan primjerak istog. Svi postupci bili su u skladu s Helsinškom deklaracijom.

Demografski, antropometrijski i klinički podatci prikupljeni su iz medicinske dokumentacije te upitnika koje su sudionice ispunjavale 1-3 dana prije porođaja. U studiju su uključene trudnice čija je trudnoća bila dovršena isključivo elektivnim carskim rezom. Isključni kriteriji bili su dijagnoza bilo kojeg oblika dijabetesa prije trudnoće, bilo kakva patološka stanja trudnoće osim GDM-a, utvrđene fetalne anomalije, prijevremeni porođaj i višeploidne trudnoće.

Podatci o tjelesnoj visini i masi sudionica prije trudnoće prikupljeni su iz medicinske dokumentacije te dodatno potvrđeni putem upitnika kojeg su popunjavale sudionice. ITM majke prije trudnoće (predgestacijski ITM, pITM) izračunat je prema formuli:

$$pITM = \frac{\text{tjelesna masa prije trudnoće (kg)}}{\text{visina}^2 (\text{m}^2)}$$

Ovisno o vrijednostima pITM, majke su kategorizirane u tri skupine predgestacijskog statusa tjelesne mase: 1) normalna tjelesna masa (< 25 kg/m²); 2) prekomjerna tjelesna masa (25,0 do 29,9 kg/m²); i 3) pretilost (> 30,0 kg/m²).

Dijagnoza GDM-a temeljila se na protokolu i kriterijima Međunarodnog udruženja studijskih grupa za dijabetes u trudnoći (IADPSG, engl. *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*) (Metzger i sur., 2010) primijenjenima u hrvatskom kliničkom okruženju (Lovrenčić i sur., 2013). Prema navedenim kriterijima, GDM je dijagnosticiran kada

su koncentracije glukoze u krvi bile $\geq 5,1$ nmol/L natašte i/ili $\geq 10,0$ nmol/L jedan sat i/ili $\geq 8,5$ nmol/L dva sata nakon oralne administracije glukoze (75 g).

U istraživanje je uključeno ukupno 216 parova majki i novorođenčadi iz jednoplodnih trudnoća.

3.3 Uzorci tkiva posteljice

Uzorci tkiva posteljice uzeti su s fetalne strane posteljice standardiziranim postupkom, unutar pet minuta nakon porođaja. Decidua je uklonjena te su izrezani komadići tkiva s 2-3 nasumične pozicije po kvadrantu posteljice (ukupno 10-12 pozicija po posteljici), izbjegavajući mjesta krvarenja, infarkta, kalcifikacije ili odlaganja fibrina. Komadići tkiva prikupljeni su u hladnu Ringerovu otopinu (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicine) kako bi se uklonio veći dio zaostale krvi. Komadići tkiva su zatim na metalnom pladnju očišćeni od krvnih žilica te dodatno isprani Ringerovom otopinom. Obradeno i isprano tkivo posušeno je na komadu gaze te podijeljeno u dvije epruvete za zamrzavanje (kriotube). Dio tkiva posteljice odmah je zamrznut pri -80°C u svrhu analize proteina, a dio je pohranjen u medij za stabilizaciju nukleinskih kiselina, RNAlater, 24 sata pri 4°C , a nakon toga pri -80°C .

3.4 Uzorci seruma iz majčine krvi

Uzorci krvi sudionica uzeti su na dan porođaja, natašte, iz lijeve kubitalne vene, u epruvete s gelom za razdvajanje seruma (Vacuette tube 5 mL Z Serum Separator Clot Activator). Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 2000 g, nakon čega je serum izdvojen, razdijeljen u dvije ili više epruveta i pohranjen u zamrzivač pri -80°C do daljnje analize.

3.5 Stanična linija

Eksperimenti *in vitro* provedeni su na modelu stanica posteljice iz prvog tromjesečja trudnoće čovjeka, staničnoj liniji ACH-3P. Ova stanična linija uspostavljena je u laboratoriju Zavoda za opstetriciju i ginekologiju, Medicinskog Sveučilišta u Grazu, Graz, Austrija, a dobivena je spajanjem primarnih trofoblasta iz prvog tromjesečja (12. tjedna) trudnoće te stanične linije koriokarcinoma čovjeka, AC1-1 (Hiden i sur., 2007). Stanična linija ACH-3P detaljno je morfološki i funkcionalno okarakterizirana od strane naših suradnika u spomenutom laboratoriju (Hiden i sur., 2007).

3.6 Osnovne kemikalije, otopine i kompleti pribora i kemikalija

Prikupljanje tkiva posteljice

- Ringerova otopina (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina za očuvanje nukleinskih kiselina RNAlater (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Izdvajanje nukleinskih kiselina:

- Komplet za izdvajanje genomske DNA – GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Komplet za izdvajanje genomske DNA i RNA – AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Komplet za izdvajanje RNA – RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Enzim i pufer za razgradnju DNA – RNase-Free-DNase set, (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Dietil-pirokarbonat (DEPC), 0,1% vodena otopina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Etanol, 96% (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Voda bez ribonukleaza (DEPC-treated water, Ambion, Life Technologies, Austrija)

Reverzna transkripcija (RT):

- Komplet za reverznu transkripciju, High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- Komplet za reverznu transkripciju LunaScript RT SuperMix Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, SAD)

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR):

- Reagens za lančanu reakciju polimerazom FG-Fast SYBR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- Reagens za lančanu reakciju polimerazom SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- Početnice nabavljene od tvrtke Metabion (Planegg, Njemačka). Od liofilizata su pripremljene matične otopine koncentracije 100 μ M od kojih su potom pripremljene radne otopine koncentracije 10 μ M. Sve otopine su čuvane pri -20°C. Slijed nukleotida korištenih početnica naveden je u **Tablici 3.1**.

Tablica 3.1. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje odsječaka cDNA. Kao referentni geni korišteni su YWHAZ, ACTB, CK7 i UBC. Puni nazivi gena od interesa navedeni su u popisu kratica.

Simbol gena	Nukleotidni slijed početnice (5' - 3')	Amplikon (bp)	Izvor
<i>SERT / SLC6A4</i>	f: TGGTTCTATGGCATCACTCAGTTC r: GTTGTGGCGGGCTCATCAG	148	(Van Lelyveld i sur., 2007)
<i>OCT3 / SLC22A3</i>	f: GAGGACCACAGTGGCTACAT r: ACAGACCTGAACAGAGCGAA	128	^a
<i>TPHI</i>	f: TGCAAAGGAGAAGATGAGAGAATTTAC r: CTGGTTATGCTCTTGGTGTCTTTC	114	(Van Lelyveld i sur., 2007)
<i>MAOA</i>	f: GAGCGGCTACATGGAAGGG r: TCACCTTCCCGAGACCATTTA	77	(Sun i sur., 2012)
<i>MAOB</i>	f: CTTTTTGGAGAGACATTTGCC r: TCACAAGTAGCCCCCTTTTGT	116	(Pattyn i sur., 2003) ^a
<i>HTR2A</i>	f: GCAAGATGCCAAGACAACAGATAA r: TCACACACAGCTCACCTTTTCAT	118	(Smith i sur., 2013)
<i>YWHAZ</i>	f: CCGTTACTTGGCTGAGGTTG r: AGTTAAGGGCCAGACCCAGT	143	(Baumann i sur., 2013)
<i>ACTB</i>	f: TCCCTGGAGAAGAGCTACG r: GTAGTTTCGTGG ATGCCACA	131	(Métayé i sur., 2002)
<i>CK7</i>	f: CCGTGCCTCTGCCTATGGGG r: GCTCCAGAAACCGCACCTTGTCGAT	192	(Barrett i sur., 2014)
<i>UBC</i>	f: TCGCAGCCGGGATTTG r: GCATTGTCAAGTGACGATCACA	64	(Baumann i sur., 2013)

f – uzvodna (engl. *Forward*), r – nizvodna (engl. *Reverse*)

^a dizajnirani uz pomoć računalnog programa ("GenScript," n.d.)

^b RTPrimerDB ID: 3165

Elektroforeza u gelu agaroze:

- Agaroz (low EEO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Pufer TAE (0,8 M Tris, 0,2 mM octena kiselina, 0.5 M EDTA)
- Pufer za nanošenje uzoraka (50% glicerol, 0,5% bromofenolno modriilo, 1 mM EDTA)
- Standard duljine odsječaka DNA – 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Duren, Njemačka)

Izdvajanje ukupnih proteina:

- Komplet za inhibiciju proteaza (HaltTM Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Reagens za izdvajanje membranskih proteina uključujući površinske proteine i receptore za analize ELISA (Cloud-clone Corp., Katy, TX, SAD)
- Kalij-fosfatni pufer (KH₂PO₄, 0,05 M, pH 7,6)

- Komplet za određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom BCA (engl. *Bicinchoninic Acid*) – Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)

Komplet za kvantitativno određivanje proteina SERT:

- Komplet SERT ELISA (Cloud-clone Corp., Katy, TX, SAD)

Određivanje enzimske aktivnosti proteina MAO:

- Natrij-boradni pufer, 0,033 M, pH 8,3
- Trikloroctena kiselina (TCA), 2 M
- 4-hidroksikinolin (4-hidroksi-1-azanaftalen, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Kinuramin (3-[2-aminofenil]-3-oksopropanamin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

Određivanje koncentracije lipida

- Reagensi za određivanje koncentracije triglicerida (TRIGL), ukupnog kolesterola (CHOL HiCo Gen.2) i HDL-kolesterola (HDL-Cholesterol Gen.4) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, SAD)
- Reagensi za određivanje koncentracije triglicerida (Alinity C Triglyceride), ukupnog kolesterola (Alinity C Cholesterol) i HDL-kolesterola (Alinity C ultra HDL) (Abbott, Chicago, IL, USA)

Genotipizacija

SERT:

- AllTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- MspI (HpaII) Restriction Enzyme, 10 U/μL (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Tango buffer, 2× (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)

MAOA:

- 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- 10 × PCR pufer II (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- 10 mM smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; svaki 2,5 mM; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- Taq DNA polimeraza, 5 U/μL (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)

- Q solution (Qiagen, Hilden, Njemačka)

HTR2A:

- Komplet za genotipizaciju polimorfizma rs6306 gena HTR2A TaqMan SNP genotyping assay (assay ID: C_11696888_10, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Početnice nabavljene od tvrtke Metabion (Planegg, Njemačka). Od liofilizata su pripremljene matične otopine koncentracije 100 µM od kojih su potom pripremljene radne otopine koncentracije 10 µM. Sve otopine su čuvane pri -20°C. Slijed nukleotida početnica naveden je u **Tablici 3.2**.

Modifikacija DNA tretiranjem bisulfitom, umnažanje ciljnih sljedova DNA i pirosekvenciranje

- Komplet za bisulfitnu konverziju DNA – EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA, SAD)
- Komplet za amplifikaciju bisulfitom modificirane DNA – PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Početnice nabavljene od tvrtke Metabion (Planegg, Njemačka). Od liofilizata su pripremljene matične otopine koncentracije 100 µM od kojih su potom pripremljene radne otopine koncentracije 10 µM. Sve otopine su čuvane pri -20°C. Slijed nukleotida početnica naveden je u **Tablici 3.3**.
- Komplet za pirosekvenciranje PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Tablica 3.2. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje odsječaka DNA u svrhu genotipizacije ciljnih gena. Puni nazivi gena od interesa navedeni su u popisu kratica.

Simbol gena / oznaka polimorfizma	Nukleotidni slijed početnice (5' - 3')	Amplikon (bp)	Izvor
SERT:			
<i>5HTTLPR / rs25531</i>	f: CTCCCTGTACCCCTCCTAGG r: TGCAAGGAGAATGCTGGAG	250 / 293	(Blazevic i sur., 2017)
<i>STin2</i>	f: GTCAGTATCACAGGCTGCCA r: TGTTCCCTAGTCTTACGCCAG	249 / 266 / 299	(Blazevic i sur., 2017)
MAOA:			
<i>uVNTR</i>	f: ACAGCCTGACCGTGGAGAAG r: GAACGGACGCTCCATTCGGA	279 / 309 / 324 / 339 / 354	(Sabol i sur., 1998)

f – uzvodna (engl. *Forward*), r – nizvodna (engl. *Reverse*)

Tablica 3.3. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje odsječaka DNA modificirane bisulfitom u svrhu analize metilacije. Puni nazivi gena od interesa navedeni su u popisu kratica. Genomske koordinate analiziranih CpG-mjesta navedene su u **Tablici 3.2.**

Simbol gena:			
Regija (CpG mjesta)	Nukleotidni slijed početnice (5' - 3')	Amplikon (bp)	Izvor
SERT/SLCC6A4:			
Promotor (CpG 1-10)	f*: GGTTTTTAGGAGAGTAGGGAGTATATAGTT r: AAAAATCCTAACTTTTCTACTCTTAACTT s: AAACACACAAAAAACAAAT	203	(Devlin i sur., 2010)
Intron 1 (CpG 11-21)	f: GGGGAGGGGGATAGAAT r*: ACAACACTTTACTCAAAACCCTCTTTA s: GGGGAGGGGGATAGAAT	273	/
Intron 1 (CpG 22-25)	f: TTTTAAAGAGGGTTTTGAGTAAAGTG r*: TTTATATCAACCAAACTCTCCCTTTACAT s: GGGTTTTGAGTAAAGTGT	150	/
MAOA:			
Egzon1 / intron 1 (CpG 1-9)	f: GGGGAGTTGATAGAAGGGTTTTTTTTAT r*: TATATCTACCTCCCCAATCACACC s: AGTTAAAGTATGGAGAATTAAG	253	(Philibert i sur., 2008)
HTR2A:			
Promotor (CpG 1)	f: TGGTGGGGGAAAAAATT r*: AAATAACCTTTTATACAAATTCCC s: TGGTGGGGGAAAAAATT	383	(Hranilovic i sur., 2016)
Promotor (CpG 2-3)	f: GATATAAATATTGTTGGTTTTGGATGGA r*: ACTACAAAATAACAACAACCAAAAA s: GTTTTGGATGGAAGTG	276	(Paquette i sur., 2013)
Promotor (CpG 4)	f: GATATAAATATTGTTGGTTTTGGATGGA r*: ACTACAAAATAACAACAACCAAAAA s: GGGAGAAGAAAAAGTTTG	276	(Paquette i sur., 2013)

f – uzvodna (engl. *Forward*), r – nizvodna (engl. *Reverse*), s – sekvencirajuća

* biotinizirana početnica

Hranjivi mediji za stanice ACH-3P

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s niskim udjelom D-glukoze i dodatkom natrijevog piruvata i L-glutamina (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Ham's F-12 medium s dodatkom L-glutamina (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Otopina antibiotika i antimikotika Gibco Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/mL (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*, GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, SAD)
- Akutaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Azaserin-hipoksantin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- Pufer HBSS, bez kalcija, magnezija (Gibco, Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)

Tretman stanica

- D-glukoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- L-glukoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Inzulin (Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, CA, SAD)

Sve kemikalije kojima nije posebno istaknut proizvođač, nabavljene su iz Kemike, Hrvatska.

3.7 Tehnička oprema i pribor

- Termomikser LLG-uni thermix1 (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučni homogenizator (B. Braun Biotech International, Njemačka)
- Homogenizator (Tehtnica, Slovenija)
- Homogenizator GentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Njemačka)
- Epruvete za homogenizaciju tipa M (M-tube, Miltenyi Biotec, Njemačka)
- Električne miješalice (IKA, Njemačka)
- Centrifuge (Hettich, Njemačka; Superspeed RC2-B, Sorvall, SDA5417C; Eppendorf Research, Njemačka)
- Vage (Tehtnica, Slovenija; Mettler H54AR, Kern, Njemačka)
- Digestor (Tlos, Hrvatska)
- Spektrofotometar NanoPhotometer N60/N50 (Implen GmbH, Munich, Njemačka)
- Uređaj za pirosekvenciranje PyroMark Q24 Advanced Pyrosequencing System (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Uređaji za PCR T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD), Peqlab peqSTAR Thermal Cycler 96X (VWR International, Lutterworth, Velika Britanija)
- Uređaji za PCR u stvarnom vremenu Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) i CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)

- Transiluminator s digitalnom kamerom, Uvitec Alliance 4.7 (Cambridge, Velika Britanija)
- pH metar Lab 845 (SI Analytics, Njemačka)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu (Clever Scientific, Velika Britanija)
- Magnetska miješalica (IKA Combimag RCH, Njemačka)
- Inkubator s tresilicom Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Njemačka)
- Čitači mikrotitarskih pločica Labsystems Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD) i Tecan INFINITE 200 PRO (Tecan Austria GmbH, Austrija)
- Hipoksični inkubacijski sustav za uzgoj stanica XVIVO incubation system (BioSpherix, Ltd., Parish, NY, SAD)
- Automatski biokemijski analizatori Cobas c 501 module (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, SAD) i Alinity c (Abbott, Chicago, IL, USA)
- Epruvete s gelom za razdvajanje seruma Vacuette tube 5 mL Z Serum Separator Clot Activator (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austrija)
- Laminar Herasafe (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Brojač stanica Cell counter CASY (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Njemačka)
- Automatske pipete i propipete (Eppendorf, Njemačka; Gilson, SAD)
- Bočice za uzgoj stanica Nunc EasYFlask 75cm2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Pločice za uzgoj stanica sa 6 jažica Nunc Cell-Culture Treated Multidishes (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Strugalica za stanice (Corning Inc, NY, USA)
- Plastične i staklene pipete za rad u kulturi stanica (Corning Inc, NY, USA)

3.8 Programski paketi

- programski paket za analizu razine metilacije PyroMark Q24 Software (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- programski paketi za statističku analizu GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) i IBMSPSS Statistics 23.0 forWindows (SPSS Statistics, Chicago, IL, USA)
- programski paket RefFinder (<http://blooge.cn/RefFinder/>)

- programski paket G*power (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Njemačka)

3.9 Izdvajanje nukleinskih kiselina

Tkivo posteljice pohranjeno u otopini RNAlater posušeno je na filter papiru i izvagano. U svrhu izdvajanja DNA, 11-13 mg dehidriranog tkiva posteljice je homogenizirano korištenjem plastičnog tučka i pripadajuće plastične mikroepuvete. DNA je izdvojena kompletom GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit prema protokolu proizvođača, uz dodatni korak razgradnje RNA. Kolonica je u zadnjem koraku inkubirana 10 minuta s 200 μL otopine za eluiranje, nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem, prema protokolu proizvođača kompleta.

Sav potrošni materijal i pribor korišten u izdvajanju RNA je preko noći tretiran s otopinom DEPC (0,1%) u svrhu inaktivacije ribonukleaza, te je potom autoklaviran (Hranilović, 2007). RNA je izdvojena iz tkiva posteljice kompletom RNeasy Mini Kit, slijedeći protokol proizvođača kompleta. Ukratko, 11-13 mg dehidriranog tkiva posteljice je homogenizirano sonikacijom titanovom mikrosandom (3 ciklusa po 10 sekundi uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 μm) u 700 μL pufera RLT s dodatkom 1% β -merkaptetanola. Ukupna RNA je dalje izdvojena prema protokolu proizvođača, uz dodatni korak razgradnje DNA. Kolonica je u zadnjem koraku inkubirana 10 minuta s 37 μL vode bez ribonukleaza, nakon čega je RNA eluirana centrifugiranjem.

DNA i RNA iz stanica ACH-3P izdvojene su kompletom AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit, prema protokolu proizvođača kompleta. Stanice ACH3-P su homogenizirane u puferu RLT Plus s dodatkom 1% β -merkaptetanola, snažnim struganjem i zamrzavanjem pri -20°C . Kolonica za izdvajanje RNA je u zadnjem koraku inkubirana 10 minuta s 35 μL vode bez ribonukleaza (iz kompleta), nakon čega je RNA eluirana centrifugiranjem. Kolonica za izdvajanje DNA je u zadnjem koraku dva puta inkubirana 10 minuta s 50 μL otopine za eluiranje (ukupno 100 μL), nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem.

Količina te čistoća izdvojenih DNA i RNA određena je spektrofotometrom (NanoPhotometer N60/N50). Cjelovitost izdvojenih DNA i RNA provjerena je elektroforezom u gelu agaroze (0,8%), uz vizualizaciju korištenjem boje Midori Green Advance DNA. Omjer apsorbancija 260/280 za uzorke DNA bio je u rasponu 1,8 – 2,0, a u gelu agaroze bile su

vidljive vrpce visoke molekularne mase bez pokazatelja raspada. Omjer apsorbancija 260/280 za uzorke RNA bio je u rasponu 2,0 – 2,2, a u gelu agaroze bile su vidljive oštre vrpce koje odgovaraju mRNA podjedinica ribosoma 28S i 18S, u približnom omjeru 2:1.

Iz eluata DNA su pripravljene radne otopine DNA koncentracije 40 ng/ μ L. Uzorci DNA i RNA pohranjeni su pri -80°C .

3.10 Analiza ekspresije mRNA

3.10.1 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija provedena je pomoću kompleta kao što je opisano u nastavku. Za svaku skupinu uzoraka pripravljene su jedna do dvije kontrolne reakcije bez dodatka enzima reverzna transkriptaza (-RT kontrola).

Jednake količine RNA izdvojene iz tkiva posteljice (1,5 μ g po uzorku) prevedene su u cDNA korištenjem kompleta High Capacity RNA to cDNA Synthesis Kit koji sadrži početnice nasumičnih heksanukleotida. Sastav reakcijske smjese prikazan je u **Tablici 3.4**. Reakcijske smjese inkubirane su pri 37°C kroz 60 minuta, a potom zagrijavane pri 95°C tijekom 5 minuta kako bi se reakcija zaustavila, a reverzna transkriptaza inaktivirala. Dobivena cDNA razrijeđena je do koncentracije 7,5 ng/ μ L RNA i pohranjena u tri alikvota pri -20°C .

Tablica 3.4. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju ukupne RNA iz tkiva posteljice.

Sastojak	+RT ^a		-RT ^b	
	konačna koncentracija	volumen (μ L)	konačna koncentracija	volumen (μ L)
H ₂ O (bez ribonukleaza)	-	varijabilno	-	varijabilno
RT pufer (2 \times)	1 \times	10,00	1 \times	10,00
RT enzim (20 \times)	1 \times	1,00	-	-
Uzorak RNA	1,5 μ g	varijabilno	1,5 μ g	varijabilno
Ukupni volumen (μL)		20,00		20,00

^a reakcijske smjese koje su sadržavale reverznu transkriptazu

^b kontrolne reakcijske smjese bez reverzne transkriptaze

Jednake količine RNA izdvojene iz stanica ACH-3P (0,7 μ g po uzorku) prevedene su u cDNA korištenjem kompleta LunaScript RT SuperMix Kit. Sastav reakcijske smjese prikazan je u **Tablici 3.5**. Reakcijske smjese inkubirane su 2 minute pri 25°C , te 10 minuta pri

55°C. Reakcije su zaustavljene zagrijavanjem pri 95°C tijekom 1 minute kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Dobivena cDNA razrijeđena je do koncentracija 10 ng/μL (za qPCR gena od interesa) ili 2,5 ng/μL (za qPCR referentnih gena) te pohranjena pri -20°C.

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju ukupne RNA iz stanične linije ACH-3P.

Sastojak	+RT ^a		-RT ^b	
	konačna koncentracija	volumen (μL)	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O (bez ribonukleaza)	-	varijabilno	-	varijabilno
LunaScript RT Supermix (5×)	1×	4,00	-	-
No RT Control mix (5×)	-	-	1×	4,00
Uzorak RNA	0,7 μg	varijabilno	0,7 μg	varijabilno
Ukupni volumen (μL)		20,00		20,00

^a reakcijske smjese koje su sadržavale reverznu transkriptazu

^b kontrolne reakcijske smjese bez reverzne transkriptaze

3.10.2 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative PCR*, qPCR) nakon reverzne transkripcije (RT-qPCR) (Bustin i sur., 2009) određena je razina mRNA pet gena od interesa (GOI, engl. *Genes Of Interest*) u tkivu posteljice (*SERT*, *OCT3*, *TPHI*, *MAOA* i *MAOB*) i tri gena od interesa u stanicama ACH-3P (*SERT*, *TPHI* i *MAOA*). U svrhu odabira gena od interesa i referentnog gena za finalne analize, određena je relativna ekspresija gena kandidata na manjem broju uzoraka. Testirana su po tri potencijalna referentna gena za uzorke tkiva posteljice (*YWHAZ*, *UBC* i *ACTB*) i za uzorke stanica ACH-3P (*YWHAZ*, *CK-7* i *ACTB*). Stabilnost analiziranih referentnih gena procijenjena je korištenjem programskog paketa/alata RefFinder (Xie i sur., 2012) i u oba se slučaja kao najstabilniji referentni gen pokazao *YWHAZ* te je stoga korišten za normalizaciju rezultata ekspresije gena od interesa i u uzorcima tkiva posteljice i u uzorcima ACH-3P stanica.

Za uzorke tkiva posteljice, reakcije RT-qPCR-a pripremane su s 30 ng (*TPHI* i *MAOA*), 15 ng (*SERT*, *OCT3*, *MAOA* i *MAOB*) ili 15 ng (*YWHAZ*, *UBC* i *ACTB*) cDNA, korištenjem reagensa za lančanu reakciju polimerazom FG-Fast SYBR Master Mix. Za uzorke stanica ACH-3P, reakcije RT-qPCR gena od interesa pripremane su s 40 ng, a referentnih gena s 10 ng cDNA, korištenjem reagensa za lančanu reakciju polimerazom SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix. Sljedovi korištenih početnica navedeni su u **Tablici 3.1**. Reakcije RT-

qPCR rađene su u duplikatima za gene s višom ekspresijom, te u triplikatima ili kvadruplikatima za gene s nižom ekspresijom. Specifičnost amplikona potvrđena je analizom krivulje taljenja. Relativne razine ekspresije gena od interesa izračunate su pomoću komparativne Cq (ddCq) metode.

3.11 Određivanje razine proteina SERT u tkivu posteljice

U svrhu određivanja razine proteina SERT u tkivu posteljice, uzorci tkiva posteljice (15 mg), čuvani pri -80°C , homogenizirani su u puferu za izdvajanje proteina membrane s dodatkom inhibitora proteaza (HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, 100X), u omjeru 1:20 (masa tkiva (g) : volumen pufera (mL)). Tkivo je homogenizirano u staklenom homogenizatoru korištenjem uređaja za homogenizaciju s keramičkim tučkom (20 ciklusa potisaka pri brzini 1200 rpm) te potom sonikacijom titanovom mikrosondom (3 ciklusa po 10 sekundi uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 μm). Uzorak je cijelo vrijeme držan na ledu kako bi se onemogućila aktivnost proteaza. Uzorci su nakon sonikacije centrifugirani 10 minuta pri 10000 g, pri 4°C kako bi se istaložili nehomogenizirani ostatci tkiva. U supernatantima je izmjerena koncentracija ukupnih proteina metodom BCA (engl. *Bicinchoninic Acid*) korištenjem kompleta (PierceTM BCA Protein Assay Kit) prema uputama proizvođača. Uzorci su pohranjeni pri -80°C do daljnjih mjerenja.

Razina proteina SERT određena je u pripremljenim uzorcima proteina posteljice imunoenzimskom metodom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), korištenjem komercijalno dostupnog kompleta. Mikropločica koja se nalazi u ovom kompletu obložena je protutijelom specifičnim za protein SERT čovjeka. U odgovarajuće jažice mikropločice dodani su standardi poznatih koncentracija proteina SERT u seriji dvostrukih razrjeđenja (0,312 ng/ μL – 0,010 ng μL) ili 100 μg ukupnih proteina tkiva posteljice razrijeđenih u puferu PBS. Pločica je inkubirana 1 sat pri 37°C i zatim preko noći pri 4°C . Nakon ispiranja, dodano je drugo protutijelo specifično za SERT čovjeka s konjugiranim biotinom te je pločica inkubirana 1 sat pri 37°C . Nakon ispiranja nevezanog protutijela, u jažice je dodan avidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) i pločica je inkubirana 30 minuta pri 37°C . Jažice su ponovno isprane i zatim je dodana otopina supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB). Enzimska reakcija prekinuta je nakon 30 minuta dodatkom otopine sumporne kiseline i promjena boje mjerena je spektrofotometrom na valnoj duljini od 450 nm. Koncentracija proteina SERT u uzorcima određena je na temelju očitane optičke gustoće uzoraka pomoću standarde krivulje i izražena je u odnosu na masu ukupnih proteina.

3.12 Određivanje aktivnosti enzima MAOA u tkivu posteljice

U svrhu određivanja enzimске aktivnosti (kinetičkih parametara V_{\max} i K_m) proteina MAOA u tkivu posteljice, uzorci tkiva posteljice (50 mg), pohranjeni pri -80°C , homogenizirani su sonikacijom titanovom mikrosondom (3 ciklusa po 10 sekundi uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 μm) u kalij-fosfatnom puferu, u omjeru 1:20 (masa tkiva (g) : volumen pufera (mL)). Uzorak je cijelo vrijeme držan na ledu kako bi se onemogućila aktivnost proteaza. Nakon sonikacije, uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 2000 g pri 4°C , kako bi se istaložili nehomogenizirani ostatci tkiva.

Aktivnost MAOA posteljice određena je ranije opisanom metodom (Jernej i sur., 2002), a koja je u ovom radu modificirana za mjerenje na mikropločici. Metoda je uključivala određivanje aktivnosti uz prisutnost kinuramina kao supstrata enzima MAO. Deaminacijom kinuramina, posredstvom enzima MAO, nastaje fluorescentni spoj 4-hidroksikinolin čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijski pomoću standardne krivulje.

Za reakciju određivanja kinetičkih parametara enzima MAO korišteno je 6 μg ukupnih proteina posteljice, razrijeđenih u natrij-boratnom puferu do ukupnog volumena 150 μL . Uzorci su predinkubirani 10 minuta pri 37°C . Brzina reakcije za svaki uzorak određena je pri šest koncentracija supstrata kinuramina: 6,25, 12,5, 25, 50, 100 i 200 μM . Raspon koncentracija supstrata odabran je na temelju preliminarnih eksperimenata. U svrhu odabira optimalnih uvjeta reakcije, napravljen je i eksperiment ovisnosti brzine reakcije o količini ukupnih proteina (1,5 – 48 μg) i trajanju reakcije (10 – 30 minuta). Kao optimalni uvjeti odabrani su količina od 6 μg ukupnih proteina po reakciji te trajanje reakcije od 15 minuta. Smjesa ukupnog volumena 180 μL inkubirana je 15 minuta pri 37°C uz stalno potresanje. Reakcija je zaustavljena dodatkom 90 μL trikloroctene kiseline (TCA). Za svaki uzorak, pripremljena je i „prazna“ proba (engl. *blank*), koja je sadržavala iste komponente kao i uzorci, ali je TCA dodana prije supstrata kako bi se inaktivirala aktivnost enzima. Svaka pločica za određivanje kinetičkih parametara enzima MAO uključivala je referentni uzorak i standardnu krivulju. Za standardnu krivulju korišten je 4-hidroksikinolin koncentracija 0, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 i 1 μM , razrijeđen u natrij-boratnom puferu do volumena 150 μL s dodatkom 90 μL TCA. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na spektrofotometru uz ekscitaciju pri valnoj duljini 310 nm i emisiju pri valnoj duljini 362 nm.

Brzina enzimske reakcije pri svakoj koncentraciji supstrata izražena je kao nanomol (nmol) nastalog produkta po masi proteina u minuti (nmol / mg proteina / min). Kinetički parametri (V_{\max} i K_m) određeni su iz Michaelis-Mentenine krivulje enzimske kinetike korištenjem programskog paketa GraphPad Prism v.8.

3.13 Određivanje koncentracije lipida u uzorcima krvi sudionica

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, kolesterola u sastavu lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *High Density Lipoprotein*) mjerene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, enzimatskom kolorimetrijskom metodom na automatskom biokemijskom analizatoru (Cobas c 501 ili Alinity c) korištenjem reagensa istog proizvođača. Koncentracije kolesterola u sastavu lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *Low Density Lipoprotein*) izračunate su na temelju podataka o koncentracijama ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola.

3.14 Genotipizacija

3.14.1 *SERT*

Polimorfizam varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTR) u promotoru gena *SERT* (*5HTTLPR*, Chr17:30237291 – Chr17:30237333 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) genotipiziran je umnažanjem lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) korištenjem specifičnih početnica (**Tablica 3.2.**) te određivanjem duljine odsječaka PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3%). Sastav reakcijske smjese prikazan je u **Tablici 3.6.**, a uvjeti umnažanja u **Tablici 3.7.** Očekivane duljine odsječaka navedene su u **Tablici 3.9.** Genotip su neovisno očitavale barem dvije osobe. U slučaju neslaganja, odsječak je ponovno umnožen i genotip je ponovno očitavan.

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) – *rs25531* (Chr17:30237328 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**), određen je metodom analize duljine restrikcijskih ulomaka (RFLP, engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). U tu svrhu su produkti PCR-a (**Tablica 3.6** i **Tablica 3.7**) izloženi djelovanju restrikcijske endonukleaze *MspI* (**Tablica 3.8**) te je određena duljina dobivenih restrikcijskih ulomaka elektroforezom u gelu agaroze (3%).

Tablica 3.6. Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za polimorfizme *5HTTLPR* i *rs25531* gena *SERT*.

Sastojak	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	13,00
AllTaqMM (4×)	1.0 ×	5,00
Početnica F (10 μM)	0,25 μM	0,50
Početnica R (10 μM)	0,25 μM	0,50
DNA (40 ng/μl)	2,0 ng/μl	1,00
Ukupni volumen (μL)		20,00

Tablica 3.7. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za polimorfizme *5HTTLPR* i *rs25531* gena *SERT*.

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95°C	2 min	1
Denaturacija	95°C	5 sek	
Nalijeganje početnica	71 – 61°C	15 sek	10
Produljivanje lanaca DNA	72°C	10 sek	
Denaturacija	95°C	5 sek	
Nalijeganje početnica	61°C	15 sek	30
Produljivanje lanaca DNA	72°C	10 sek	
Završno produljivanje	72°C	10 min	1

Tablica 3.8. Sastav restrikcijske smjese za određivanje polimorfizma *rs25531* gena *SERT*.

Sastojak	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	1,5
Tango buffer (10×)	1.0 ×	2,0
Enzim <i>MspI</i> (10 U/ μl)	1,5 U	1,5
Produkt PCR-a	-	15,0
Ukupni volumen (μL)		20,0

Polimorfizam VNTR u drugom intronu gena *SERT* (*STin2*, Chr17:30221457 – Chr17:30221506 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) genotipiziran je metodom PCR korištenjem specifičnih početnica (**Tablica 3.2**) te određivanjem duljine odsječaka PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3%). Sastav reakcijske smjese za PCR prikazan je u **Tablici 3.10**, a uvjeti umnažanja u **Tablici 3.11**.

Tablica 3.9. Očekivane duljine odsječaka DNA nakon reakcije PCR i restrikcije endonukleazom MspI u svrhu određivanja polimorfizama *5HTTLPR* i *rs25531* gena *SERT*.

Genotip	Očekivana duljina produkta PCR-a (pb) ^a	Očekivana duljina odsječaka restrikcije (pb) ^b
S/S	250	38 i 212
S/L	250 i 293	-
S/La	-	38, 212, 255
S/Lg	-	38, 81, 174 i 212
L/L	293	-
La/La	-	38 i 255
La/Lg	-	38, 81, 174 i 255
Lg/Lg	-	38, 81 i 174

^a za genotipizaciju polimorfizma *5HTTLPR*^b za genotipizaciju polimorfizma *rs25531***Tablica 3.10.** Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za polimorfizam *STin2* gena *SERT*.

Sastojak	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	9,50
AllTaqMM (4×)	1.0 ×	3,75
Početnica F (10 μM)	0,25 μM	0,38
Početnica R (10 μM)	0,25 μM	0,38
DNA (40 ng/μl)	2,7 ng/μl	1,00
Ukupni volumen (μL)		15,00

Tablica 3.11. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za polimorfizam *STin2* gena *SERT*.

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95°C	2 min	1
Denaturacija	95°C	5 sek	
Nalijeganje početnica	58°C	15 sek	45
Produljivanje lanaca DNA	72°C	10 sek	
Završno produljivanje	72°C	10 min	1

Mogući aleli i očekivane duljine odsječaka prikazane su u **Tablici 3.12.****Tablica 3.12.** Očekivane duljine odsječaka DNA za polimorfizam *STin2* gena *SERT*.

Alel (broj ponavljanja)	Očekivana duljina produkta PCR-a (pb)
9	249
10	266
12	299

3.14.2 *MAOA*

Polimorfizam VNTR u promotoru gena *MAOA* (*uVNTR*, Chr23:43655101 – Chr23:43655205 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) genotipiziran je umnažanjem polimorfne regije metodom PCR korištenjem specifičnih početnica (**Tablica 3.2**) te određivanjem duljine odsječaka PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3,5%). Sastav reakcijske smjese za PCR prikazan je u **Tablici 3.13**, a uvjeti umnažanja u **Tablici 3.14**.

Tablica 3.13. Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za polimorfizam *uVNTR* gena *MAOA*.

Sastojak	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	4,18
PCR pufer II (10×)	1×	1,00
10 nM dNTP mix (2,5 mM svaki)	0,2 mM	0,80
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	0,60
Q solution (5×)	1×	2,00
Početnica F (10 μM)	0,2 μM	0,20
Početnica R (10 μM)	0,2 μM	0,20
DNA (40 ng/μl)	4 ng/μL	1,00
Taq DNA polimeraza (5 U/μL)	0,10 U	0,02
Ukupni volumen (μL)		10,00

Tablica 3.14. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za polimorfizam *uVNTR* gena *MAOA*.

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95°C	2 min	1
Denaturacija	95°C	30 sek	
Nalijeganje početnica	59°C	30 sek	35
Produljivanje lanaca DNA	72°C	40 sek	
Završno produljivanje	72°C	7 min	1

Očekivani aleli i duljine odsječaka navedeni su u **Tablici 3.15**. Genotip su neovisno očitavale barem dvije osobe. U slučaju neslaganja, odsječak je ponovno umnožen i genotip je ponovno očitavan.

Tablica 3.15. Očekivane duljine odsječaka DNA za polimorfizam *uVNTR* gena *MAOA*.

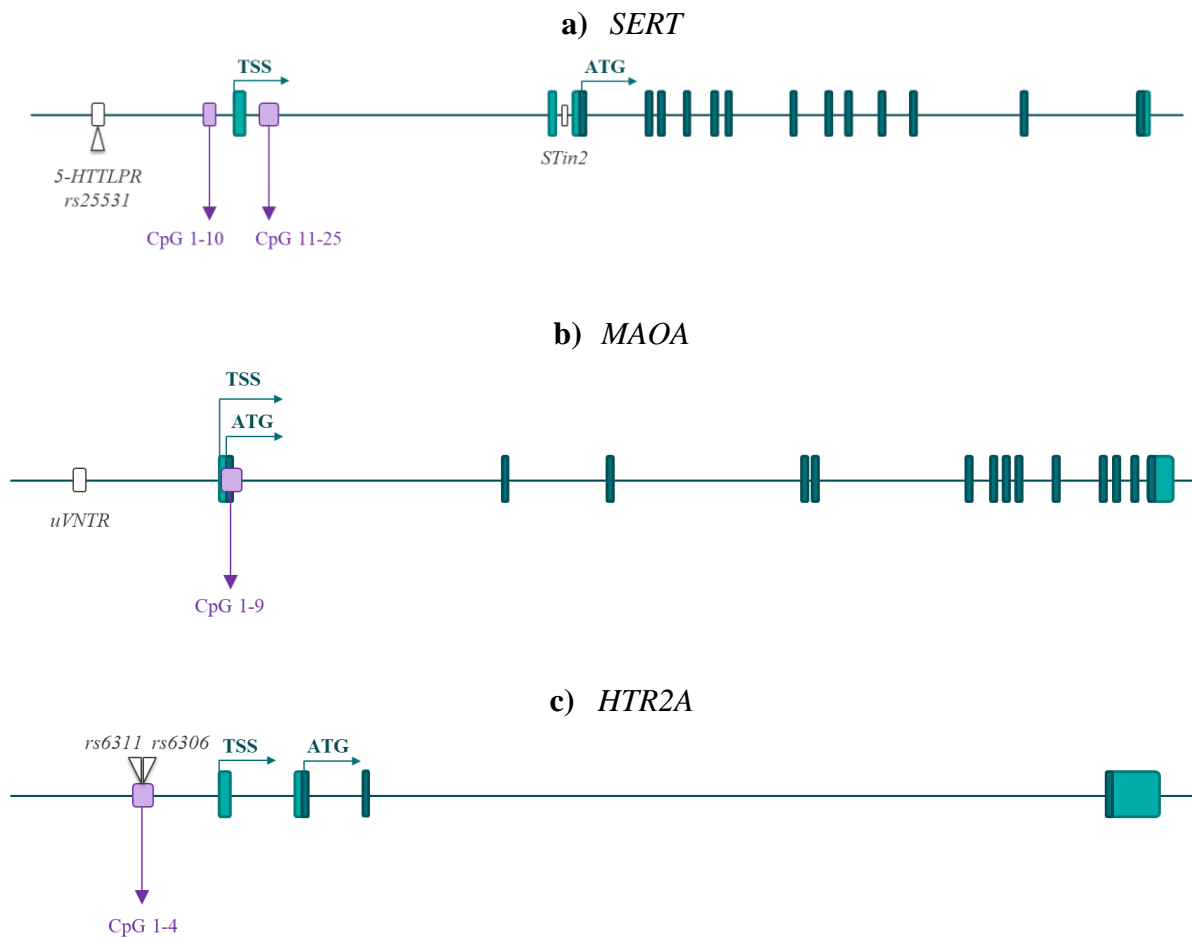
Alel (broj ponavljanja)	Očekivana duljina produkta PCR-a (pb)
2	279
3	309
3,5	324
4	339
4,5	354

3.14.3 *HTR2A*

SNP *rs6306* (-1421 C > T, Chr13: 46897326 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) u genu *HTR2A* genotipiziran je korištenjem reagensa za genotipizaciju TaqMan SNP prema uputama proizvođača. 20 ng genomske DNA umnoženo je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 10 µL korištenjem uređaja za PCR u stvarnom vremenu Applied Biosystems 7300. SNP *rs6311* (-1438 G > A, Chr13: 46897343 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) u genu *HTR2A* genotipiziran je vizualnom provjerom pirograma dobivenog u svrhu određivanja razine metilacije DNA u promotoru gena *HTR2A*.

3.15 Analiza metilacije molekule DNA

Analiza metilacije DNA provedena je metodom pirosekvenciranja DNA izložene bisulfitu (engl. *bisulfite pyrosequencing*) (Tost i Gut, 2007). U uzorcima tkiva posteljice analizirano je 15 CpG-mjesta u prvom intronu gena *SERT*, devet CpG-mjesta u prvom egzonu i prvom intronu gena *MAOA* te četiri CpG-mjesta u promotoru gena *HTR2A*, dok je u uzorcima stanica ACH-3P analizirano 10 CpG-mjesta u promotoru te 15 CpG-mjesta u prvom intronu gena *SERT* (**Tablica 3.16, Slika 3.2**)



Slika 3.2. Shematski prikaz strukture gena a) *SERT*, b) *MAOA* i c) *HTR2A* s naznačenim smještajem analiziranih polimorfizama i CpG-mjesta. Zeleni pravokutnici predstavljaju egzone (svijetlo zeleno – netranslatirani, tamno zeleno – translatirani), bijeli pravokutnici predstavljaju polimorfizme duljine, bijeli trokuti označavaju polimorfizme pojedinačnog nukleotida (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*), a ljubičasti pravokutnici predstavljaju regije u kojima je analizirana metilacija molekule DNA. TSS – mjesto početka transkripcije (TSS, engl. *Transcription Start Site*), ATG – mjesto početka translacije (kodon ATG). Genomske koordinate analiziranih polimorfizama navedene su u poglavlju **3.14** (Genotipizacija), a analiziranih CpG-mjesta u **Tablici 3.16**.

Tablica 3.16. Genomske koordinate analiziranih CpG-mjesta.

Simbol gena: Regija (CpG-mjesta)	# CpG mjesta	Kromosom	GRCh38 koordinate ^a	RefSeq koordinate ^b	TSS (pb) koordinate ^c	ATG (pb) koordinate ^d
SERT/SLCC6A4:						
Promotor (CpG 1-10)	1	17	Chr17: 30 236 173	4764	-476	-14214
	2	17	Chr17: 30 236 157	4780	-460	-14198
	3	17	Chr17: 30 236 142	4795	-445	-14183
	4	17	Chr17: 30 236 126	4810	-429	-14167
	5	17	Chr17: 30 236 121	4815	-424	-14162
	6	17	Chr17: 30 236 102	4835	-405	-14143
	7	17	Chr17: 30 236 091	4846	-394	-14132
	8	17	Chr17: 30 236 089	4848	-392	-14130
	9	17	Chr17: 30 236 084	4853	-387	-14125
	10	17	Chr17: 30 236 072	4865	-375	-14113
Intron 1 (CpG 11-21)	11	17	Chr17: 30 235 532	5405	166	-13573
	12	17	Chr17: 30 235 527	5410	171	-13568
	13	17	Chr17: 30 235 519	5418	179	-13560
	14	17	Chr17: 30 235 512	5425	186	-13553
	15	17	Chr17: 30 235 504	5433	194	-13545
	16	17	Chr17: 30 235 490	5447	208	-13531
	17	17	Chr17: 30 235 482	5455	216	-13523
	18	17	Chr17: 30 235 475	5462	223	-13516
	19	17	Chr17: 30 235 472	5465	226	-13513
	20	17	Chr17: 30 235 457	5480	241	-13498
Intron 1 (CpG 22-25)	22	17	Chr17: 30 235 272	5665	426	-13313
	23	17	Chr17: 30 235 247	5690	451	-13288
	24	17	Chr17: 30 235 203	5734	495	-13244
	25	17	Chr17: 30 235 201	5736	497	-13242
	MAOA:					
Egzon1 (CpG 1-9)	1	X	Chr23: 43 656 361	5201	62	18
	2	X	Chr23: 43 656 368	5208	69	25
	3	X	Chr23: 43 656 370	5210	71	27
	4	X	Chr23: 43 656 383	5223	84	40
	5	X	Chr23: 43 656 386	5226	87	43
	6	X	Chr23: 43 656 392	5232	93	49
	7	X	Chr23: 43 656 398	5238	99	55
Intron 1 (CpG 1-9)	8	X	Chr23: 43 656 427	5267	128	84
	9	X	Chr23: 43 656 432	5272	133	89
HTR2A:						
Promotor (CpG 1)	1	13	Chr13: 46 897 571	4464	-518	-1665
Promotor (CpG 2-3)	2	13	Chr13: 46 897 344	4691	-291	-1438
	3	13	Chr13: 46 897 326	4709	-273	-1420
Promotor (CpG 4)	4	13	Chr13: 46 897 130	4905	-77	-1224

a Koordinate u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38 (Genome Reference Consortium human genome build)

b Koordinate u referentnom slijedu (engl. *reference sequence*, RefSeq) pojedinog gena NG_011747.2 za *SERT*, NG_008957.2 za *MAOA* i NG_013011.1 za *HTR2A*.

c Koordinate u parovima baza (pb) u odnosu na mjesto početka transkripcije (TSS, engl. *Transcription Start Site*) mRNA NM_001045.6 za *SERT*, NM_000240.4 za *MAOA* i NM_000621.5 za *HTR2A*.

d Koordinate u parovima baza (pb) u odnosu na mjesto početka translacije (kodon ATG).

3.15.1 Tretiranje genomske DNA bisulfitom

Prevođenje nemetiliranih citozina u uracil provedena je izlaganjem genomske DNA bisulfitu (engl. *bisulfite conversion*). Izlaganje bisulfitu i naknadno pročišćavanje molekule DNA provedeno je korištenjem kompleta EZ DNA Methylation-Gold Kit, prema uputama proizvođača kompleta. Postupak je proveden s 800 ng DNA iz tkiva posteljice ili stanica ACH-3P. Kolonica za pročišćavanje DNA izložene bisulfitu je u zadnjem koraku inkubirana 10 minuta s 16 μ L otopine za eluiranje, nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem.

3.15.2 Umnažanje ciljnih odsječaka DNA izložene bisulfitu

Ciljni odsječci molekule DNA izložene bisulfitu umnožene su korištenjem kompleta (PyroMark PCR Kit) i početnica specifičnih za pojedini odsječak DNA. Sljedovi nukleotida početnica i duljine amplikona gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A* prikazani su u **Tablici 3.3**. Sastavi reakcijskih smjesa prikazani su u **Tablicama 3.17**, **3.18** i **3.19**, a uvjeti reakcija u **Tablici 3.20**. Uspješnost reakcije umnažanja potvrđena je elektroforezom odsječaka PCR-a u gelu agaroze (2%). Svaka pločica za PCR i analizu pirosekvenciranjem uključivala je negativnu kontrolu (bez kalupa DNA) i referentni uzorak.

Tablica 3.17. Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za analizu metilacije u promotoru i intronu 1 gena *SERT*.

Sastojak	Promotor (CpG 1-10)		Intron 1 (CpG 11-21)		Intron 1 (CpG 22-25)	
	konačna koncentracija	volumen (μ L)	konačna koncentracija	volumen (μ L)	konačna koncentracija	volumen (μ L)
H ₂ O	-	7,50	-	6,56	-	4,32
CoraLoad (10 \times)	1 \times	2,50	1 \times	2,00	1 \times	1,50
PyroMark-MM (2 \times)	1 \times	12,50	1 \times	10,00	1 \times	7,50
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 mM	0,50	-	-	1 mM	0,60
Početnica F (10 μ M)	0,2 μ M	0,50	0,2 μ M	0,40	0,2 μ M	0,30
Početnica R (10 μ M)	0,2 μ M	0,50	0,2 μ M	0,40	0,2 μ M	0,30
DNA modificirana bisulfitom	-	1,00	-	0,64	-	0,48
Ukupni volumen (μL)		25		20		15

Tablica 3.18. Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za analizu metilacije u egzonu 1 / intronu 1 gena *MAOA*.

Sastojak	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	5,1
CoraLoad (10×)	1×	1,50
PyroMark-MM (2×)	1×	7,50
Početnica F (10 μM)	0,2 μM	0,30
Početnica R (10 μM)	0,2 μM	0,30
DNA modificirana bisulfitom	-	0,30
Ukupni volumen (μL)		15,00

Tablica 3.19. Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom za analizu metilacije u promotoru gena *HTR2A*.

Sastojak	Promotor (CpG 1)		Promotor (CpG 2-3, CpG 4)	
	konačna koncentracija	volumen (μL)	konačna koncentracija	volumen (μL)
H ₂ O	-	7,70	-	13,50
CoraLoad (10×)	1×	2,50	1×	4,50
PyroMark-MM (2×)	1×	12,50	1×	22,50
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	0,50	2 mM	0,90
Početnica F (10 μM)	0,2 μM	0,50	0,2 μM	0,90
Početnica R (10 μM)	0,2 μM	0,50	0,2 μM	0,90
DNA modificirana bisulfitom	-	0,80	-	1,80
Ukupni volumen (μL)		25		45

Tablica 3.20. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za analizu metilacije gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A*.

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95°C	15 min	1
Denaturacija	95°C	30 sek	
Nalijeganje početnica	56°C	30 sek	50
Produljivanje lanaca DNA	72°C	30 / 40 sek *	
Završno produljivanje	72°C	7 min	1

*40 sek - (CpG 1) u genu *HTR2A*

3.15.3 Pirosekvenciranje i obrada rezultata

Umnoženi sljedovi DNA izložene bisulfitu pirosekvencirani su korištenjem kompleta za pirosekvenciranje (PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents) na uređaju za pirosekvenciranje (PyroMark Q24 Advanced Pyrosequencing System). Početnice korištene u

reakciji pirosekvenciranja (**Tablica 3.3**) obilježene su biotinom na 5' kraju kako bi se omogućila imobilizacija amplikona na magnetsku kuglicu obloženu streptavidinom, u svrhu pročišćavanja. Korištenjem programskog paketa PyroMark Q24 Software, za pojedino analizirano područje, na temelju specifičnog slijeda za analizu (prije modifikacije bisulfitom), generiran je slijed za dodavanje nukleotida (engl. *dispensation order*). Zadani sljedovi sadržavali su dodatno „prazne nukleotide“ (engl. *blank dispensation*) koji služe kao negativne kontrole te citozin izvan CpG-slijeda u svrhu kontrole modifikacije bisulfitom. Postotak metilacije DNA na pojedinim CpG-mjestima automatski je očitani korištenjem programskog paketa PyroMark Q24 Software. Vrijednosti koje nisu zadovoljile kontrolu kvalitete pirosekvenciranja i/ili su identificirane kao odstupajuće vrijednosti (engl. *outliers*), isključene su iz analiza. Svaka pločica za reakciju PCR i analizu pirosekvenciranjem uključivala je negativnu kontrolu (bez kalupa DNA) i referentni uzorak.

3.16 Eksperimenti na kulturi stanica

3.16.1 Uzgoj stanica

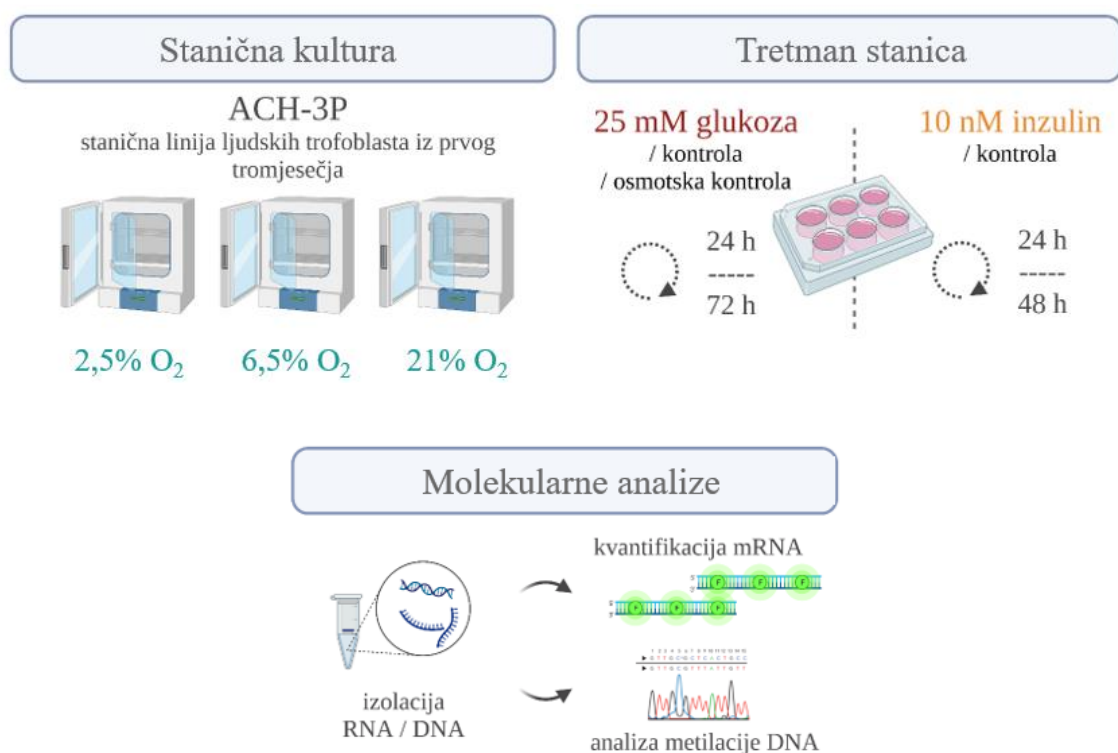
Stanice ACH-3P uzgajane su u bočicama za staničnu kulturu površine 75 cm², u mediju DMEM koji je sadržavao D-glukozu (5,5 mM), L-glutamin i natrijev piruvat (u pokusima tretmana s glukozom) ili u Hamovom mediju F-12 koji je sadržavao L-glutamin (u pokusima tretmana s inzulinom), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *Fetal Bovine Serum*) i 1% penicilina/streptomicina. Stanice su održavane pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂ i 21% O₂ u standardnom inkubatoru za staničnu kulturu, ili 5% CO₂ i 2,5% ili 6,5% O₂ u hipoksičnom inkubacijskom sustavu XVIVO (BioSpherix, Ltd., Parish, NY, SAD). Svakih pet pasaža, stanice su nasađivane u mediju koji je sadržavao azaserin (5.7 μM) i hipoksantin (100 μM) kako bi se selekcionirali trofoblasti i spriječilo prerastanje stanica koriokarcinoma.

3.16.2 Tretman stanica glukozom i inzulinom

Sažetak eksperimentalnog pristupa analize utjecaja glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina u staničnoj liniji trofoblasta ACH-3P prikazan je na **Slici 3.3**. Za tretmane glukozom i inzulinom, stanice ACH-3P su nasađene na pločice sa 6 jažica (15000 stanica po jažici) i uzgajane su prije tretmana u uvjetima s niskim sadržajem seruma (2% FBS). Cilj ovakvog pristupa bio je osigurati kontrolirane i

standardizirane eksperimentalne uvjete umanjujući potencijalne učinke inzulina, glukoze i serotonina koji su prisutni u serumu. Vremenske točke za tretmane odabrane su na temelju objavljenih studija o učincima glukoze i inzulina u modelima stanica trofoblasta (Easton i sur., 2023; Tandl i sur., 2021) i rezultata naših preliminarnih eksperimenata.

Za tretman glukozom, stanice ACH-3P uzgajane su tri dana prije tretmana u mediju s niskim sadržajem seruma u atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂ i 2,5%, 6,5% ili 21% O₂. Stanice su zatim inkubirane 24 ili 72 sata u mediju DMEM (s 2% FBS) koji je sadržavao D-glukozu u koncentraciji od 5,5 mmol/L (kontrola, normoglikemija) ili 25 mmol/L (hiperglikemija). Kao osmotska kontrola korišten je medij DMEM koji je sadržavao 5,5 mmol/L D-glukozu i 19,5 mmol/L L-glukozu. Koncentracije glukoze za oponašanje normoglikemije i hiperglikemije preuzete su iz studija o ulozi dijabetičkih razina glukoze u različitim modelima stanica (Wang i sur., 2022)), a također su korištene u prethodnim studijama naših suradnika na staničnoj liniji ACH-3P (Fröhlich i sur., 2012).



Slika 3.3. Sažetak eksperimentalnog pristupa analize utjecaja glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina u staničnoj liniji trofoblasta ACH-3P.

Za tretman inzulinom, stanice ACH-3P uzgajane su dva dana prije tretmana u mediju s niskim sadržajem seruma (2% FBS) u mediju Ham F-12, a zatim su inkubirane u odsutnosti (kontrola) ili prisutnosti 10 nM inzulina, pri 37 °C u vlažnoj atmosferi koja je sadržavala 5% CO₂ i 2,5% ili 6,5% O₂, tijekom 24 ili 48 sati. Koncentracija inzulina odabrana je na temelju prethodnih eksperimenata na stanicama ACH-3P, koji su pokazali da navedena koncentracija oponaša hiperinzulinemiju u našem eksperimentalnom modelu (Tandl i sur., 2021). Ova koncentracija također odgovara fiziološki relevantnoj postprandijalnoj koncentraciji inzulina (Song i sur., 2000).

U svrhu analize ekspresije mRNA i metilacije molekule DNA, stanice su po završetku tretmana isprane otopinom HBSS te homogenizirane snažnim struganjem u 350 µL pufera RLT Plus (iz kompleta za izdvajanje nukleinskih kiselina AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit) s dodatkom 1% β-merkaptoetanolu. Uzorci lizata stanica pohranjeni su pri -20°C do daljnje obrade. Daljnje molekularne analize uključivale su izdvajanje nukleinskih kiselina (opisano u poglavlju 3.9), analize ekspresije mRNA (opisano u poglavlju 3.10) te analize metilacije molekule DNA pirosekvenciranjem DNA izložene bisulfitu (opisano u poglavlju 3.15).

3.17 Statistička obrada podataka

Statističke analize provedene su korištenjem računalnih programa GraphPad Prism v.8 i IBM SPSS Statistics. Odstupajuće vrijednosti su pretražene korištenjem metode robusne regresije i uklanjanja odstupajućih vrijednosti (ROUT, engl. *Robust Regression and Outlier Removal*) sa vrijednošću Q (engl. *maximum false discovery rate*) postavljenom na 1% (Motulsky i Brown, 2006) ili metode po Grubbsu (Grubbs, 1969). Normalnost raspodjele podataka ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Usporedba između dvije ili više skupina podataka provedena je Studentovim t-testom ili jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) za podatke s normalnom raspodjelom te Mann-Whitney testom ili Kruskal-Wallisovim testom za podatke koji su odstupali od normalne raspodjele. Interakcija učinaka dviju nezavisnih varijabli provedena je korištenjem dvosmjernog testa ANOVA, za normalno distribuirane vrijednosti (Petz, 1997). Kontinuirane varijable korelirane su Pearsonovim ili Spearmanovim testom korelacije (ovisno o normalnosti raspodjele podataka). Za kontrolu mogućih utjecaja kovarijabli korištena je multipla linearna regresija. Korištenjem programa G*power (Faul i sur., 2009), određena je minimalna veličina uzorka od 192 za razinu učinka 0,10, vjerojatnost α pogreške od 5%, statističku jakost od 90 % i 6 prediktora.

Za određivanje utjecaja glukoze, inzulina i kisika te interakcije učinaka glukoze ili inzulina i kisika korištena je analiza kovarijance (ANCOVA) s brojem pasaže uključenim kao kovarijantom. Sidakov *post-hoc* test korišten je za korekciju višestrukih usporedbi. U slučaju uočene značajne interakcije učinaka nezavisnih varijabli, provedena je naknadna ANCOVA radi usporedbe između skupina. Statistički značajnim se smatrao $p < 0,05$.

4 **REZULTATI**

4.1 Podaci o sudionicima u istraživanju

Dio doktorskog rada proveden je na podskupini trudnica i novorođenčadi (parova majka i novorođenčce) kohorte rođenih (engl. *birth cohort*) PlaNS. Analize razina mRNA odabranih regulatornih gena serotonina u uzorcima tkiva posteljice provedene su na dvije skupine sudionika, tzv. otkrivajućoj (engl. *discovery*; $n = 123$) i replikacijskoj (engl. *replication*; $n = 93$) skupini. Na temelju rezultata dobivenih na otkrivajućoj skupini, definirane su analize koje su provedene na replikacijskoj skupini. Uzorci su ciljano oformljeni tako da sadrže podjednak broj sudionica s normalnom tolerancijom glukoze (NGT, engl. *Normal Glucose Tolerance*) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM) te da svaka od navedenih skupina sadrži podjednak broj sudionica s normalnom tjelesnom masom (NW, engl. *Normal Weight*) i prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću (OWO, engl. *Overweight / Obesity*) prije trudnoće, kao i podjednak broj muške i ženske novorođenčadi. S obzirom da su rezultati dobiveni u otkrivajućoj i replikacijskoj skupini slični, u nastavku će biti prikazani rezultati na skupnom uzorku ($n = 216$).

Osnovni demografski i klinički podaci o sudionicima istraživanja prikazani su u **Tablici 4.1.** (kontinuirane varijable) i **Tablici 4.2.** (kategoričke varijable). U skladu s dizajnom studije, skupine NGT i GDM nisu se razlikovale s obzirom na pITM (**Tablica 4.1.**) te s obzirom na udio žena s različitim pred-gestacijskim statusom tjelesne mase i na udio muške i ženske novorođenčadi (**Tablica 4.2.**).

Tablica 4.1. Demografske i kliničke karakteristike majki i novorođenčadi uključenih u istraživanje, s obzirom na status tolerancije glukoze majke (kontinuirane varijable).

Karakteristika	NGT ($n = 109$)	GDM ($n = 107$)	<i>p</i> -vrijednost
Dob majke pri porodu, godine	32,5 [29,8 – 36,7]	34,1 [31,1 – 38,1]	0,073 ^a
ITM prije trudnoće, kg/m ²	24,2 [21,4 – 30,1]	25,3 [22,6 – 29,5]	0,060 ^b
Prinos tjelesne mase u trudnoći, kg	15 [11 – 18]	12 [8 – 15]	0,0006 ^b
Gestacijska dob pri porodu, tjedni	39,3 [38,7 – 39,8]	39,1 [38,6 – 39,6]	0,136 ^a
Porodajna masa novorođenčeta, g	3450 [3190 – 3730]	3560 [3210 – 3840]	0,248 ^a
Porodajna duljina novorođenčeta, cm	50 [49 – 51]	50 [49 – 51]	0,857 ^a
Ponderalni indeks novorođenčeta, g/cm ³	2,81 [2,67-2,96]	2,82 [2,67-3,03]	0,442 ^b

Prikazani su medijani i interkvartilni rasponi. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, ITM – indeks tjelesne mase. Statistički značajne *p*-vrijednosti su podebljane. ^a t-test, ^b Mann-Whitney

Nadalje, dob majke pri porodu (**Tablica 4.1.**) kao ni paritet i udio žena koje su pušile u trudnoći (**Tablica 4.2.**) nije se razlikovao između skupina NGT i GDM. Sudionice u skupini NGT imale su, u prosjeku, 3 kg viši prinos tjelesne mase u trudnoći (GWG, engl. *Gestational Weight Gain*) od sudionica u GDM skupini ($p = 0,0006$, **Tablica 4.1.**). U skladu s dizajnom studije, svi porođaji su bili u punom terminu trudnoće (gestacijska dob ≥ 37 tjedana). Gestacijska dob te antropometrijske karakteristike novorođenčadi (porođajna masa, duljina i ponderalni indeks) nisu se razlikovale između skupina NGT i GDM (**Tablica 4.1.**). Sve sudionice s GDM-om bile su na prilagođenoj dijabetičkoj prehrani u svrhu kontrole razine glukoze u krvi.

Tablica 4.2. Demografske i kliničke karakteristike majki i novorođenčadi uključenih u istraživanje, s obzirom na status tolerancije glukoze majke (kategoričke varijable).

Karakteristika	NGT (n = 109)	GDM (n = 107)	<i>p</i> -vrijednost
Status tjelesne mase			
normalna tjelesna masa	60 (55,0 %)	51 (47,7 %)	0,246 ^b
prekomjerna tjelesna masa	21 (19,3 %)	31 (29,0 %)	
pretilost	28 (25,7 %)	25 (23,4 %)	
Spol novorođenčeta			
žensko	55 (50,5 %)	53 (49,5 %)	>0,999 ^c
muško	54 (49,5 %)	54 (50,5 %)	
Paritet			
prvorotkinje	43 (39,5 %)	40 (37,4 %)	0,781 ^c
višerotkinje	66 (60,5 %)	67 (62,6 %)	
Pušačice^a			
ne	79 (75,2 %)	75 (72,8 %)	0,753 ^c
da	26 (24,8 %)	28 (27,2 %)	

Prikazani su podatci o broju sudionika (n) i postotku (%). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus. ^a Žene koje su izjavile da nikad nisu pušile ili da su prestale pušiti najmanje 6 mjeseci prije trudnoće kategorizirane su kao nepušačice, dok su žene koje su izjavile da su pušile tijekom cijele trudnoće ili da su prestale pušiti tijekom trudnoće kategorizirane kao pušačice. Nejasni slučajevi (n = 8 u NGT, n = 4 u GDM) tretirani su kao podaci koji nedostaju. ^b hi-kvadrat test, ^c Fisherov egzaktan test

4.2 Povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninskog sustava posteljice

Da bismo istražili povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninskog sustava posteljice, usporedili smo razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici između četiri skupine sudionica s obzirom na status debljine i toleranciju glukoze u trudnoći

(u daljnjem tekstu: metaboličke skupine): **NGT-NW** (sudionice s NGT-om i pITM-om manjim od 25,0 kg/m², n = 60), **NGT-OWO** (sudionice s NGT-om i pITM-om jednakim ili većim od 25,0 kg/m²; n = 49), **GDM-NW** (sudionice s GDM-om i pITM-om manjim od 25,0 kg/m²; n = 51) i **GDM-OWO** (sudionice s GDM-om i pITM-om jednakim ili većim od 25,0 kg/m²; n = 56). Dodatno, istražili smo potencijalnu korelaciju pITM-a s razinama mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici, a u sudionica za koje smo imali dostupne biokemijske podatke o serumskim koncentracijama lipida (n = 154) i potencijalnu korelaciju serumske koncentracije lipida na kraju trudnoće s razinama mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici.

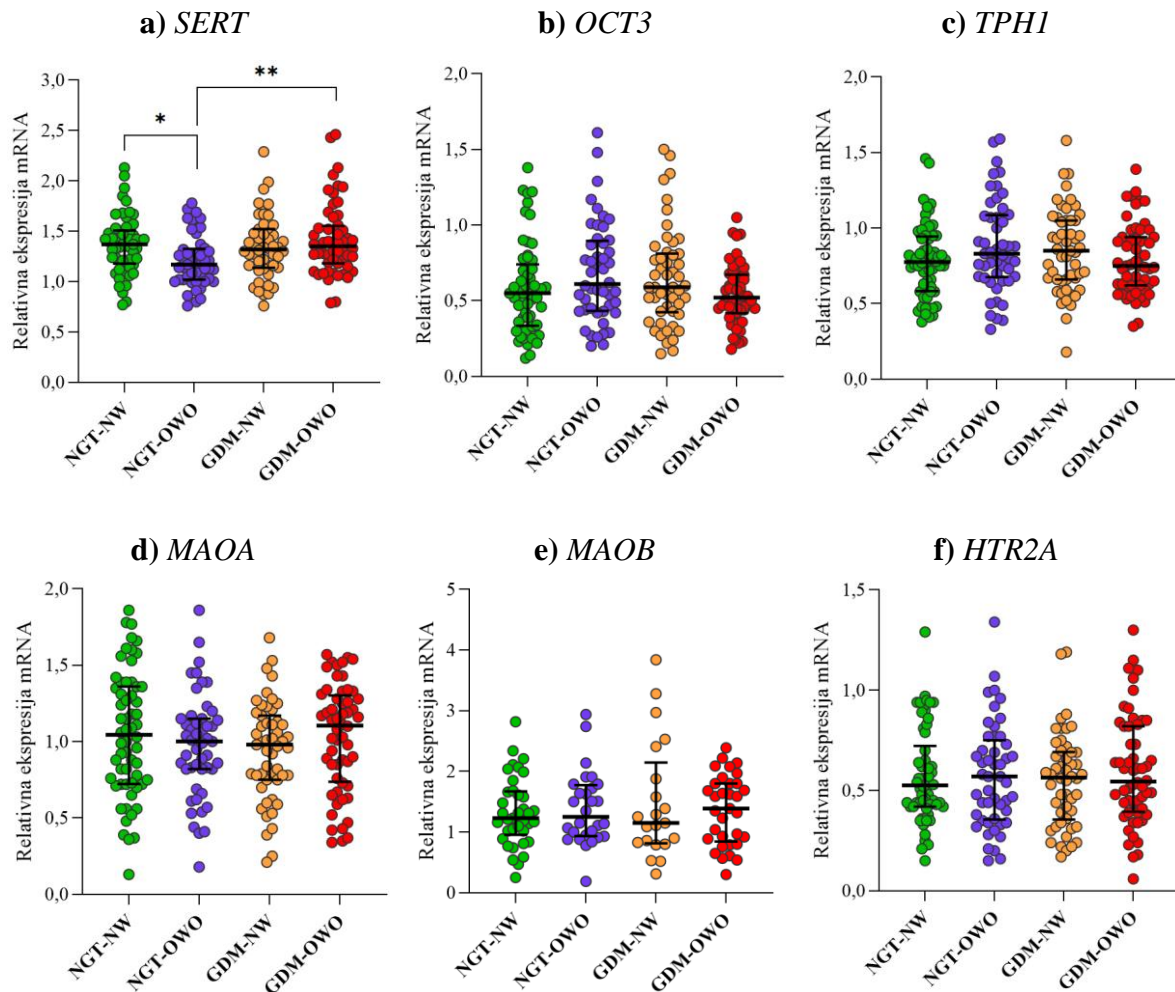
4.2.1 **Razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici u različitim metaboličkim skupinama**

Gen *SERT* kodira membranski prijenosnik visokog afiniteta i specifičnosti za serotonin. Razine mRNA gena *SERT* u posteljici (**Slika 4.1.a**), bile su slične u skupinama NGT-NW, GDM-NW i GDM-OWO, dok su u skupini NGT-OWO bile blago, ali statistički značajno niže nego u skupini NGT-NW (za 14,6%, $p = 0,013$) i skupini GDM-OWO (za 13,3%, $p = 0,008$). Sveukupno, rezultati pokazuju da je predgestacijska debljina povezana sa sniženom razinom mRNA *SERT* u posteljici trudnica s normalnom tolerancijom glukoze, ali ne i trudnica s GDM-om.

Gen *OCT3* kodira membranski prijenosnik niskog afiniteta i specifičnosti za serotonin. Razine mRNA gena *OCT3* u posteljici pokazale su relativno visoku inter-individualnu varijabilnost, pri čemu su u četiri uzorka bile izvan područja detekcije ($Cq > 45$), te su ti uzorci tretirani kao nedostajući podaci. Razine mRNA *OCT3* u posteljici nisu se statistički značajno razlikovale između četiri metaboličke skupine sudionica (**Slika 4.1.b**).

Gen *TPHI* kodira perifernu izoformu ključnog sintetskog enzima serotonina. Razine mRNA ovog gena u posteljici bile su relativno niske (Cq između 25,9 i 29,3) i nisu se statistički značajno razlikovale između istraživanih skupina (**Slika 4.1.c**).

Gen *MAOA* kodira izoformu ključnog kataboličkog enzima serotonina s najvišim afinitetom za serotonin u usporedbi s ostalim biogenim monoaminima. Razine mRNA *MAOA* u posteljici nisu se razlikovale između istraživanih skupina (**Slika 4.1.d**).



Slika 4.1. Razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici s obzirom na status tjelesne mase majke prije trudnoće i status tolerancije glukoze u trudnoći. Relativne razine mRNA gena a) *SERT*, b) *OCT3*, c) *TPH1*, d) *MAOA*, e) *MAOB* i f) *HTR2A* određene su metodom RT-qPCR i normalizirane su s obzirom na referentni uzorak i na razinu mRNA *YWHAZ*. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa prije trudnoće, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće. Prikazane su individualne vrijednosti te medijani i interkvartilni raspon. Razlike između skupina analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyev *post-hoc* test ili Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov *post-hoc* test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

U otkrivajućoj kohorti ($n = 123$), analizirali smo i gen *MAOB*, koji kodira izoformu MAO s niskim afinitetom za serotonin. Razine mRNA *MAOB* u posteljici bile su relativno niske (Cq između 25,0 i 31,1) u usporedbi s razinama mRNA *MAOA* (Cq između 17,4 i 24,0) i nisu se razlikovale između skupina (Slika 4.1.e). S obzirom na manji značaj *MAOB* u katabolizmu serotonina i opažene vrlo niske razine mRNA ove izoforme u posteljici, gen *MAOB* nismo analizirali u replikacijskoj kohorti.

Gen *HTR2A* kodira serotoninski receptor s različitim funkcijama u posteljici čovjeka. Razine mRNA *HTR2A* u posteljici pokazale su relativno nisku ekspresiju (Cq između 27,5 i 33,1) i nisu se statistički značajno razlikovale između metaboličkih skupina (**Slika 4.1.f**).

4.2.2 Povezanost pITM-a i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici

Kako bismo dodatno istražili povezanost između majčine debljine i ekspresije regulatornih gena serotonina u posteljici, analizirali smo korelaciju pITM-a s razinama mRNA navedenih gena u posteljici, u ukupnom uzorku sudionica te zasebno u sudionica s NGT-om ili GDM-om (**Tablica 4.3.**). pITM nije korelirao s razinama mRNA *OCT3*, *TPHI*, *MAOA*, *MAOB* i *HTR2A* ni u ukupnom uzorku niti u zasebnim analizama sudionica s NGT-om ili GDM-om. Međutim, primijećena je slaba ($r_s = -0,21$), ali statistički značajna ($p = 0,026$) negativna korelacija pITM-a s razinom mRNA *SERT* u sudionica s NGT-om, dok takve korelacije nije bilo u sudionica s GDM-om ($r_s = 0,03$; $p = 0,778$). Ovi rezultati dodatno potvrđuju povezanost predgestacijske debljine sa sniženom razinom mRNA *SERT* u posteljici trudnica s normalnom tolerancijom glukoze, ali ne i trudnica s GDM-om.

Tablica 4.3. Korelacija pITM-a i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici.

Gen	Ukupni uzorak (n = 216)		NGT (n = 109)		GDM (n = 107)	
	r_s	<i>p</i> -vrijednost	r_s	<i>p</i> -vrijednost	r_s	<i>p</i> -vrijednost
<i>SERT</i>	-0,11	0,105	-0,21	0,026	0,03	0,778
<i>OCT3</i>	0,08	0,275	0,16	0,108	-0,02	0,834
<i>TPHI</i>	0,05	0,498	0,09	0,330	-0,05	0,584
<i>MAOA</i>	-0,07	0,336	-0,15	0,122	0,08	0,434
<i>MAOB</i> ^a	0,03	0,756	-0,05	0,682	0,12	0,394
<i>HTR2A</i>	0,04	0,521	-0,02	0,853	0,10	0,318

NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije. ^a analize za *MAOB* su provedene samo na otkrivajućoj kohorti (n = 123; n = 68 u skupini NGT, n = 58 u skupini GDM). Statistički značajni rezultati su podebljani.

4.2.3 Povezanost koncentracija lipida u krvi i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici

Kako bismo istražili molekularne odrednice razina ekspresije regulatornih gena serotonina u posteljici, ispitali smo povezanost između koncentracija pojedinih lipida u krvi majke i razina mRNA navedenih gena u posteljici (**Tablica 4.4**). Analize smo proveli na podskupini sudionica (n = 154) s dostupnim podacima o profilu lipida na kraju trudnoće (specifično, 1 do 3 dana prije porođaja). Na ukupnom uzorku sudionica, primijetili smo

pozitivnu korelaciju koncentracije triglicerida i razine mRNA *SERT* te koncentracije HDL-kolesterola i razine mRNA *OCT3*, dok su koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola negativno korelirale s razinama mRNA *HTR2A* (Tablica 4.4). Iako su opažene korelacije bile statistički značajne (p između 0,032 i 0,006), bile su relativno slabe (r_s između -0,17 i 0,22). Koncentracija niti jednog od analiziranih lipida nije korelirala s razinama mRNA *MAOA* i *TPHI*.

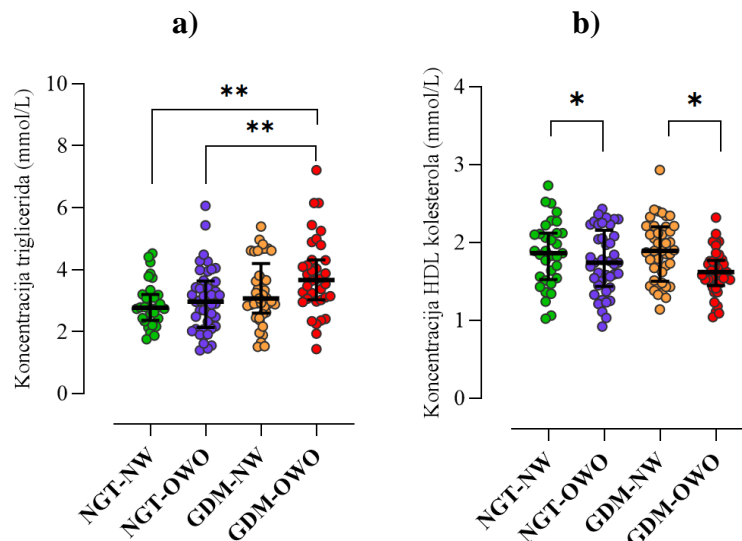
Tablica 4.4. Korelacija koncentracija triglicerida (Tg), ukupnog kolesterola (Chl), HDL-kolesterola i LDL-kolesterola u krvi majke s razinama mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici.

Gen	Ukupni uzorak (n = 154)				NGT (n = 75)				GDM (n = 79)			
	Tg	Chl	HDL	LDL	Tg	Chl	HDL	LDL	Tg	Chl	HDL	LDL
<i>SERT</i>												
r_s	0,17	0,09	-0,09	0,12	0,01	0,13	-0,14	0,22	0,22	0,08	-0,04	0,09
p	0,032	0,266	0,248	0,132	0,912	0,264	0,239	0,057	0,051	0,466	0,741	0,436
<i>OCT3</i>												
r_s	-0,10	0,09	0,19	0,09	-0,21	-0,01	0,22	-0,06	0,08	0,18	0,09	0,20
p	0,239	0,267	0,023	0,302	0,082	0,945	0,062	0,621	0,502	0,118	0,426	0,089
<i>TPHI</i>												
r_s	-0,08	-0,10	0,09	-0,09	-0,19	-0,13	0,20	-0,18	0,06	-0,08	-0,05	-0,01
p	0,299	0,240	0,281	0,275	0,112	0,262	0,096	0,120	0,615	0,507	0,642	0,903
<i>MAOA</i>												
r_s/r_p	-0,05	0,01 ^a	0,00 ^a	0,07 ^a	0,10	0,01 ^a	-0,06 ^a	0,09 ^a	-0,15	0,00 ^a	0,08 ^a	0,02
p	0,567	0,945	0,977	0,378	0,400	0,925	0,587	0,466	0,199	0,979	0,481	0,833
<i>HTR2A</i>												
r_s	-0,09	-0,21	0,05	-0,22	-0,16	-0,19	0,21	-0,16	0,01	-0,22	-0,13	-0,28
p	0,268	0,008	0,579	0,006	0,162	0,100	0,076	0,174	0,928	0,050	0,243	0,013

NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije. ^a Pearsonov koeficijent korelacije, sve ostale vrijednosti se odnose na Spearmanov koeficijent korelacije. Ove analize nisu provedene za gen *MAOB* zbog malog broja uzoraka. Statistički značajni rezultati su podebljani.

Zasebnim analizama na podskupinama sudionica s NGT-om i GDM-om pokazana je korelacija između koncentracije triglicerida i razine mRNA *SERT* prisutna samo u sudionica s GDM-om, a HDL-kolesterola i razine mRNA *OCT3* samo u sudionica s NGT-om (Tablica 4.4). S obzirom na rezultate analiza povezanosti koncentracija lipida i razina mRNA u podskupinama sudionica s NGT-om i GDM-om, usporedili smo koncentracije triglicerida i HDL-kolesterola između metaboličkih skupina sudionica. Koncentracije triglicerida bile su značajno više u skupini GDM-OWO u odnosu na skupine NGT-NW ($p = 0,003$) i NGT-OWO

($p = 0,008$, **Slika 4.2.a**). Koncentracije HDL-kolesterola bile su značajno niže u skupini NGT-OWO u odnosu na NGT-NW ($p = 0,048$) te u skupini GDM-OWO u odnosu na GDM-NW ($p = 0,011$, **Slika 4.2.b**) što upućuje na učinak debljine, ali ne GDM-a, na razinu HDL-kolesterola. Sveukupno, rezultati upućuju na povezanost lipidnog profila u krvi majke i homeostaze serotonina u posteljici te naglašavaju važnost daljnjih istraživanja u kontekstu različitog statusa tolerancije glukoze u trudnoći.



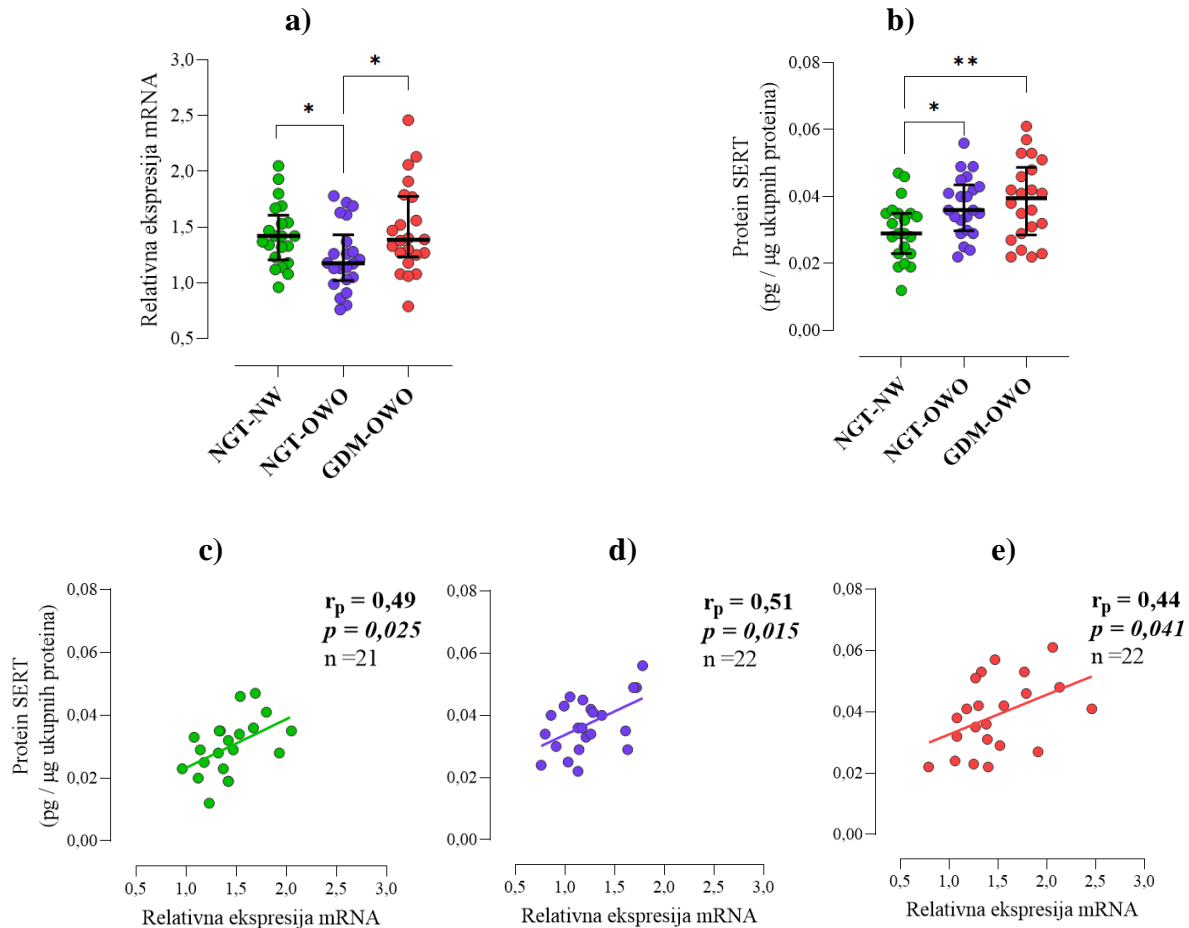
Slika 4.2. Koncentracija **a)** triglicerida i **b)** HDL-kolesterola u krvi majke s obzirom na majčin status tjelesne mase prije trudnoće i status tolerancije glukoze u trudnoći. Prikazane su individualne vrijednosti te medijani i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyev post-hoc test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.2.4 Razina proteina SERT u posteljici

Da bismo detaljnije istražili odnos između majčinog metaboličkog stanja i ekspresije gena SERT u posteljici, odredili smo i razine proteina SERT (metodom ELISA) u odabranim uzorcima posteljica iz skupina NGT-NW ($n = 21$), NGT-OWO ($n = 22$) i GDM-OWO ($n = 22$). Uzorci za analizu proteina SERT odabrani su slučajnim odabirom po pet do šest uzoraka iz svakog kvartila vrijednosti mRNA odgovarajuće skupine.

Sukladno rezultatima na ukupnom uzorku (**Slika 4.1.a**), razine mRNA SERT u odabranim uzorcima posteljice (**Slika 4.3.a**) bile su niže u skupini NGT-OWO nego skupinama NGT-NW ($p = 0,049$) i GDM-OWO ($p = 0,015$), a nisu se razlikovale između NGT-NW i GDM-OWO ($p = 0,652$). Međutim, suprotno našem očekivanju, razine proteina SERT (**Slika**

4.3.b) bile su više u skupini NGT-OWO nego NGT-NW ($p = 0,021$) te više u skupini GDM-OWO nego NGT-NW ($p = 0,005$). Također je uočen statistički značajan linearni trend između istraživanih skupina, s najnižim vrijednostima u skupini NGT-NW, srednjim u NGT-OWO i najvišim u GDM-OWO ($p = 0,036$, test za linearni trend).



Slika 4.3. Razine **a)** mRNA *SERT* i **b)** proteina SERT te korelacija razine mRNA *SERT* i proteina SERT u posteljici u skupinama **c)** NGT-NW, **d)** NGT-OWO i **e)** GDM-OWO. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na referentni uzorak i na razinu mRNA *YWHAZ*, a razina proteina određena je metodom ELISA. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa prije trudnoće, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće, r_p – Pearsonov koeficijent korelacije. **a)** i **b)** Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon svake metaboličke skupine; razlike među skupinama analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Fisherov LSD (engl. *Least Significant Difference*) post-hoc test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Statistički značajni rezultati su podebljani.

U sve tri metaboličke skupine – NGT-NW (**Slika 4.3.c**), NGT-OWO (**Slika 4.3.d**) i GDM-OWO (**Slika 4.3.e**) – uočena je pozitivna korelacija između razina mRNA *SERT* i razina proteina SERT. Također se može uočiti da su regresijski pravci pojedinih skupina međusobno

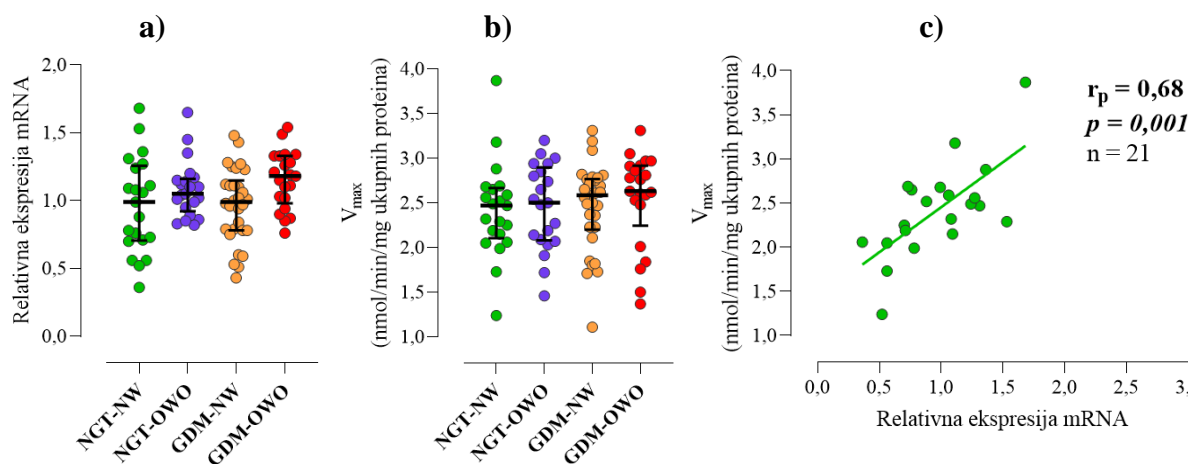
paralelni, s podjednakim vrijednostima koeficijenta nagiba (0,016 u skupini NGT-NW; 0,015 u skupini NGT-OWO; 0,013 u skupini GDM-OWO). Ovi rezultati upućuju na podjednaku efikasnost translacije u svim skupinama te sugeriraju da povišene razine proteina SERT u uvjetima majčine debljine nisu posljedica povećane sinteze već potencijalno smanjene razgradnje proteina SERT.

Sveukupno, moglo bi se zaključiti da je opažena smanjena razina mRNA *SERT* u skupini NGT-OWO moguć pokušaj kompenzacije suviška proteina SERT smanjenom transkripcijom gena *SERT*. Nepromijenjena razina mRNA *SERT* u skupini GDM-OWO upućuje da ovaj kompenzacijski mehanizam izostaje u uvjetima poremećene tolerancije glukoze te su posljedično razine proteina SERT najviše u skupini GDM-OWO.

4.2.5 Enzimska aktivnost MAOA u posteljici

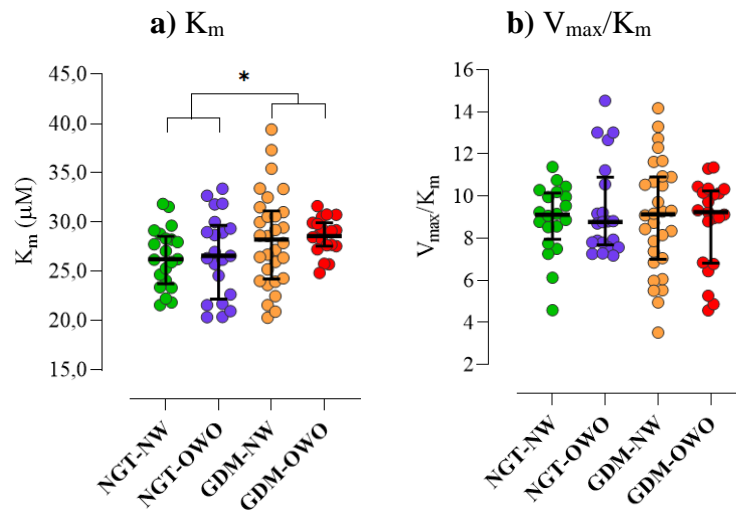
U replikacijskom uzorku ($n = 94$), odredili smo enzimsku aktivnost MAOA u posteljici kako bismo istražili potencijalne razlike u enzimskoj kinetici između metaboličkih skupina te potencijalnu povezanost razine mRNA gena *MAOA* i maksimalne brzine enzimske reakcije (V_{\max}) kao aproksimativne mjere ukupne količine aktivnog proteina.

Metaboličke skupine nisu se razlikovale u razini mRNA *MAOA* (**Slika 4.4.a**), u skladu s rezultatom na ukupnom uzorku (**Slika 4.1.d**). Između skupina nije bilo razlika niti u maksimalnoj brzini enzimske reakcije (V_{\max}), kao aproksimativnoj mjeri ukupne količine aktivnog proteina MAOA (**Slika 4.4.b**). Zanimljivo, u skupini NGT-NW, više razine mRNA bile su povezane s višim vrijednostima V_{\max} ($r_p = 0,68$, $p = 0,001$, **Slika 4.4.c**), dok korelacije između razine mRNA i vrijednosti V_{\max} nije bilo u skupinama NGT-OWO ($r_s = -0,06$, $p = 0,810$, $n = 21$), GDM-NW ($r_p = 0,17$, $p = 0,370$, $n = 30$) i GDM-OWO ($r_p = 0,22$, $p = 0,330$, $n = 21$).



Slika 4.4. a) Razine mRNA *MAOA* i **b)** maksimalne brzine enzimske reakcije (V_{\max}) *MAOA* te **c)** korelacija razine mRNA *MAOA* i V_{\max} u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na referentni uzorak i na razinu mRNA *YWHAZ*. Maksimalna brzina enzimske reakcije određena je uz prisutnost kinuramina kao supstrata te je izračunata iz Michaelis-Mentenine krivulje enzimske kinetike. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa prije trudnoće, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, r_p – Pearsonov koeficijent korelacije. **a)** i **b)** Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon. Razlike između skupina analizirane su **a)** Kruskal-Wallisovim testom ($KW = 7,8$, $p = 0,049$) uz Dunnov *post-hoc* test (svi $p > 0,05$) ili **b)** jednosmjernom analizom varijance (ANOVA; $R^2 = 0,01$, $p = 0,895$) uz Tukeyev *post-hoc* test (svi $p > 0,05$). Statistički značajni rezultati su podebljani.

Nadalje, usporedili smo funkcionalnost enzima *MAOA* između metaboličkih skupina. Michaelisova konstanta (K_m), mjera afiniteta enzima za supstrat, značajno se razlikovala između metaboličkih skupina ($R^2 = 0,06$, $p = 0,002$, **Slika 4.5.a**). Budući da *post-hoc* test nije pokazao statistički značajne razlike između pojedinih skupina (svi $p > 0,05$), rezultate smo analizirali i dvosmjernom analizom varijance (ANOVA). Analiza je pokazala statistički značajan učinak statusa tolerancije glukoze na K_m ($p = 0,023$), pri čemu su skupine s GDM-om imale viši K_m u odnosu na skupine s NGT-om. Ovaj rezultat upućuje na to da je afinitet enzima *MAOA* prema supstratu snižen u posteljicama iz trudnoća s GDM-om. Katalitička učinkovitost enzima, izračunata kao omjer V_{\max} i K_m nije se značajno razlikovala između metaboličkih skupina ($R^2 = 0,01$, $p = 0,318$, **Slika 4.5.b**).



Slika 4.5. Funkcionalnost proteina MAOA u posteljici: **a)** Michaelis-Mentenina konstanta (K_m) i **b)** katalitička učinkovitost enzima (V_{max}/K_m); s obzirom na majčin status tjelesne mase prije trudnoće i status tolerancije glukoze u trudnoći. Aktivnost enzima određena je reakcijom uz prisutnost kinuramina kao supstrata te izračunata iz Michaelis-Mentenine krivulje enzimske kinetike. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon. Učinci su analizirani dvosmjernom analizom varijance (ANOVA). **a)** $p = 0,749$ za učinak statusa debljine, $p = 0,023$ za učinak statusa tolerancije glukoze; **b)** $p = 0,569$ za učinak statusa debljine, $p = 0,848$ za učinak statusa tolerancije glukoze.

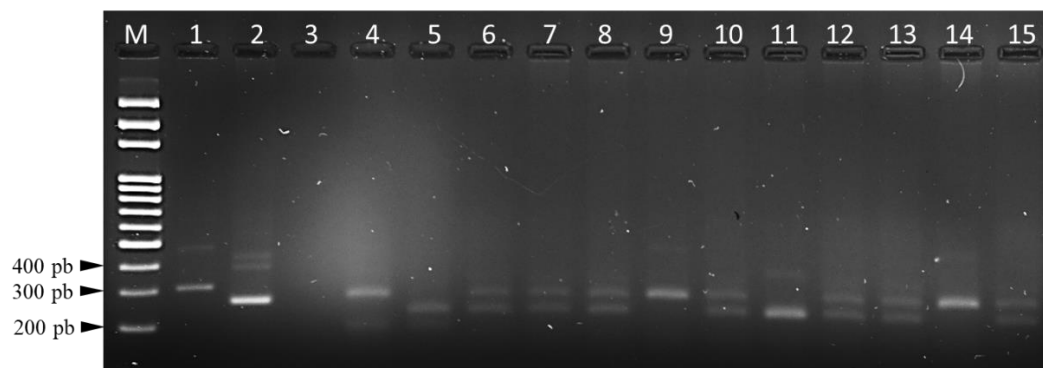
4.3 Povezanost polimorfizama i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici

Da bismo istražili povezanost polimorfizama u nukleotidnom slijedu gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A* s njihovom ekspresijom u posteljici, prvo smo usporedili učestalosti genotipova između novorođenčadi majki s NGT-om i majki s GDM-om, a zatim smo usporedili razine mRNA pojedinog gena u posteljici između odgovarajućih skupina genotipova.

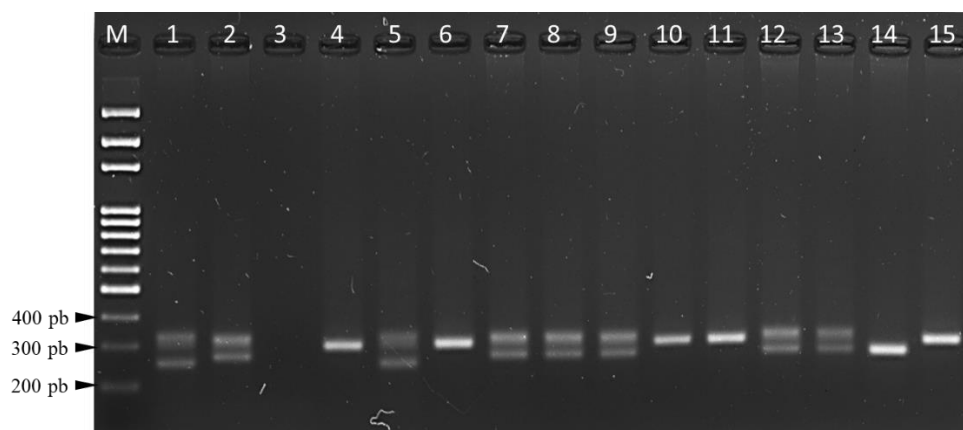
4.3.1 Polimorfizmi gena *SERT*

U genu *SERT* analizirali smo jedan polimorfizam duljine (*5HTTLPR*) i jedan polimorfizam pojedinačnog nukleotida (*rs25532*) u promotorskoj regiji (**Slika 4.6.**) te jedan polimorfizam duljine u drugom intronu (*STin2*, **Slika 4.7.**). Opažene učestalosti genotipova na ukupnom uzorku nisu odstupale od Hardy-Weinbergove ravnoteže ($p = 0,961$ za *5HTTLPR*, $p = 0,797$ za *5HTTLPR/rs25532*, $p = 0,692$ za *STin2*). Učestalosti genotipova nisu se razlikovale

između novorođenčadi majki s NGT-om i GDM-om niti za jedan od analiziranih polimorfizama (Tablica 4.5).



Slika 4.6. Produkti lančane reakcije polimerazom (jažice 1-3) i razgradnje odsječaka PCR-a restriksijskom endonukleazom *MspI* (jažice 4-15) u svrhu određivanja polimorfizama *5HTTLPR* i *rs25531* gena *SERT*. Elektroforeza je provedena u gelu agaroze (3%). Produkti PCR-a: jažica 1 – genotip S/S, jažica 2 – genotip L/L, jažica 3 – negativna kontrola. Produkti razgradnje: jažica 4 – genotip La/Lg, jažica 5 – genotip Lg/S, jažice 6, 7, 8, 10, 12, 13 i 15, - genotip La/S, jažice 9 i 14 – genotip La/La, jažica 11 – genotip S/S. M - standard duljine odsječaka DNA.



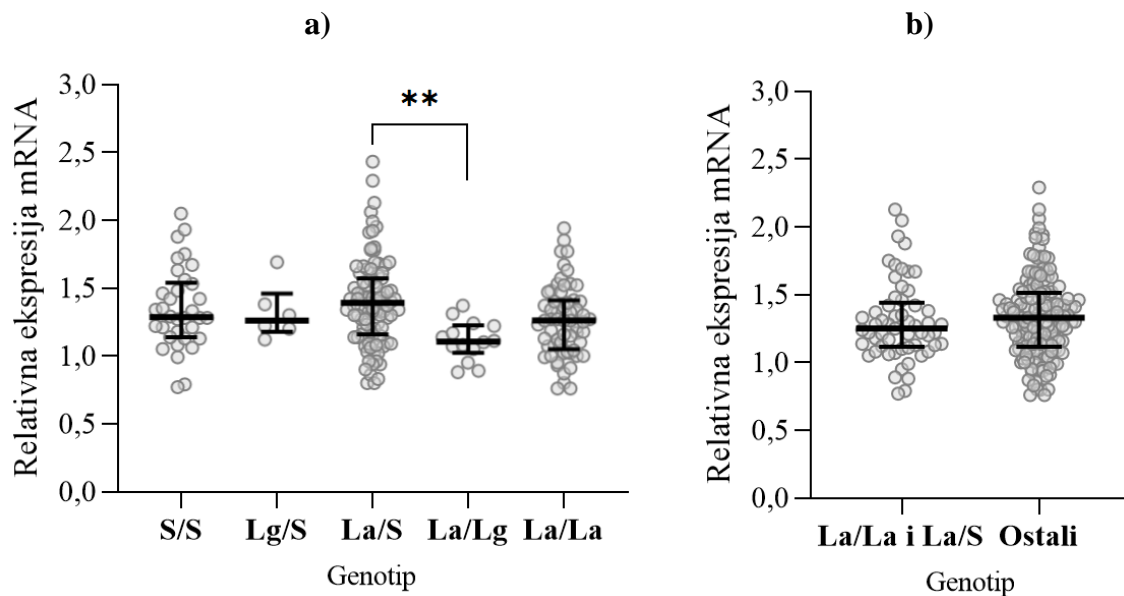
Slika 4.7. Produkti lančane reakcije polimerazom u svrhu određivanja polimorfizma *STin2* gena *SERT*. Elektroforeza je provedena u gelu agaroze (3%). Jažice 1 i 5 – genotip 12/9, jažice 2, 7, 8, 9, 12 i 13 – genotip 12/10, jažica 3 – negativna kontrola, jažice 4, 6, 10, 11 i 15 – genotip 12/12, jažica 14 – genotip 10/10. M - standard duljine odsječaka DNA.

Tablica 4.5. Učestalosti genotipova polimorfizama u promotoru (*5HTTLPR*, *5HTTLPR/rs25532*) i drugom intronu (*STin2*) gena *SERT* u novorođenčadi majki s normalnom tolerancijom glukoze (NGT) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

Polimorfizam Genotip	NGT (n = 109)	GDM (n = 107)	<i>p</i> -vrijednost ^a
<i>5HTTLPR</i>			
S/S	18 (16,5 %)	16 (15,0 %)	0,861
S/L	50 (45,9 %)	53 (49,5 %)	
L/L	41 (37,6 %)	38 (35,5 %)	
<i>5HTTLPR/rs25532</i>			
S/S	18 (16,5 %)	16 (15,0 %)	0,515
Lg/S	1 (0,9 %)	5 (4,7 %)	
La/S	49 (45,0 %)	48 (44,9 %)	
Lg/Lg	0 (0,0 %)	1 (0,9 %)	
La/Lg	8 (7,3 %)	9 (8,4 %)	
La/La	33 (30,3 %)	28 (26,2 %)	
<i>STin2</i>			
12/12	30 (27,5 %)	37 (34,6 %)	0,502
12/10	57 (52,3 %)	50 (46,7 %)	
10/10	17 (15,6 %)	16 (15,0 %)	
12/9	3 (2,8 %)	4 (3,7 %)	
10/9	2 (1,8 %)	0 (0,0 %)	

Prikazani su broj (n) i postotak (%). ^a hi-kvadrat test.

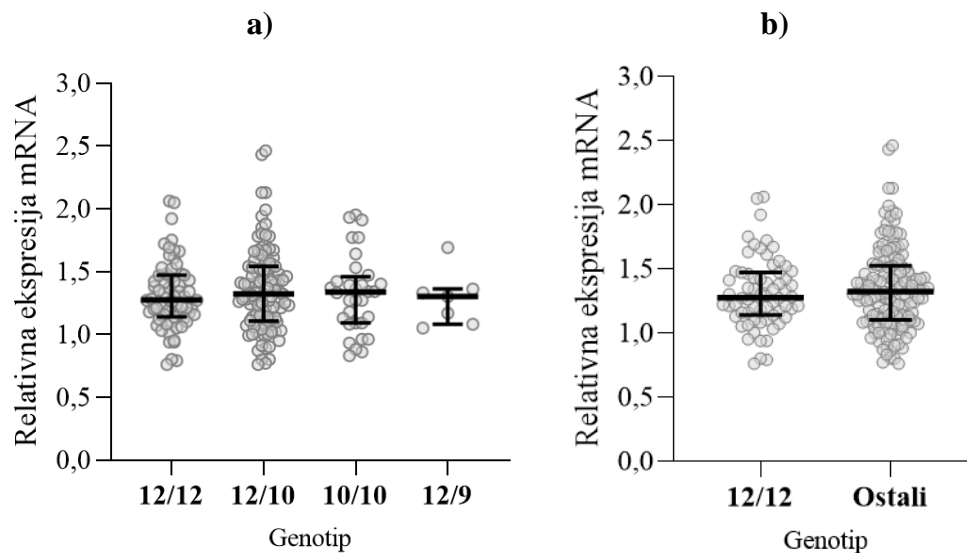
Na **Slici 4.8.a** prikazane su razine mRNA *SERT* u posteljici u skupinama genotipova trialelnog sustava (*5HTTLPR/rs25532*) polimorfizma u promotoru gena *SERT*. Razina mRNA *SERT* u posteljici značajno se razlikovala među skupinama genotipova (KW = 17,36; $p = 0,002$). *Post-hoc* test je pokazao da je bila viša u skupini s genotipom La/S u odnosu na skupinu s genotipom La/Lg ($p = 0,003$), dok se nije razlikovala između ostalih skupina genotipova (**Slika 4.8.a**). U nastavku smo genotipove razvrstali u skupinu s visokom ekspresijom i skupinu s niskom ekspresijom. S obzirom na to da se alel La povezuje s višom ekspresijom mRNA gena *SERT* u odnosu na alele Lg i S (Murphy i Moya, 2011), homozigotnom genotipu La/La smo dodijelili status genotipa s visokom ekspresijom, dok smo genotipove S/S, Lg/S i Lg/Lg razvrstali u skupinu s niskom ekspresijom.



Slika 4.8. Razina mRNA gena *SERT* u posteljici u ovisnosti o trialelnom polimorfizmu *5HTTLPR/rs25532* u promotoru gena *SERT*. Relativna razina mRNA *SERT* u uzorcima posteljice određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazane su **a)** razine mRNA s obzirom na genotip *5HTTLPR/rs25532* (genotip Lg/Lg nije prikazan, $n = 1$) i **b)** razine mRNA u skupini genotipova s visokom (La/La, $n = 61$ i La/S, $n = 97$) i niskom (S/S, $n = 34$; Lg/S, $n = 6$; La/Lg, $n = 17$ i Lg/Lg, $n = 1$) ekspresijom prema literaturnim i opaženim podacima (vidi tekst za detalje). Prikazane su individualne vrijednosti te medijani i interkvartilni raspon svake od genotipnih skupina. Razlike između skupina analizirane su **a)** Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov *post-hoc* test ili **b)** Mann-Whitneyevim testom. ** $p < 0,01$

Genotipove s kombinacijom jednog alela s visokom ekspresijom (La) i jednog alela s niskom ekspresijom (S ili Lg) smo razvrstali sukladno opažanju na ispitivanom uzorku (**Slika 4.8.a**), tj. genotip La/S smo razvrstali u skupinu genotipova s visokom ekspresijom, dok smo genotip La/Lg razvrstali u skupinu genotipova s niskom ekspresijom. S obzirom na takvo razvrstavanje, na ispitivanom uzorku nije uočena razlika u razini mRNA među skupinama ($p = 0,336$; **Slika 4.8.b**).

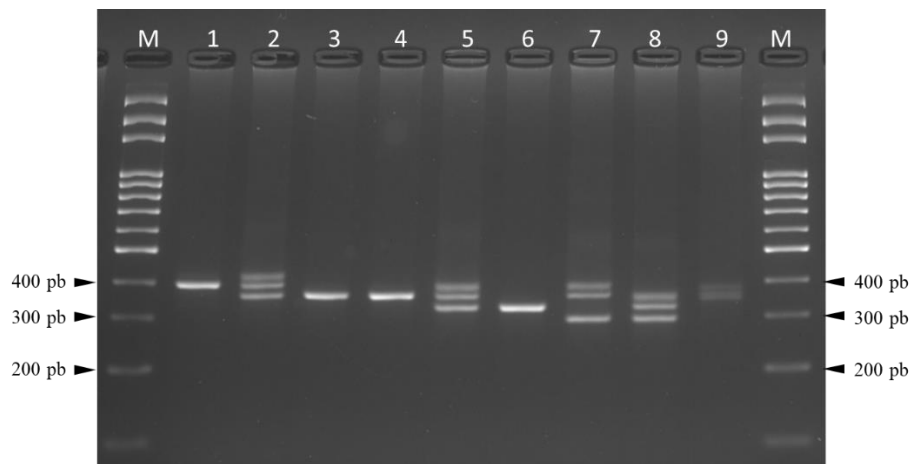
Razina mRNA *SERT* u posteljici nije se razlikovala s obzirom na genotip polimorfizma *STin2* (KW = 0,77, $p = 0,9429$, **Slika 4.9.a**). Razina mRNA nije se razlikovala ($p = 0,615$) niti među skupinama grupiranim sukladno literaturnim podacima (Hranilovic i sur., 2004), prema kojima su genotipovi razvrstani u visoko ekspimirajući (12/12) i nisko ekspimirajuće (12/10, 10/10, 12/9) genotipove (**Slika 4.9.b**).



Slika 4.9. Razina mRNA *SERT* u posteljici u ovisnosti o polimorfizmu *STin2* u drugom intronu gena *SERT*. Relativna razina mRNA *SERT* u uzorcima posteljice određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazane su **a)** razine mRNA s obzirom na genotip *STin2* (genotip 10/9 nije prikazan, $n = 2$) i **b)** razine mRNA u skupini genotipova s visokom (12/12, $n = 67$) i niskom (12/10, $n = 107$; 10/10, $n = 33$; 12/9, $n = 7$ i 10/9, $n = 2$) ekspresijom prema literaturnim podacima (vidi tekst za detalje). Prikazane su individualne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon svake od genotipnih skupina. Razlike među skupinama analizirane su **a)** Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov *post-hoc* test ili **b)** Mann-Whitneyevim testom. Sve p -vrijednosti bile su veće od 0,05.

4.3.2 Polimorfizam gena *MAOA*

U genu *MAOA* analizirali smo polimorfizam *uVNTR* u području promotora (**Slika 4.10**), koji se sastoji od nukleotidnog slijeda duljine 30 pb prisutnog u 2, 3, 3,5, 4 ili 4,5 kopija (Sabol i sur., 1998). S obzirom na smještaj gena *MAOA* na kromosomu X, muška novorođenčad je hemizigotna, te je analiza usklađenosti s Hardy-Weinbergovom ravnotežom provedena prema metodi prilagođenoj za X-vezane gene (Graffelman i Weir, 2016). Učestalost genotipova polimorfizma *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* na ukupnom uzorku bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ($p = 0,966$). Učestalost genotipova nije se razlikovala između skupina NGT i GDM (**Tablica 4.6**).



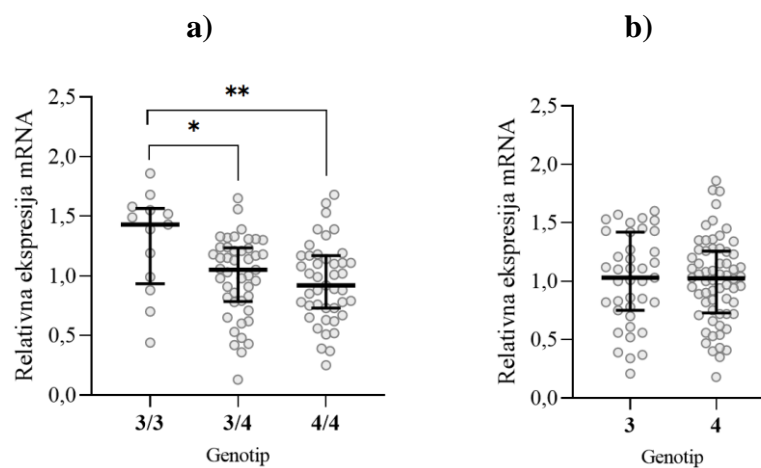
Slika 4.10. Produkti lančane reakcije polimerazom u svrhu određivanja polimorfizma *uVNTR* gena *MAOA*. Elektroforeza je provedena u gelu agaroze (3,5%). Jažica 1 – genotip 4,5/4,5, jažica 2 – genotip 4/4,5*, jažice 3 i 4, genotip 4/4, jažica 5 – genotip 3/4*, jažica 6, genotip 3/3, jažica 7 – genotip 2/4*, jažica 8 – genotip 2/3*, jažica 9 genotip 3,5/4*. M - standard duljine odsječaka DNA. *U heterozigota postoji dodatna vrpca iznad odsječaka očekivanih duljina, koja je heterodupleks kraćeg i duljeg lanca DNA.

Tablica 4.6. Učestalosti genotipova polimorfizma *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* u novorođenčadi majki s normalnom tolerancijom glukoze (NGT) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

Spol Genotip <i>uVNTR</i>	NGT (n = 109)	GDM (n = 107)	<i>p</i> -vrijednost ^a
Ženska novorođenčad			
2/4	1 (1,8 %)	0 (0,0 %)	0,627
3/3	7 (12,7 %)	6 (11,3 %)	
3/3,5	1 (1,8 %)	1 (1,9 %)	
3/4	23 (41,8 %)	22 (41,5 %)	
3/4,5	1 (1,8 %)	0 (0,0 %)	
3,5/4	0 (0,0 %)	1 (1,9 %)	
4/4	20 (36,4 %)	23 (43,4 %)	
4/4,5	2 (3,6 %)	0 (0,0 %)	
Muška novorođenčad			
3	16 (29,6 %)	23 (42,6 %)	0,235
3,5	1 (1,9 %)	0 (0,0 %)	
4	36 (66,7 %)	28 (51,9 %)	
4,5	1 (1,9 %)	3 (5,6 %)	

Prikazani su broj (n) i postotak (%). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus. ^a hi-kvadrat test.

Usporedbe razine mRNA u posteljici s obzirom na polimorfizam *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* provedene su samo za učestale genotipove, koji su bili dokazani u više od pet sudionika (specifično, genotipovi 3/3, 3/4 i 4/4 za žensku te 3 i 4 za mušku novorođenčad). U ženske novorođenčadi, razina mRNA gena *MAOA* u posteljici bila je viša u skupini s genotipom 3/3 u odnosu na genotipove 3/4 ($p = 0,022$) i 4/4 ($p = 0,006$), dok između genotipova 3/4 i 4/4 nije bilo razlike (**Slika 4.11.a**). U muške novorođenčadi, nije bilo razlike u razini mRNA između hemizigotnih genotipova 3 i 4 ($p = 0,936$, **Slika 4.11.b**).



Slika 4.11. Razina mRNA gena *MAOA* u posteljici u ovisnosti o polimorfizmu *uVNTR* u promotoru gena *MAOA*. Relativna razina mRNA *MAOA* u uzorcima posteljice određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazane su razine mRNA s obzirom na genotip *uVNTR* u **a**) ženske novorođenčadi (rijetki genotipovi, 2/4 ($n = 1$), 3/3,5 ($n = 2$), 3/4,5 ($n = 1$), 3,5/4 ($n = 1$) i 4/4,5 ($n = 2$), nisu prikazani) i **b**) muške novorođenčadi (rijetki genotipovi, 3,5 ($n = 1$) i 4,5 ($n = 4$), nisu prikazani). Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon svake od genotipnih skupina. Razlike među skupinama analizirane su **a**) jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyev *post-hoc* test ili **b**) t-testom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.3.3 Polimorfizmi gena *HTR2A*

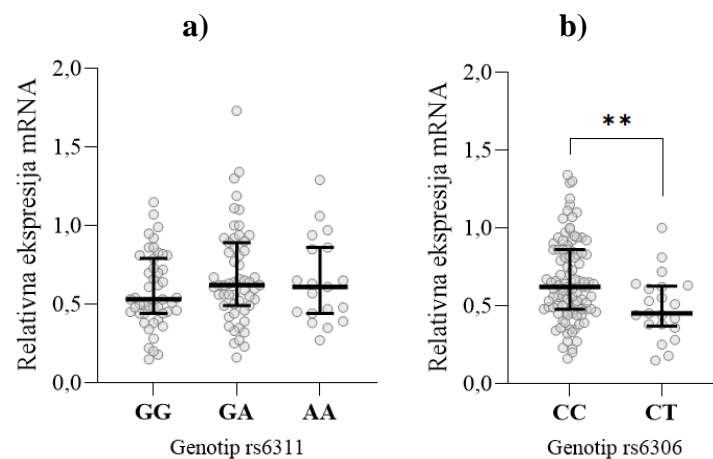
U genu *HTR2A* analizirali smo dvije varijacije pojedinačnog nukleotida u promotorskoj regiji: *rs6311* (-1438 G > A) i *rs6306* (-1421 C > T), samo u otkrivajućem uzorku ($n = 123$). Učestalosti genotipova obaju polimorfizama bile su u skladu s očekivanjem prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($p = 0,807$ za *rs6311*, $p = 0,931$ za *rs6306*). Između novorođenčadi majki s NGT-om i GDM-om nije bilo razlike u učestalosti genotipova *rs6311* ($p = 0,557$) i *rs6306* ($p = 0,547$, **Tablica 4.7.**)

Tablica 4.7. Učestalosti genotipova polimorfizama *rs6311* i *6306* u promotoru gena *HTR2A* u novorođenčadi majki s normalnom tolerancijom glukoze (NGT) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

Polimorfizam Genotip	NGT (n = 67)	GDM (n = 56)	<i>p</i> -vrijednost ^a
<i>rs6311</i>			
GG	29 (43,3 %)	20 (35,7 %)	0,557
GA	27 (40,3 %)	28 (50,0 %)	
AA	11 (16,4 %)	8 (14,3 %)	
<i>rs6306</i>			
CC	55 (82,1 %)	45 (80,4 %)	0,547
CT	12 (17,9 %)	10 (17,9 %)	
TT	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)	

Prikazani su broj (n) i postotak (%). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus. ^a hi-kvadrat test.

Razina mRNA *HTR2A* u posteljici nije se razlikovala s obzirom na genotip polimorfizma *rs6311* ($p = 0,230$, **Slika 4.12.a**). U slučaju polimorfizma *rs6306*, razine mRNA *HTR2A* su bile niže (za 25,5 %) u posteljicama s rijetkim genotipom CT u odnosu na genotip CC ($p = 0,007$, **Slika 4.12.b**).



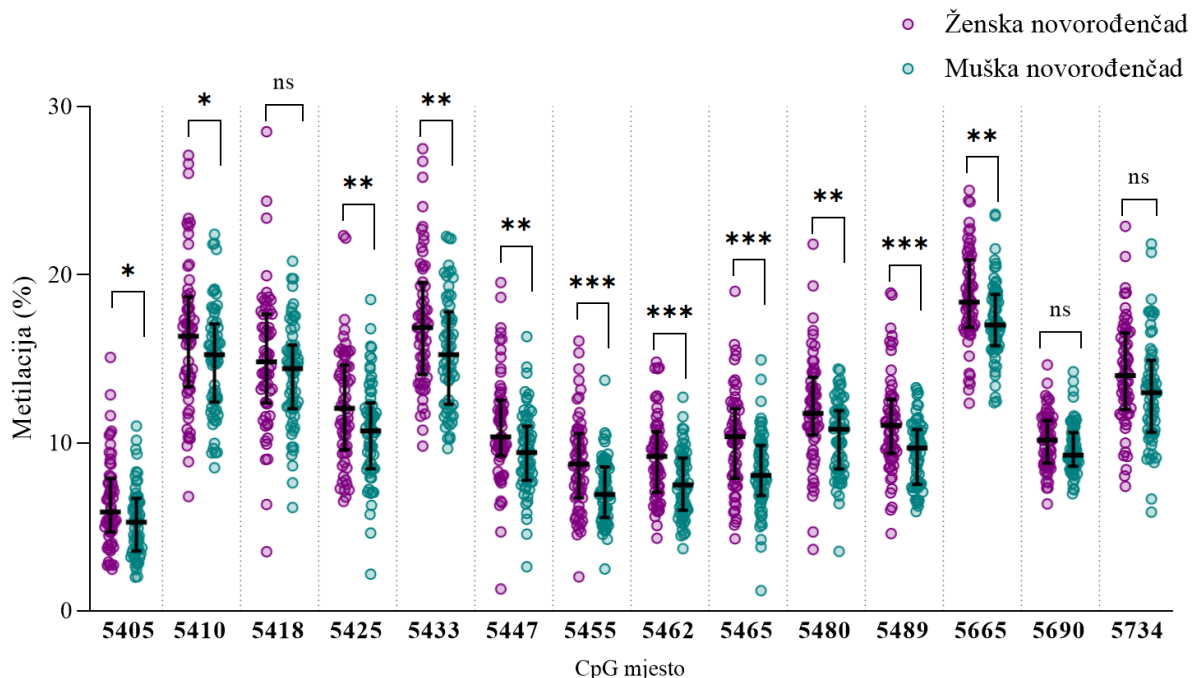
Slika 4.12. Razina mRNA gena *HTR2A* u posteljici u ovisnosti o polimorfizmima a) *rs6311* (-1438 G > A) i b) *rs6306* (-1421 C > T) u promotoru gena *HTR2A*. Relativna razina mRNA *HTR2A* u uzorcima posteljice određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Genotip TT polimorfizma *rs6306* (n = 1) nije prikazan. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama analizirane su a) Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov *post-hoc* test ili b) t-testom. ** $p < 0,01$.

4.4 Povezanost metilacije i razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici

U nastavku istraživanja željeli smo ispitati ovisne li razine mRNA gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A* u posteljici o stupnju metiliranosti CpG-mjesta u regulatornim regijama ovih gena. Za ostale gene nismo pronašli literaturne i/ili *in silico* podatke o diferencijalno metiliranim CpG-mjestima. Istraživanje smo proveli na podskupini sudionika iz otkrivajućeg uzorka ($n = 123$), a stupanj metiliranosti odabranih CpG-mjesta u uzorcima posteljice odredili smo metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom.

4.4.1 Povezanost metilacije i razine mRNA gena *SERT*

Metilacijske analize gena *SERT* obuhvatile su 15 CpG-mjesta u prvom intronu (**Tablica 3.16**). Određivanje metilacije CpG-mjesta 5736 nije prošlo kontrolu kvalitete kod većeg broja uzoraka te to mjesto nije uključeno u analize. Stupanj metiliranosti značajno se razlikovao između pojedinih CpG-mjesta ($KW = 990$, $p < 0,0001$), a na većini CpG-mjesta (uz iznimku mjesta 5418, 5690 i 5734), metilacija je bila viša u posteljicama ženske nego muške novorođenčadi (**Slika 4.13.**)



Slika 4.13. Razine metilacije 14 analiziranih CpG-mjesta u prvom intronu gena *SERT* u posteljicama ženske ($n = 61$) i muške ($n = 62$) novorođenčadi. Razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama analizirane su t-testom ili Mann-Whitneyevim testom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

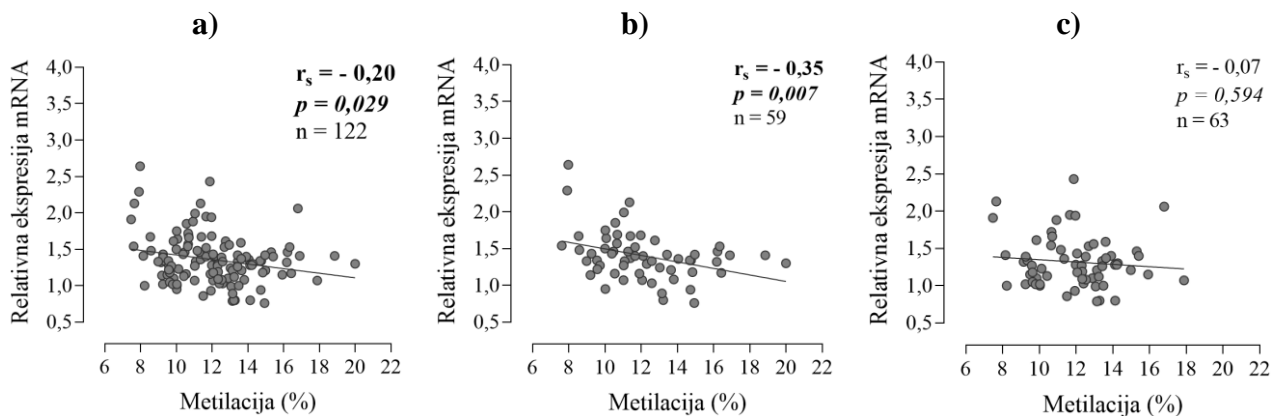
Razine metilacije na svim mjestima osim na mjestu 5405 bile su međusobno pozitivno korelirane (r od 0,35 do 0,88; svi $p < 0,0001$, **Tablica 4.8.**). Stoga smo izračunali srednju vrijednost metilacije svih mjesta osim mjesta 4505 i koristili smo je u daljnjim analizama kao integrativnu mjeru metilacije u ispitivanoj regiji (u daljnjem tekstu: metilacija *SERT*).

U ukupnom uzorku, razine metilacije *SERT* i mRNA *SERT* su bile slabo ($r_s = -0,20$), ali statistički značajno ($p = 0,029$) korelirane, pri čemu su više razine metilacije bile povezane s nižim razinama mRNA (**Slika 4.14.**). Daljnja analiza podataka pokazala je prisutnost negativne korelacije razina metilacije *SERT* i mRNA *SERT* i u podskupini sudionica s NW ($r_s = -0,35$, $p = 0,007$, $n = 59$, **Slika 4.14.a**), dok u podskupini sudionica s OWO nije bilo korelacije između razine metilacije i mRNA ($r_s = -0,07$, $p = 0,594$, $n = 63$, **Slika 4.14.b**). Korelacije metilacije *SERT* i mRNA *SERT* nije bilo u podskupinama GDM i NGT (nije prikazano).

Tablica 4.8. Koeficijenti korelacije (ispod dijagonale tablice) i p -vrijednosti (iznad dijagonale tablice) za međusobnu korelaciju metilacije 14 CpG-mjesta u prvom intronu gena *SERT* u posteljici.

$\begin{matrix} p \\ r_s / r_p \end{matrix}$	5405	5410	5418	5425	5433	5447	5455	5462	5465	5480	5489	5665	5690	5734
5405		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0587	0,0143	0,0344
5410	0,57		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5418	0,42	0,69		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5425	0,42	0,59 ^a	0,77		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
5433	0,33	0,77 ^a	0,78	0,65 ^a		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5447	0,46	0,68	0,72	0,60	0,82		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5455	0,38	0,56	0,66	0,59	0,71	0,75		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5462	0,45	0,68	0,75	0,66	0,82	0,81	0,79		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5465	0,37	0,59 ^a	0,73	0,60 ^a	0,70 ^a	0,72	0,82	0,81		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5480	0,49	0,76 ^a	0,65	0,53 ^a	0,78 ^a	0,77	0,70	0,77	0,73		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
5489	0,47	0,72	0,70	0,63	0,80	0,82	0,72	0,83	0,76	0,88		<0,0001	<0,0001	<0,0001
5665	0,17	0,63 ^a	0,60	0,43 ^a	0,71 ^a	0,57	0,44	0,60	0,48 ^a	0,59 ^a	0,70		<0,0001	<0,0001
5690	0,22	0,63 ^a	0,61	0,44 ^a	0,67 ^a	0,61	0,46	0,61	0,48 ^a	0,64 ^a	0,71	0,82 ^a		<0,0001
5734	0,19	0,58 ^a	0,47	0,36 ^a	0,60 ^a	0,54	0,43	0,51	0,40 ^a	0,54 ^a	0,64	0,70 ^a	0,76 ^a	

p – p -vrijednost, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, r_p – Pearsonov koeficijent korelacije. ^a Pearsonov koeficijent korelacije, sve ostale vrijednosti se odnose na Spearmanov koeficijent korelacije. Statistički značajne p -vrijednosti su podebljane.

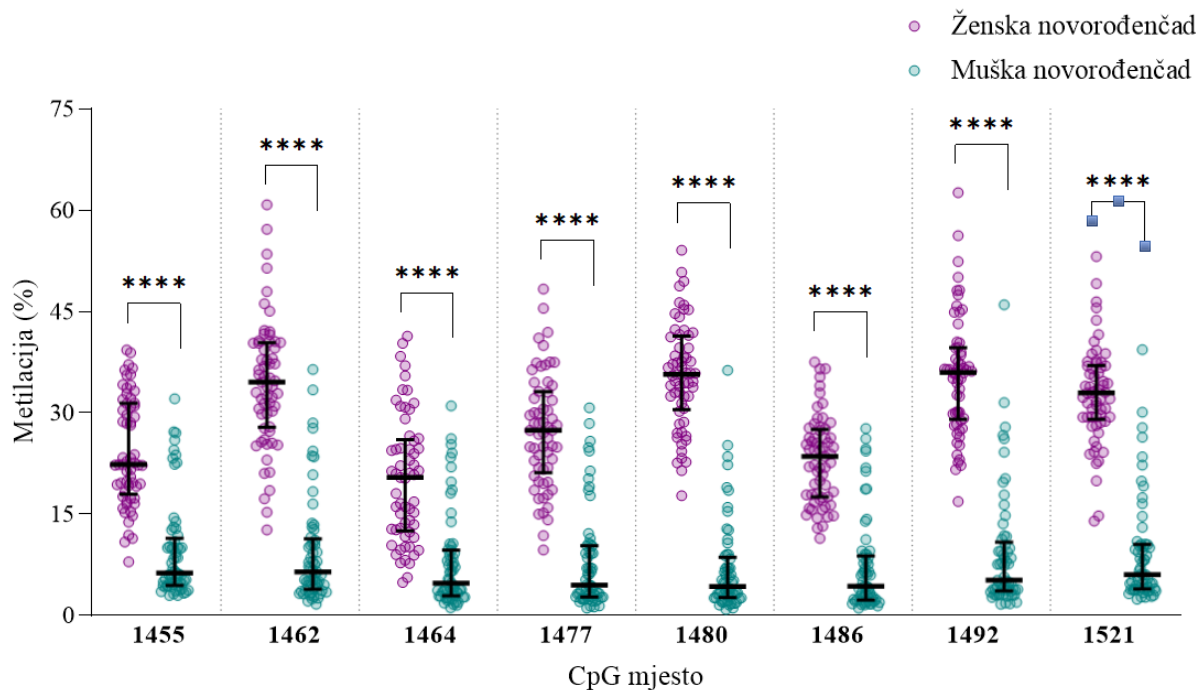


Slika 4.14. Korelacija metilacije i razine mRNA gena *SERT* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Analize su provedene u **a)** ukupnom uzorku sudionica te zasebno u skupini sudionica s **b)** normalnom tjelesnom masom prije trudnoće i **c)** prekomjernom tjelesnom masom / pretilošću prije trudnoće. r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, n – broj sudionika (jedan uzorak je bio odstupajuća vrijednost i izostavljen je iz analiza). Statistički značajni rezultati su podebljani.

4.4.2 Povezanost metilacije i razine mRNA gena *MAOA*

Metilacijske analize gena *MAOA* obuhvatile su devet CpG-mjesta u prvom egzonu i intronu (**Tablica 3.16**). Određivanje metilacije CpG-mjesta 1526 nije prošlo kontrolu kvalitete kod većeg broja uzoraka te to mjesto nije uključeno u analize. Na svim CpG-mjestima, metilacija je bila izrazito viša u ženske nego muške novorođenčadi (**Slika 4.15.**), što se može povezati s inaktivacijom jednog kromosoma X u ženske novorođenčadi. Stoga su sve daljnje analize provedene za svaki spol zasebno. U ženske novorođenčadi ($n = 61$), stupanj metiliranosti značajno se razlikovao između pojedinih CpG-mjesta ($KW = 162, p < 0,0001$). U muške novorođenčadi ($n = 62$), stupanj metiliranosti značajno se razlikovao ($KW = 24, p = 0,001$) jedino između CpG-mjesta 1455 u odnosu na 1480 ($p = 0,018$) i 1486 ($p = 0,022$).

U ženske novorođenčadi, razine metilacije bile su međusobno pozitivno korelirane (r od 0,29 do 0,81; svi $p < 0,05$, **Tablica 4.9.**) između svih mjesta osim mjesta 1455 i 1492. U muške novorođenčadi, razine metilacije na svim mjestima bile su međusobno visoko pozitivno korelirane između svih mjesta (r od 0,88 do 0,96; svi $p < 0,0001$, **Tablica 4.10.**). U novorođenčadi je, neovisno o spolu, na mjestu 1455 uočena je dihotomizacija razina metilacije među uzorcima. Stoga smo u daljnjim analizama kao integrativnu mjeru metilacije u ispitivanoj regiji koristili srednju vrijednost metilacije 7 CpG-mjesta (bez mjesta 1455, u daljnjem tekstu: metilacija *MAOA*).



Slika 4.15. Razine metilacije osam analiziranih CpG-mjesta u prvom egzonu i prvom intronu gena *MAOA* u posteljicama ženske ($n = 61$) i muške ($n = 62$) novorođenčadi. Razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama analizirane su Mann-Whitneyevim testom. **** $p < 0,0001$

Tablica 4.9. Ženska novorođenčad: koeficijenti korelacije (ispod dijagonale tablice) i p -vrijednosti (iznad dijagonale tablice) za međusobnu korelaciju metilacije 8 CpG-mjesta u prvom egzonu i intronu gena *MAOA* u posteljicama.

p r_s / r_p	1455	1462	1464	1477	1480	1486	1492	1521
1455		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0008	0,234	0,0002
1462	0,70 ^a		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,0007	<0,0001
1464	0,81 ^a	0,59		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0243	0,0025
1477	0,65 ^a	0,61	0,60		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1480	0,63 ^a	0,60	0,59	0,61		<0,0001	<0,0001	<0,0001
1486	0,42 ^a	0,43	0,52	0,68	0,65		<0,0001	<0,0001
1492	0,15 ^a	0,42	0,29	0,52	0,60	0,62		<0,0001
1521	0,46 ^a	0,60	0,38	0,56	0,64	0,50	0,63	

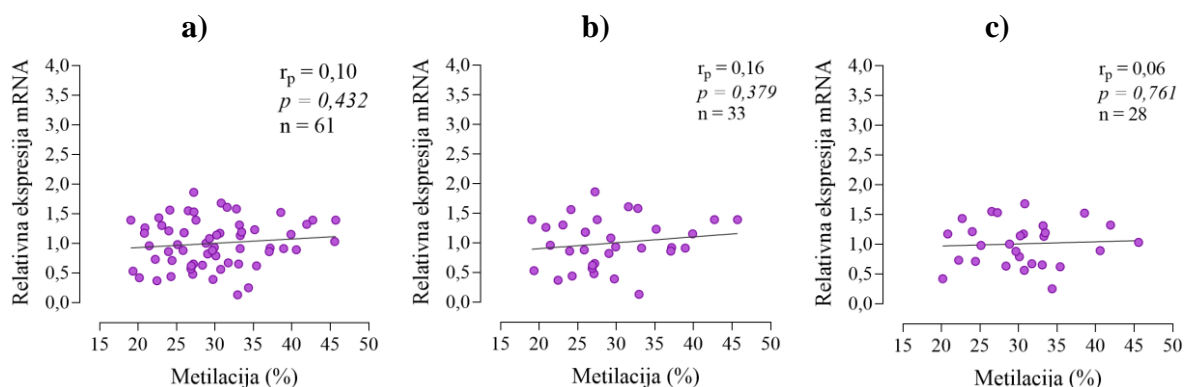
p – p -vrijednost, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, r_p – Pearsonov koeficijent korelacije.
^a Spearmanov koeficijent korelacije, sve ostale vrijednosti se odnose na Pearsonov koeficijent korelacije. Statistički značajne p -vrijednosti su podebljane.

Tablica 4.10. Muška novorođenčad: koeficijenti korelacije (ispod dijagonale tablice) i p -vrijednosti (iznad dijagonale tablice) za međusobnu korelaciju metilacije 8 CpG-mjesta u prvom egzonu i intronu gena *MAOA* u posteljicama.

P r_s	1455	1462	1464	1477	1480	1486	1492	1521
1455		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1462	0,93		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1464	0,91	0,90		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1477	0,88	0,93	0,90		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1480	0,89	0,92	0,90	0,95		<0,0001	<0,0001	<0,0001
1486	0,91	0,92	0,90	0,96	0,95		<0,0001	<0,0001
1492	0,92	0,93	0,92	0,95	0,94	0,94		<0,0001
1521	0,92	0,93	0,93	0,94	0,92	0,96	0,95	

p – p -vrijednost, r_s – Spearmanov koeficijent korelacije. Statistički značajne p -vrijednosti su podebljane.

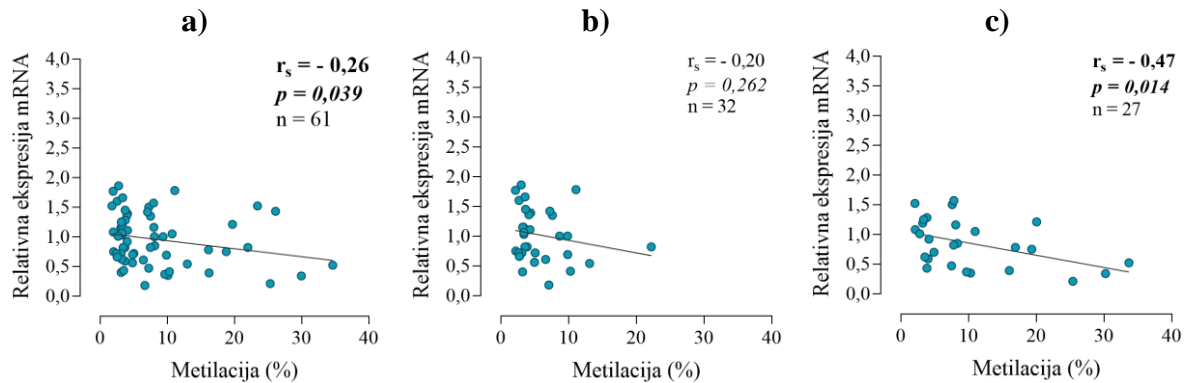
U ženske novorođenčadi, razine metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* u posteljici nisu bile korelirane niti na ukupnom uzorku (**Slika 4.16.a**), niti u zasebno analiziranim skupinama NGT (**Slika 4.16.b**) i GDM (**Slika 4.16.c**).



Slika 4.16. Ženska novorođenčad: korelacija metilacije i razine mRNA gena *MAOA* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Analize su provedene u **a**) ukupnom uzorku sudionica te zasebno u skupini sudionica s **b**) normalnom tolerancijom glukoze i **c**) gestacijskim dijabetes melitusom. r_p – Pearsonov koeficijent korelacije, n – broj sudionika.

U muške novorođenčadi, razine metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* u posteljici bile su slabo, ali značajno korelirane u ukupnom uzorku ($r_s = -0,26$, $p = 0,039$, **Slika 4.17.a**), pri čemu su niže razine metilacije bile povezane s višim razinama mRNA. U skupini sudionica s NGT-om, korelacija razina metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* nije dosegla prag statističke

značajnosti ($r_s = -0,20$, $p = 0,262$, $n = 32$, **Slika 4.17.b**), dok je u skupini sudionica s GDM-om bila umjerena i ostala statistički značajna ($r_s = -0,47$, $p = 0,014$, $n = 27$, **Slika 4.17.c**). Korelacije metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* nije bilo u podskupinama NW i OWO (nije prikazano).



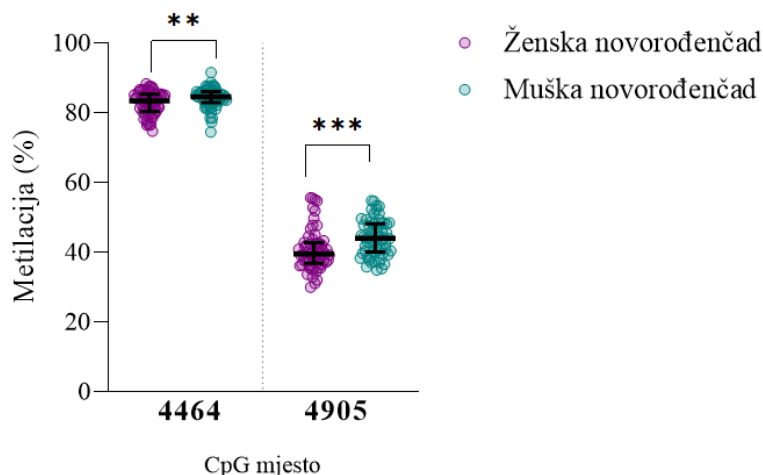
Slika 4.17. Muška novorođenčad: Korelacije metilacije i razine mRNA gena *MAOA* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Analize su provedene u **a**) ukupnom uzorku sudionica te zasebno u skupini sudionica s **b**) normalnom tolerancijom glukoze i **c**) gestacijskim dijabetes melitusom. r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, n – broj sudionika. Statistički značajni rezultati su podebljani.

4.4.3 Povezanost metilacije i razine mRNA gena *HTR2A*

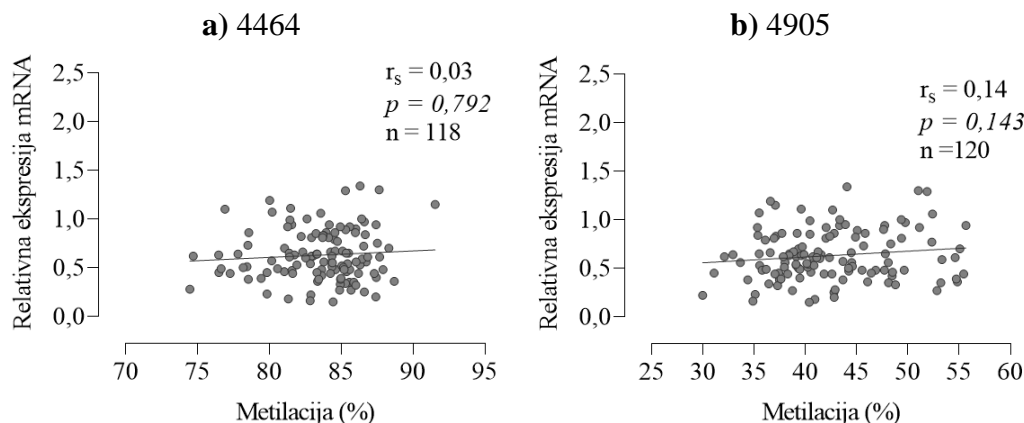
Metilacijske analize gena *HTR2A* obuhvatile su četiri CpG-mjesta u promotoru (**Tablica 3.16**). Analiza metilacije na mjestu 4464 za dva uzorka nije bila uspješna te su oni isključeni iz analize. Metilacija na CpG-mjestima 4691 i 4709 bila je pod snažnim utjecajem genotipova *rs6311* i *rs6306*. Naime, polimorfizam *rs6311* rezultira zamjenom gvanina adeninom u slijedu CpG na mjestu 4691, dok polimorfizam *rs6306* rezultira zamjenom citozina timinom na CpG-mjestu 4709. Stoga smo analize korelacije metilacije i mRNA usredotočili na mjesta 4464 i 4905 čija je metilacija bila neovisna o genotipu. Razine metilacije CpG-mjesta 4464 i 4905 bile su značajno pozitivno korelirane ($r = 0,35$, $p < 0,0001$), ali je metiliranost mjesta 4464 bila izrazito viša nego mjesta 4905 ($p < 0,0001$) te su stoga daljnje analize provedene za svako mjesto zasebno. Na oba mjesta razina metilacije bila je niža u posteljicama ženske nego muške novorođenčad ($p = 0,004$ za 4464, $p = 0,0003$ za 4905, **Slika 4.18.**).

Na ukupnom uzorku, stupanj metiliranosti CpG-mjesta 4464 ($r = 0,03$, $p = 0,792$, $n = 118$, **Slika 4.19.a**) i 4905 ($r = 0,14$, $p = 0,143$, $n = 120$, **Slika 4.19.b**) nije bio koreliran s razinom mRNA gena *HTR2A* u posteljici. S obzirom na razlike u razini mRNA u ovisnosti o

genotipu polimorfizma *rs6306* (Slika 4.12.), korelacije su istražene i zasebno u skupinama genotipa CC i CT, no nije pronađena korelacija s razinom metilacije niti na CpG-mjestu 4464 ni na CpG-mjestu 4905 (oba $p > 0,05$, nije prikazano). Stupanj metiliranosti CpG-mjesta 4464 i 4905 nije bio koreliran s razinom mRNA gena *HTR2A* niti u podskupinama sudionika s obzirom na status tjelesne mase ili status tolerancije glukoze (svi $p > 0,05$).



Slika 4.18. Razine metilacije dva CpG-mjesta u promotoru gena *HTR2A* u posteljicama ženske ($n = 61$) i muške ($n = 62$) novorođenčadi. Razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Usporedbe među skupinama analizirane su t-testom (4464) ili Mann-Whitneyevim testom (4905). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



Slika 4.19. Korelacije metilacije i razine mRNA gena *HTR2A* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana je s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije mjesta a) 4464 i b) 4905 u posteljici određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. r_s – Spearmanov koeficijent korelacije, n – broj sudionika.

4.5 Povezanost razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici i antropometrijskih karakteristika novorođenčeta

4.5.1 Bivarijatne analize

Da bismo istražili potencijalnu ulogu serotoninskog sustava posteljice u regulaciji fetalnog rasta, analizirali smo korelaciju razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici s porođajnom masom, duljinom i ponderalnim indeksom novorođenčeta.

Tablica 4.11. Korelacija razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici s porođajnom masom, duljinom i ponderalnim indeksom novorođenčeta.

Naziv gena	Porođajna masa novorođenčeta		Porođajna duljina novorođenčeta		Ponderalni indeks novorođenčeta	
	r_s	p -vrijednost	r_s	p -vrijednost	r_s	p -vrijednost
<i>SERT</i>	-0,19	0,005	-0,15	0,029	-0,07	0,343
<i>OCT3</i>	0,12	0,094	0,07	0,295	0,07	0,308
<i>TPHI</i>	0,03	0,634	0,13	0,062	-0,10	0,160
<i>MAOA</i>	0,05	0,499	0,04	0,519	0,04	0,591
<i>MAOB</i> ^a	0,06	0,536	0,15	0,108	-0,09	0,340
<i>HTR2A</i>	0,02	0,716	-0,07	0,308	0,11	0,100

r_s – Spearmanov koeficijent korelacije. ^a analize za *MAOB* su provedene samo na otkrivajućoj kohorti (n = 123; n = 68 u skupini NGT, n = 58 u skupini GDM). Statistički značajni rezultati su podebljani.

Razina mRNA gena *SERT* u posteljici slabo, ali značajno je korelirala s porođajnom masom ($r_s = -0,19$, $p = 0,005$) i duljinom ($r_s = -0,15$, $p = 0,029$), na način da su niže razine mRNA *SERT* bile povezane s višom porođajnom masom i duljinom. Ponderalni indeks novorođenčeta nije bio koreliran s razinom mRNA *SERT* ($r_s = -0,07$, $p = 0,343$, **Tablica 4.11.**). Razine mRNA ostalih gena (*OCT3*, *TPHI*, *MAOA*, *MAOB* i *HTR2A*) u posteljici nisu korelirale s porođajnom masom, duljinom niti ponderalnim indeksom novorođenčeta (**Tablica 4.11.**).

4.5.2 Multipla linearna regresijska analiza

Budući da smo uočili statistički značajnu negativnu korelaciju razina mRNA gena *SERT* u posteljici s porođajnom masom i duljinom novorođenčeta (**Tablica 4.11.**), proveli smo i višestruke linearne regresijske analize s porođajnom masom ili duljinom kao izlaznim varijablama, a mRNA *SERT* kao prediktorom, uz spol novorođenčeta, pušenje u trudnoći i gestacijsku dob kao kontrolne varijable. Analize su provedene na podskupu uzoraka za koje smo imali podatak o pušenju u trudnoći (n = 208).

Model je statistički značajno objasnio 17,1% varijance porođajne mase novorođenčeta, a razina mRNA *SERT* u posteljici ostala je značajan prediktor porođajne mase (**Tablica 4.12.**). mRNA *SERT* je također ostala značajni prediktor porođajne duljine novorođenčeta ($p = 0,035$) kada su u model uključeni spol novorođenčeta te pušenje majke u trudnoći, a model je objasnio 13,8% varijance u izlaznoj varijabli ($p < 0,0001$, **Tablica 4.12.**)

Tablica 4.12. Multipla linearna regresijska analiza mRNA gena *SERT* kao prediktora porođajne mase i duljine novorođenčeta.

Prediktor	Porođajna masa novorođenčeta			Porođajna duljina novorođenčeta		
	B	SE	<i>p</i> -vrijednost	B	SE	<i>p</i> -vrijednost
mRNA <i>SERT</i>	-217,6	77,2	0,005	-0,70	0,33	0,035
Spol novorođenčeta	127,8	53,1	0,017	0,88	0,23	< 0,0001
Gestacijska dob pri porodu	117,1	32,7	0,0004	-0,27	0,14	0,053
Pušenje u trudnoći	-110,7	60,6	0,070	-0,52	0,26	0,047
	R ² = 0,171			R ² = 0,138		
	F (4,203) = 10,45, p < 0,0001			F (4,203) = 8,11, p < 0,0001		

B – nestandardizirani beta koeficijent, SE – standardna pogreška. Statistički značajne *p*-vrijednosti su podebljane.

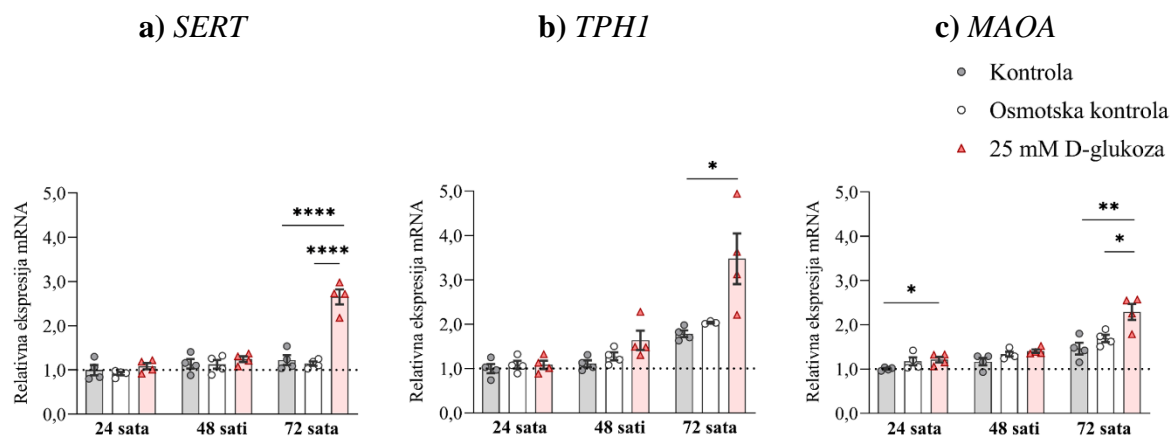
4.6 Istraživanja *in vitro* učinaka metaboličkih abnormalnosti na serotoninski sustav posteljice

In vitro istraživanja učinaka metaboličkih abnormalnosti na serotoninski sustav posteljice proveli smo na staničnoj liniji trofoblasta čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće, stanicama ACH-3P. U prvoj fazi istraživanja, testirali smo učinke glukoze u uvjetima atmosferske razine kisika (21,0%), koja se najčešće susreće u literaturi. U nastavku smo istražili učinke glukoze i inzulina u uvjetima razina kisika kakve su prisutne *in vivo*, tijekom perioda ranog razvoja posteljice (6,5% i 2,5%).

4.6.1 Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri razini kisika od 21 %

Stanice ACH-3P smo inkubirali u uvjetima atmosferske razine kisika (21,0%) tijekom 24, 48 ili 72 sata, u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze (kontrola), 5,5 mM D-glukoze s dodatkom 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola) ili 25 mM D-glukoze (hiperglikemija). Nakon provedenih tretmana, izdvojili smo nukleinske kiseline iz lizata stanica i proveli odgovarajuće molekularne analize.

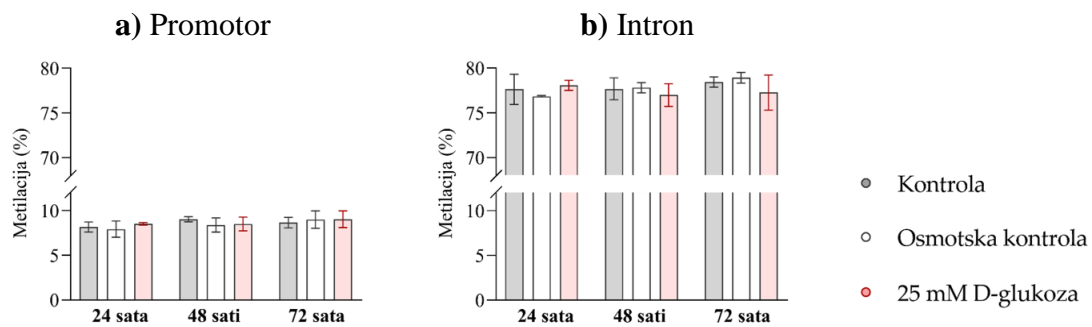
Visoka koncentracija glukoze nije imala statistički značajan učinak na razinu mRNA gena *SERT* (Slika 4.20.a), *TPHI* (Slika 4.20.b) i *MAOA* (Slika 4.20.c) nakon 24 i 48 sata. Međutim, nakon 72 sata, razine mRNA sva tri gena bile su za 1,5 – 2,0 puta više u stanicama inkubiranim u prisutnosti 25 mM D-glukoze u odnosu na stanice inkubirane u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze ili 5,5 mM D-glukoze s dodatkom 19,5 mM L-glukoze (Slika 4.20.). Ovi rezultati upućuju na to da produžena (72 h) izloženost povišenim razinama glukoze pri atmosferskoj razini kisika potiče transkripcijsku aktivnost sva tri testirana gena u trofoblastima.



Slika 4.20. Učinak glukoze na razinu mRNA regulatornih gena serotonina pri atmosferskoj razini kisika (21%). Stanice ACH-3P uzgajane su u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze (kontrola, sivi stupci), 5,5 mM D-glukoze + 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola, bijeli stupci) ili 25 mM D-glukoze (hiperglikemija, crveni stupci) tijekom 24, 48 ili 72 sata pri atmosferskoj razini kisika. Relativne razine mRNA gena a) *SERT*, b) *TPHI* i c) *MAOA* određene su metodom RT-qPCR i normalizirane s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazani su rezultati dva neovisna eksperimenta, svaki napravljen u duplikatu. Za svaki gen, podaci su prikazani u odnosu na srednju vrijednost kontrolnih uzoraka nakon 24 sata tretmana, čija je vrijednost proizvoljno postavljena na 1,00; prikazane su individualne vrijednosti sa srednjom vrijednošću i standardnom pogreškom. Statistička analiza provedena je analizom kovarijance (ANCOVA) s brojem pasaža stanica kao kovarijablom uz Sidakov *post-hoc* test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$.

Budući da smo primijetili povezanost između nižih razina metilacije i viših razina ekspresije gena *SERT* u uzorcima posteljice (Slika 4.14.), željeli smo u nastavku istražiti je li učinak glukoze na ekspresiju gena *SERT* u stanicama ACH-3P pri atmosferskoj razini kisika bio posredovan putem učinka na metilaciju regulatornih regija ovog gena. Stoga smo analizirali metilaciju devet CpG-mjesta u promotoru i 14 CpG-mjesta u prvom intronu gena *SERT* u reprezentativnim uzorcima stanica iz pokusa prikazanih na Slici 4.20. Stupanj metiliranosti promotora (Slika 4.21.a) i introna (Slika 4.21.b) nije se razlikovao između kontrolnih stanica i stanica tretiranih glukozom nakon 24 i 48 sati, ali niti nakon 72 sata inkubacije. Ovi rezultati

upućuju da glukoza nije bila povezana s regulacijom ekspresije gena *SERT* na razini metilacije molekule DNA.



Slika 4.21. Učinak glukoze na metilaciju gena *SERT* u stanicama ACH-3P serotonina pri atmosferskoj razini kisika (21%). Stanice su uzgajane u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze (kontrola, sivi stupci), 5,5 mM D-glukoze + 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola, bijeli stupci) ili 25 mM D-glukoze (hiperglikemija, crveni stupci) tijekom 24, 48 ili 72 sata. Prikazana je prosječna metilacija **a)** 9 CpG-mjesta u promotoru i **b)** 14 CpG-mjesta u intronu 1 gena *SERT*, određena pirosekvenciranjem bisulfitno modificirane DNA. Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom ($n = 3 - 4$).

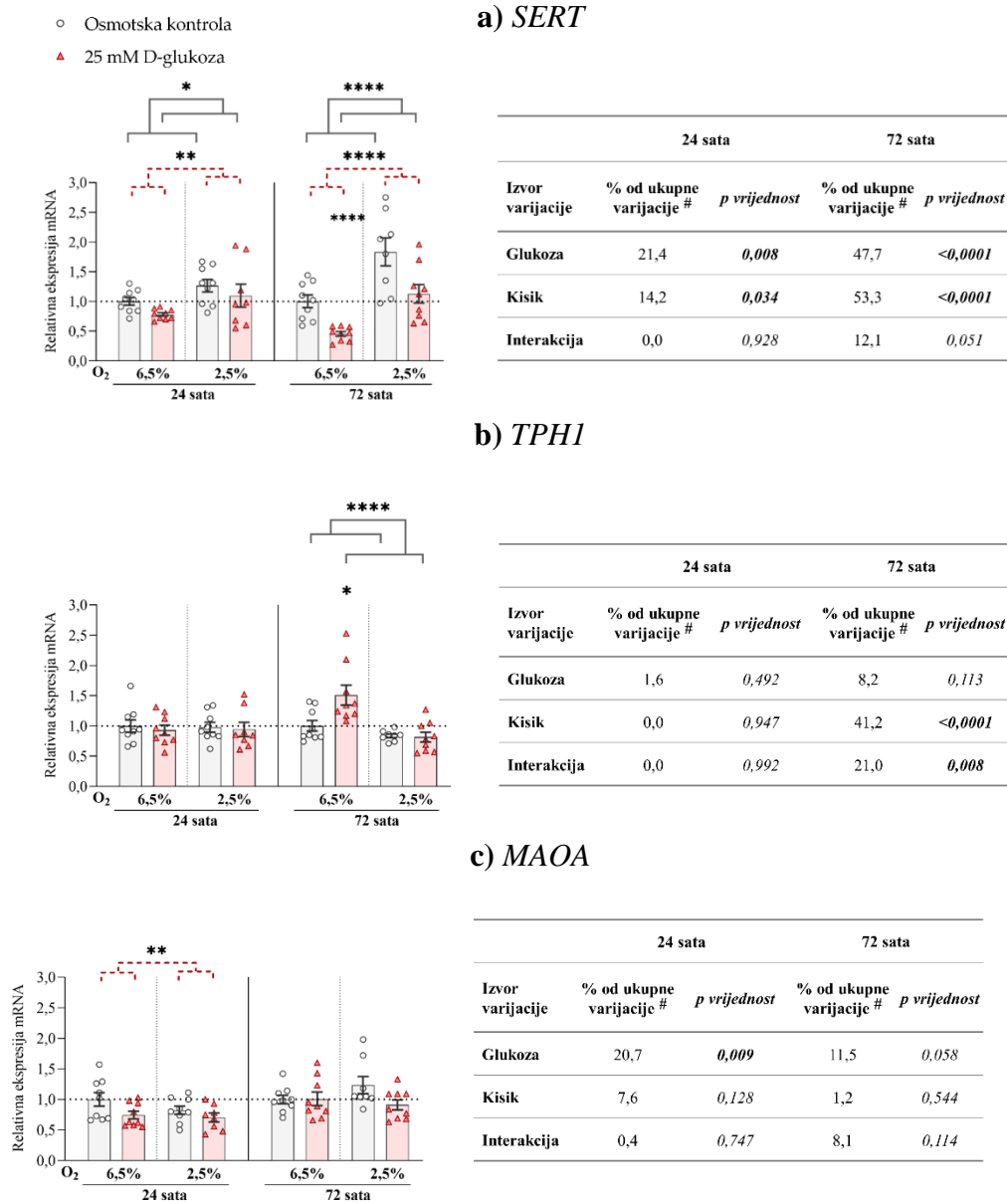
4.6.2 Učinci glukoze na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%

Kako bismo istražili učinke glukoze pri razinama kisika kakve su prisutne *in vivo*, stanice ACH-3P smo inkubirali tijekom 24 ili 72 sata u prisutnosti različitih koncentracija glukoze pri uvjetima kisika od 6,5% ili 2,5%. **Slika 4.22.** prikazuje usporedbu razina mRNA gena *SERT*, *TPH* i *MAOA* između stanica inkubiranih u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze s dodatkom 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola) i stanica inkubiranih u prisutnosti 25 mM D-glukoze (hiperglikemija). Slični rezultati dobiveni su za usporedbu stanica inkubiranih u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze (kontrola) ili 25 mM D-glukoze (nije prikazano).

U obje vremenske točke i pri obje razine kisika, razina mRNA gena *SERT* bila je niža pri visokoj koncentraciji glukoze u odnosu na kontrolne uvjete ($p = 0,008$ nakon 24 sata, $p < 0,0001$ nakon 72 sata). Pri tom je razina mRNA *SERT* bila viša pri razini kisika od 2,5% u odnosu na 6,5% ($p = 0,034$, nakon 24 sata, odnosno $p < 0,0001$ nakon 72 sata, **Slika 4.22.a**). Nakon 72 sata, uočen je granično značajna ($p = 0,051$) interakcija učinaka glukoze i kisika na razina mRNA gena *SERT*. Specifično, pri uvjetima kisika od 6,5%, glukoza je imala statistički značajan učinak na razinu mRNA *SERT* (snizila je razinu za 50%, $p < 0,0001$), dok pri uvjetima kisika od 2,5% učinak glukoze na razinu mRNA *SERT* nije bio statistički značajan ($p = 0,186$).

Nakon 24 sata inkubacije, razina mRNA gena *TPHI* (**Slika 4.22.b**) nije se značajno razlikovala ovisno o razini glukoze ili kisika, niti je postojala interakcija između učinaka ova dva parametra. Međutim, nakon 72 sata inkubacije, razina mRNA *TPHI* bila je snižena u uvjetima niže razine (2,5%) kisika u odnosu na višu razinu (6,5%) kisika ($p < 0,0001$). Osim toga, uočena je značajna interakcija između učinaka glukoze i kisika na razinu mRNA gena *TPHI* ($p = 0,008$) – u uvjetima kisika od 6,5%, razina mRNA *TPHI* bila je viša u uvjetima hiperglikemije nego u kontrolnim uvjetima (za 17%, $p = 0,019$), dok u uvjetima kisika od 2,5%, nije bilo razlike u razini mRNA *TPHI* između stanica inkubiranih u hiperglikemičnim i kontrolnim uvjetima. Ovaj rezultat upućuje da visoka koncentracija glukoze potiče transkripciju gena *TPHI* pri uvjetima kisika od 6,5%, dok pri kisiku od 2,5% nema značajan učinak na transkripciju ovog gena.

Razina mRNA gena *MAOA* (**Slika 4.22.c**) bila je nakon 24 sata inkubacije niža pri visokim koncentracijama glukoze u odnosu na kontrolne uvjete (za 20%, $p = 0,009$), dok nakon 72 sata nije bilo statistički značajnih razlika u razini mRNA *MAOA* između stanica inkubiranih u prisutnosti različitih koncentracija glukoze. Razina mRNA *MAOA* se nije razlikovala između stanica inkubiranih pri 2,5 i 6,5% kisika ni nakon 24 sata niti nakon 72 sata (**Slika 4.22.c**). Ovaj rezultat upućuje da kisik u rasponu razina prisutnih *in vivo* nema učinak na ekspresiju gena *MAOA*, za razliku od opaženog učinka na ekspresiju gena *SERT* (**Slika 4.22.a**) i *TPHI* (**Slika 4.22.b**).

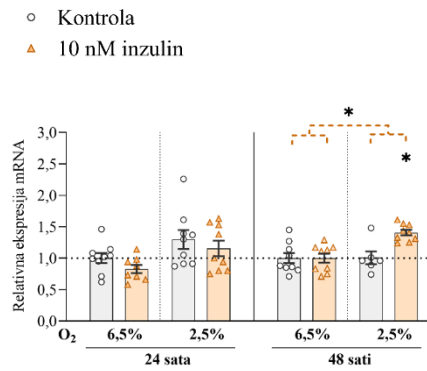


Slika 4.22. Učinak glukoze i kisika na razinu mRNA regulatornih gena serotonina u stanicama ACH-3P pri razinama kisika kave su prisutne *in vivo*. Stanice su uzgajane u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze + 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola, sivi stupci) ili 25 mM D-glukoze (hiperglikemija, crveni stupci), pri 6,5% O₂ ili 2,5% O₂ tijekom 24 ili 72 sata. Relativne razine mRNA gena **a) SERT**, **b) TPH1** i **c) MAOA** određene su metodom RT-qPCR i normalizirane s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazani su rezultati triju neovisnih eksperimenata, svaki napravljen u triplikatu. Za svaki gen, podaci u svakoj vremenskoj točki prikazani su u odnosu na srednju vrijednost osmotske kontrole pri 6,5% O₂, čija je vrijednost proizvoljno postavljena na 1,0; prikazane su individualne vrijednosti sa srednjom vrijednošću i standardnom pogreškom. Statistička analiza provedena je analizom kovarijance (ANCOVA) s brojem pasaža stanica kao kovarijablom uz Sidakov *post-hoc* test. *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, crvena isprekidana linija – glavni učinak glukoze, siva linija – glavni učinak kisika. # udio od ukupne varijance nakon kontrole učinka broja pasaža stanica (parcijalni η^2).

4.6.3 Učinci inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%

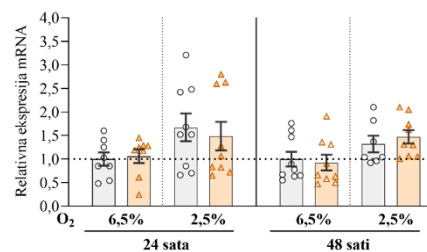
Kako bismo istražili učinke inzulina pri razinama kisika kakve su prisutne *in vivo*, stanice ACH-3P su uzgajane tijekom 24 ili 48 sati u odsutnosti (kontrola) ili prisutnosti 10 nM inzulina (hiperinzulinemija) pri uvjetima kisika od 6,5% ili 2,5% (**Slika 4.23.**).

Razine mRNA gena *SERT* (**Slika 4.23.a**) nisu se nakon 24 sata inkubacije statistički značajno razlikovale u ovisnosti o koncentraciji inzulina ili razini kisika niti je postojala interakcija učinaka inzulina i kisika. Međutim, nakon 48 sati inkubacije uočen je statistički značajan glavni učinak inzulina na razinu mRNA gena *SERT* (povećanje za 19%, $p = 0,016$). Nadalje, nakon 48 sati uočena je i statistički značajna interakcija između učinaka inzulina i kisika ($p = 0,016$; **Slika 4.23.a**), pri čemu je dodatak inzulina značajno povišio razinu mRNA *SERT* samo pri uvjetima od 2,5% kisika (za 8%, $p = 0,011$). Inzulin i kisik nisu imali učinka na razine mRNA gena *TPHI* (**Slika 4.23.b**) i *MAOA* (**Slika 4.23.c**) ni nakon 24 sata ni nakon 48 sati, niti je bilo statistički značajne interakcije učinaka inzulina i kisika.



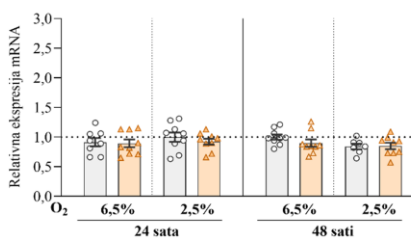
a) *SERT*

Izvor varijacije	24 sata		48 sati	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Inzulin	7,3	0,134	19,2	0,016
Kisik	3,6	0,297	3,2	0,346
Interakcija	0,1	0,856	18,9	0,016



b) *TPH1*

Izvor varijacije	24 sata		48 sati	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Inzulin	0,2	0,832	0,1	0,864
Kisik	1,4	0,524	0,5	0,712
Interakcija	1,2	0,562	2,1	0,435



c) *MAOA*

Izvor varijacije	24 sata		48 sati	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Inzulin	0,4	0,736	2,6	0,384
Kisik	0,7	0,640	0,4	0,722
Interakcija	2,3	0,411	3,5	0,314

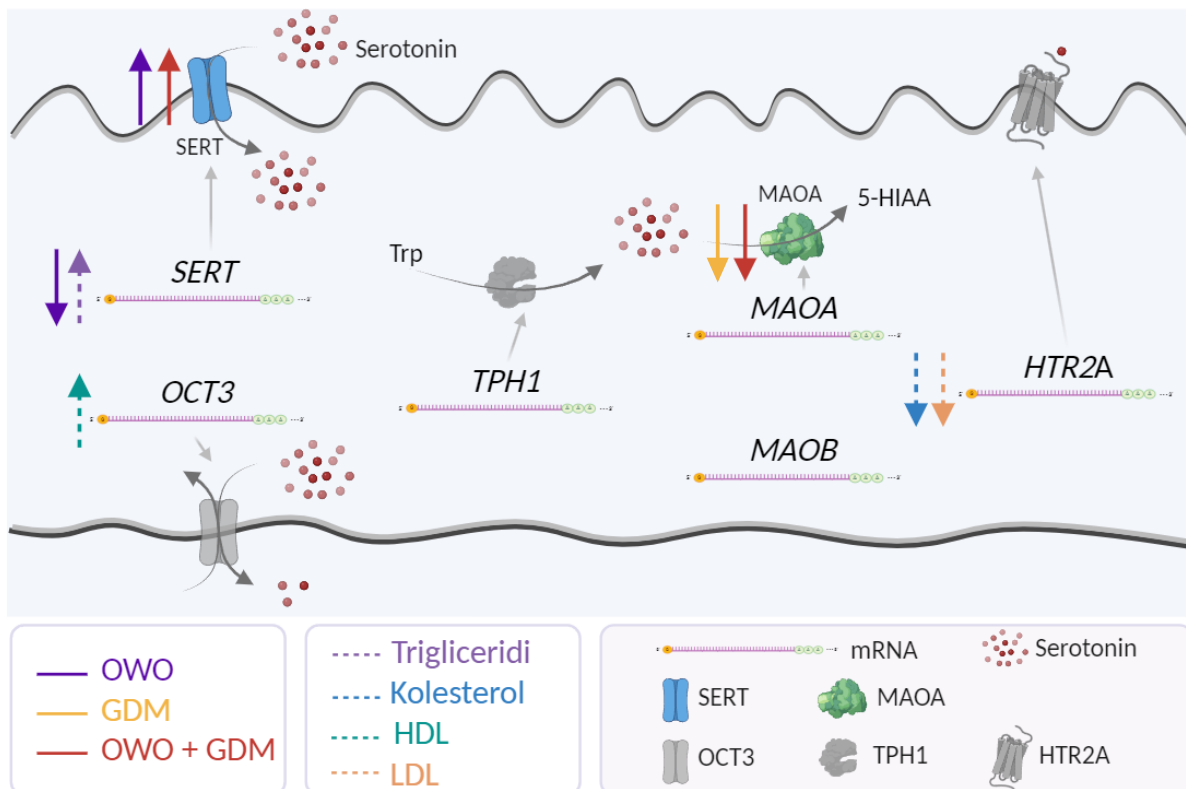
Slika 4.23. Učinak inzulina i kisika na razinu mRNA regulatornih gena serotonina u stanicama ACH-3P pri razinama kisika kave su prisutne *in vivo*. Stanice su uzgajane u odsutnosti (kontrola, sivi stupci) ili u prisutnosti inzulina (10 nM, hiperinzulinemija, narančasti stupci) pri 6,5% O₂ ili 2,5% O₂ tijekom 24 ili 48 sati. Relativne razine mRNA gena **a) *SERT***, **b) *TPH1*** i **c) *MAOA*** određene su metodom RT-qPCR i normalizirane s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Prikazani su rezultati triju neovisnih eksperimenata, svaki napravljen u duplikatu ili triplikatu. Za svaki gen, podaci u svakoj vremenskoj točki prikazani su u odnosu na srednju vrijednost kontrole pri 6,5% O₂, čija je vrijednost proizvoljno postavljena na 1,0; prikazane su individualne vrijednosti sa srednjom vrijednošću i standardnom pogreškom. Statistička analiza provedena je analizom kovarijance (ANCOVA) s brojem pasaža stanica kao kovarijablom uz Sidakov *post-hoc* test. **p*<0,05, narančasta isprekidana linija – glavni učinak inzulina. # udio od ukupne varijance nakon kontrole učinka broja pasaža stanica (parcijalni η^2).

5 RASPRAVA

Serotoninski sustav posteljice igra važnu ulogu u regulaciji razvoja i različitih funkcija posteljice (Perić i sur., 2022), a osigurava i serotonin potreban za pravilno odvijanje ranih razvojnih procesa u embriju/fetusu, naročito za pravilnu regulaciju neurorazvoja (Rosenfeld, 2020). Održavanje homeostaze serotonina je složen i strogo reguliran proces, ali istovremeno osjetljiv na utjecaje okolnih čimbenika i genetičkih varijacija. Majčina predgestacijska debljina (prekomjerna tjelesna masa i pretilost) i GDM povezani su s velikim brojem metaboličkih, hormonalnih, imunoloških i drugih abnormalnosti te također s promjenama u razvoju i funkcijama posteljice (Howell i Powell, 2017). Ova stanja također su povezana s komplikacijama u trudnoći i pri porodu, povećanim rizikom od raznih razvojnih i metaboličkih poremećaja potomstva u djetinjstvu i tijekom života, kao i dugoročnim posljedicama za zdravlje majke (Boney i sur., 2005; Catalano, 2010; Catalano i Shankar, 2017; Chu i Godfrey, 2020; Tong i Kalish, 2021; Wang i sur., 2016). Istraživanjem provedenim u sklopu ovog doktorskog rada željeli smo doprinijeti boljem razumijevanju regulacije homeostaze serotonina u posteljici čovjeka. Na skupini parova majka – novorođenče istražili smo moguću povezanost metaboličkog stanja majke sa svim ključnim komponentama – prijenosnicima, metaboličkim enzimima i receptorima – uključenima u regulaciju homeostaze serotonina u posteljici na kraju trudnoće. Također smo ispitali genetičke i epigenetičke mehanizme koji su uključeni u regulaciju aktivnosti ključnih regulatornih gena serotonina u posteljici te odredili povezanost homeostaze serotonina u posteljici s antropometrijskim mjerama novorođenčeta. Dodatno, na modelu stanica trofoblasta čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće, istražili smo *in vitro* učinke glukoze, inzulina i kisika te interakcije njihovih učinaka na ekspresiju ključnih regulatornih gena serotonina.

5.1 Istraživanje na skupini trudnica i novorođenčadi

Ključni rezultati dijela istraživanja na skupini trudnica i novorođenčadi sažeti su na **Slici 5.1**. Majčina debljina povezana je sa sniženom razinom mRNA *SERT* te povišenom razinom proteina SERT u posteljici. Gestacijski dijabetes melitus (GDM) također je povezan s povišenom razinom proteina SERT u posteljicama iz trudnoća s prekomjernom tjelesnom masom, ali i sa sniženim afinitetom enzima MAOA. Nadalje, koncentracije lipida u krvi majke povezane su s promjenama u ekspresiji nekoliko regulatornih gena serotonina. Konkretno, koncentracija triglicerida povezana je s povišenom mRNA *SERT*, koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola povezane su sa sniženom mRNA *HTR2A*, a koncentracija HDL-kolesterola s povišenom razinom mRNA *OCT3*.



Slika 5.1. Povezanost majčinog metaboličkog stanja s ekspresijom i/ili funkcijom regulatornih gena serotonina u posteljici čovjeka na kraju trudnoće. Boja strelice označava metabolički parametar (u skladu s legendom), a smjer strelice označava pozitivnu (↑) ili negativnu (↓) povezanost parametra s razinom pojedine mRNA/proteina ili s aktivnošću enzima. OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće, GDM – gestacijski dijabetes melitus, SERT – serotoninski transporter, OCT3 – prijenosnik organskih kationa tipa 3, TPH1 – triptofan hidrosilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, MAOB – monoaminoksidaza B, HTR2A – receptor serotonina tipa 2A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina. Učinak na aktivnost enzima MAOA odnosi se na afinitet enzima prema supstratu (K_m); maksimalna brzina enzimske reakcije (V_{max}) nije bila povezana niti s jednim od metaboličkih parametara. Analize korelacije koncentracija lipida s mRNA *MAOB* nisu provedene zbog malog broja uzoraka. Sivo prikazani proteini nisu istraženi. Izrađeno korištenjem računalnog programa Biorender.com

5.1.1 Serotoninski prijenosnik – SERT

Membranski prijenosnik visokog afiniteta i specifičnosti za serotonin – SERT – visoko je ekspimiran u posteljici čovjeka tijekom cijele trudnoće (Balkovetz i sur., 1989; Karahoda i sur., 2020a; Kliman i sur., 2018). Naši rezultati pokazali su relativno visoku ekspresiju mRNA gena *SERT* u terminskoj posteljici u usporedbi s ekspresijom mRNA ostalih analiziranih regulatornih gena serotonina. Lokalizacija proteina SERT na mikroviloznoj membrani

sinciciotrofoblasta, okrenutoj prema majčinom krvotoku (Bottalico i sur., 2004), upućuje na njegovu ulogu u internalizaciji serotonina iz majčinog krvotoka u unutarstanične prostore posteljice. Viša ekspresija proteina SERT na kraju trudnoće nego u njezinim ranijim stadijima (Karahoda i sur., 2020a) upućuje na veću važnost tog procesa na kraju trudnoće.

Naši rezultati pokazali su složenu povezanost majčinog predgestacijskog statusa tjelesne mase i statusa tolerancije glukoze u trudnoći s regulacijom ekspresije gena *SERT* u posteljici na kraju trudnoće. Konkretno, u sudionica s normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći, predgestacijska debljina je bila povezana sa sniženom razinom mRNA *SERT*, dok se u sudionica s GDM-om razina mRNA *SERT* nije razlikovala ovisno o statusu tjelesne mase (**Slika 4.1.a**). Sukladno ovim rezultatima, viši pITM je bio povezan s nižim razinama mRNA *SERT* samo u sudionica s normalnom tolerancijom glukoze, dok u sudionica s GDM-om nije bilo korelacije između ova dva parametra (**Tablica 4.3.**). Sveukupno, ovi rezultati upućuju na povezanost predgestacijske debljine sa sniženom ekspresijom gena *SERT* u posteljicama žena s normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći, dok su u žena s GDM-om vjerojatno prisutni i neki dodatni čimbenici zbog kojih njihova debljine nema ovakav učinak. Jedan od takvih potencijalnih čimbenika mogla bi biti razina triglicerida u krvi majke.

Naime, naši rezultati pokazali su pozitivnu korelaciju između koncentracije triglicerida u majčinoj krvi i razine mRNA *SERT* u posteljici samo u žena s GDM-om (**Tablica 4.4.**). Prema literaturnim podacima koncentracije triglicerida na kraju trudnoće se ne razlikuju ovisno o debljini u sudionica s normalnom tolerancijom glukoze (O'Malley i sur., 2020), ali su povišeni u trudnica s GDM-om (Ryckman i sur., 2015). Dodatno, kada su žene s GDM-om stratificirane prema debljini, serumske koncentracije triglicerida bile su povišene samo u skupini pretilih (O'Malley i sur., 2020). Ovo je u skladu s našim podacima prema kojima je koncentracija triglicerida bila povišena samo u krvi sudionica s debljinom i GDM-om u odnosu na skupine s normalnom tolerancijom glukoze, neovisno o statusu debljine (**Slika 4.2.a**). Ovi rezultati, zajedno sa literaturnim podacima, upućuju na to da trigliceridi povišuju mRNA *SERT* samo u posteljicama sudionica s prekomjernom tjelesnom masom i GDM-om. Ako debljina, kao što je pokazano u normoglikemičnim trudnoćama, snižava mRNA *SERT* i u GDM posteljicama, suprotni učinak triglicerida bi konačno rezultirao normalnom razinom mRNA.

U ovom istraživanju nismo uočili značajan učinak GDM-a na razinu mRNA *SERT* u posteljici. Prethodno kliničko istraživanje pokazalo je snižene razine mRNA *SERT* u posteljicama iz trudnoća kompliciranih GDM-om (Viau i sur., 2009). Važno je naglasiti da su

u navedenom istraživanju trudnice s GDM-om imale značajno viši pITM u odnosu na kontrolnu skupinu. Imajući u vidu naše rezultate, može se pretpostaviti da je sniženju razine mRNA *SERT* u GDM posteljicama pokazano u tom radu (Viau i sur., 2009) mogao pridonijeti nesrazmjer u statusu debljine među istraživanim skupinama. Također, navedena studija (Viau i sur., 2009) je uključivala mali broj sudionica (n = 21 NGT i n = 14 GDM sudionica), a porodi su većinom bili vaginalni. S obzirom da način poroda značajno utječe na ekspresiju velikog broja gena u posteljici (Lekva i sur., 2016) u naše istraživanje bile su uključene isključivo trudnoće dovršene elektivnim carskim rezom čime je izbjegnut potencijalni učinak načina poroda na rezultate. Suprotno našim rezultatima i rezultatima navedene studije (Viau i sur., 2009), nedavnim istraživanjem pokazana je značajno povišena razina mRNA *SERT* u terminskim posteljicama trudnica s GDM-om u odnosu na kontrolnu skupinu (Song i sur., 2022). U toj studiji pITM nije bio uključen u analize iako su sudionice s GDM-om imale značajno viši pITM u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatno, u navedeno istraživanje bili su uključeni i prijevremeni porodi, zbog čega izravna usporedba s našim rezultatima nije moguća. Dodatni čimbenik koji je mogao utjecati na rezultate je prilagođena dijabetička prehrana, koja je u našoj studiji bila preporučena svim ženama s GDM-om, ali ne i ženama s predgestacijskom debljinom bez dijagnoze GDM-a. Prilagođena dijabetička prehrana je vjerojatno povezana s uočenim manjim prinosom tjelesne mase (GWG, engl. *Gestational Weight Gain*) tijekom trudnoće (u prosjeku 3 kg) u skupini sudionica s GDM-om (**Tablica 4.1.**). Ovaj rezultat upućuje na povoljno djelovanje prilagođene prehrane na GWG u skupini trudnoća s GDM-om, čime se potencijalno poništava negativni učinak debljine na ravnotežu serotonina u posteljici.

Za razliku od snižene razine mRNA *SERT* u posteljicama sudionica s predgestacijskom debljinom i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći (**Slika 4.1.a** i **Slika 4.3.a**), razina proteina SERT u navedenoj skupini sudionica je bila povišena, a još veći porast bio je prisutan kada je predgestacijska debljina bila praćena dijagnozom GDM-a (**Slika 4.3.b**). Snižena razina mRNA *SERT* u posteljicama sudionica s predgestacijskom debljinom i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći mogla bi potencijalno biti posljedica negativne povratne sprege, odnosno smanjene sinteze mRNA s ciljem da se snize razine proteina SERT.

S obzirom na različit smjer promjena u razinama mRNA i proteina između metaboličkih skupina, očekivali smo nedostatak korelacije između tih parametara. Međutim, u svim metaboličkim skupinama razine mRNA *SERT* bile su slabo do umjereno, no statistički značajno pozitivno korelirane s razinama proteina SERT (**Slika 4.3.c-e**). Paralelnost

regresijskih pravaca (**Slika 4.3.c-e**) upućuje na zaključak da je translacija podjednako učinkovita u svim metaboličkim skupinama, a da su povišene razine proteina SERT povezane sa njegovom sniženom razgradnjom u skupinama s predgestacijskom debljinom. Prethodnom studijom na kliničkim uzorcima terminske posteljice pokazan je pad razine i mRNA *SERT* i proteina SERT u trudnoćama kompliciranim GDM-om (Viau i sur., 2009), što se ne slaže s našim rezultatima. Razlog tome mogu biti prethodno spomenute razlike u dizajnu naše studije i studije Viau i sur. (2009), u kojoj se, za razliku od našeg istraživanja, nije razmatrao pITM majke te je većina porođaja bila izvedena vaginalnim putem. Funkcionalne analize su pokazale snižen unos serotonina u trofoblaste iz trudnoća kompliciranih GDM-om (Li i sur., 2014), koji je bio posljedica nižeg prijenosa proteina SERT od endoplazmatskog retikuluma do stanične membrane. Bilo bi vrijedno proširiti buduća istraživanja i istražiti funkcionalnost proteina SERT u kliničkim uzorcima posteljica iz trudnoća kompliciranih majčinom debljinom ili GDM-om.

Istraživanje učinaka majčinog metaboličkog stanja na molekularne procese u posteljici predstavlja veliku važnost u kontekstu regulacije fetalnog rasta i razvoja. Stoga smo istražili povezanost serotoninskog sustava posteljice s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi. Niže razine mRNA *SERT* bile su povezane s višom porođajnom masom i duljinom, ali ne i s ponderalnim indeksom novorođenčeta (**Tablica 4.11.**). Povezanost mRNA *SERT* s porođajnom masom i duljinom novorođenčeta je ostala statistički značajna kada smo u regresijski model uključili spol novorođenčeta, pušenje u trudnoći i gestacijsku dob kao kontrolne varijable (**Tablica 4.12.**).

Naši rezultati su u skladu s rezultatima nedavnog istraživanja na modelu miša, koji pokazuju da delecija gena *SERT* u posteljici dovodi do promjene u ekspresiji velikog broja gena posteljice uključenih u puteve prijenosa različitih hranjivih tvari, uključujući vitamine, lipide, ugljikohidrate i proteine, iz majčinog u fetalni krvotok (Mao i sur., 2021). Ovi literaturni podatci, i rezultati ovog doktorskog rada, upućuju na još jednu važnu ulogu SERT-a u posteljici – regulaciju prijenosa nutrijenata.

Ponderalni indeks novorođenčadi predstavlja jednu od mjera adipoziteta, analognu ITM-u u odraslih, koja je osobito korisna za prepoznavanje poremećaja fetalnog rasta (Roje i sur., 2004). U naše istraživanje nije bila uključena novorođenčad s dijagnozom intrauterinog zastoja rasta ili makrosomijom. No rezultati povezanosti mRNA *SERT* s porođajnom masom i duljinom su dobar poticaj za uključivanje novorođenčadi izvan normalnog raspona porođajne

mase u buduća istraživanja. Pokazano je da povišeni trigliceridi u GDM-u posreduju u povezanosti debljine s makrosomijom (Song i sur., 2022), što zajedno s pozitivnom korelacijom koncentracije triglicerida i mRNA *SERT* u posteljici, također upućuje na važnost daljnjih analiza povezanosti serotoninske homeostaze posteljice s neonatalnim karakteristikama koje bi u model uključile i majčino metaboličko stanje.

Zaključno, s obzirom na brojne uloge serotonina u posteljici, promijenjene razine proteina SERT mogu pokrenuti niz promjena u rastu i strukturi posteljice. SERT internalizira serotonin u unutarstanični prostor, čime se s jedne strane dokida serotoninska signalizacija, a s druge strane povećava količina serotonina dostupnog za regulaciju unutarstaničnih procesa ili prijenos preko posteljice do fetusa. Promjene u razinama serotonina u interviloznom prostoru mogu putem promijenjene serotoninske signalizacije imati učinak na rast i endokrine funkcije posteljice. Promjene u razinama serotonina unutar posteljice mogu uzrokovati promjene u rastu i razvoju fetusa. Buduća istraživanja trebala bi otkriti jesu li promjene u regulaciji ekspresije proteina SERT adaptivni mehanizam ili pridonose poremećaju serotoninske homeostaze u posteljici. U slučaju poremećene serotoninske homeostaze biti će važno istražiti na koji način se nepovoljni učinci mogu prevenirati ili regulirati u trudnoćama kompliciranim debljinom ili GDM-om.

Kako bismo pobliže istražili molekularne mehanizme regulacije serotoninske homeostaze u posteljici, proveli smo genotipizacijske i metilacijske analize za polimorfizme i regije potencijalno uključene u regulaciju ekspresije gena *SERT*. Prema literaturi, u regulaciju razine mRNA *SERT* uključeni su trialelni polimorfizam u promotoru (*5HTTLPR/rs25532*) i polimorfizam duljine u drugom intronu (*STin2*) gena *SERT* (Hranilovic i sur., 2004; Murphy i Moya, 2011). Naši rezultati pokazali su da nema razlike u ekspresiji među genotipovima polimorfizma *5HTTLPR/ rs25532* (Slika 4.8.b) niti među genotipovima polimorfizma *STin2* (Slika 4.9.). Sveukupno, ovi rezultati upućuju na to da funkcionalni polimorfizmi gena *SERT* zasebno nemaju značajan učinak na regulaciju transkripcije ovog gena u posteljici čovjeka pri kraju trudnoće.

S druge strane, analize metilacije DNA upućuju na važnost epigenetičke regulacije ekspresije gena *SERT* u posteljici. Konkretno, dobiveni rezultati su pokazali da je metilacija DNA 14 CpG-mjesta unutar prvog introna gena *SERT* negativno korelirana s razinama mRNA *SERT* (Slika 4.14.). Ovi rezultati su u skladu s generalnim mehanizmom utišavanja ekspresije gena putem metilacije DNA, koja remeti vezivanje čimbenika transkripcije u području

regulatornih dijelova gena (Jones, 2012; Moore i sur., 2013). Zanimljivo, negativna korelacija metilacije i razine mRNA u posteljici bila je ograničena samo na skupinu sudionica s normalnom tjelesnom masom, dok je u skupini sudionica s debljinom ovaj odnos bio narušen. Metilacija DNA djeluje na ekspresiju gena zajedno s ostalim epigenetičkim mehanizmima poput metilacije histona i malih nekodirajućih RNA (miRNA) (Moore i sur., 2013). Poznato je da miRNA imaju važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji ekspresije gena *SERT* u posteljici čovjeka (Moya i sur., 2013). Osim toga, ekspresija pojedinih miRNA promijenjena je u trudnoćama s GDM-om (Sun i sur., 2020). Epigenetički mehanizmi, poput miRNA, potencijalno moduliraju regulaciju ekspresije gena putem metilacije DNA u trudnoćama praćenima debljinom ili GDM-om, što iziskuje pozornost u daljnjim istraživanjima.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima analize metilacije promotorske regije gena *SERT*, dobivenim u prethodnoj kliničkoj studiji na manjem uzorku sudionika (Blazević i sur., 2017). U navedenom istraživanju, metilacija na području promotora gena *SERT* (koje se preklapa s područjem promotora istraživanim na staničnom modelu u ovom doktorskom radu, **Slika 3.2.a**, CpG 1-10) također je bila negativno korelirana s razinom mRNA *SERT*. Nadalje, koncentracije glukoze u plazmi majke u drugom tromjesečju trudnoće bile su u negativnoj korelaciji s metilacijom DNA u promotoru gena *SERT* (Blazević i sur., 2017). Metilacija DNA predstavlja potencijalni mehanizam putem kojeg majčino metaboličko stanje regulira ekspresiju gena *SERT* u posteljici. Stoga će naše daljnje analize detaljnije istražiti povezanost majčinog metaboličkog stanja s razinom metilacije DNA u prvom intronu gena *SERT*, u našem uzorku posteljica. Zanimljivo, metilacija nizvodne regije prvog introna gena *SERT* bila je povezana s majčinim metaboličkim stanjem i u krvi pupkovine (Lillycrop i sur., 2019). Ovo dodatno naglašava osjetljivost metilacije gena *SERT* na promjene u majčinom metabolizmu koje se mogu odraziti na potomstvo.

Dobivene razine metilacije DNA istraživane regije gena *SERT* u posteljici (raspon od 0,76% – 28,51%, **Slika 4.13.**) slične su razinama metilacije ove regije u uzorcima krvi pupkovine dobivenim na našem uzorku (raspon od 2,91% - 51,86%) (Bečeheli i sur., 2024) kao i uzorcima iz objavljene literature (raspon srednjih vrijednosti pojedinačnih CpG-mjesta od 10% do 50%) (Dukal i sur., 2015). Dodatno, u skladu s pokazanim razinama metilacije u krvi pupkovine (Bečeheli i sur., 2024; Dukal i sur., 2015), razine metilacije u posteljici bile su značajno više u uzorcima ženske nego muške novorođenčadi (**Slika 4.13.**). Većina diferencijalno metiliranih regija u somatskim tkivima ima više razine metilacije u ženskim u

odnosu na muške uzorke (McCarthy i sur., 2014). Obrnuto, većina diferencijalno metiliranih regija u posteljici pokazuje više razine metilacije u muške nego ženske novorođenčadi (Inkster i sur., 2021). Navedeni rezultati upućuju da je specifični uzorak metilacije područja introna gena *SERT* u posteljici ovisan o spolu sličniji uzorku većine diferencijalno metiliranih regija u somatskim tkivima nego uzorku većine diferencijalno metiliranih područja u samoj posteljici.

5.1.2 Monoaminoksidaza A – MAOA

Posteljica eksprimira velik broj enzima i transportera koji sudjeluju u razgradnji i iznošenju hormona i ksenobiotika (Burton i Fowden, 2015) te na taj način štiti plod od potencijalno štetnih tvari iz majčina krvotoka. Monoaminoksidaza A (MAOA), enzim koji razgrađuje monoamine s najvišim afinitetom za serotonin, visoko je ekspimirana u posteljici (Auda i sur., 1998; Karahoda i sur., 2020a; Pavličev i sur., 2017; Sivasubramaniam i sur., 2002). To potvrđuju i naši rezultati prema kojima je mRNA *MAOA* bila visoko ekspimirana u uzorcima posteljica na kraju trudnoće.

Ekspresija gena *MAOA* u posteljici identificirana je kao biološki posrednik povezanosti prenatalnog stresa i temperamenta djeteta (Pehme i sur., 2018). Također je pokazano da su ekspresija gena *MAOA* i katalitička efikasnost enzima MAOA promijenjeni u posteljicama iz trudnoća s preeklampsijom (Sivasubramaniam i sur., 2002), međutim potencijalne promjene ekspresije gena *MAOA* i aktivnosti ovog enzima u posteljici nisu dosad istraživane u kontekstu majčine debljine ili GDM-a.

U ovom istraživanju smo otkrili da ekspresija gena *MAOA* u posteljici, za razliku od ekspresije gena *SERT*, nije povezana s majčinim predgestacijskim statusom tjelesne mase, niti sa statusom tolerancije glukoze u trudnoći, kao niti s koncentracijom lipida u krvi. Ovi rezultati upućuju na to da majčino metaboličko stanje nema učinka na ekspresiju gena *MAOA* u posteljici. Nasuprot tome, na razini enzimske aktivnosti MAOA uočili smo određene promjene povezane s majčinim metaboličkim stanjem. Maksimalna brzina enzimske reakcije (V_{max}), mjera ukupne količine aktivnog proteina MAOA, nije se razlikovala između različitih metaboličkih skupina (**Slika 4.4.**). Međutim, vrijednosti K_m enzima bile su značajno više u posteljicama iz trudnoća s GDM-om u odnosu na trudnoće s normalnom tolerancijom glukoze (**Slika 4.5.a**). Povišena vrijednost K_m upućuje na snižen afinitet enzima MAOA prema supstratu, što bi moglo biti posljedica prisutnosti čimbenika koji inhibiraju vezivanje supstrata za vezno mjesto na enzimu u posteljicama iz trudnoća s GDM-om (Silverstein, 2019). Slabiji

afinitet enzima MAOA u posteljicama iz trudnoća s GDM-om potencijalno može uzrokovati veću dostupnost serotonina fetusu zbog nemogućnosti njegove brze razgradnje unutar posteljice. Naime, ekspresija i aktivnost enzima MAOA je povišena krajem trudnoće (Karahoda i sur., 2020a), a eksplantat posteljice na kraju trudnoće metabolizira približno 75% serotonina iz medija (Karahoda i sur., 2020b). Rezultati ovih istraživanja upućuju na važnost uloge enzima MAOA u razgradnji serotonina u posteljici na kraju trudnoće.

Enzimski aktivnosti MAOA u posteljici čovjeka određivana je u pet prethodnih istraživanja koja su, kao i mi, koristila kinuramin kao supstrat za MAO. U dva od spomenutih istraživanja izmjerene vrijednosti kinetičkih parametara V_{\max} i K_m su usporedive s našima (Naoi i Nagatsu, 1987; Weyler i Salach, 1985), dok je jedna studija pokazala vrlo niske razine V_{\max} (Zhang i sur., 2010). Razlozi ovih razlika nisu potpuno jasni, ali potencijalno ovise o metodi izdvajanja proteina. Tako je u jednoj studiji, visoko pročišćen izolat proteina MAOA iz posteljice pokazao puno veću razinu V_{\max} u odnosu na naše rezultate (Javors i sur., 1989). Inter-individualna varijabilnost enzimske aktivnosti MAOA među uzorcima posteljica u našem je istraživanju bila relativno mala (V_{\max} varirao je do pet puta) u odnosu na jednu studiju, u kojoj je raspon V_{\max} obuhvaćao vrijednosti dobivene u našem istraživanju, ali je varirao čak do 65 puta među uzorcima posteljica (Abdelouahab i sur., 2010).

Zanimljivo, više razine mRNA *MAOA* bile su povezane s višim vrijednostima V_{\max} enzima MAOA u skupini zdravih sudionica, ali ne i u ostalim metaboličkim skupinama. Ovaj rezultat upućuje da u slučaju majčine debljine, GDM-a ili njihove kombinacije dolazi do nekog oblika interferencije u proces translacije i/ili regulacije razgradnje proteina, što u konačnici remeti linearan odnos između razine transkripta i aktivnosti njegovog proteinskog produkta.

Kako bismo istražili molekularne mehanizme regulacije ekspresije gena *MAOA* u posteljici, genotipizirali smo polimorfizam duljine *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* te odredili razinu metilacije u regiji prvog egzona i introna gena *MAOA*. Za polimorfizam *uVNTR* prethodno je pokazano da je povezan s razinom ekspresije u posteljici čovjeka (Zhang i sur., 2010) i aktivnosti enzima MAOA u staničnom modelu trofoblasta (Sabol i sur., 1998). U našem istraživanju, pronašli smo razlike u povezanosti ovog polimorfizma i ekspresije gena *MAOA* u posteljici, ovisne o spolu. U ženske novorođenčadi, razina mRNA *MAOA* bila je viša u posteljicama s genotipom 3/3 u odnosu na genotip 4/4 ili 3/4, dok između genotipova 3/4 i 4/4 nije bilo razlike (**Slika 4.11.a**). U muške novorođenčadi, nije bilo razlike u razini mRNA *MAOA* između hemizigotnih genotipova 3 i 4. Budući da je skupina ženske novorođenčadi

genotipa 3/3 bila relativno mala ($n = 13$), a u muške novorođenčadi nije postojala značajna razlika u razinama mRNA *MAOA* u posteljici, potrebno je provesti dodatno istraživanje na većem broju uzoraka kako bi se sa sigurnošću potvrdio rezultat dobiven u posteljicama ženske novorođenčadi. Sveukupno, rezultati genotipizacije polimorfizma *uVNTR* gena *MAOA* upućuju da mRNA *MAOA* u posteljicama muške novorođenčadi nije regulirana duljinom polimorfne regije *uVNTR*, dok u ženske novorođenčadi postoji mogućnost regulacije ekspresije mRNA *MAOA* ovisno o broju ponavljanja polimorfizma *uVNTR*.

U prethodnom istraživanju na posteljicama čovjeka, alel duljine 4 ponavljanja, u odnosu na alel duljine 3 ponavljanja, bio je povezan s višom razinom mRNA *MAOA* (Zhang i sur., 2010), što je u suprotnosti s našim rezultatima. Navedena studija razmatrala je rezultate neovisno o spolu što je moglo pridonijeti razlikama između rezultata istraživanja. Nadalje, u modelu stanica trofoblasta aleli duljine 3,5 i 4 ponavljanja povezani su s visokom aktivnošću enzima *MAOA* (Sabol i sur., 1998). S obzirom na lokaciju polimorfizma *uVNTR* u promotoru gena *MAOA*, nije za očekivati da bi genotip bio povezan s aktivnošću proteina, a da ta povezanost nije posredovana regulacijom razine mRNA, te stoga nismo istraživali vezu genotipa i enzimske aktivnosti. Općenito, literaturni podatci su neusuglašeni i potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnila povezanost polimorfizma *uVNTR* s ekspresijom gena *MAOA* u posteljici.

Analize metilacije prvog egzona i introna gena *MAOA* u uzorcima posteljice pokazale su razlike u povezanosti metilacije *MAOA* i razine mRNA *MAOA*, ovisne o spolu. U muške novorođenčadi, više razine metilacije bile su povezane s nižim razinama mRNA *MAOA* (**Slika 4.17.a**), dok u ženske novorođenčadi nije bilo korelacije između ova dva parametra (**Slika 4.16.a**). Ovi rezultati upućuju da je u posteljicama muške novorođenčadi metilacija DNA uključena u regulaciju transkripcijske aktivnosti gena *MAOA*. Metilirani konstrukti ovog odsječka transfecirani u model stanica embrionalnog bubrega čovjeka HEK293 pokazali su sniženu promotorsku aktivnost (Checknita i sur., 2015) što jasno upućuje na regulatornu ulogu ovog područja. U skladu s našim rezultatima, viša metilacija CpG-otoka u promotoru gena *MAOA* povezana je s nižom razinom mRNA *MAOA* u uzorcima tkiva kolangiokarcinoma muških pacijenata (Huang i sur., 2012). Osim toga, povišena metilacija istog područja u perifernoj krvi povezana je sa sniženom aktivnošću enzima u mozgu čovjeka (Shumay i sur., 2012). Povezanost između razine metilacije i razine mRNA gena *MAOA* te povezanost između razine mRNA *MAOA* i aktivnosti (V_{\max}) enzima *MAOA* upućuje na to da metilacija gena

MAOA sudjeluje u regulaciji aktivnosti MAOA, barem u posteljicama muške novorođenčadi. Ovo predviđanje je u skladu s rezultatom studije koja je pokazala da metilacija DNA gena *MAOA* u krvi predviđa aktivnost MAOA u mozgu zdravih muškaraca (Shumay i sur., 2012). Budući da je naš uzorak uključivao mali broj muške novorođenčadi iz zdravih trudnoća kojima je izmjerena razina metilacije DNA i enzimaska aktivnost MAOA ($n = 5$), bilo bi potrebno proširiti istraživanje kako bi se potvrdila navedena pretpostavka.

U našem istraživanju, razina metilacije je bila izrazito viša u posteljicama ženske nego muške novorođenčadi na svim CpG-mjestima (**Slika 4.15.**). Viša razina metilacije prvog egzona u žena u odnosu na muškarce uočena je u nekoliko prethodnih studija (Checknita i sur., 2018; Melas i Forsell, 2015), što se može povezati s nasumičnom inaktivacijom jednog kromosoma X mehanizmom metilacije DNA (Cotton i sur., 2011). Uzorak inaktivacije je osobito specifičan u posteljici (takozvani pjegavi uzorak, engl. *patchy*), s velikim područjima inaktivacije ili majčinog ili očevog kromosoma X (Phung i sur., 2022). Poznato je i da je dio gena na kromosomu X sklon izbjegavanju inaktivacije (Peeters i sur., 2014; Phung i sur., 2022). Spomenuti fenomeni potencijalno pridonose uočenim velikim inter-individualnim razlikama u razinama metilacije DNA pojedinih CpG-mjesta analiziranog područja gena *MAOA* u našem istraživanju (**Slika 4.15.**).

5.1.3 Receptor serotonina tipa 2A – HTR2A

Receptor serotonina tipa 2A je najistraživaniji tip receptora serotonina u posteljici te je, osim tipa 1A, jedini receptor serotonina za kojeg je pokazana ekspresija u posteljici na razini i mRNA i proteina (Perić i sur., 2022). U našem istraživanju, razine mRNA *HTR2A* u posteljici su bile relativno niske u odnosu na ostale regulatorne gene serotonina. To bi moglo značiti da HTR2A nema ključnu ulogu u biologiji posteljice pri kraju trudnoće no za konačne zaključke bilo bi nužno istražiti razine proteina HTR2A. Osim toga, bilo bi važno istražiti moguću povezanost debljine i GDM-a s promjenama ostalih tipova receptora koji su eksprimirani u posteljici.

U našem istraživanju nismo uočili razliku u razinama mRNA *HTR2A* u posteljicama između metaboličkih skupina sudionica (**Slika 4.1.f.**). Međutim, uočena je negativna korelacija između razine mRNA *HTR2A* u posteljici i koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola u majčinoj krvi (**Tablica 4.4.**). Povišene koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola u krvi povezane su s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Wadhera i sur.,

2016). Koncentracije ovih lipida se ne razlikuju ovisno o statusu debljine (Feingold, 2000) ili prisutnosti GDM-a (Ryckman i sur., 2015), ali je povišena koncentracija LDL-kolesterola u krvi majke tijekom trudnoće povezana s povećanim omjerom mase posteljice prema porođajnoj masi novorođenčeta (Mitsuda i sur., 2023). Serotonin aktivacijom receptora HTR2A pokreće signalnu kaskadu koja uključuje signalne putove ERK1/2 i STAT3 čime stimulira proliferaciju staničnih linija trofoblata (BeWo, JEG-3) (Oufkir i sur., 2010; Oufkir i Vaillancourt, 2011; Sonier i sur., 2005). Moglo bi se nagađati da ovdje opažena snižena ekspresija gena *HTR2A* u uvjetima viših koncentracija LDL-kolesterola u krvi majke predstavlja kompenzacijski odgovor s ciljem smanjenja serotoninske signalizacije te posljedično prekomjernog rasta posteljice. Povišene razine triglicerida u krvi majke također uzrokuju povećan rast posteljice (Mitsuda i sur., 2023) pa bi se i naš rezultat povezanosti viših koncentracija triglicerida u krvi majke s višim razinama mRNA *SERT* u posteljici, naročito u skupini sudionica s GDM-om, mogao protumačiti na isti način – kao kompenzacijski odgovor na prekomjerni rast posteljice, s ciljem smanjenja serotoninske signalizacije snižavanjem razina serotonina u međustaničnom prostoru. Važno je naglasiti da je koncentracija triglicerida bila indikativno ($p = 0,073$) pozitivno ($r_p = 0,23$) korelirana i s razinom proteina *SERT* u posteljici. Mogući razlog granične statističke značajnosti ovog rezultata je manji broj uključenih sudionica ($n=61$), pa bi ovaj međuodnos vrijedilo istražiti na većem uzorku i osobito u kontekstu različitog statusa tolerancije glukoze u trudnoći.

Istraživanja upućuju na to da receptor HTR2A posreduje u vazokonstriktivnim učincima serotonina, tj. regulaciji protoka krvi kroz posteljicu (Bertrand i St-Louis, 1999; Reviriego i sur., 1990; Ugun-Klusek i sur., 2011). Nadalje, studije na primarnim trofoblastima čovjeka (Hudon Thibeault i sur., 2017) te na staničnim linijama trofoblata (BeWo, JEG-3) (Klempan i sur., 2011) pokazale su da serotonin, putem aktivacije receptora HTR2A, inducira ekspresiju i aktivnost aromataze CYP19, ključnog enzima u sintezi estrogena u posteljici. Stoga, promijenjene razine mRNA *HTR2A* u uvjetima majčine dislipidemije mogu upućivati i na promjene u protoku krvi kroz posteljicu ili promjene u endokrinim funkcijama posteljice.

Kao i geni *SERT* i *MAOA*, gen *HTR2A* također sadrži genetičke varijante i epigenetičke motive koji potencijalno sudjeluju u regulaciji njegove ekspresije. Naši rezultati pokazali su da razina mRNA *HTR2A* ne ovisi o genotipu učestalog polimorfizma *rs6311* (-1438 G > A, **Slika 4.12.a**) u promotorskoj regiji gena. Ovaj rezultat je u suprotnosti s istraživanjem koje je pronašlo povezanost genotipa GG i GA s povišenom ekspresijom gena *HTR2A* u mozgu

čovjeka (Abdolmaleky i sur., 2011), što upućuje na tkivnu specifičnost učinaka ovog polimorfizma.

Potencijalna regulatorna uloga rijetkog polimorfizma *rs6306* (-1421 C > T), smještenog također u promotorskoj regiji gena *HTR2A*, do sad nije bila istraživana. Naši rezultati su pokazali da je rijetka varijantu ovog polimorfizma povezana sa sniženom razinom mRNA *HTR2A* u uzorcima posteljice (**Slika 4.12.b**), što ističe važnost uključivanja polimorfizma *rs6306* u buduća istraživanja regulacije ekspresije gena *HTR2A*.

Analiza metilacije dvaju CpG-mjesta u promotoru gena *HTR2A* pokazala je izrazito visoke razine metilacije CpG-mjesta 4464 i relativno visoke metilacije mjesta 4905 (**Slika 4.18.**). Visoka prosječna metilacija na ova dva CpG-mjesta i okolnim mjestima u regiji promotora gena *HTR2A* zabilježena je u različitim tkivima čovjeka (Hranilovic i sur., 2016; Perez-Cornago i sur., 2014). Iako je pokazano je da ova mjesta sudjeluju u regulaciji razine ekspresije gena *HTR2A* (Abdolmaleky i sur., 2011; Cheah i sur., 2017; Falkenberg i sur., 2011; Polesskaya i sur., 2006), mi nismo uočili korelaciju razine metilacije CpG-mjesta 4464 (**Slika 4.19.a**) i 4905 (**Slika 4.18.b**) s razinom ekspresije gena *HTR2A* u posteljici. To upućuje na postojanje alternativnih mehanizama u posteljici, poput miRNA ili histonskih modifikacija, koji djeluju na razinu mRNA *HTR2A* i koje je potrebno dodatno istražiti.

Razina metilacije na oba CpG-mjesta bila je viša u posteljicama muške nego ženske novorođenčadi. Ovo je u skladu s nedavnim istraživanjem prema kojem je razina metilacije viša u posteljicama muške novorođenčadi na većini autosomalnih lokusa sa spolno specifičnom metilacijom DNA (Inkster i sur., 2021).

5.1.4 Ostali regulatorni geni serotonina u posteljici – *OCT3*, *TPH1* i *MAOB*

U radu smo istražili povezanost majčinog metaboličkog stanja s razinama mRNA još nekoliko regulatornih gena serotonina u posteljici, uključujući jedan prijenosnik monoamina niskog afiniteta i visokog kapaciteta – *OCT3*, ključni sintetski enzim serotonina – *TPH1* te izoformu enzima za razgradnju monoamina s niskim afinitetom za serotonin – *MAOB*.

Razina mRNA *OCT3* u posteljici nije se razlikovala između metaboličkih skupina (**Slika 4.1.b**) niti je korelirala s majčinim pITM-om (**Tablica 4.3.**). Međutim, više koncentracije HDL-kolesterola u krvi majke bile su povezane s višim razinama mRNA *OCT3* u posteljici (**Tablica 4.4.**), što je bilo ograničeno samo na skupinu s normalnom tolerancijom

glukoze. Prema literaturi, serumske razine HDL-kolesterola na kraju trudnoće niže su u žena s GDM-om nego u žena s normalnom tolerancijom glukoze (Ryckman i sur., 2015). Prema našim podacima, koncentracije HDL-kolesterola bile su niže u krvi žena s debljinom, dok dijagnoza GDM-a nije bila povezana s njegovim razinama (**Slika 4.2.b**). Studija Ryckman i sur. (2015) nije u analizu uključila status debljine majke što je moglo pridonijeti uočenim razlikama. Naši rezultati upućuju na složenu povezanost koncentracija HDL-kolesterola s razinom mRNA *OCT3* u ovisnosti o statusu tjelesne mase i GDM-a koju je potrebno dalje istražiti.

Razine mRNA *OCT3* u posteljici pokazale su veliku inter-individualnu varijabilnost u našem istraživanju (u nekoliko uzoraka bile su čak ispod praga detekcije). Ovaj podatak upućuje da na razine mRNA *OCT3* u posteljici pri kraju trudnoće djeluju različiti čimbenici koje bi bilo vrijedno detaljnije istražiti u budućim istraživanjima.

Unutar trofoblasta, serotonin se ne skladišti u unutarstaničnim vezikulama. To potvrđuju rezultati o nedostatku aktivnosti vezikularnog monoaminskog prijenosnika (VMAT) u modelima trofoblasta *in vitro* (Prasad i sur., 1996), kao i rezultati o nedostatku mRNA za dvije izoforme proteina VMAT u posteljici čovjeka (Bottalico i sur., 2004; Pavličev i sur., 2017; Suryawanshi i sur., 2018). Pohranjivanje serotonina u unutarstaničnim vezikulama omogućuje oslobađanje ovog monoamina iz stanica egzocitozom (De-Miguel i Trueta, 2005; Leon-Pinzon i sur., 2014; Reed i sur., 2000). Mehanizmi oslobađanja unutarstaničnog serotonina koji nije pohranjen u vezikulama manje su poznati. Jedan mogući put oslobađanja je upravo putem prijenosnika organskih kationa OCT2 (Busch i sur., 1998) ili OCT3 (Kekuda i sur., 1998), koji prenose organske katione u oba smjera kroz membranu stanice. Dok OCT2 nije detektiran (Sata i sur., 2005) ili je detektiran u vrlo niskim razinama (Ahmadimoghaddam i sur., 2013; Baković i sur., 2021; Hasegawa i sur., 2020; Lee i sur., 2013; Sonier i sur., 2005) u stanicama posteljice, OCT3 je obilno eksprimiran u posteljici kroz cijelu trudnoću (Hasegawa i sur., 2020; Karahoda i sur., 2020a; Lee i sur., 2013; Sata i sur., 2005). Pretpostavlja se da je lokaliziran na bazalnoj membrani posteljice okrenutoj prema fetusu (Karahoda i sur., 2020b; Lee i sur., 2018; Sata i sur., 2005) te je to jedini trenutno predloženi mehanizam prolaska serotonina iz posteljice prema fetusu, što ga čini zanimljivom metom daljnjih istraživanja.

Razina mRNA *TPHI* u posteljici nije se razlikovala između metaboličkih skupina sudionica (**Slika 4.1.c**) niti je bila povezana s majčinim pITM-om (**Tablica 4.3.**) ili serumskim koncentracijama lipida (**Tablica 4.4.**). U prethodnom istraživanju, pronađena je povišena aktivnost TPH u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem rasta fetusa u usporedbi s

posteljicama kontrolnih trudnoća iste gestacijske dobi (Ranzil i sur., 2019). Prema tome, bilo bi važno u istraživanje uključiti novorođenčad izvan normalnog raspona porođajne mase. Istraživanje na animalnom modelu pokazalo je da eksperimentalno izazvana upala u organizmu majke podiže sintezu serotonina u posteljici te dovodi do neurorazvojnih promjena kod fetusa (Goeden i sur., 2016). Bilo bi stoga važno u budućim kliničkim istraživanjima ispitati moguću povezanost između majčinih upalnih biomarkera i ekspresije gena *TPHI* u posteljici.

Važno je naglasiti da smo u našem istraživanju pronašli vrlo niske razine mRNA *TPHI* u uzorcima tkiva posteljica na kraju trudnoće, što je u skladu s prethodnom studijom, kojom je metodom imunohistokemije, pronađena prisutnost samo sporadičnih slabih signala proteina TPH1 u terminskim posteljicama (Kliman i sur., 2018). U nekoliko drugih istraživanja pokazana je prisutnost mRNA *TPHI* (Karahoda i sur., 2020a; Laurent i sur., 2017; Ranzil i sur., 2019) i aktivnost enzima TPH (Ranzil i sur., 2019) u posteljici čovjeka na kraju trudnoće. Međutim, analizom transkriptoma pojedinačnih stanica nije dokazana mRNA *TPHI* u stanicama terminske posteljice čovjeka (Pavličev i sur., 2017), što upućuje na to da se *TPHI* eksprimira samo u određenom tipu stanica posteljice. Također je pokazano da je ekspresija gena *TPHI* i aktivnost enzima TPH1 u posteljici niža na kraju nego na početku trudnoće (Karahoda i sur., 2020a, 2020b), što upućuje na veću važnost sinteze serotonina u posteljici u ranim fazama trudnoće.

U skladu s literaturnim podacima o niskim razinama mRNA *MAOB* u terminskoj posteljici (Karahoda i sur., 2020b; Pavličev i sur., 2017), detektirali smo vrlo niske razine mRNA *MAOB* u uzorcima posteljica, koje se nisu razlikovale s obzirom na majčin metabolički status (**Slika 4.1.e**). Budući da izoforma *MAOB* ima niski afinitet za serotonin (Tipton, 2018) te da ima puno nižu ekspresiju u posteljici od izoforme *MAOA* koja ima visok afinitet za serotonin, dodatna istraživanja na razini mRNA *MAOB* vjerojatno ne bi imali veliku važnost u kontekstu regulacije homeostaze serotonina u posteljici. Sva istraživanja mRNA *MAOB* su stoga bila ograničena na otkrivajuću kohortu.

5.2 Istraživanje na kulturi stanica

Ovo je prvo istraživanje učinaka glukoze, inzulina i kisika na razine ekspresije tri ključna regulatorna gena serotonina, *SERT*, *TPHI* i *MAOA in vitro*, na modelu stanica posteljice čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće, s naglaskom na razine kisika koji su karakteristične za rani razvoj posteljice čovjeka.

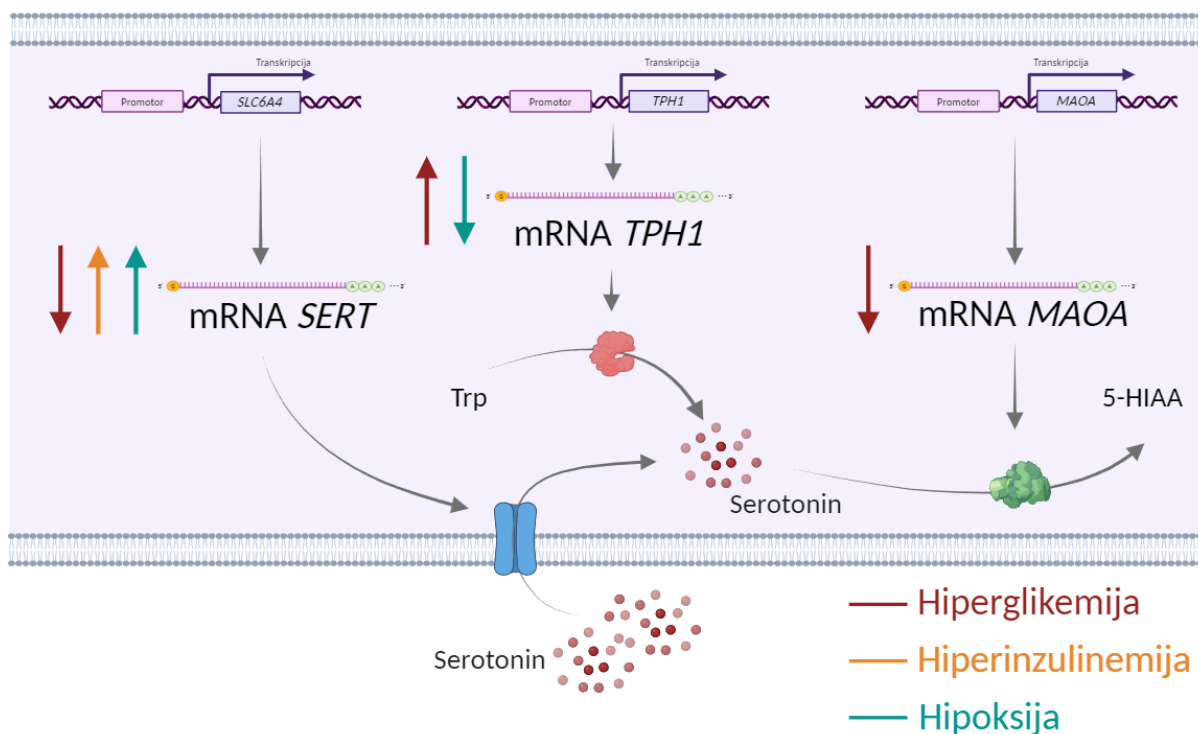
5.2.1 Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri atmosferskoj razini kisika

Istraživanje učinaka glukoze na modelu stanica trofoblasta ACH-3P iz prvog tromjesečja trudnoće započeli smo u uvjetima atmosferske razine kisika (21,0%, **Slika 4.20.**). Pri atmosferskoj razini kisika, visoka razina glukoze imala je izrazite učinke na razine mRNA gena *SERT*, *TPHI* i *MAOA*, povisujući ekspresiju sva tri gena za 1,5 do 2 puta nakon 72 h.

Naši rezultati na tkivu posteljice na kraju trudnoće pokazali su da je metilacija DNA u intronu gena *SERT* bila negativno korelirana s ekspresijom mRNA gena *SERT* (**Slika 4.14.**). Metilacija DNA je epigenetički mehanizam osjetljiv na okolišne promjene (Bianco-Miotto i sur., 2017). Prethodno je istraživanje sugeriralo da metilacija gena *SERT* potencijalno posreduje učincima dugotrajne izloženosti glukozi na ekspresiju gena *SERT* u posteljici čovjeka (Blazevic i sur., 2017). Kako bismo istražili je li metilacija DNA mehanizam odgovoran za učinak kratkotrajne izloženosti glukozi na ekspresiju mRNA *SERT* u ACH-3P stanicama pri atmosferskoj razini kisika, analizirali smo metilaciju promotora i prvog introna gena *SERT* u reprezentativnim uzorcima stanica. Međutim, nismo otkrili nikakve promjene u metilaciji DNA između kontrolnih i stanica izloženih visokoj razini glukoze (**Slika 4.21.**). Ovaj rezultat upućuje na to da metilacija DNA nema značajnu ulogu na ekspresiju mRNA gena *SERT* u trofoblastima, nakon kratkotrajne izloženosti visokoj koncentraciji glukoze.

5.2.2 Učinci glukoze i inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5 % i 2,5 %

U nastavku smo istražili učinke glukoze u uvjetima razina kisika koje su prisutne *in vivo* tijekom ranih faza razvoja posteljice (2,5% i 6,5%). Rezultati ovih istraživanja sažeti su na **Slici 5.2.** Ukratko, pokazali smo da visoka razina glukoze snižava razinu mRNA *SERT*, dok niska razina kisika ili visoka razina inzulina povisuju razinu mRNA *SERT*. Niža razina mRNA *SERT* u uvjetima hiperglikemije bila je vidljiva pri obje razine kisika, što je dokazano statistički značajnim glavnim učinkom glukoze, iako bi se moglo zaključiti da je u kasnijoj vremenskoj točki sniženje razine bilo izraženije pri 6,5% kisika, na što upućuje granična značajnost interakcije učinaka glukoze i kisika ($p = 0,051$) i rezultati *post-hoc* testa. S druge strane, inzulin je povisio razinu mRNA *SERT* samo pri 2,5% kisika. Ovo zajedno upućuje na to da su već rano u trudnoći trofoblasti osjetljivi na majčine metaboličke promjene.



Slika 5.2. Učinak glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju regulatornih gena serotonina u trofoblastima čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće. SERT – serotoninški transporter, TPH1 – triptofan hidrosilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina, ↑ povišena razina, ↓ snižena razina. Izrađeno korištenjem računalnog programa Biorender.com.

Učinak povišene koncentracije glukoze na funkciju proteina SERT istražen je do danas u staničnoj liniji Caco-2, uspostavljenoj iz adenokarcinoma crijeva čovjeka (Gonçalves i sur., 2008). U skladu s našim rezultatima u stanicama ACH-3P, kratkotrajna izloženost visokoj glukozi (30 – 40 mM) smanjila je unos serotonina posredovan proteinom SERT u Caco-2 stanice (Gonçalves i sur., 2008). Međutim, dugotrajna izloženost (21 – 24 tjedna) Caco-2 stanica visokoj glukozi (30 mM) povećala je unos serotonina posredovan proteinom SERT (Gonçalves i sur., 2008). Ovaj je rezultat u skladu s prethodnom kliničkom studijom, u kojoj je pronađena korelacija između koncentracije glukoze u krvi majke natašte tijekom drugog tromjesečja trudnoće i ekspresije mRNA *SERT* u tkivu posteljice čovjeka na kraju trudnoće (Blazević i sur., 2017). Zajedno, ovi rezultati upućuju da učinci visoke glukoze na ekspresiju gena *SERT* ovise o trajanju izloženosti, pri čemu kratkotrajna izloženost rezultira sniženom ekspresijom, a dugotrajna izloženost rezultira povišenom ekspresijom.

U prethodnom istraživanju na primarnim trofoblastima čovjeka s kraja trudnoće, pokazano je da inzulin regulira promet proteina SERT od endoplazmatskog retikuluma do membrane stanice, ali da nema učinak na ekspresiju mRNA *SERT* (Li i sur., 2014). Spomenuti rezultati ekspresije u primarnim trofoblastima dobiveni su nakon 24 sata tretmana s inzulinom pri atmosferskoj razini kisika (21%) i u skladu su s našim rezultatima dobivenim na stanicama ACH-3P nakon 24 sata tretmana s inzulinom. Međutim, kada je trajanje tretmana s inzulinom produženo na 48 sati, inzulin je povećao razinu mRNA *SERT* pri 2,5% kisika, ali nije imao učinka pri 6,5% kisika. To pokazuje da i duljina trajanja tretmana i razina kisika igraju ulogu u određivanju učinka inzulina na ekspresiju gena *SERT*. Dodatno moguće objašnjenje za odstupanje između naših rezultata i rezultata studije (Li i sur., 2014) jest da učinak inzulina na razinu mRNA *SERT* može varirati ovisno i o razdoblju trudnoće.

U skladu s našim rezultatom povišene razine mRNA *SERT* pri razini kisika od 2,5% u usporedbi s 6,5%, razina mRNA *SERT* u staničnoj liniji posteljice BeWo bila je povišena pri 3% u usporedbi s 8% kisika (Gorczyca i sur., 2021). Hipoksija je povišila razinu mRNA *SERT* i u glatkim mišićnim stanicama plućnih krvnih žila (Eddahibi i sur., 1999). Suprotno tome, razina kisika nije utjecala na razinu mRNA *SERT* u terminskim eksplantatima posteljice (Gorczyca i sur., 2021). Važno je naglasiti da su eksplantati posteljice uzgajani pri kontroliranim razinama kisika tijekom 24 sata (Gorczyca i sur., 2021), dok je u našem eksperimentu s glukozom uzgoj stanica pri kontroliranim razinama kisika trajao 5 ili 7 dana (uključujući razdoblje prije tretmana), što je moglo pridonijeti različitim rezultatima. Potencijalni mehanizmi koji stoje u pozadini osjetljivosti gena *SERT* čovjeka na razine kisika mogu se objasniti prisutnošću motiva za vezanje transkripcijskih faktora osjetljivih na zasićenost kisikom, npr. faktora inducirano hipoksijom AP-1 u promotoru gena *SERT* (Bengel i sur., 1997; Eddahibi i sur., 1999).

Za razliku od mRNA *SERT*, razina mRNA *TPH1* se povišila u odgovoru na izlaganje stanica glukozi pri uvjetima kisika od 6,5% (Slika 4.22.b). Iako ne postoje studije koje su istraživale učinke glukoze na ekspresiju *TPH1* u modelima stanica posteljice, visoka razina glukoze izrazito je povišila razinu ekspresije *Tph1* u stanicama gušterače štakora, kako *in vitro* tako i *in vivo* (Zhang i sur., 2017). Spomenuto istraživanje upućuje na važnu ulogu enzima TPH1 u glukozom potaknutoj funkciji β -stanica gušterače (Zhang i sur., 2017).

Prethodna studija otkrila je da je razina mRNA *TPH1* povišena u uvjetima hipoksije u endotelnim stanicama pluća čovjeka (Ciucan i sur., 2013). Ovaj rezultat je u skladu s nalazom

da promotor gena *Tph1* miša sadrži elemente koji reagiraju na hipoksiju (HRE engl. *Hypoxia Responsive Elements*) i mjesto vezivanja za faktor induciran hipoksijom AP-1 (Ciuculan i sur., 2013). Međutim, u našim eksperimentima, razina mRNA *TPHI* bila je viša pri 6,5% kisika nego pri 2,5% kisika (**Slika 4.22.b**). Ovo upućuje na to da suptilne promjene kisika od 6,5% do 2,5% u posteljici čovjeka u ranoj trudnoći reguliraju ekspresiju gena *TPHI* alternativnim mehanizmom koji dominira nad mehanizmom induciranim hipoksijom. Mogući mehanizam mogao bi uključivati regulaciju pokretanjem mehanizma povratne sprege u odgovoru na povišene unutarstanične razine serotonina do kojih dolazi zbog povišene ekspresije gena *SERT* u uvjetima hipoksije i posljedično većeg unosa serotonina u stanicu. Ova pretpostavka zahtijeva daljnje istraživanje.

Poput razine mRNA *SERT*, razina mRNA *MAOA* u stanicama ACH-3P je bila snižena u uvjetima hiperglikemije (**Slika 4.22.c**). U prethodnom istraživanju, kratkotrajna izloženost visokoj glukozi povisila je ekspresiju *MAOA* u tkivu arterija dojke, *in vitro* (Lascu i sur., 2022). Osim što se ti rezultati odnose na drukčiji eksperimentalni model od našeg, ti učinci su opaženi pri atmosferskim razinama kisika od 21% i ne mogu se izravno usporediti s našim rezultatima dobivenim pri niskim razinama kisika.

Naši rezultati su pokazali da razina kisika nema učinak na razinu mRNA *MAOA* (**Slika 4.22.c**). U skladu s ovim rezultatom, razine mRNA *MAOA* nisu promijenjene u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom (Sivasubramaniam i sur., 2002), stanjem koje karakterizira izrazita hipoksija posteljice. Međutim, u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom pronađena je snižena aktivnost *MAOA* (Carrasco i sur., 2000; Sivasubramaniam i sur., 2002). Na temelju ovih rezultata moglo bi se zaključiti da kisik nema učinak na ekspresiju *MAOA*, ali mogao bi imati učinak na aktivnost *MAOA* u posteljici.

Inzulin nije imao učinak na razinu mRNA *MAOA* (**Slika 4.23.b**) ili *TPHI* (**Slika 4.23.c**). Do danas nema studija o mogućim učincima inzulina na ekspresiju *MAOA* ili *TPHI* u trofoblastima ili drugim tipovima stanica.

Naši rezultati o suprotnim učincima glukoze kao i kisika na razinu mRNA *SERT* i *TPHI*, zajedno s jednakim učincima glukoze na razinu mRNA *SERT* i *MAOA* (sažeto na **Slika 5.2**), mogu upućivati na moguće (pato)fiziološke implikacije. Primjerice, budući da *SERT* posreduje unos serotonina u stanice i ima ga u izobilju na površini sinciciotrofoblasta okrenutoj prema krvi majke (Balkovetz i sur., 1989; Karahoda i sur., 2020b), sniženje ekspresije gena

SERT u uvjetima hiperglikemije može dovesti do povećanih razina serotonina u izvanstaničnom prostoru i posljedično do hiperaktivacije serotoninских receptora. Ovisno o lokaciji i tipu receptora, to može uzrokovati vazoaktivne učinke na krvne žile majke ili promijeniti procese proliferacije, diferencijacije ili migracije trofoblasta, poznate učinke serotonina u posteljici (Perić i sur., 2022). S druge strane, povišena ekspresija gena *SERT* u uvjetima hiperinzulinemije ili hipoksije mogla bi dovesti do povećanih unutarstaničnih razina serotonina s potencijalnim učincima na biološke mehanizme putem serotonilacije unutarstaničnih proteina (Chan i sur., 2024; Farrelly i sur., 2019; Paulmann i sur., 2009).

Naši rezultati upućuju na sniženu ekspresiju gena *MAOA* u trofoblastima iz prvog tromjesečja trudnoće, u uvjetima hiperglikemije. Aktivnost enzima *MAOA* jedan je od najvažnijih posrednika u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) u stanicama (Maggiorani i sur., 2017). Kao što je prethodno pokazano u staničnoj liniji tumora mokraćnog mjehura štakora, smanjena proizvodnja ROS inhibicijom enzima *MAOA* smanjila je ekspresiju proteina uključenih u transport glukoze, kao što je GLUT1 (Resta i sur., 2022). Stoga se može nagađati da je snižena ekspresija *MAOA* u odgovoru na visoku glukozu adaptivni mehanizam s ciljem smanjenja oksidacijskog stresa i/ili transporta glukoze kroz posteljicu.

Važno je napomenuti da hiperosmolarnost utječe na proliferaciju stanica ACH-3P (Majali-Martinez i sur., 2021) kao i nekoliko drugih staničnih linija trofoblasta (Weiss i sur., 2001). U ovom istraživanju pokazali smo slične učinke hiperglikemije na ekspresiju gena od interesa u usporedbi s osmotskom kontrolom i/ili normoglikemičnom kontrolom, što upućuje na to da je na ekspresiju *SERT*, *TPHI* i *MAOA* izravno utjecala visoka glukoza, a ne povišeni osmotski tlak. Također je važno istaknuti da u našim eksperimentima s inzulinom, za razliku od eksperimenta s glukozom, nismo uočili statistički značajan učinak kisika na ekspresiju analiziranih gena. To može biti posljedica drugačijeg eksperimentalnog sustava, prvenstveno različitog trajanja inkubacije pri ispitivanim uvjetima kisika (3 i 4 dana u eksperimentima s inzulinom u usporedbi s 5 i 7 dana u eksperimentima s glukozom).

5.3 Prednosti, ograničenja i buduća istraživanja

Naše istraživanje na kliničkim uzorcima posteljice ima nekoliko prednosti. Prvo, u istraživanje je uključena dobro definirana kohorta sudionika ujednačenog etničkog porijekla (uglavnom hrvatskog). Posteljice uključene u istraživanje su bile porijeklom od zdrave

novorođenčadi rođene u punom terminu (> 37 tjedana) planiranim carskim rezom, čime su izbjegnuti potencijalni zbujujući učinci gestacijske dobi ili načina poroda na rezultate. Također, uključivanje samo sudionica čija je trudnoća prekinuta carskim rezom omogućilo je ujednačavanje vremenskog perioda od poroda do prikupljanja tkiva posteljice. Odabrani uzorak sudionika uključivao je ujednačen broj muške i ženske novorođenčadi te ujednačen broj sudionica s različitim statusom predgestacijske tjelesne mase i tolerancije glukoze u trudnoći. Druga velika prednost je da je istraživanje uključilo sve ključne regulatorne gene serotonina eksprimirane u posteljici, koji kodiraju za serotoninske prijenosnike – SERT i OCT3, metaboličke enzime serotonina – TPH1, MAOA i MAOB te receptor serotonina – HTR2A. Na taj način moguće je dobiti uvid u međusobne odnose pojedinih komponenti serotoninske homeostaze u istom modelu istraživanja. Nadalje, za ključne regulatorne gene serotonina – prijenosnik SERT i razgradni enzim MAOA, eksprimirane u visokim razinama u posteljici, odredili smo i učinke na razinu ili funkciju proteina.

Slabost istraživanja je što su sve analize provedene na ukupnom tkivu posteljice. Dok je korištenje tkiva posteljice uobičajeno u kliničkim studijama te rezultati istraživanja mogu pridonijeti razumijevanju učinaka za populacije stanica većinski prisutne u posteljici, poput trofoblasta, rjeđe zastupljene populacije stanica, poput Hoffbauerovih stanica, mogu biti zanemarene. Sljedeće, nije poznato utječe li način poroda na reprezentativnost rezultata stoga je potrebno u buduće studije uključiti sudionice čija trudnoća završava vaginalnim porodom. Konačno, naši rezultati su ograničeni samo na novorođenčad normalne porođajne mase. Kako bi se odredila povezanost istraživanih promjena u čitavom rasponu porođajnih masa novorođenčadi, u budućnosti će biti potrebno uključiti i novorođenčad izvan raspona porođajne mase koje je bilo zastupljeno u ovom istraživanju.

Naše istraživanje na kulturi stanica također ima svoje prednosti. Prvo, dok je većina studija patologija posteljice usredotočena na terminske posteljice, neke od tih patologija nastaju zbog disfunkcije posteljice već u ranom razdoblju trudnoće. Stoga je, u pogledu razvoja, važno proučavati posteljice u ranoj trudnoći. Mi smo se odlučili za staničnu liniju ACH-3P izvedenu iz trofoblasta prvog tromjesečja, koja je posebno prikladna za *in vitro* istraživanja jer nalikuje primarnim trofoblastima čovjeka u prvom tromjesečju, ali, u usporedbi s primarnim trofoblastima, ima proliferativna svojstva (Hiden i sur., 2007) te njihova dostupnost nije limitirana količinom i etičkim ograničenjima. Također, eksprimira receptore za inzulin (Tandl i sur., 2021), što je bilo posebno bitno za ovu studiju. Još jedna prednost je što smo proučavali

učinke glukoze i inzulina u uvjetima razina kisika koje su prisutne *in vivo*, budući da se rani razvoj posteljice odvija u hipoksičnom okruženju (Rodesch i sur., 1992), a pokazalo se da kisik regulira gene *SERT* i *TPHI* u različitim modelima stanica (Ciuclan i sur., 2013; Eddahibi i sur., 1999). Naši rezultati jasno pokazuju da je kisik glavna determinanta homeostaze serotonina u posteljici, koju treba uzimati u obzir i u budućim *in vitro* studijama. Na kraju, svojstva stanica u kulturi stanica ovise o broju pasaža stanica (Kwist i sur., 2016). Iz tog razloga, uključivanje broja pasaža stanica kao kovarijable u statističkim analizama daje snagu opaženim učincima.

Slabost našeg istraživanja na kulturi stanica je što smo analizirali samo razine mRNA, a nismo ispitivali razine ili funkciju proteina. Nadalje, koristili smo samo jednu staničnu liniju, što može ograničiti mogućnost generalizacije rezultata. Zbog činjenice da stanice ACH-3P imaju muški genotip (XY), potreban je oprez pri tumačenju trenutnih podataka, budući da odgovor posteljice na izmijenjenu okolinu varira između muških i ženskih fetusa (McIntyre i sur., 2019), a serotoninski sustav općenito pokazuje razlike specifične za spol (Perić i sur., 2022). Buduća istraživanja bi trebala uključiti razine i/ili aktivnosti ciljanih regulatornih proteina serotonina te dodatne gene i stanične linije. To bi doprinijelo sveobuhvatnijem razumijevanju regulacije serotonina u posteljici čovjeka.

Također ostaje za razjasniti jesu li opažene promjene ekspresije regulatornih gena serotonina u kontekstu majčine debljine ili GDM-a adaptivni odgovor posteljice da zaštiti fetus ili su posljedica nesposobnosti posteljice da se prilagodi promjenama u okolini. Nemogućnost prilagodbe mogla bi dovesti do nepovoljnih ishoda za rast i razvoj fetusa povezanih s majčinom debljinom i/ili GDM-om. U slučaju neprilagođenosti posteljice, regulatorne komponente serotonina u posteljici mogle bi postati potencijalna meta za prevenciju negativnih posljedica majčine debljine i GDM-a na zdravlje djeteta.

5.4 Doprinosi istraživanja

Rezultati ovog istraživanja doprinijeli su boljem razumijevanju molekularnih promjena u posteljici u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om. Naši rezultati naglašavaju da su i majčina predgestacijska debljina i GDM povezani s promijenjenom ekspresijom pojedinih komponenti serotoninskog sustava posteljice te da bi te promjene mogle pridonositi promijenjenoj serotoninskoj homeostazi u posteljici. Ova saznanja mogla bi u perspektivi voditi prema novim strategijama prevencije ili liječenja negativnih posljedica majčine debljine i GDM-a za zdravlje majke i potomstva. Dodatno, rezultati su pridonijeli

fundamentalnom razumijevanju molekularnih mehanizama regulacije serotoninske homeostaze u posteljici.

Svijest o negativnim učincima GDM-a na kratkoročno i dugoročno zdravlje majke i djeteta kontinuirano se podiže (Bedell i sur., 2021). Veliki napori ulažu se u pronalaženje kriterija za rano dijagnosticiranje GDM-a, kao što je mjerenje razine glukoze u krvi natašte (Bandres-Meriz i sur., 2020) te koncentracija određenih adipokina (Bao i sur., 2022) već u prvom tromjesečju trudnoće, kako bi se što ranije pristupilo prevenciji i sprječavanju negativnih utjecaja na zdravlje majke i djeteta. S druge strane, naši rezultati o povezanosti predgestacijske debljine i homeostaze serotonina u posteljici naglašavaju važnost primjerene tjelesne mase i prije samog ulaska u trudnoću, što je još uvelike zanemareno. Najdjelotvornijom za prevenciju metaboličkih promjena u organizmu majke s povišenom tjelesnom masom se trenutno pokazala povećana fizička aktivnost koja umanjuje razmjere promjena u majčinoj metaboličkoj i endokrinoj homeostazi te umanjuje dostupnost masti i ostalih hranjivih tvari za prijenos preko posteljice (Fernandez-Twinn i sur., 2017; Fowden i sur., 2021). Trenutna iskustva i trend porasta debljine u trudničkoj populaciji pokazuju da ne postoje dostatne preporuke i programi usmjereni promoviranju kontrole tjelesne mase prije i u trudnoći. Dodatni napori trebali bi se uložiti u podizanje svijesti populacije o važnosti metaboličkog zdravlja budućih trudnica prije i za vrijeme trudnoće kako bi se osigurali kratkoročni i dugoročni povoljni učinci na zdravlje majki i potomstva.

6 ZAKLJUČAK

Zaključci istraživanja na skupini trudnica i novorođenčadi:

- 1) Debljina majke povezana je s povišenom razinom proteina SERT u terminskoj posteljici. Obrnuto, kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze, debljina je povezana sa sniženom razinom mRNA *SERT*, dok kod sudionica s GDM-om, nije povezana s razinom mRNA *SERT* u posteljici. Ovi rezultati upućuju na smanjenu razgradnju proteina SERT u uvjetima debljine te na moguće kompenzatorno smanjenje transkripcije gena *SERT* kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze.
- 2) Vrijednosti Michaelis-Mentenine konstante (K_m) enzima MAOA posteljice povišene su u sudionica s GDM-om, što upućuje na smanjenu aktivnost ovog enzima u GDM-u.
- 3) Koncentracije triglicerida i kolesterola u krvi majke nisu povezane s razinama mRNA *TPHI* i *MAOA* u posteljici. Povezanost lipida s razinama mRNA *SERT* i *OCT3* u posteljici mogla bi se razlikovati između sudionica s normalnom tolerancijom glukoze i sudionica s GDM-om, što bi bilo vrijedno detaljnije istražiti u budućim istraživanjima.
- 4) U regulaciji ekspresije gena *SERT* u posteljici, epigenetički mehanizmi nadređeni su genetičkim mehanizmima. Regulacija ekspresije gena *MAOA* u posteljici razlikuje se ovisno o spolu: u ženske novorođenčadi dominiraju genetički mehanizmi, a u muške novorođenčadi epigenetički mehanizmi.
- 5) Razina mRNA *SERT* u terminskoj posteljici povezana je s porođajnom masom i duljinom novorođenčeta, što podupire ulogu ovog gena u regulaciji fetalnog rasta, koja je prethodno pokazana na animalnom modelu.

Zaključci istraživanja *in vitro* na kulturi stanica:

- 6) U modelu stanica trofoblasta čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće, glukoza i kisik utječu na ekspresiju gena *SERT*, *MAOA* i *TPHI*, dok inzulin utječe na ekspresiju gena *SERT*. Ovi rezultati upućuju da abnormalnosti u razinama glukoze, inzulina i kisika mogu potaknuti promjene homeostaze serotonina u posteljici tijekom rane trudnoće.

Zaključno, homeostaza serotoninskog sustava u posteljici na kraju trudnoće promijenjena je u majki čije je metaboličko zdravlje narušeno debljinom i/ili GDM-om. Odstupanja pojedinih regulatornih komponenti serotonina su mala, ali su pokazana na razini mRNA i proteina, a mogla bi biti posljedica promjena koje se očituju već tijekom prvog tromjesečja trudnoće.

7 **POPIS LITERATURE**

- Abdelouahab, N., Huel, G., Suvorov, A., Foliguet, B., Goua, V., Debotte, G., Sahuquillo, J., Charles, M.-A., Takser, L., 2010. Monoamine oxidase activity in placenta in relation to manganese, cadmium, lead, and mercury at delivery. *Neurotoxicol Teratol* 32, 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.08.010>
- Abdolmaleky, H.M., Yaqubi, S., Papageorgis, P., Lambert, A.W., Ozturk, S., Sivaraman, V., Thiagalingam, S., 2011. Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 129, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.04.007>
- Adults (US), N.O.E.I.E.P. on the I., Evaluation, and Treatment of Obesity in, 1998. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. National Heart, Lung, and Blood Institute.
- Ahmadimoghaddam, D., Zemankova, L., Nachtigal, P., Dolezelova, E., Neumanova, Z., Cerveny, L., Ceckova, M., Kacerovský, M., Micuda, S., Staud, F., 2013. Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: Expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. *Biol Reprod* 88, 55. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105064>
- Amboss [WWW Document], 2022. URL <https://www.amboss.com/us/knowledge/the-placenta-umbilical-cord-and-amniotic-sac> (pristupljeno 9.15.23).
- Andersson-Hall, U.K., Järvinen, E.A.J., Bosaeus, M.H., Gustavsson, C.E., Hårsmar, E.J., Niklasson, C.A., Albertsson-Wikland, K.G., Holmäng, A.B., 2019. Maternal obesity and gestational diabetes mellitus affect body composition through infancy: The PONCH study. *Pediatr Res* 85, 369–377. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0248-9>
- Auda, G.R., Kirk, S.H., Billett, M.A., Billett, E.E., 1998. Localization of monoamine oxidase mRNA in human placenta. *J Histochem Cytochem* 46, 1393–1400. <https://doi.org/10.1177/002215549804601208>
- Azmitia, E.C., 2010. Evolution of serotonin: Sunlight to suicide, u: Muller, C.P., Jackobs, B.L. (Ur.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, pp. 3–22. [https://doi.org/10.1016/s1569-7339\(10\)70069-2](https://doi.org/10.1016/s1569-7339(10)70069-2)
- Baković, P., Kesić, M., Perić, M., Bečeheli, I., Horvatiček, M., George, M., Čičin-Šain, L., Desoye, G., Wadsack, C., Panzenboeck, U., Štefulj, J., 2021. Differential serotonin uptake mechanisms at the human maternal-fetal interface. *Int J Mol Sci* 22, 7807. <https://doi.org/10.3390/ijms22157807>
- Balkovetz, D.F., Tirupathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V., 1989. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 264, 2195–2198. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94161-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94161-X)
- Bandres-Meriz, J., Dieberger, A.M., Hoch, D., Pöchlauer, C., Bachbauer, M., Glasner, A., Niedrist, T., van Poppel, M.N.M., Desoye, G., 2020. Maternal obesity affects the glucose-insulin axis during the first trimester of human pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 1566673. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fendo.2020.566673>

- Bao, Y., Zhang, J., Liu, Y., Wu, L., Yang, J., 2022. Identification of human placenta-derived circular RNAs and autophagy related circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in gestational diabetes mellitus. *Front Genet* 13, 1050906.
- Barrett, H.L., Kubala, M.H., Romero, K.S., Denny, K.J., Woodruff, T.M., McIntyre, H.D., Callaway, L.K., Nitert, M.D., 2014. Placental lipases in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus (GDM). *PLOS ONE* 9, e104826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104826>
- Baumann, M., Körner, M., Huang, X., Wenger, F., Surbek, D., Albrecht, C., 2013. Placental ABCA1 and ABCG1 expression in gestational disease: Pre-eclampsia affects ABCA1 levels in syncytiotrophoblasts. *Placenta* 34, 1079–1086. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.06.309>
- Bečeheli, I., Horvatiček, M., Perić, M., Nikolić, B., Holuka, C., Klasić, M., Ivanišević, M., Starčević, M., Desoye, G., Hranilović, D., Turner, J.D., Štefulj, J., 2024. Methylation of serotonin regulating genes in cord blood cells: Association with maternal metabolic parameters and correlation with methylation in peripheral blood cells during childhood and adolescence. *Clin Epigenetics* 16, 4. <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01610-w>
- Bedell, S., Hutson, J., de Vrijer, B., Eastabrook, G., 2021. Effects of maternal obesity and gestational diabetes mellitus on the placenta: Current knowledge and targets for therapeutic interventions. *Curr Vasc Pharmacol* 19, 176–192. <https://doi.org/10.2174/1570161118666200616144512>
- Bengel, D., Heils, A., Petri, S., Seemann, M., Glatz, K., Andrews, A., Murphy, D.L., Lesch, K.P., 1997. Gene structure and 5'-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res* 44, 286–292. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(96\)00234-3](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(96)00234-3)
- Berger, M., Gray, J.A., Roth, B.L., 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60, 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bertrand, C., St-Louis, J., 1999. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 180, 650–659. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70268-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70268-1)
- Bianco-Miotto, T., Craig, J.M., Gasser, Y.P., Dijk, S.J. van, Ozanne, S.E., 2017. Epigenetics and DOHaD: From basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000733>
- Blazević, S., Horvatiček, M., Kesic, M., Zill, P., Hranilovic, D., Ivanisevic, M., Desoye, G., Štefulj, J., 2017. Epigenetic adaptation of the placental serotonin transporter gene (SLC6A4) to gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 12, e0179934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179934>
- Boney, C.M., Verma, A., Tucker, R., Vohr, B.R., 2005. Metabolic syndrome in childhood: Association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115, e290-296. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1808>

- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M.L., King, J., Shih, J.C., Blakely, R.D., Deneris, E.S., Levitt, P., 2011. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 472, 347–350. <https://doi.org/10.1038/nature09972>
- Bottalico, B., Larsson, I., Brodzki, J., Hernandez-Andrade, E., Caslén, B., Marsál, K., Hansson, S.R., 2004. Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 25, 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.10.017>
- Buckley, S.J., 2006. Placenta rituals and folklore from around the world. *Midwifery Today Int Midwife* 58–59.
- Bulmer, J.N., Innes, B.A., Robson, S.C., Lash, G.E., 2020. Transient loss of endothelial cells in human spiral artery remodelling during early pregnancy: Challenging the dogma. *Placenta* 101, 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.10.003>
- Burton, G.J., Fowden, A.L., 2015. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>
- Burton, G.J., Tham, S.W., 1992. Formation of vasculo-syncytial membranes in the human placenta. *J Dev Physiol* 18, 43–47.
- Burton, G.J., Watson, A.L., Hempstock, J., Skepper, J.N., Jauniaux, E., 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2954–2959. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8563>
- Busch, A.E., Karbach, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J.C., Sonders, M.S., Baumann, C., Waldegger, S., Lang, F., Koepsell, H., 1998. Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol* 54, 342–352. <https://doi.org/10.1124/mol.54.2.342>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Carrasco, G., Cruz, M.A., Dominguez, A., Gallardo, V., Miguel, P., González, C., 2000. The expression and activity of monoamine oxidase A, but not of the serotonin transporter, is decreased in human placenta from pre-eclamptic pregnancies. *Life Sci* 67, 2961–2969. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00883-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00883-3)
- Catalano, P.M., 2010. The impact of gestational diabetes and maternal obesity on the mother and her offspring. *J Dev Orig Health Dis* 1, 208–215. <https://doi.org/10.1017/S2040174410000115>
- Catalano, P.M., Shankar, K., 2017. Obesity and pregnancy: Mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ* 356, j1. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1>

- Celli, J., Rappold, G., Niesler, B., 2017. The human serotonin type 3 receptor gene (HTR3A-E) allelic variant database. *Hum Mutat* 38, 137–147. <https://doi.org/10.1002/humu.23136>
- Chan, J.C., Alenina, N., Cunningham, A.M., Ramakrishnan, A., Shen, L., Bader, M., Maze, I., 2024. Serotonin transporter-dependent histone serotonylation in placenta contributes to the neurodevelopmental transcriptome. *J Mol Biol* 168454. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168454>
- Cheah, S.-Y., Lawford, B.R., Young, R.M., Morris, C.P., Voisey, J., 2017. mRNA expression and DNA methylation analysis of serotonin receptor 2A (HTR2A) in the human schizophrenic brain. *Genes* 8, 14. <https://doi.org/10.3390/genes8010014>
- Checknita, D., Ekström, T.J., Comasco, E., Nilsson, K.W., Tiihonen, J., Hodgins, S., 2018. Associations of monoamine oxidase A gene first exon methylation with sexual abuse and current depression in women. *J Neural Transm (Vienna)* 125, 1053–1064. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1875-3>
- Checknita, D., Maussion, G., Labonté, B., Comai, S., Tremblay, R.E., Vitaro, F., Turecki, N., Bertazzo, A., Gobbi, G., Côté, G., Turecki, G., 2015. Monoamine oxidase A gene promoter methylation and transcriptional downregulation in an offender population with antisocial personality disorder. *Br J Psychiatry* 206, 216–222. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.144964>
- Chen, C., Xu, X., Yan, Y., 2018. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. *PLOS ONE* 13, e0202183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202183>
- Chu, A.H.Y., Godfrey, K.M., 2020. Gestational diabetes mellitus and developmental programming. *Ann Nutr Metab* 76 Suppl 3, 4–15. <https://doi.org/10.1159/000509902>
- Cindrova-Davies, T., Sferruzzi-Perri, A.N., 2022. Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol*, Special issue: Human embryogenesis by Naomi Moris and Marta Shahbazi / Special Issue: Luminogenesis and Hydraulics in Development by Chii Jou Chan 131, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2022.03.039>
- Ciuculan, L., Hussey, M.J., Burton, V., Good, R., Duggan, N., Beach, S., Jones, P., Fox, R., Clay, I., Bonneau, O., Konstantinova, I., Pearce, A., Rowlands, D.J., Jarai, G., Westwick, J., MacLean, M.R., Thomas, M., 2013. Imatinib attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension pathology via reduction in 5-hydroxytryptamine through inhibition of tryptophan hydroxylase 1 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 78–89. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1028OC>
- Costa, M.A., 2016. The endocrine function of human placenta: An overview. *Reprod Biomed Online* 32, 14–43. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>
- Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J.-M., Gershon, M.D., Mallet, J., Vodjdani, G., 2007. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 329–334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606722104>
- Cotton, A.M., Lam, L., Affleck, J.G., Wilson, I.M., Peñaherrera, M.S., McFadden, D.E., Kobor, M.S., Lam, W.L., Robinson, W.P., Brown, C.J., 2011. Chromosome-wide DNA

- methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum Genet* 130, 187–201. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1007-8>
- dbSNP - NCBI [WWW Document], n.d. URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6306#clinical_significance (pristupljeno 1.30.24).
- Delmiš, J., 2019. Razvoj posteljice. *Gynaecol Perinatol* 28, 20–26.
- De-Miguel, F.F., Trueta, C., 2005. Synaptic and Extrasynaptic Secretion of Serotonin. *Cell Mol Neurobiol* 25, 297–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-3061-z>
- Desoye, G., 2018. The human placenta in diabetes and obesity: Friend or foe? The 2017 Norbert Freinkel award lecture. *Diabetes Care* 41, 1362–1369. <https://doi.org/10.2337/dci17-0045>
- Desoye, G., Wells, J.C.K., 2021. Pregnancies in diabetes and obesity: The capacity-load model of placental adaptation. *Diabetes* 70, 823–830. <https://doi.org/10.2337/db20-1111>
- Devlin, A.M., Brain, U., Austin, J., Oberlander, T.F., 2010. Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLOS ONE* 5, e12201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012201>
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G.A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., Bixby, H., Cowan, M.J., Riley, L.M., Hajifathalian, K., Fortunato, L., Taddei, C., 2016. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet* 387, 1377–1396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)
- Duan, H., Wang, J., 2010. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 743–753. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.170142>
- Dukal, H., Frank, J., Lang, M., Treutlein, J., Gilles, M., Wolf, I.A., Krumm, B., Massart, R., Szyf, M., Laucht, M., Deuschle, M., Rietschel, M., Witt, S.H., 2015. New-born females show higher stress- and genotype-independent methylation of SLC6A4 than males. *Borderline Personal Disord Emot Dysregul* 2, 8. <https://doi.org/10.1186/s40479-015-0029-6>
- Easton, Z.J.W., Luo, X., Li, L., Regnault, T.R.H., 2023. The impact of hyperglycemia upon BeWo trophoblast cell metabolic function: A multi-OMICS and functional metabolic analysis. *PLOS ONE* 18, e0283118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283118>
- Eddahibi, S., Fabre, V., Boni, C., Martres, M.P., Raffestin, B., Hamon, M., Adnot, S., 1999. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res* 84, 329–336. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.3.329>
- Eurostat - BMI statistics [WWW Document], 2019. URL https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics (pristupljeno 10.23.23).

- Falkenberg, V.R., Gurbaxani, B.M., Unger, E.R., Rajeevan, M.S., 2011. Functional genomics of serotonin receptor 2A (HTR2A): Interaction of polymorphism, methylation, expression and disease association. *Neuromol Med* 13, 66–76. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8138-2>
- Farrelly, L.A., Thompson, R.E., Zhao, S., Lepack, A.E., Lyu, Y., Bhanu, N.V., Zhang, B., Loh, Y.-H.E., Ramakrishnan, A., Vadodaria, K.C., Heard, K.J., Erikson, G., Nakadai, T., Bastle, R.M., Lukasak, B.J., Zebroski, H.I., Alenina, N., Bade, M., Berton, O., Roeder, R.G., Molina, H., Gage, F.H., Shen, L., Garcia, B.A., Li, H., Tom W. Muir, Maze, I., 2019. Histone seronylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature* 567, 535–539. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1024-7>
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., Lang, A.-G., 2009. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 41, 1149–1160. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>
- Feingold, K.R., 2000. Obesity and dyslipidemia, u: Feingold, K.R., Anawalt, B., Blackman, M.R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Shah, A.S., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trencé, D.L., Wilson, D.P. (Ur.), Endotext. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Fernandez-Twinn, D.S., Gascoin, G., Musial, B., Carr, S., Duque-Guimaraes, D., Blackmore, H.L., Alfaradhi, M.Z., Loche, E., Sferruzzi-Perri, A.N., Fowden, A.L., Ozanne, S.E., 2017. Exercise rescues obese mothers' insulin sensitivity, placental hypoxia and male offspring insulin sensitivity. *Sci Rep* 7, 44650. <https://doi.org/10.1038/srep44650>
- Fowden, A.L., Camm, E.J., Sferruzzi-Perri, A.N., 2021. Effects of maternal obesity on placental phenotype. *Curr Vasc Pharmacol* 19, 113–131. <https://doi.org/10.2174/1570161118666200513115316>
- Fröhlich, J.D., Huppertz, B., Abuja, P.M., König, J., Desoye, G., 2012. Oxygen modulates the response of first-trimester trophoblasts to hyperglycemia. *Am J Pathol* 180, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.012>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI200421625>
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261–282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C.H., Polliotti, B.M., Fisher, S.J., 1996. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 97, 540–550. <https://doi.org/10.1172/JCI118447>

- GenScript [WWW Document], n.d. URL <https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool> (pristupljeno 3.11.21).
- Godfrey, K.M., Costello, P.M., Lillycrop, K.A., 2015. The developmental environment, epigenetic biomarkers and long-term health. *J Dev Orig Health Dis* 6, 399–406. <https://doi.org/10.1017/S204017441500121X>
- Goeden, N., Velasquez, J., Arnold, K.A., Chan, Y., Lund, B.T., Anderson, G.M., Bonnin, A., 2016. Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain. *J Neurosci* 36, 6041–6049. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2534-15.2016>
- Gonçalves, P., Araújo, J.R., Martel, F., 2008. The effect of high glucose on SERT, the human plasmalemmal serotonin transporter. *Nutr Neurosci* 11, 244–250. <https://doi.org/10.1179/147683008X344156>
- Gorczyca, L., Du, J., Bircsak, K.M., Wen, X., Vetrano, A.M., Aleksunes, L.M., 2021. Low oxygen tension differentially regulates the expression of placental solute carriers and ABC transporters. *FEBS Lett* 595, 811–827. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13937>
- Graffelman, J., Weir, B.S., 2016. Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity (Edinb)* 116, 558–568. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.20>
- Grubbs, F.E., 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11, 1–21. <https://doi.org/10.2307/1266761>
- Gujrati, V.R., Shanker, K., Vrat, S., Chandravati, Parmar, S.S., 1996. Novel appearance of placental nuclear monoamine oxidase: Biochemical and histochemical evidence for hyperserotonomic state in preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1543–1550. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70104-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70104-7)
- Hadden, C., Fahmi, T., Cooper, A., Savenka, A.V., Lupashin, V.V., Roberts, D.J., Maroteaux, L., Hauguel-de Mouzon, S., Kilic, F., 2017. Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway. *J Cell Physiol* 232, 3520–3529. <https://doi.org/10.1002/jcp.25812>
- Halmøy, A., Johansson, S., Winge, I., McKinney, J.A., Knappskog, P.M., Haavik, J., 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in offspring of mothers with impaired serotonin production. *Arch Gen Psychiatry* 67, 1033–1043. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.124>
- Hasegawa, N., Furugen, A., Ono, K., Koishikawa, M., Miyazawa, Y., Nishimura, A., Umazume, T., Narumi, K., Kobayashi, M., Iseki, K., 2020. Cellular uptake properties of lamotrigine in human placental cell lines: Investigation of involvement of organic cation transporters (SLC22A1–5). *Drug Metab Pharmacokinet* 35, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.01.005>
- Hempstock, J., Cindrova-Davies, T., Jauniaux, E., Burton, G.J., 2004. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: A morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 58. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-58>

- Hidden, U., Wadsack, C., Prutsch, N., Gauster, M., Weiss, U., Frank, H.-G., Schmitz, U., Fast-Hirsch, C., Hengstschläger, M., Pötgens, A., Rüben, A., Knöfler, M., Haslinger, P., Huppertz, B., Bilban, M., Kaufmann, P., Desoye, G., 2007. The first trimester human trophoblast cell line ACH-3P: A novel tool to study autocrine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations – TNF- α stimulates MMP15 expression. *BMC Dev Biol* 7, 137. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-137>
- Hoch, D., Gauster, M., Hauguel-de Mouzon, S., Desoye, G., 2019. Diabesity-associated oxidative and inflammatory stress signalling in the early human placenta. *Mol Aspects Med, Molecular Aspects of Signalling in Diabesity* 66, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.11.002>
- Howell, K.R., Powell, T.L., 2017. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction* 153, R97–R108. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0495>
- Hranilović, D., 2007. Priprema otopina i probora za izdvajanje RNA, u: Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (Ur.), *Metode u Molekularnoj Biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, pp. 232–233.
- Hranilovic, D., Blazevic, S., Stefulj, J., Zill, P., 2016. DNA methylation analysis of HTR2A regulatory region in leukocytes of autistic subjects. *Autism Res* 9, 204–209. <https://doi.org/10.1002/aur.1519>
- Hranilovic, D., Stefulj, J., Schwab, S., Borrmann-Hassenbach, M., Albus, M., Jernej, B., Wildenauer, D., 2004. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry* 55, 1090–1094. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.01.029>
- Huang, L., Frampton, G., Rao, A., Zhang, K., Chen, W., Lai, J., Yin, X., Walker, K., Culbreath, B., Leyva-Illades, D., Quinn, M., McMillin, M., Bradley, M., Liang, L.-J., DeMorrow, S., 2012. Monoamine oxidase A expression is suppressed in human cholangiocarcinoma via coordinated epigenetic and IL-6-driven events. *Lab Invest* 92, 1451–1460. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.110>
- Huang, W.Q., Zhang, C.L., Di, X.Y., Zhang, R.Q., 1998. Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 19, 655–661. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(98\)90027-3](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(98)90027-3)
- Hudon Thibeault, A.-A., Laurent, L., Vo Duy, S., Sauvé, S., Caron, P., Guillemette, C., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2017. Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit. *Mol Cell Endocrinol* 442, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.021>
- Inkster, A.M., Yuan, V., Konwar, C., Matthews, A.M., Brown, C.J., Robinson, W.P., 2021. A cross-cohort analysis of autosomal DNA methylation sex differences in the term placenta. *Biol Sex Differ* 12, 38. <https://doi.org/10.1186/s13293-021-00381-4>
- Jacobs, B.L., Azmitia, E.C., 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72, 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>

- Jaremek, A., Jeyarajah, M.J., Jaju Bhattad, G., Renaud, S.J., 2021. Omics approaches to study formation and function of human placental syncytiotrophoblast. *Front Cell Dev Biol* 9.
- Jauniaux, E., Watson, A.L., Hempstock, J., Bao, Y.-P., Skepper, J.N., Burton, G.J., 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157, 2111–2122. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64849-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64849-3)
- Javors, M.A., Bembenek, M.E., Bowden, C.L., Abell, C.W., Maas, J.W., 1989. The effect of debrisoquin on MAO A and MAO B activities. *Life Sci* 45, 2359–2364. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90118-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90118-5)
- Jernej, B., Vladić, A., Čičin-Šain, L., Hranilović, D., Banović, M., Balija, M., Bilić, E., Sučić, Z., Vukadin, S., Grgicević, D., 2002. Platelet serotonin measures in migraine. *Headache* 42, 588–595. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2002.02145.x>
- Jin, X., Qiu, T., Li, L., Yu, R., Chen, X., Li, C., Proud, C.G., Jiang, T., 2023. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharm Sin B* 13, 2403–2424. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012>
- Jones, C.J., Fox, H., 1991. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microsc Rev* 4, 129–178. [https://doi.org/10.1016/0892-0354\(91\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0892-0354(91)90019-9)
- Jones, H.N., Powell, T.L., Jansson, T., 2007. Regulation of placental nutrient transport—a review. *Placenta* 28, 763–774. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.05.002>
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Karahoda, R., Abad, C., Horackova, H., Kastner, P., Zaugg, J., Cerveny, L., Kucera, R., Albrecht, C., Staud, F., 2020a. Dynamics of tryptophan metabolic pathways in human placenta and placental-derived cells: Effect of gestation age and trophoblast differentiation. *Front Cell Dev Biol* 8.
- Karahoda, R., Horackova, H., Kastner, P., Matthios, A., Cerveny, L., Kucera, R., Kacerovsky, M., Duintjer Tebbens, J., Bonnin, A., Abad, C., Staud, F., 2020b. Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. *Acta Physiol (Oxf)* 229, e13478. <https://doi.org/10.1111/apha.13478>
- Kaufmann, P., Sen, D.K., Schweikhart, G., 1979. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res* 200, 409–423. <https://doi.org/10.1007/BF00234852>
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y.J., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1998. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273, 15971–15979. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15971>
- Klempan, T., Hudon-Thibeault, A.-A., Oufkir, T., Vaillancourt, C., Sanderson, J.T., 2011. Stimulation of serotonergic 5-HT_{2A} receptor signaling increases placental aromatase

- (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta* 32, 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.003>
- Kliman, H.J., Quaratella, S.B., Setaro, A.C., Siegman, E.C., Subha, Z.T., Tal, R., Milano, K.M., Steck, T.L., 2018. Pathway of maternal serotonin to the human embryo and fetus. *Endocrinology* 159, 1609–1629. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03025>
- Kwist, K., Bridges, W.C., Burg, K.J.L., 2016. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* 68, 1661–1667. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9883-8>
- Lascu, A., Ionică, L.N., Buriman, D.G., Merce, A.P., Deaconu, L., Borza, C., Crețu, O.M., Sturza, A., Muntean, D.M., Feier, H.B., 2022. Metformin and empagliflozin modulate monoamine oxidase-related oxidative stress and improve vascular function in human mammary arteries. *Mol Cell Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04633-8>
- Lassance, L., Haghiac, M., Leahy, P., Basu, S., Minium, J., Zhou, J., Reider, M., Catalano, P.M., Hauguel-de Mouzon, S., 2015. Identification of early transcriptome signatures in placenta exposed to insulin and obesity. *Am J Obstet Gynecol* 212, 647.e1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.02.026>
- Laurent, L., Deroy, K., St-Pierre, J., Côté, F., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2017. Human placenta expresses both peripheral and neuronal isoform of tryptophan hydroxylase. *Biochimie* 140, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.008>
- Leboyer, M., Philippe, A., Bouvard, M., Guilloud-Bataille, M., Bondoux, D., Tabuteau, F., Feingold, J., Mouren-Simeoni, M.C., Launay, J.M., 1999. Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol Psychiatry* 45, 158–163. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(97\)00532-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(97)00532-5)
- Lee, N., Hebert, M.F., Prasad, B., Easterling, T.R., Kelly, E.J., Unadkat, J.D., Wang, J., 2013. Effect of gestational age on mRNA and protein expression of polyspecific organic cation transporters during pregnancy. *Drug Metab Dispos* 41, 2225–2232. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054072>
- Lee, N., Hebert, M.F., Wagner, D.J., Easterling, T.R., Liang, C.J., Rice, K., Wang, J., 2018. Organic cation transporter 3 facilitates fetal exposure to metformin during pregnancy. *Mol Pharmacol* 94, 1125–1131. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112482>
- Lekva, T., Lyle, R., Roland, M.C.P., Friis, C., Bianchi, D.W., Jaffe, I.Z., Norwitz, E.R., Bollerslev, J., Henriksen, T., Ueland, T., 2016. Gene expression in term placentas is regulated more by spinal or epidural anesthesia than by late-onset preeclampsia or gestational diabetes mellitus. *Sci Rep* 6, 29715. <https://doi.org/10.1038/srep29715>
- Leon-Pinzon, C., Cercós, M.G., Noguez, P., Trueta, C., De-Miguel, F.F., 2014. Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Front Cell Neurosci* 8, 169.
- Li, H.-P., Chen, X., Li, M.-Q., 2013. Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 650–659.

- Li, Y., Hadden, C., Singh, P., Mercado, C.P., Murphy, P., Dajani, N.K., Lowery, C.L., Roberts, D.J., Maroteaux, L., Kilic, F., 2014. GDM-associated insulin deficiency hinders the dissociation of SERT from ERp44 and down-regulates placental 5-HT uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E5697–E5705. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416675112>
- Lillycrop, K.A., Garratt, E.S., Titcombe, P., Melton, P.E., Murray, R.J.S., Barton, S.J., Clarke-Harris, R., Costello, P.M., Holbrook, J.D., Hopkins, J.C., Childs, C.E., Paras-Chavez, C., Calder, P.C., Mori, T.A., Beilin, L., Burdge, G.C., Gluckman, P.D., Inskip, H.M., Harvey, N.C., Hanson, M.A., Huang, R.-C., Cooper, C., Godfrey, K.M., 2019. Differential SLC6A4 methylation: A predictive epigenetic marker of adiposity from birth to adulthood. *Int J Obes* 43, 974–988. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0254-3>
- Lovrenčić, M.V., Honović, L., Kralik, S., Matica, J., Prašek, M., Pape-Medvidović, E., Ivanišević, M., Đelmiš, J., 2013. Redefinition of gestational diabetes mellitus: implications for laboratory practice in Croatia. *Biochem Med* 23, 7–11. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.002>
- Lv, J., Liu, F., 2017. The role of serotonin beyond the central nervous system during embryogenesis. *Front Cell Neurosci* 11, 74.
- Maggiorani, D., Manzella, N., Edmondson, D.E., Mattevi, A., Parini, A., Binda, C., Mialet-Perez, J., 2017. Monoamine oxidases, oxidative stress, and altered mitochondrial dynamics in cardiac ageing. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 3017947. <https://doi.org/10.1155/2017/3017947>
- Majali-Martinez, A., Weiss-Fuchs, U., Miedl, H., Forstner, D., Bandres-Meriz, J., Hoch, D., Djelmiss, J., Ivanisevic, M., Hiden, U., Gauster, M., Desoye, G., 2021. Type 1 diabetes mellitus and the first trimester placenta: Hyperglycemia-induced effects on trophoblast proliferation, cell cycle regulators, and invasion. *Int J Mol Sci* 22, 10989. <https://doi.org/10.3390/ijms222010989>
- Mao, J., Kinkade, J.A., Bivens, N.J., Roberts, R.M., Rosenfeld, C.S., 2021. Placental Changes in the serotonin transporter (Slc6a4) knockout mouse suggest a role for serotonin in controlling nutrient acquisition. *Placenta* 115, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.09.021>
- McCarthy, N.S., Melton, P.E., Cadby, G., Yazar, S., Franchina, M., Moses, E.K., Mackey, D.A., Hewitt, A.W., 2014. Meta-analysis of human methylation data for evidence of sex-specific autosomal patterns. *BMC Genomics* 15, 981. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-981>
- McIntyre, H.D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E.R., Damm, P., 2019. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 5, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- Melas, P.A., Forsell, Y., 2015. Hypomethylation of MAOA's first exon region in depression: A replication study. *Psychiatry Res* 226, 389–391. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.01.003>

- Métayé, T., Menet, E., Guilhot, J., Kraimps, J.-L., 2002. Expression and activity of g protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3279–3286. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.7.8618>
- Metzger, B.E., Gabbe, S.G., Persson, B., Lowe, L.P., Dyer, A.R., Oats, J.J.N., Buchanan, T.A., 2010. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy: Response to Weinert. *Diabetes Care* 33, e98. <https://doi.org/10.2337/dc10-0719>
- Mitsuda, N., Eitoku, M., Yamasaki, K., J-P, N.A., Fujieda, M., Maeda, N., Suganuma, N., Kamijima, M., Yamazaki, S., Ohya, Y., Kishi, R., Yaegashi, N., Hashimoto, K., Mori, C., Ito, S., Yamagata, Z., Inadera, H., Nakayama, T., Sobue, T., Shima, M., Nakamura, H., Kusuhara, K., Katoh, T., on behalf of the Japan Environment and Children's Study (JECS) Group, 2023. Association between maternal cholesterol level during pregnancy and placental weight and birthweight ratio: Data from the Japan Environment and Children's Study. *BMC Pregnancy Childbirth* 23, 484. <https://doi.org/10.1186/s12884-023-05810-3>
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Mossman, H.W., 1937. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures, *Contributions to Embryology* (Carnegie institute). ed. Carnegie Institution.
- Motulsky, H.J., Brown, R.E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>
- Moya, P.R., Wendland, J.R., Salemme, J., Fried, R.L., Murphy, D.L., 2013. miR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 621–629. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000454>
- Murphy, D.L., Moya, P.R., 2011. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: Their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. *Curr Opin Pharmacol, Neurosciences* 11, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.02.008>
- Naoi, M., Nagatsu, T., 1987. Quinoline and quininaldine as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sci* 40, 1075–1082. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90570-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90570-4)
- Napso, T., Yong, H.E.J., Lopez-Tello, J., Sferruzzi-Perri, A.N., 2018. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front Physiol* 9.
- O'Malley, E.G., Reynolds, C.M.E., Killalea, A., O'Kelly, R., Sheehan, S.R., Turner, M.J., 2020. Maternal obesity and dyslipidemia associated with gestational diabetes mellitus (GDM). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 246, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.01.007>

- O'Tierney-Ginn, P., Presley, L., Myers, S., Catalano, P., 2015. Placental growth response to maternal insulin in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 159–165. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3281>
- Oufkir, T., Arseneault, M., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2010. The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 31, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.019>
- Oufkir, T., Vaillancourt, C., 2011. Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT (2A) receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell. *Placenta* 32, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.005>
- Pantham, P., Aye, I.L.M.H., Powell, T.L., 2015. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta* 36, 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.006>
- Papadimas, G.K., Tzirogiannis, K.N., Mykoniatis, M.G., Grypioti, A.D., Manta, G.A., Panoutsopoulos, G.I., 2012. The emerging role of serotonin in liver regeneration. *Swiss Med Wkly* 142, 1–6. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13548>
- Paquette, A.G., Lesseur, C., Armstrong, D.A., Koestler, D.C., Appleton, A.A., Lester, B.M., Marsit, C.J., 2013. Placental HTR2A methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes. *Epigenetics* 8, 796–801. <https://doi.org/10.4161/epi.25358>
- Pattyn, F., Speleman, F., De Paepe, A., Vandesompele, J., 2003. RTPrimerDB: The real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res* 31, 122–123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg011>
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevšek, M., Fink, H., Rupnik, M., Walther, D.J., 2009. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation. *PLoS Biology* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
- Paulo, M.S., Abdo, N.M., Bettencourt-Silva, R., Al-Rifai, R.H., 2021. Gestational diabetes mellitus in Europe: A systematic review and meta-analysis of prevalence studies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12.
- Pavličev, M., Wagner, G.P., Chavan, A.R., Owens, K., Maziarz, J., Dunn-Fletcher, C., Kallapur, S.G., Muglia, L., Jones, H., 2017. Single-cell transcriptomics of the human placenta: Inferring the cell communication network of the maternal-fetal interface. *Genome Res* 27, 349–361. <https://doi.org/10.1101/gr.207597.116>
- Peeters, S.B., Cotton, A.M., Brown, C.J., 2014. Variable escape from X-chromosome inactivation: identifying factors that tip the scales towards expression. *Bioessays* 36, 746–756. <https://doi.org/10.1002/bies.201400032>
- Pehme, P.M., Zhang, W., Finik, J., Pritchett, A., Buthmann, J., Dana, K., Hao, K., Nomura, Y., 2018. Placental MAOA expression mediates prenatal stress effects on temperament in 12-month-olds. *Infant Child Dev* 27, e2094. <https://doi.org/10.1002/icd.2094>

- Perez-Cornago, A., Mansego, M.L., Zulet, M.A., Martinez, J.A., 2014. DNA hypermethylation of the serotonin receptor type-2A gene is associated with a worse response to a weight loss intervention in subjects with metabolic syndrome. *Nutrients* 6, 2387–2403. <https://doi.org/10.3390/nu6062387>
- Perić, M., Bečeheli, I., Čičin-Šain, L., Desoye, G., Štefulj, J., 2022. Serotonin system in the human placenta – the knowns and unknowns. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13, 1061317. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fendo.2022.1061317>
- Petz, B., 1997. Dvosmjerna analiza varijance, u: Osnovne statističke metode za nematematičare. Naklada Slap, Jastrebarsko.
- Philibert, R., Madan, A., Andersen, A., Cadoret, R., Packer, H., Sandhu, H., 2007. Serotonin transporter mRNA levels are associated with the methylation of an upstream CpG island. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B, 101–105. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30414>
- Philibert, R.A., Gunter, T.D., Beach, S.R.H., Brody, G.H., Madan, A., 2008. MAOA methylation is associated with nicotine and alcohol dependence in women. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 565–570. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30778>
- Phung, T.N., Olney, K.C., Pinto, B.J., Silasi, M., Perley, L., O'Bryan, J., Kliman, H.J., Wilson, M.A., 2022. X chromosome inactivation in the human placenta is patchy and distinct from adult tissues. *HGG Adv* 3, 100121. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2022.100121>
- Polesskaya, O.O., Aston, C., Sokolov, B.P., 2006. Allele C-specific methylation of the 5-HT2A receptor gene: Evidence for correlation with its expression and expression of DNA methylase DNMT1. *J Neurosci Res* 83, 362–373. <https://doi.org/10.1002/jnr.20732>
- Prasad, P.D., Hoffmans, B.J., Moe, A.J., Smith, C.H., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1996. Functional expression of the plasma membrane serotonin transporter but not the vesicular monoamine transporter in human placental trophoblasts and choriocarcinoma cells. *Placenta* 17, 201–207. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(96\)90039-9](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(96)90039-9)
- Ramamoorthy, S., Giovanetti, E., Qian, Y., Blakely, R.D., 1998. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J Biol Chem* 273, 2458–2466. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2458>
- Ramsay, R.R., Albrecht, A., 2018. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *J Neural Transm* 125, 1659–1683. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1861-9>
- Ranzil, S., Ellery, S., Walker, D.W., Vaillancourt, C., Alfaidy, N., Bonnin, A., Borg, A., Wallace, E.M., Ebeling, P.R., Erwich, J.J., Murthi, P., 2019. Disrupted placental serotonin synthetic pathway and increased placental serotonin: Potential implications in the pathogenesis of human fetal growth restriction. *Placenta* 84, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.05.012>
- Rapport, M.M., Green, Arda.Alden., Page, I.H., 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176, 1243–1251. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)57137-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)57137-4)

- Reed, G.L., Fitzgerald, M.L., Polgár, J., 2000. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* 96, 3334–3342.
- Resta, J., Santin, Y., Roumigué, M., Riant, E., Lucas, A., Couderc, B., Binda, C., Lluet, P., Parini, A., Mialet-Perez, J., 2022. Monoamine oxidase inhibitors prevent glucose-dependent energy production, proliferation and migration of bladder carcinoma cells. *Int J Mol Sci* 23, 11747. <https://doi.org/10.3390/ijms231911747>
- Reviriego, J., Fernandez-Alfonso, M.S., Marín, J., 1990. Actions of vasoactive drugs on human placental vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol* 21, 719–727. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(90\)91024-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(90)91024-1)
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., Jauniaux, E., 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283–285.
- Roje, D., Banovic, I., Tadin, I., Vucinović, M., Capkun, V., Barisic, A., Vulic, M., Mestrovic, Z., Mimica, M., Miletic, T., 2004. Gestational age-the most important factor of neonatal ponderal index. *Yonsei Med J* 45, 273–280. <https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.2.273>
- Rosenfeld, C.S., 2021. The placenta-brain-axis. *J Neurosci Res* 99, 271–283. <https://doi.org/10.1002/jnr.24603>
- Rosenfeld, C.S., 2020. Placental serotonin signaling, pregnancy outcomes, and regulation of fetal brain development. *Biol Reprod* 102, 532–538. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz204>
- Ruble, C.L., Smith, R.M., Calley, J., Munsie, L., Airey, D.C., Gao, Y., Shin, J.H., Hyde, T.M., Straub, R.E., Weinberger, D.R., Nisenbaum, L.K., 2016. Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (HTR2A) locus: Identification of novel HTR2A and antisense (HTR2A-AS1) exons. *BMC Genetics* 17, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0325-6>
- Ryckman, K.K., Spracklen, C.N., Smith, C.J., Robinson, J.G., Saftlas, A.F., 2015. Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *BJOG* 122, 643–651. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13261>
- Sabol, S.Z., Hu, S., Hamer, D., 1998. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103, 273–279. <https://doi.org/10.1007/s004390050816>
- Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Nagata, H., Tsukimori, K., Nakano, H., Sawada, Y., 2005. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 888–895. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.086827>
- Sharp, T., Barnes, N.M., 2020. Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology* 177, 108155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108155>
- Shumay, E., Fowler, J.S., 2010. Identification and characterization of putative methylation targets in the MAOA locus using bioinformatic approaches. *Epigenetics* 5, 325–342. <https://doi.org/10.4161/epi.5.4.11719>

- Shumay, E., Logan, J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., 2012. Evidence that the methylation state of the monoamine oxidase A (MAOA) gene predicts brain activity of MAO A enzyme in healthy men. *Epigenetics* 7, 1151–1160. <https://doi.org/10.4161/epi.21976>
- Silverstein, T.P., 2019. When both K_m and V_{max} are altered, Is the enzyme inhibited or activated? *Biochem Mol Biol Educ* 47, 446–449. <https://doi.org/10.1002/bmb.21235>
- Sivasubramaniam, S.D., Finch, C.C., Billett, M.A., Baker, P.N., Billett, E.E., 2002. Monoamine oxidase expression and activity in human placentae from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 23, 163–171. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0770>
- Smith, R.M., Papp, A.C., Webb, A., Ruble, C.L., Munsie, L.M., Nisenbaum, L.K., Kleinman, J.E., Lipska, B.K., Sadee, W., 2013. Multiple regulatory variants modulate expression of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in human cortex. *Biol Psychiatry* 73, 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.028>
- Song, J.Y., Lee, K.E., Byeon, E.J., Choi, J., Kim, S.J., Shin, J.E., 2022. Maternal gestational diabetes influences DNA methylation in the serotonin system in the human placenta. *Life* 12, 1869. <https://doi.org/10.3390/life12111869>
- Song, S.H., McIntyre, S.S., Shah, H., Veldhuis, J.D., Hayes, P.C., Butler, P.C., 2000. Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4491–4499. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7043>
- Sonier, B., Lavigne, C., Arseneault, M., Ouellette, R., Vaillancourt, C., 2005. Expression of the 5-HT_{2A} Serotonergic Receptor in Human Placenta and Choriocarcinoma Cells: Mitogenic Implications of Serotonin. *Placenta* 26, 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.08.003>
- Spohn, S.N., Mawe, G.M., 2017. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling—the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 412–420. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.51>
- Štefulj, J., Žutić, M., Brekalo, M., Matijaš, M., Nakić Radoš, S., 2023a. Peripartum mental health in women with overweight and obesity: Preliminary findings from the MumHealth study. Izlaganje na: 4th International Scientific Conference of the University Department of Psychology, Catholic University of Croatia - Changing Life Circumstances: Opportunity for Individual and Community Growth, pp. 61–61.
- Štefulj, J., Žutić, M., Brekalo, M., Matijaš, M., Nakić Radoš, S., 2023b. Gestacijski dijabetes u Hrvatskoj: Prevalencija, antropometrijski korelati i povezanost s pokazateljima mentalnog zdravlja trudnica. Izlaganje na: 30. godišnja konferencija hrvatskih psihologa, Hrvatsko psihološko društvo.
- Sun, D.-G., Tian, S., Zhang, L., Hu, Y., Guan, C.-Y., Ma, X., Xia, H.-F., 2020. The miRNA-29b is downregulated in placenta during gestational diabetes mellitus and may alter placenta development by regulating trophoblast migration and invasion through a HIF3A-dependent mechanism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 169.
- Sun, Y., Zhang, J., Yuan, Y., Yu, X., Shen, Y., Xu, Q., 2012. Study of a possible role of the monoamine oxidase A (MAOA) gene in paranoid schizophrenia among a Chinese

- population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B, 104–111. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32009>
- Suryawanshi, H., Morozov, P., Straus, A., Sahasrabudhe, N., Max, K.E.A., Garzia, A., Kustagi, M., Tuschl, T., Williams, Z., 2018. A single-cell survey of the human first-trimester placenta and decidua. *Sci Adv* 4, eaau4788. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau4788>
- Takahashi, H., Nakashima, S., Ohama, E., Takeda, S., Ikuta, F., 1986. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain Dev* 8, 355–365. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(86\)80055-9](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(86)80055-9)
- Tandl, V., Hoch, D., Bandres-Meriz, J., Nikodijevic, S., Desoye, G., Majali-Martinez, A., 2021. Different regulation of IRE1 α and eIF2 α pathways by oxygen and insulin in ACH-3P trophoblast model. *Reproduction* 162, 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0668>
- Thébault-Dagher, F., Robles, M., Herba, C.M., St-Pierre, J., Brochen, C., Muckle, G., Lupien, S.J., Séguin, J.R., Fraser, W.D., Vaillancourt, C., Lippé, S., 2021. Febrile seizure incidence and age at first occurrence are associated with changes in placental normalized gene expression: the ‘3D’ pregnancy cohort study. *J Neuroendocrinol* 33, e13046. <https://doi.org/10.1111/jne.13046>
- Thibeault, A.-A.H., de Los Santos, Y.L., Doucet, N., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2019. Serotonin and serotonin reuptake inhibitors alter placental aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 195, 105470. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105470>
- Tipton, K.F., 2018. 90 years of monoamine oxidase: Some progress and some confusion. *J Neural Transm* 125, 1519–1551. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1881-5>
- Tong, L., Kalish, B.T., 2021. The impact of maternal obesity on childhood neurodevelopment. *J Perinatol* 41, 928–939. <https://doi.org/10.1038/s41372-020-00871-0>
- Tost, J., Gut, I.G., 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2, 2265–2275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.314>
- Turco, M.Y., Moffett, A., 2019. Development of the human placenta. *Development* 146, dev163428. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
- Turecki, G., Brière, R., Dewar, K., Antonetti, T., Lesage, A.D., Séguin, M., Chawky, N., Vanier, C., Alda, M., Jooper, R., Benkelfat, C., Rouleau, G.A., 1999. Prediction of level of serotonin 2A receptor binding by serotonin receptor 2A genetic variation in postmortem brain samples from subjects who did or did not commit suicide. *Am J Psychiatry* 156, 1456–1458. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.9.1456>
- Ugun-Klusek, A., Tamang, A., Loughna, P., Billett, E., Buckley, G., Sivasubramaniam, S., 2011. Reduced placental vascular reactivity to 5-hydroxytryptamine in pre-eclampsia and the status of 5HT(2A) receptors. *Vascul Pharmacol* 55, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.07.006>
- Vaillancourt, C., Petit, A., Gallo-Payet, N., Bellabarba, D., Lehoux, J.-G., Bélisle, S., 1994. Labelling of D2-dopaminergic and 5-HT2-serotonergic binding sites in human

- trophoblastic cells using [3H]-spiperone. *J Recept Res* 14, 11–22. <https://doi.org/10.3109/10799899409066993>
- Van Lelyveld, N., Ter Linde, J., Schipper, M.E.I., Samsom, M., 2007. Regional differences in expression of TPH-1, SERT, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the human stomach and duodenum. *Neurogastroenterol Motil* 19, 342–348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00891.x>
- Vialli, M., Erspamer, V., 1937. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 27, 81–99. <https://doi.org/10.1007/bf00391792>
- Viau, M., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2009. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT_{2A} receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online* 19, 207–215. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60074-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60074-0)
- Vince, K., Brkić, M., Poljičanin, T., Matijević, R., 2021. Prevalence and impact of pre-pregnancy body mass index on pregnancy outcome: a cross-sectional study in Croatia. *J Obstet Gynaecol* 41, 55–59. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1706157>
- Wadhera, R.K., Steen, D.L., Khan, I., Giugliano, R.P., Foody, J.M., 2016. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J Clin Lipidol* 10, 472–489. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.11.010>
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Winter, S., Hölte, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinkel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C.S., Ahnert-Hilger, G., Bader, M., 2003. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115, 851–862. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01014-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01014-6)
- Wang, Y., Tang, S., Xu, S., Weng, S., Liu, Z., 2016. Maternal body mass index and risk of autism spectrum disorders in offspring: A meta-analysis. *Sci Rep* 6, 34248. <https://doi.org/10.1038/srep34248>
- Wang, Z., Wang, D., Chen, J., Long, T., Zhong, C., Li, Y., 2022. Effects of glucose and osmotic pressure on the proliferation and cell cycle of human chorionic trophoblast cells. *Open Life Sci* 17, 1418–1428. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0508>
- Weiss, U., Cervar, M., Puerstner, P., Schmut, O., Haas, J., Mauschitz, R., Arian, G., Desoye, G., 2001. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia* 44, 209–219. <https://doi.org/10.1007/s001250051601>
- Weyler, W., Salach, J.I., 1985. Purification and properties of mitochondrial monoamine oxidase type A from human placenta. *J Biol Chem* 260, 13199–13207.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Druse, M., Walker, P., Lauder, J.M., 1996. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* 73, 19–29.

- Wilson, M.E., Ford, S.P., 2001. Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod Suppl* 58, 223–232.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Yabut, J.M., Desjardins, E.M., Chan, E.J., Day, E.A., Leroux, J.M., Wang, B., Crane, E.D., Wong, W., Morrison, K.M., Crane, J.D., Khan, W.I., Steinberg, G.R., 2020. Genetic deletion of mast cell serotonin synthesis prevents the development of obesity and insulin resistance. *Nat Commun* 11, 463. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14080-7>
- Yavarone, M.S., Shuey, D.L., Sadler, T.W., Lauder, J.M., 1993. Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* 14, 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80257-7](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80257-7)
- Zhang, H., Smith, G.N., Liu, X., Holden, J.J.A., 2010. Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genomics* 42, 85–92. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00220.2009>
- Zhang, Y., Deng, R., Yang, X., Xu, W., Liu, Y., Li, F., Zhang, J., Tang, H., Ji, X., Bi, Y., Wang, X., Zhou, L., Ning, G., 2017. Glucose potentiates β -cell function by inducing Tph1 expression in rat islets. *FASEB J* 31, 5342–5355. <https://doi.org/10.1096/fj.201700351R>

8 SAŽETAK

Posteljica je privremeni organ ključan za normalan tijek trudnoće i pravilan razvoj fetusa. Serotonin je multifunkcionalna signalna molekula s važnom ulogom u regulaciji razvoja i funkcije posteljice. Majčina debljina (prekomjerna tjelesna masa ili pretilost) i gestacijski dijabetes melitus (GDM) povezani su s promjenama u razvoju, strukturi i funkciji posteljice te s povišenim rizicima za različite zdravstvene komplikacije majke i djeteta. Cilj ovog rada bio je doprinijeti boljem razumijevanju homeostaze serotoniniskog sustava posteljice. Specifični ciljevi bili su: istražiti učinke majčine debljine i GDM-a na ekspresiju regulatornih gena serotoninina u posteljici, istražiti povezanost njihove ekspresije s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta te istražiti doprinos genetičkih i epigenetičkih mehanizama regulaciji ključnih komponenti serotoniniskog sustava posteljice.

Rezultatima dobivenim na uzorcima tkiva posteljice iz detaljno karakteriziranih trudnoća su pokazano je da je u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i/ili GDM-om promijenjena regulacija ključnih komponenti serotoniniskog sustava posteljice. Specifično, snižena je razina mRNA serotoniniskog prijenosnika (*SERT*), povišena je razina proteina SERT i snižen je afinitet razgradnog enzima serotoninina MAOA. Majčino metaboličko stanje nije povezano s razinama mRNA gena *TPHI*, koji kodira enzim sinteze serotoninina. Promjene koncentracija lipida u krvi majke povezane su s promjenama u razinama ekspresije mRNA prijenosnika serotoninina, *SERT* i *OCT3*, te receptora serotoninina *HTR2A*. Razina ekspresije gena *SERT* u posteljici čovjeka povezana je s porođajnom masom i duljinom, ali ne i ponderalnim indeksom, novorođenčeta. U regulaciji razine mRNA *SERT* i *MAOA*, epigenetički mehanizmi nadređeni su genetičkim, dok je razina mRNA *HTR2A* povezana s rijetkom genetičkom varijantom. Istraživanje *in vitro*, u modelu stanica posteljice iz prvog tromjesečja trudnoće pokazalo je da posteljica odgovara na promjene koncentracije glukoze inzulina i kisika promjenama u ekspresiji triju ključnih regulatornih gena serotoninina – *SERT*, *TPHI* i *MAOA*.

Zaključno, majčina tjelesna masa i GDM povezani su s ekspresijom i/ili funkcijom nekoliko regulatornih komponenti homeostaze serotoninina u posteljici, što može doprinijeti promjenama u rastu, razvoju i funkcijama posteljice. Promjene u homeostazi serotoninina u posteljici, kao posljedica učinaka majčinog metaboličkog stanja, potencijalno nastaju već rano u trudnoći. Ovo upućuje na važnost prevencije i rane dijagnostike te pruža temelj za razvoj strategija liječenja negativnih posljedica majčine debljine i GDM-a u svrhu očuvanja zdravlja majke i djeteta.

9 SUMMARY

Placenta is a temporary organ crucial for the maintenance of pregnancy and proper fetal development. Serotonin is a multifunctional signalling molecule important in regulating the development and several different functions of the placenta. Maternal obesity and gestational diabetes mellitus (GDM) are associated with changes in placental development, structure and function, as well as an increased risks for various maternal and child health complications. The aim of this research was to contribute to the understanding of the placental serotonin homeostasis. The specific aims were: to investigate the effects of maternal obesity and GDM on the expression of placental serotonin regulatory genes, to investigate the association of the expression of placental serotonin regulatory genes with the anthropometric characteristics of newborns, and to investigate the contribution of genetic and epigenetic mechanisms in regulation of key components of the placental serotonin system.

The results obtained on placental tissue samples from well characterized pregnancies showed an altered regulation of two key components of the placental serotonin system in pregnancies complicated by maternal obesity and/or GDM. Specifically, the serotonin transporter (*SERT*) mRNA level was decreased, while the level of SERT protein was increased, and the affinity of the serotonin-degrading enzyme MAOA was decreased. Maternal metabolic state was not associated with serotonin synthesizing enzyme *TPHI* mRNA levels. Maternal blood lipid concentrations were associated with changes in mRNA levels of serotonin transporters, *SERT*, and *OCT3*, and serotonin receptor *HTR2A*. Placental *SERT* expression was associated with newborn birthweight and length, but not with ponderal index. Epigenetic regulation of *SERT* and *MAOA* mRNA levels dominated over genetic mechanisms explored, while *HTR2A* mRNA level was associated with a rare genetic variant. *In vitro* research in the first trimester trophoblast cell line showed that placenta responds to glucose, insulin and oxygen through changes in the expression of three key serotonin regulatory genes – *SERT*, *TPHI* and *MAOA*.

In conclusion, maternal obesity and GDM are associated with expression or function of serotonin system components in the placenta that may contribute to changes in placental growth, development, and function. Changes in placental serotonin homeostasis, influenced by maternal metabolic state, potentially occur early in pregnancy. These findings indicate the importance of prevention and early diagnosis and provide a basis for the development of new treatment strategies for the negative consequences of maternal obesity and GDM in order to preserve the health of mother and child.

Popis kratica

5HIAA	<i>5-hydroxyindoleacetic acid</i> , 5-hidroksiindol octena kiselina
5HT	<i>5-hydroxytryptamine</i> , 5-hidroksitriptamin, serotonin
ADHD	<i>attention deficit hyperactivity disorder</i> , poremećaj pažnje s hiperaktivnošću
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , analiza varijance
ASA	<i>acetylsalicylic acid</i> , acetilsalicilna kiselina
Chl	kolesterol
Cq	<i>quantification cycle</i> , granični ciklus
DEPC	<i>diethylpyrocarbonate</i> , dietil-pirokarbonat
dNTP	<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i> , deoksiribonukleozid trifosfat
EDTA	<i>ethylene-diaminetetraacetic acid</i> , etilen-diamino tetraoctena kiselina
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , komplet za imunoenzimski test
GDM	<i>gestational diabetes melitus</i> , gestacijski dijabetes melitus
GWG	<i>gestational weight gain</i> , prinos tjelesne mase u trudnoći
HDL	<i>high density lipoprotein</i> , lipoprotein visoke gustoće
IADPSG	<i>The International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups</i> , Međunarodno udruženje studijskih grupa za dijabetes u trudnoći
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i> , intrauterini zastoj rasta
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , lipoprotein niske gustoće
LGA	<i>large for gestational age</i> , novorođenče preveliko za gestacijsku dob
LSD	<i>least significant difference</i> , najmanja značajna razlika
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , glasnička ribonukleinska kiselina
miRNA	<i>microRNA</i> , mala nekodirajuća RNA
NGT	<i>normal glucose tolerance</i> , normalna tolerancija glukoze
NW	<i>normal weight</i> , predgestacijska normalna tjelesna masa
oGTT	<i>oral glucose tolerance test</i> , oralni test tolerancije na glukozu
OWO	<i>overweight – obesity</i> , predgestacijska prekomjerna tjelesna masa ili pretilost
ITM	indeks tjelesne mase
pITM	predgestacijski indeks tjelesne mase
qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivne kisikove vrste
RT	reverzna transkripcija
SD	standardna devijacija
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfizam pojedinačnog nukleotida
Tg	trigliceridi
Trp	triptofan
TSS	<i>transcription start site</i> , mjesto početka transkripcije
VNTR	<i>variable number tandem repeats</i> , polimorfizam varijabilnog broja tandemskih ponavljanja
Popis gena	
<i>ACTB</i>	<i>actin beta</i> , beta-aktin
<i>CK7</i>	<i>cytokeratin 7</i> , citokeratin 7
<i>HTR2A</i>	<i>5-hydroxytryptamine receptor 2A</i> , serotoniniski receptor 2A
<i>MAOA</i>	<i>monoamine oxidase A</i> , monoaminoksidaza A

<i>MAOB</i>	<i>monoamine oxidase B</i> , monoaminoksidaza B
<i>OCT1 / SLC22A1</i>	<i>organic cation transporter 1</i> , prijenosnik organskih kationa 1
<i>OCT2 / SLC22A2</i>	<i>organic cation transporter 2</i> , prijenosnik organskih kationa 2
<i>OCT3 / SLC22A3</i>	<i>organic cation transporter 3</i> , prijenosnik organskih kationa 3
<i>PMAT / SLC29A4</i>	<i>plasma membrane monoamine transporter</i> , prijenosnik monoamina plazmatske membrane
<i>SERT / SLC6A4</i>	serotoninski transporter
<i>TPH1</i>	triptofan hidroksilaza 1
<i>UBC</i>	<i>ubiquitin C</i> , ubikvitin C
<i>VMAT1 / SLC18A1</i>	<i>vesicular monoamine transporter 1</i> , vezikularni prijenosnik monoamina 1
<i>VMAT2 / SLC18A2</i>	<i>vesicular monoamine transporter 2</i> , vezikularni prijenosnik monoamina 2
<i>YWHAZ</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i> , aktivacijski protein zeta monooksigenaze tirozina 3/monooksigenaze triptofana 5

Životopis

Datum i mjesto rođenja

14. prosinca 1987., Split, Hrvatska

Obrazovanje

2019. – : Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2012: Magistra molekularne biologije (mag. biol. mol.), Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Diplomski studij molekularne biologije
- 2009.: Prvostupnica molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.), Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij molekularne biologije

Radno iskustvo

2019. – : **Asistentica** – doktorandica, Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju
- 07/2021. – 08/2021.: Kratkoročni studijski boravak na Medicinskom sveučilištu u Grazu, grupa prof. Gernota Desoye
2014. – 2019.: **Voditeljica laboratorija**, InovaGen d.o.o.
2013. – 2014.: **Suradnica**, Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za molekularnu i staničnu biologiju Zavoda za molekularnu biologiju (stručno osposobljavanje za rad)

Tečajevi i stručna usavršavanja

- 2021.: Tečaj za rad sa kulturom stanica u hipoksičnim uvjetima (Medicinsko sveučilište u Grazu, Austrija)
- 2022.: Tečaj „Placental Biology Course“, Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge (11.07 – 15.07.2022.)

Stipendije i priznanja

- 2022.: Stipendija za pohađanje tečaja „Placental Biology Course“, Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge (11.07 – 15.07.2022.)
- 2022.: Stipendija za sudjelovanje na “9th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (IX SLIMP)” - Travel award IFPA (International Federation of Placenta Associations)
- 2021.: Stipendija Instituta Ruđer Bošković za kratkoročni studijski boravak na Medicinskom sveučilištu u Grazu (30 dana)

Sudjelovanja u znanstvenim projektima

2019. - 2023: Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninški sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina (HrZZ, voditelj J. Štefulj)

Popularizacija znanosti

- 2023: Radionica, Frizbijada 2023: Istraživačke rute
- 2022: Prilog emisije Treći element: Prenatalni razvoj
- 2022: On-line predavanje, Otvoreni dan IRB-a 2022: Maja Perić: Neuroplacentologija – III. dio 'Organ kojeg nemaš, a omogućio ti je život'
- 2022: Radionica, Otvoreni dan IRB-a 2022: Neuroplacentologija - što je to?
- 2010 i 2011: Znanstvene radionice: Ljetna tvornica znanosti

Publikacije (* dijeljeno prvo autorstvo):

1. Bečeheli I, Horvatiček M, **Perić M**, Nikolić B, Holuka C, Klasić M, Ivanišević M, Starčević M, Desoye G, Hranilović D, Dubravka, Štefulj J. Methylation of serotonin regulating genes in cord blood cells: association with maternal metabolic parameters and correlation with methylation in peripheral blood cells during childhood and adolescence. *Clinical Epigenetics*, (2024) (16)4:1-18. doi: doi.org/10.1186/s13148-023-01610-w
2. **Perić M**, Horvatiček M, Tendl V, Bečeheli I, Majali-Martinez A, Desoye G, Štefulj J. Glucose, Insulin and Oxygen Modulate Expression of Serotonin-Regulating Genes in Human First- Trimester Trophoblast Cell Line ACH-3P. *Biomedicines* (2023) 11(6):1619. doi: 10.3390/biomedicines11061619
3. **Perić M***, Bečeheli I*, Čičin-Šain L, Desoye G, Štefulj J. Serotonin system in the human placenta – the knowns and unknowns. *Frontiers in Endocrinology* (2022) 1 (13):1061317. doi:10.3389/fendo.2022.1061317.
4. Horvatiček M*, **Perić M***, Bečeheli I, Klasić M, Žutić M, Kesić M, Desoye G, Radoš SN, Ivanišević M, Hranilovic D, Štefulj J. Maternal Metabolic State and Fetal Sex and Genotype Modulate Methylation of the Serotonin Receptor Type 2A Gene (HTR2A) in the Human Placenta. *Biomedicines* (2022) 10(2):467 doi.org/10.3390/biomedicines10020467
5. Baković P*, Kesić M*, **Perić M**, Bečeheli I, Horvatiček M, George M, Čičin-Šain L, Desoye G, Wadsack C, Panzenboeck U, Štefulj J. Differential Serotonin Uptake Mechanisms at the Human Maternal-Fetal Interface. *Int J Mol Sci* (2021) 22(15):7807 doi.org/10.3390/ijms22157807
6. Štefulj J, **Perić M**, Malnar M, Kosiček M, Schweinzer C, Živković J, Scholler M, Panzenboeck U, Hećimović S. Pharmacological Activation of LXRs Decreases Amyloid- β Levels in Niemann-Pick Type C Model Cells. *Curr Pharm Biotechnol* (2013) 14(6):582-93. doi: 10.2174/138920101131400224.
7. Vidaček NŠ, Pavlić D, **Perić M**, Rubelj I. Lifestyle, Telomeres and Aging - what is the connection? *Periodicum Biologorum* (2013).

Poglavlja u knjigama:

1. **Perić M**, Mitrečić D. Terapijski izazov moždanog udara. U: Mitrečić D, ur., Primjena tehnologije matičnih stanica u istraživanju i liječenju neuroloških bolesti. Zagreb: Medicinska naklada. (2012) p. 13-22 (priručnik)
2. **Perić M**, Mitrečić D. Matične stanice za neurodegenerativne bolesti. U: Mitrečić D, ur., Primjena tehnologije matičnih stanica u istraživanju i liječenju neuroloških bolesti. Zagreb: Medicinska naklada. (2012) p. 23-30 (priručnik)

Izabrana kongresna priopćenja i izlaganja na radionicama:

1. **Perić M**, Horvatiček M, Bečeheli I, Ivanišević M, Štefulj J. Relationship between placental serotonin transporter gene (SLC6A4) expression, maternal metabolic state, and infant birthweight. 9th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (IX SLIMP), Bogota, Kolumbija, SLIMP 2022 abstracts, Placenta 122, 2022.
2. **Perić M**, Horvatiček M, Tendl V, Majali-Martinez A, Bečeheli I, Desoye G, Štefulj J. Effects of glucose, insulin and oxygen on mRNA expression of serotonin-regulating genes in human first trimester trophoblast cell line ACH-3P. 54th annual DPSG meeting, Madrid, Španjolska, 2022. PP03, p. 50
3. **Perić M**, Horvatiček M, Bečeheli I, Tendl V, Majali-Martinez A, Desoye G, Ivanišević M, Štefulj J. Influence of maternal obesity and gestational diabetes on placental serotonin homeostasis. Placental Biology Course, Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge, CTR Placental Biology Course Booklet 2022. str. 108