

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: Laboratorij 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 s kraja 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 genetičkom varijantom. *In vitro* istraživanja na modelu stanica posteljice iz prvog tromjesečja trudnoće sugerirala su 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 veće stope ovih poremećaja širom svijeta.

Broj stranica: 139

Broj slika: 33

Broj tablica: 32

Broj literaturnih navoda: 212

Jezik izvornika: hrvatski

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

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (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

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/s: prof. dr. sc. Jasminka Štefulj, Institut Ruđer Bošković

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 placenta from the end of pregnancy 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 *TPHI* and *MAOA* mRNA levels. Epigenetic mechanisms dominated in the regulation of *SERT* and *MAOA*, while *HTR2A* mRNA levels were associated with a rare genetic 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 serotonin homeostasis in the placenta. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms associated with maternal obesity and GDM, which is especially important considering the increasing rates of these disorders worldwide.

Number of pages: 139

Number of figures: 33

Number of tables: 32

Number of references: 212

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:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (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

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 serotoniniski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do
funkcije proteina“ (HRZZ: IP-2018-01-6547).

Ocjena rada
u tisku

Zahvale

Ocjena rada
u tisku

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	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	Razgradni enzimi serotonina u posteljici.....	16
1.3.2.4	Transmembranski prijenosnici serotonina u posteljici	17
1.3.2.5	Receptori serotonina u posteljici.....	19
2	CILJ	21
3	MATERIJALI I METODE.....	23
3.1	Koncept istraživanja	24
3.2	Sudionici.....	25
3.3	Uzorci tkiva posteljice	26
3.4	Stanična linija	26
3.5	Osnovne kemikalije, otopine i kompleti.....	26
3.6	Tehnička oprema i pribor	31

3.7	Programski paketi	33
3.8	Izdvajanje nukleinskih kiselina	33
3.9	Analiza ekspresije mRNA	34
3.9.1	Reverzna transkripcija.....	34
3.9.2	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	35
3.10	Određivanje razine proteina SERT u tkivu posteljice	36
3.11	Određivanje aktivnosti enzima MAOA u tkivu posteljice	37
3.12	Određivanje koncentracije lipida u uzorcima krvi sudionica	38
3.13	Genotipizacija.....	38
3.13.1	<i>SERT</i>	38
3.13.2	<i>MAOA</i>	41
3.13.3	<i>HTR2A</i>	42
3.14	Analiza metilacije molekule DNA	42
3.14.1	Tretiranje genomske DNA bisulfitom.....	45
3.14.2	Umnažanje ciljnih odsječaka DNA tretirane bisulfitom	45
3.14.3	Pirosekvenciranje i obrada rezultata	46
3.15	Eksperimenti u kulturi stanica	47
3.15.1	Uzgoj stanica	47
3.15.2	Tretman stanica glukozom i inzulinom.....	47
3.16	Statistička obrada rezultata.....	49
4	REZULTATI.....	51
4.1	Podaci o sudionicima u kliničkom dijelu istraživanja	52
4.2	Povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninskog sustava posteljice.....	53
4.2.1	Razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici kod različitih metaboličkih skupina sudionica	54
4.2.2	Povezanost pITM-a i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici	56

4.2.3	Povezanost koncentracija lipida u krvi i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici	56
4.2.4	Razina proteina SERT u posteljici	58
4.2.5	Enzimsko aktivnost MAOA u posteljici	59
4.3	Povezanost polimorfizama i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici ..	62
4.3.1	Polimorfizmi gena <i>SERT</i>	62
4.3.2	Polimorfizam gena <i>MAOA</i>	66
4.3.3	Polimorfizmi gena <i>HTR2A</i>	68
4.4	Povezanost metilacije i razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici	69
4.4.1	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>SERT</i>	69
4.4.2	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>MAOA</i>	72
4.4.3	Povezanost metilacije i razine mRNA gena <i>HTR2A</i>	75
4.5	Povezanost razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici i antropometrijskih karakteristika novorođenčeta.....	77
4.5.1	Bivarijantne analize.....	77
4.5.2	Multipla linearna regresijska analiza.....	77
4.6	<i>In vitro</i> istraživanja učinaka metaboličkih abnormalnosti na serotoninski sustav posteljice	78
4.6.1	Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri razini kisika od 21 %	79
4.6.2	Učinci glukoze na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%	80
4.6.3	Učinci inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%	83
5	RASPRAVA.....	85
5.1	Klinički dio istraživanja	86
5.1.1	Serotoninski prijenosnik – SERT	87

5.1.2	Monoaminoksidaza A – MAOA	93
5.1.3	Receptor serotonina tipa 2A – HTR2A.....	96
5.1.4	Ostali regulatorni geni serotonina u posteljici – <i>OCT3</i> , <i>TPHI</i> i <i>MAOB</i>	99
5.2	<i>In vitro</i> istraživanja.....	101
5.2.1	Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri atmosferskoj razini kisika	101
5.2.2	Učinci glukoze i inzulina na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 2,5 % i 6,5 %	102
5.3	Prednosti, ograničenja i buduća istraživanja	106
5.4	Doprinosi istraživanja.....	108
6	ZAKLJUČAK.....	109
7	POPIS LITERATURE.....	112
8	SAŽETAK.....	132
9	SUMMARY	134
	Popis kratica.....	136
	Životopis.....	138

Ocjena rada u tisku

1 UVOD

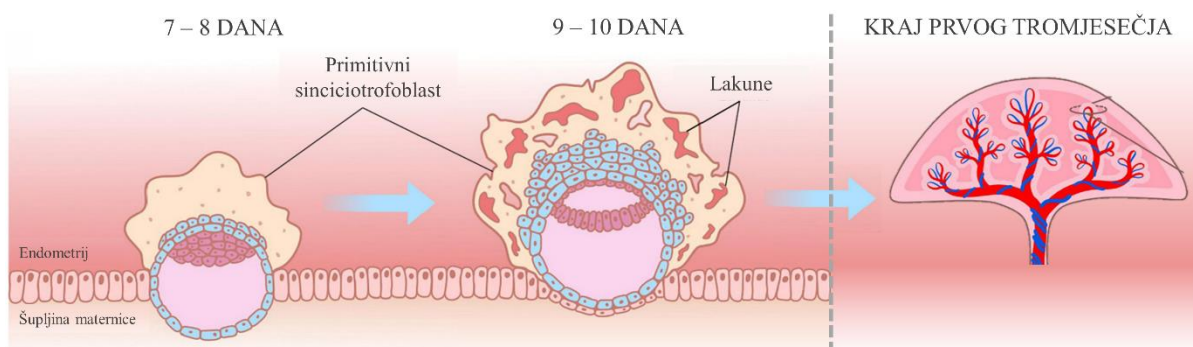
1.1 Posteljica čovjeka

Posteljica (placenta, od lat. *placenta*) je privremeni fetalni organ neophodan za održavanje trudnoće i normalan razvoj embrija/fetusa kod 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 nedovoljno razumije i predmet je brojnih znanstvenih istraživanja.

1.1.1 Razvoj

Razvoj posteljice čovjeka (**Slika 1.1.**) započinje oko sedmog dana nakon začeća kada se blastocista implantira u stijenku maternice (Turco i Moffett, 2019). Posteljica se razvija iz trofoektoderma i ekstraembrionalnog mezoderma blastociste, što je čini organom genetički istovjetnom fetusu. Iz trofoektoderma blastociste diferenciraju se citotrofoblasti. Dijeljenjem citotrofoblasta, na vanjskim dijelovima strukture dolazi do njihovog fuzioniranja u višejezgreni sinciotrofoblast. Već oko devetog dana nakon začeća, unutar rastućeg sinciotrofoblasta, dolazi do formiranja praznina (lakuna) u koje se ispuštaju izlučevine majčinih endometrijalnih žlijezda. 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 ekstraembrionalnog 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, oko 18. dana nakon začeća, razvijaju se fetalne krvne žile te fibroblasti i makrofazi koji zajedno s površinskim slojem citotrofoblasta i sinciotrofoblasta naposljetku formiraju 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 formiraju endovaskularni čep na ulazu majčinih spiralnih arterija u intervillozne prostore, čime sprječavaju prolazak majčine krvi. Na kraju prvog tromjesečja trudnoće,

remodeliranje majčinih spiralnih arterija transformira 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 žljezdanih izlučevina) na hemotrofični (putem krvi).



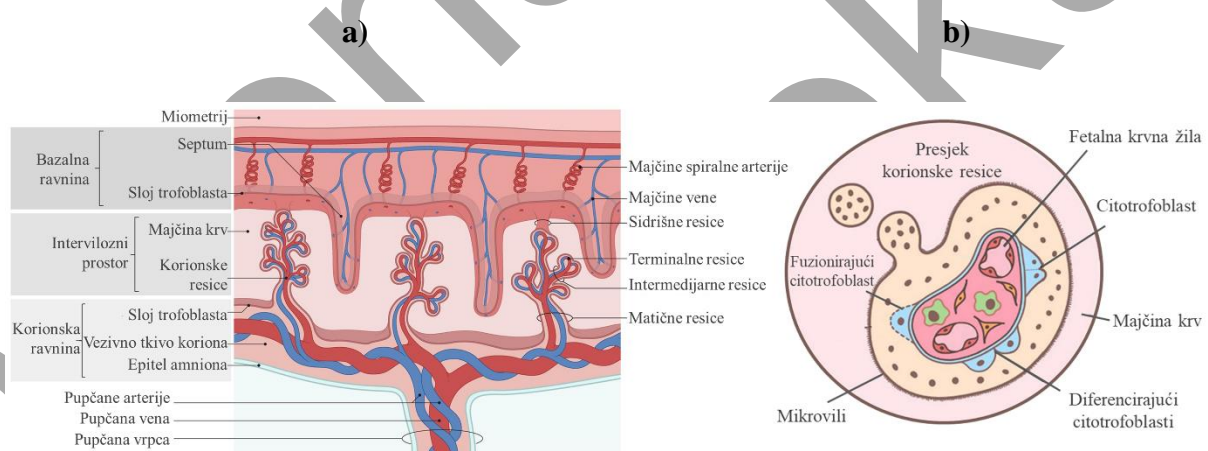
Slika 1.1 Razvoj posteljice čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz (Jaremek i sur., 2021)

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 fuzije citotrofoblasta (Genbacev i sur., 1996; Jauniaux i sur., 2000).

Krajem prvog tromjesečja, formirana posteljična barijera sastoji se od endotelnih stanica fetalnih kapilara, mezenhimalne jezgre (Hofbauerove stanice, fibroblasti i kolagena stroma) i stanica citotrofoblasta prekrivenih kontinuiranim slojem sinciciotrofoblasta (Jones i Fox, 1991). Kako trudnoća napreduje, broj citotrofoblasta se smanjuje, a sloj sinciciotrofoblasta i mezenhimalna jezgra se stanjuju, što osigurava bliski kontakt fetalne i majčine krvi preko izrazito tanke barijere, takozvane vaskulo-sincicijalne membrane, koju čine isključivo endotel fetalnih kapilara i sloj sinciciotrofoblasta (<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 oko 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 citotrofoblasta, 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 obavlja 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 tvari 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 putem difuzije, prijenosa posredovanog 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 trofoblata, 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. ljudski korionski gonadotropin (HCG, engl. *human chorionic gonadotrophin*), ljudski laktogen posteljice (HPL, engl. *human placental lactogen*), ljudski 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 iz majčina krvotoka. 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 tzv. Hofbauerove stanice, jedine stanice imunološkog sustava dosad prepoznate u posteljici (Turco i Moffett, 2019).

1.2 Majčina debljina i gestacijski dijabetes melitus

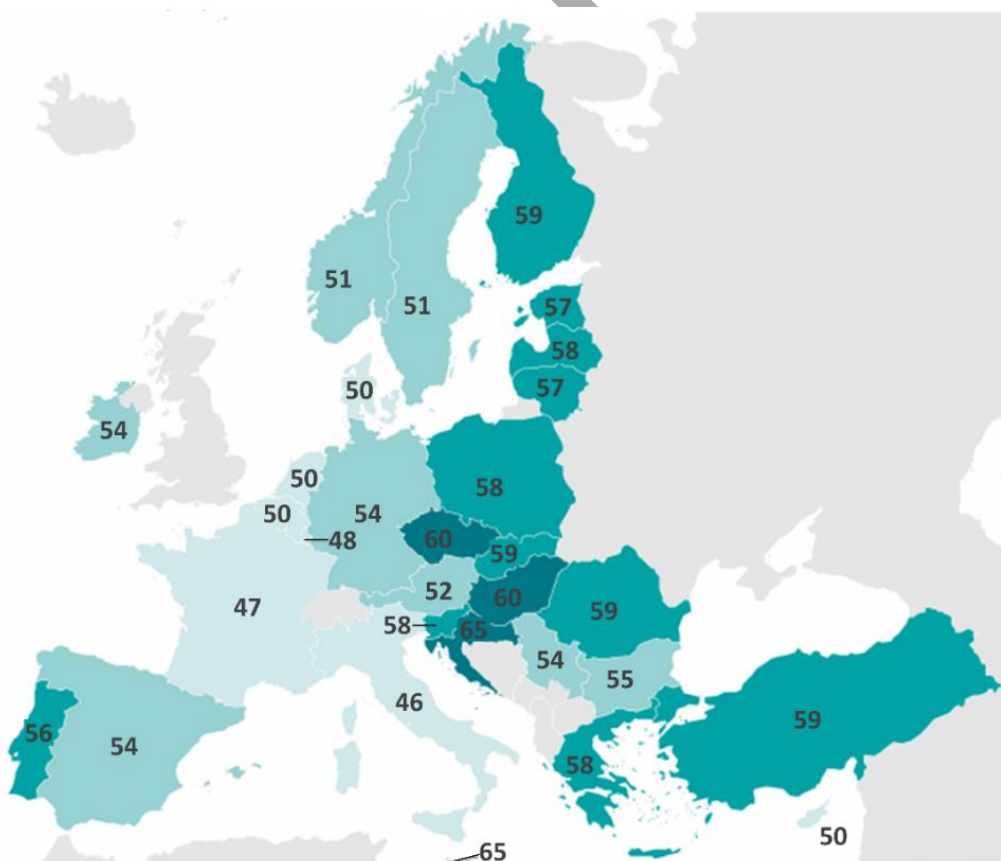
Trudnoća je razdoblje velikih fizioloških promjena u gotovo svim tjelesnim sustavima žene. Metaboličko stanje trudnice vrlo je važan čimbenik za normalan razvoj trudnoće. Stanja narušenog metaboličkog zdravlja poput prekomjerne tjelesne mase, pretilosti i gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM) se danas ubrajaju u najčešće komplikacije 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), 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 glukoze (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 oko 30%, dok je među njima oko 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% (raspon 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 Hrvatskoj se bilježi učestalost 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 više kronološke dobi, etniciteta (ne-bjelačkog), obiteljske povijesti dijabetesa 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 nadalje je povezano s povišenim markerima 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 oko 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, inzulinski odgovor 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 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 oocite putem promijenjene hormonalne ravnoteže osi hipotalamus-hipofiza-jajnici, a potencijalno i na endometriju maternice, što zajedno rezultira smanjenjem plodnosti te povećanim rizikom od spontanij 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 s povećanim rizikom od 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). Brojna istraživanja su utvrdila 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 hipertenzijskih poremećaja u trudnoći, a čak 50 – 60% njih razvije dijabetes tipa 2 u narednih 10 godina nakon dijagnoze GDM-a (Catalano, 2010).

Istraživanja na animalnim modelima sugeriraju da *in utero* izloženost dijabetesu remeti razvoj i funkciju hipotalamusa, stvarajući predispoziciju potomaka za pretilost (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 iz trudnoća s dijagnosticiranim GDM-om imaju povećan rizik od debljine i

povezanih metaboličkih poremećaja poput intolerancije glukoze i dijabetesa (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 koji stoje u podlozi posljedica majčine debljine i GDM-a na potomstvo (Catalano i Shankar, 2017; Godfrey i sur., 2015).

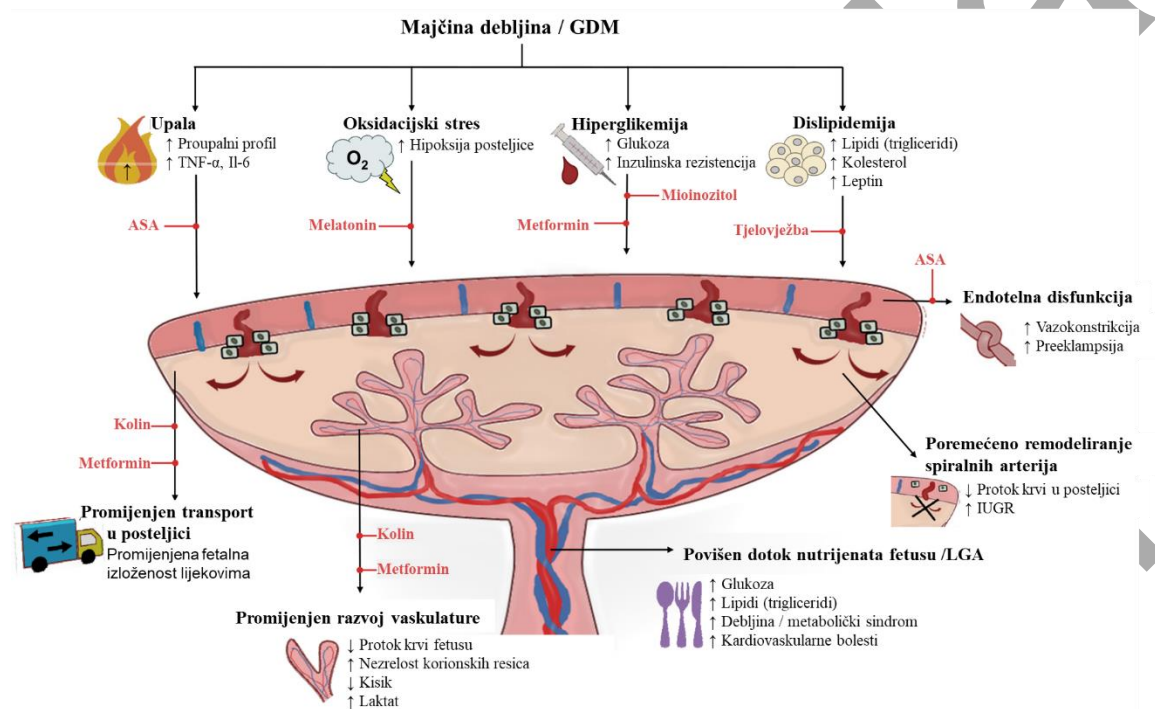
1.2.3 Posteljica u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i GDM-om

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 više 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 te brojnih patofizioloških sličnosti majčine debljine i GDM-a, 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 svog ubrzanog rasta, tj. na samom početku trudnoće (Desoye, 2018). Istraživanja sugeriraju 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 za

posljedicu imaju i promjene u efikasnosti 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 se povezuju 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 sugeriraju 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 zaštitio embrij/fetus u razvoju 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 efikasnosti posteljice), 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 udjela masnog tkiva kod 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, među kojima se ističu geni uključeni u regulaciju funkcije mitohondrija i metabolizma (Lassance i sur., 2015). To nadalje rezultira otpuštanjem različitih čimbenika iz posteljice, poput citokina i laktogena, koji dodatno smanjuju osjetljivost na inzulin u majčinih tkivima. 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. 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 energetske 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 serotonina, kao što su enzimi sinteze i razgradnje serotonina, njegovi transmembranski prijenosnici te receptori za serotonin. Njihovim složenim međudjelovanjem održava se homeostaza ovog monoamina i osigurava nesmetano odvijanje signalizacije putem serotonina. 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, novija istraživanja pokazala su da je serotoninski sustav prisutan i u različitim drugim perifernim organima, uključujući posteljicu (Berger i sur., 2009; Perić i sur., 2022).

1.3.1 Funkcije serotoninskog sustava posteljice

Dostupni dokazi iz kliničkih studija, studija na *in vitro* modelima posteljice te studija na animalnim modelima zajednički pokazuju da serotoninski sustav posteljice regulira razvoj i više različitih funkcija 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 *in vitro* modelima posteljice čovjeka (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 trofoblata. 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 trofoblata sugerirala njegovu

uključenost u regulaciju endokrinih funkcija posteljice, specifično, u regulaciju posteljične sinteze estrogena (Hudon Thibeault i sur., 2017; Klempan i sur., 2011; Thibeault i sur., 2019). Novija istraživanja na animalnim modelima sugeriraju ulogu serotoninskog sustava posteljice u regulaciji prijenosa hranjivih tvari kroz posteljicu (Mao i sur., 2021).

Različiti dokazi upućuju da 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). Prvo, 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 *in situ* sinteza serotonina (Bonnin i sur., 2011; Takahashi i sur., 1986), što se kod ljudi događa krajem prvog/početkom drugog tromjesečja trudnoće. Nadalje, 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.

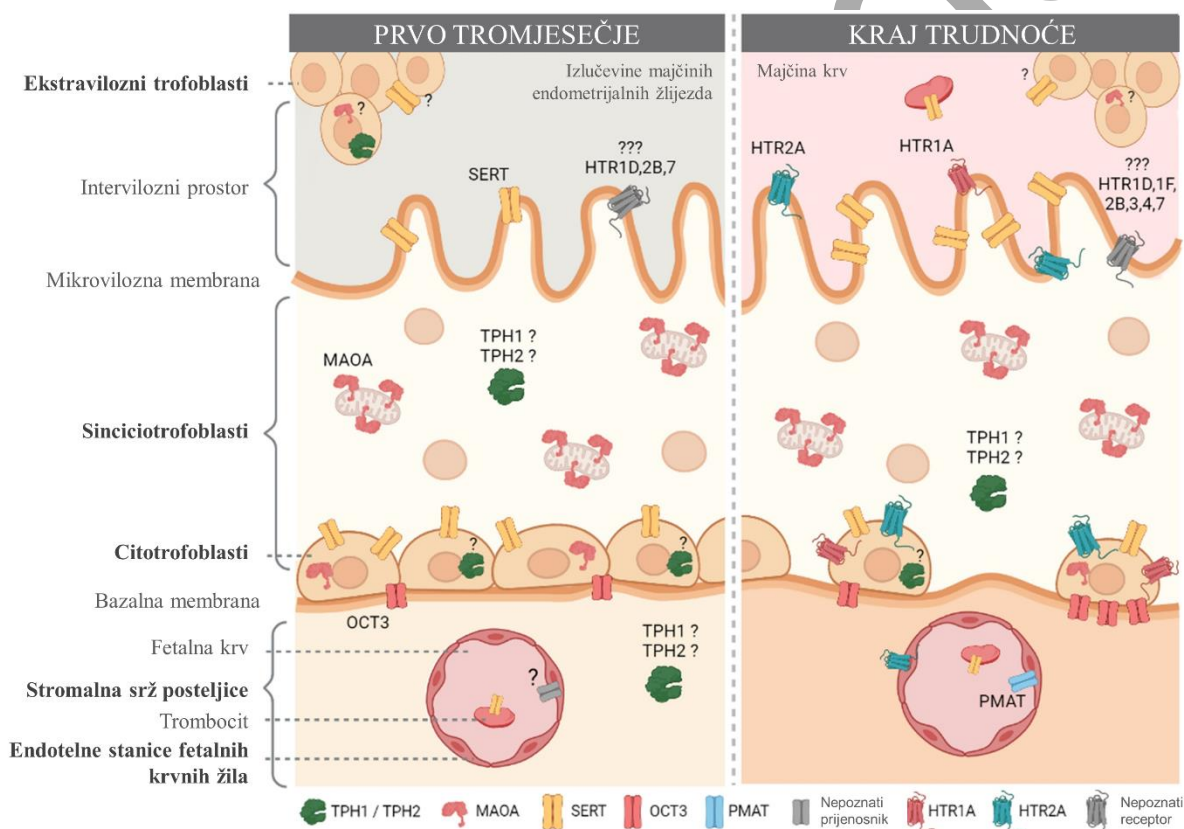
1.3.2 Komponente serotoninskog sustava posteljice

Posteljica eksplicira 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.), a pojedine komponente tog dinamičnog procesa još uvijek su prilično nerazjašnjene (Perić i sur., 2022).

1.3.2.1 Serotonin u posteljici

Dokazi o prisutnosti i staničnom smještaju molekule serotonina u posteljici čovjeka nisu usuglašeni. Prvo imunohistokemijsko istraživanje lokalizacije serotonina u terminskoj posteljici čovjeka pokazalo je da je serotonin prisutan u sinciotrofoblastu, stromalnim stanicama i endotelu fetalnih krvnih žila (Huang i sur., 1998). U novijem imunohistokemijskom

istraživanju posteljice čovjeka, uočeni su tek tragovi serotonina u prvom i drugom tromjesečju dok na kraju trudnoće nije uočen uopće (Kliman i sur., 2018). Međutim, u prisutnosti egzogeno dodanog serotonina te nakon farmakološke blokade katabolizma serotonina, dokazana je prisutnost serotonina u različitim staničnim odjeljcima citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta (Kliman i sur., 2018), što sugerira da je serotonin prisutan u posteljici, ali su njegove razine strogo kontrolirane brзом enzimskom razgradnjom.



Slika 1.5. Smještaj komponenti serotoninskog sustava u posteljici čovjeka ovisno o gestacijskoj dobi. Na slici je prikazana prisutnost i lokalizacija 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 aminokiseline. Postoje dvije izoforme enzima TPH, TPH1 i TPH2, kodirane genima koji se nalaze na kromosomima 11, odnosno 12 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 prvom istraživanju koje je pokazalo nedostatak sinteze serotonina u posteljici miša (Yavarone i sur., 1993), daljnja istraživanja su pronašla dokaze o sintezi 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). Veći broj istraživanja slaže se 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 njihovim rezultatima, analiza transkriptoma pojedinačnih stanica (engl. *single-cell transcriptomics*) sekvenciranjem RNA (RNA-seq) nije detektirala mRNA *TPH1* u terminskoj posteljici, a mRNA *TPH2* je bila prisutna u vrlo niskim razinama (Pavličev i sur., 2017).

1.3.2.3 Razgradni enzimi serotonina u posteljici

Serotonin se katabolizira uglavnom do konačnog metabolita 5-hidroksiindolactone 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 kromosomu X čovjeka (Xp11.3) (Sivasubramaniam i sur., 2002). Obje izoforme kataliziraju oksidacijsku deaminaciju serotonina i raznih drugih endogenih i prehrambenih monoamina, 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 imunohistokemijskim studijama (Kliman i sur., 2018) i studijama aktivnosti enzima (Karahoda i sur., 2020a). Gen *MAOA* se u posteljici čovjeka eksprimira u sinciciotrofoblastu (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, sinciciotrofoblast sadrži mnogo više razine mRNA *MAOA* u odnosu na citotrofoblaste (oko 10 puta više u prvom tromjesečju i oko 2 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 sekvence duljine 30 pb prisutne 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) sugeriraju da polimorfizam *uVNTR* regulira ekspresiju gena *MAOA*.

Gen *MAOA* također sadrži dvije regije obogaćene dinukleotidima CpG (CpG otoci) (Shumay i Fowler, 2010), slijed sekvence u kojem je citozin često metiliran. CpG otoci su regije DNA koje u svom slijedu sadrže više od 50% nukleotida C i G, dulji su od 200 parova baza (pb) te imaju omjer prisutnih u odnosu na očekivani (temeljen na broju gvanozina i citozina u danom segmentu) broj CpG dinukleotida 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, s bitno različitim kinetičkim svojstvima: 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, serotoninški prijenosnik ili SERT (također poznat kao 5-HTT) (Ramamoorthy i sur., 1998), koji je vrlo selektivan za serotonin. Sustav unosa-2 uključuje plazma membranski prijenosnik monoamina (PMAT) i prijenosnike organskih kationa (OCT) 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 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 ekspimiran 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. (2023).

Niske razine mRNA gena *PMAT*, još jednog prijenosnika serotonina niskog afiniteta, otkrivene su u tkivu posteljice čovjeka (Lee i sur., 2013). mRNA gena *PMAT* nije pronađena u trofoblastima čovjeka iz prvog tromjesečja (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. Kod ljudi je identificirano 14 različitih podtipova receptora za serotonin, klasificiranih 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 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, sudjelujući tako 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 kod različitih komplikacija trudnoće povezanih s nepravilnostima u razvoju i funkciji posteljice, uključujući majčinu pretilost i GDM.

Ocjena rada u tijeku

2 CILJ

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:

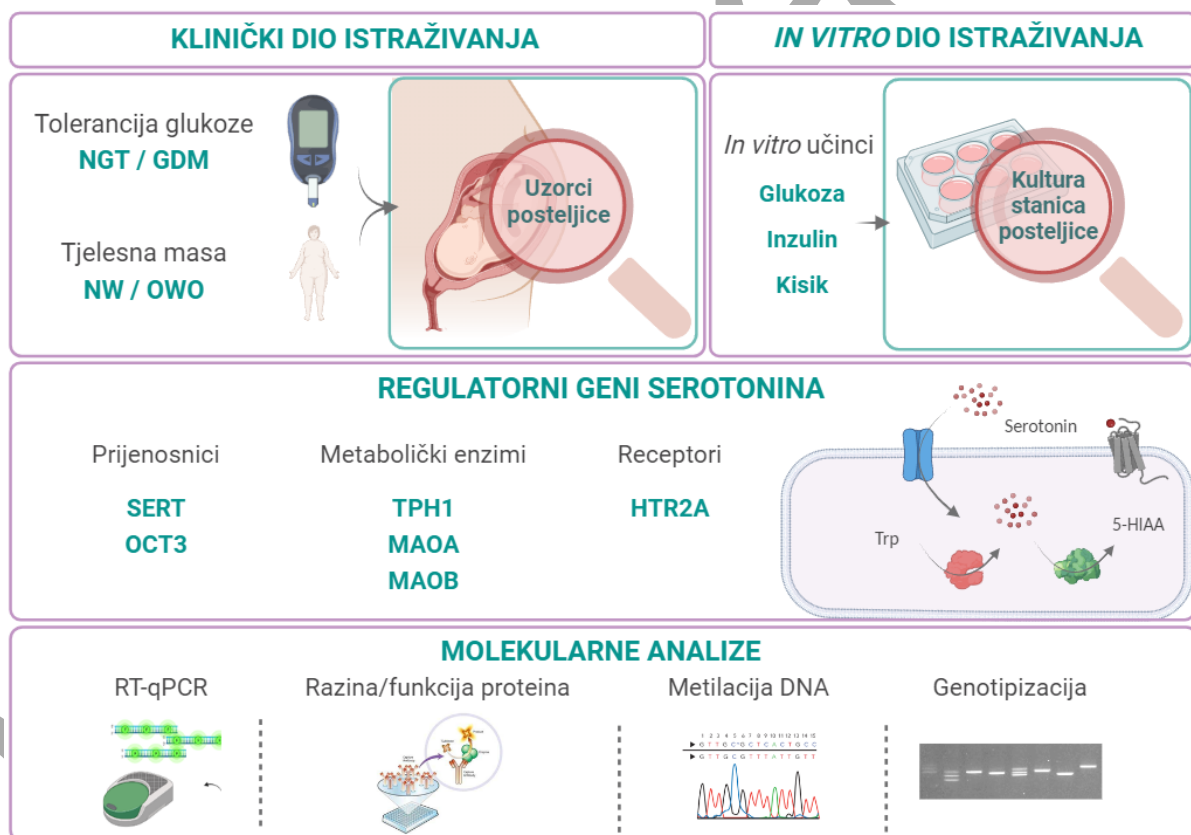
- 1) odrediti odnos između majčinih metaboličkih parametara (debljine i GDM-a) i ekspresije odabranih regulatornih gena serotonina u posteljici;
- 2) istražiti odnos između ekspresije, polimorfizama i metilacije odabranih regulatornih gena serotonina u posteljici;
- 3) istražiti potencijalnu povezanost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

Ocjena rada
u tisku

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) te odnos ekspresije s genotipom i metilacijom molekule DNA istražen je na uzorcima tkiva posteljice iz detaljno karakteriziranih trudnoća. Paralelno, učinak promjena razine glukoze, inzulina i kisika (povezanih s majčinom debljinom i GDM-om) na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina istražen je *in vitro* na staničnoj liniji trofoblasta čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće.



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 – serotoninski transporter, OCT3 – prijenosnik organskih kationa tipa 3, TPH1 – triptofan hidroksilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, MAOB – monoaminoksidaza B, HTR2A – receptor serotonina tipa 2A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina. Izrađeno uz pomoć 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 serotoninški 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 uključivale u istraživanje u Klinici za ženske bolesti i porođaje Sveučilišnog bolničkog centra u Zagrebu. 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 podaci prikupljeni su iz medicinske dokumentacije te upitnika koje su sudionice ispunjavale 1-3 dana prije porođaja. U studiju su uključene isključivo trudnoće dovršene 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 višepodne 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:

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

Ovisno o pITM-u, 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 $\geq 5,1$ mmol/L natašte i/ili $\geq 10,0$ mmol/L 1h i/ili $\geq 8,5$ mmol/L 2h 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 5 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 medicinu) 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 (Qiagen), 24 sata na 4°C , a nakon toga pri -80°C .

3.4 Stanična linija

In vitro eksperimenti provedeni su na modelu stanica posteljice iz prvog tromjesečja trudnoće čovjeka, staničnoj liniji ACH-3P. Stanična linija ACH-3P uspostavljena je u laboratoriju Zavoda za opstetriciju i ginekologiju, Medicinskog Sveučilišta u Grazu, Graz, Austrija, a dobivena je fuzijom 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).

3.5 Osnovne kemikalije, otopine i kompleti

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 pripravljene matične otopine koncentracije 100 μM od kojih su potom pripravljene radne otopine koncentracije 10 μM . Sve otopine su čuvane pri -20°C . Sastav korištenih početnica naveden je u **Tablici 3.1**.

Elektroforeza u gelu agaroze:

- Agarosa (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% bromfenolno 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)

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	("GenScript," n.d.)
<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: CCGTGCGCTCTGCCTATGGGG 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 RTPrimerDB ID: 3165

Izdvajanje ukupnih proteina:

- Komplet za inhibiciju proteaza (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Reagens za izdvajanje membranskih proteina uključujući površinske proteine i receptore u svrhu 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)

Reagensi za 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)

Genotipizacija

SERT:

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

MAOA:

- 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- 10 \times PCR pufer II (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- 10 nM smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; svaki 2,5 mM; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)
- Taq DNA polimeraza, 5 U/ μ L (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 μ M od kojih su potom pripremljene radne otopine koncentracije 10 μ M. Sve otopine su čuvane pri -20°C. Sastav korištenih 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 bisulfitno modificirane DNA – PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- 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. Sastav korištenih 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: TGTTCTAGTCTTACGCCAG	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*)

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)
- Puffer 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.

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 3.16.**

Regija (CpG mjesta)	Nukleotidni slijed početnice (5' - 3')	Amplikon (bp)	Izvor
SERT/SLCC6A4:			
Promotor (CpG 1-10)	f*: GGTTTTTAGGAGAGTAGGGAGTATATAGTT r: AAAAATCCTAACTTTTCTACTCTTTAACTT s: AAACACACAAAAAACAAAT f: GGGGAGGGGGATAGAAT	203	(Devlin i sur., 2010)
Intron 1 (CpG 11-21)	r*: ACAACACTTTACTCAAAACCCTCTTTA s: GGGGAGGGGGATAGAAT f: TTTTAAAGAGGGTTTTGAGTAAAGTG	273	/
Intron 1 (CpG 22-25)	r*: TTTATATCAACCAAAACTCTCCCTTTACAT s: GGGTTTTGAGTAAAGTGT	150	/
MAOA:			
Egzon1 / intron 1 (CpG 1-9)	f: GGGGAGTTGATAGAAGGGTTTTTTTTAT r*: TATATCTACCTCCCCAATCACACC s: AGTAAAGTATGGAGAATTAAG	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

3.6 Tehnička oprema i pribor

- Termomikser LLG-uni thermix1 (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučni dezintegrator (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 hematološki analizatori Cobas c 501 module (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, SAD) i Alinity c (Abbott, Chicago, IL, USA)
- 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)

3.7 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)

3.8 Izdvajanje nukleinskih kiselina

Tkivo posteljice pohranjeno u otopini RNAlater je posušeno na filter papiru te je izvagana masa dehidriranog tkiva. U svrhu izdvajanja DNA, 11-13 mg dehidriranog tkiva posteljice je homogenizirano uz pomoć plastičnog tučka i pripadajuće plastične mikroeprevete. DNA je dalje izdvojena pomoću kompleta GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit prema protokolu proizvođača, uz dodatni korak razgradnje RNA. Kolonica je u zadnjem koraku inkubirana 10 min s 200 μ L otopine za eluiranje, nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem, po protokolu proizvođača kompleta.

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

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

Količina te čistoća izdvojenih DNA i RNA određena je spektrofotometrijski (NanoPhotometer N60/N50). Cjelovitost izdvojenih DNA i RNA provjerena je elektroforezom u gelu agaroze (0,8%), uz vizualizaciju pomoću Midori Green Advance DNA boje. Omjer apsorbancija 260/280 za uzorke DNA bio je u rasponu 1,8 – 2,0 te su u gelu agaroze pokazali vrpce visoke molekularne mase bez pokazatelja raspada. Omjer apsorbancija 260/280 za uzorke RNA bio je u rasponu 2,0 – 2,2 te su u gelu agaroze pokazali 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/ μL . Uzorci DNA i RNA pohranjeni su pri -80°C do daljnje upotrebe.

3.9 Analiza ekspresije mRNA

3.9.1 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 μg po uzorku) prevedene su u cDNA uz pomoć 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 na 37°C kroz 60 min, a reakcije su zaustavljene zagrijavanjem na 95°C kroz 5 min kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Dobivena cDNA razrijeđena je do koncentracije 7,5 ng/ μL RNA i pohranjena u tri alikvota pri -20°C do daljnje upotrebe.

Jednake količine RNA izdvojene iz stanica ACH-3P (0,7 µg po uzorku) prevedene su u cDNA uz pomoć kompleta LunaScript RT SuperMix Kit. Sastav reakcijske smjese prikazan je u **Tablici 3.5**. Reakcijske smjese inkubirane su 2 min na 25°C, te 10 min na 55°C. Reakcije su zaustavljene zagrijavanjem na 95°C kroz 1 min kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Dobivena cDNA razrijeđena je do koncentracija 10 ng/µL (za qPCR reakcije gena od interesa) ili 2,5 ng/µL (za qPCR reakcije referentnih gena) te pohranjena pri -20°C do daljnje upotrebe.

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

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

^a reakcijske smjese koje su sadržavale reverznu transkriptazu

^b kontrolne reakcijske smjese bez reverzne transkriptaze

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

3.9.2 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

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 (engl. *genes of interest*, GOI) u tkivu posteljice (*SERT*, *OCT3*, *TPH1*, *MAOA* i *MAOB*) i tri gena od interesa u stanicama ACH-3P (*SERT*, *TPH1* 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 pomoću 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, pomoću 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, pomoću 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, triplikatima ili kvadriplikatima. Specifičnost amplikona potvrđena je analizom krivulje taljenja. Relativne razine ekspresije gena od interesa izračunate su pomoću komparativne C_q (ddC_q) metode.

3.10 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 (Cloud-clone Corp.) s dodatkom inhibitora proteaza (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Fisher Scientific Inc.), u omjeru 1:20 (masa tkiva (g) : volumen pufera (mL)). Tkivo je homogenizirano u staklenom homogenizatoru uz pomoć uređaja za homogenizaciju s keramičkim tučkom (20 ciklusa potisaka pri brzini 1200 rpm) te potom sonikacijom titanovom mikrosondom (3 ciklusa po 10 s 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 min pri 10000 g na 4°C kako bi se istaložili nehomogenizirani ostatci tkiva. U supernatantima je izmjerena koncentracija ukupnih proteina metodom BCA (engl. *bicinchoninic acid*) uz pomoć kompleta (Pierce™ 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*), pomoću

kompleta (Cloud-clone Corp.). 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 duplih razrjeđenja (0,312 ng/ μ L – 0,010 ng μ L) ili 100 μ g ukupnih proteina tkiva posteljice razrijeđenih u puferu PBS. Pločica je inkubirana 1 sat na 37°C i zatim preko noći na 4°C. Nakon ispiranja, dodano je drugo protutijelo specifično za SERT čovjeka s konjugiranim biotinom te je pločica inkubirana 1 sat na 37°C. Nakon ispiranja nevezanog protutijela, u jažice je dodan avidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) i pločica je inkubirana 30 minuta na 37°C. Jažice su ponovno isprane i zatim je dodana otopina supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB). Enzimska reakcija prekinuta je nakon 30 min dodatkom otopine sumporne kiseline i promjena boje mjerena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Koncentracija proteina SERT u uzorcima određena je iz očitane optičke gustoće uzoraka pomoću standarde krivulje i izražena je prema masi ukupnih proteina.

3.11 Određivanje aktivnosti enzima MAOA u tkivu posteljice

U svrhu određivanja enzimske aktivnost (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 mikrosandom (3 ciklusa po 10 s uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 μ m) 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 min pri 2000 g na 4°C, kako bi se istaložili nehomogenizirani ostatci tkiva.

Aktivnost posteljične MAOA 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 spektrofotofluorimetrijski pomoću standardne krivulje.

Za reakciju određivanja kinetičkih parametara enzima MAO korišteno je 6 μ g ukupnih proteina posteljice, razrijeđenih u natrij-boratnom puferu do ukupnog volumena 150 μ L. Uzorci su predinkubirani 10 min na 37°C. Brzina reakcije za svaki uzorak određivana je pri 6 koncentracija supstrata kinuramina: 6,25, 12,5, 25, 50, 100 i 200 μ M. Raspon koncentracija supstrata odabran je na temelju preliminarnih eksperimenata. U svrhu odabira optimalnih

uvjeta reakcije, također je napravljen eksperiment ovisnosti brzine reakcije o količini ukupnih proteina (1,5 – 48 μg) i trajanju reakcije (10 – 30 min). Kao optimalni uvjeti odabrani su količina od 6 μg ukupnih proteina po reakciji te trajanje reakcije od 15 min. Smjesa ukupnog volumena 180 μL inkubirana je 15 min na 37°C uz stalno potresanje. Reakcija je zaustavljena dodatkom 90 μL trikloroetane 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 spektrofotofluorimetru uz ekscitaciju pri valnoj duljini 310 nm i emisiju pri valnoj duljini 362 nm.

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

3.12 Određivanje koncentracije lipida u uzorcima krvi sudionica

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, kolesterola u sastavu lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *high density lipoprotein*) i kolesterola u sastavu lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*) u uzorcima seruma sudionica mjerene su u kliničkom laboratoriju, na automatskom hematološkom analizatoru (Cobas c 501 ili Alinity c).

3.13 Genotipizacija

3.13.1 *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) uz pomoć specifičnih početnica (**Tablica 3.2.**) te određivanjem duljine produkata PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3%). Sastav reakcijske smjese prikazan je u **Tablici 3.6.**, a

termalni uvjeti PCR-a 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 nanovo mu je očitani genotip.

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 \times)	1.0 \times	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

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) – *rs25531* (Chr17:30237328 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**), određen je metodom analize odsječaka restrikcije (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*). U tu svrhu su produkti PCR-a (**Tablica 3.6** i **Tablica 3.7**) razgrađeni (digestirani) restrikcijskom endonukleazom *MspI* te je određena duljina dobivenih odsječaka elektroforezom u gelu agaroze (3%). Sastav reakcijske smjese za restrikcijsku digestiju prikazan je u **Tablici 3.8**. Mogući genotipovi i očekivane duljine odsječaka prikazane su u **Tablici 3.9**. Genotip su neovisno očitavale barem dvije osobe. U slučaju neslaganja, odsječak je ponovno umnožen i nanovo mu je očitani genotip.

Tablica 3.8. Sastav reakcijske smjese za restriksijsku digestiju u svrhu određivanja 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

Tablica 3.9. Očekivane duljine odsječaka DNA nakon reakcije PCR i razgradnje produkata PCR-a restriksijskom 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*

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 uz pomoć specifičnih početnica (**Tablica 3.2**) te određivanjem duljine produkata PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3%). Sastav reakcijske smjese za PCR prikazan je u **Tablici 3.10.**, a termalni uvjeti reakcije u **Tablici 3.11.**

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

3.13.2 *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 uz pomoć specifičnih početnica (**Tablica 3.2**) te određivanjem duljine produkata PCR-a elektroforezom u gelu agaroze (3,5%). Sastav reakcijske smjese za PCR prikazan je u **Tablici 3.13.**, a termalni uvjeti reakcije 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

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 nanovo mu je očitani genotip.

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

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

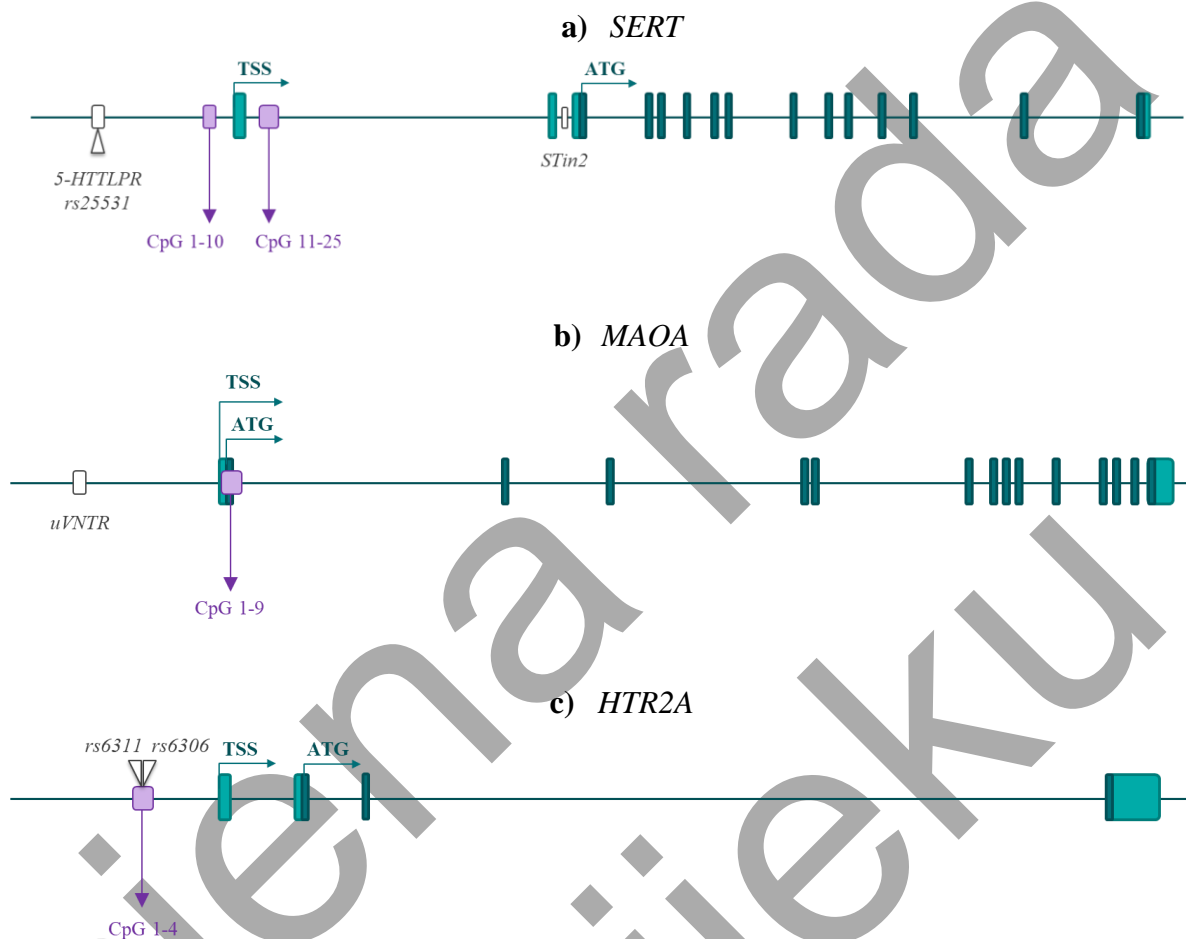
3.13.3 *HTR2A*

SNP *rs6306* (-1421 C > T, Chr13: 46897326 u genomu čovjeka GRCh38.p14/hg38, **Slika 3.2.**) u genu *HTR2A* genotipiziran je pomoću TaqMan SNP reagensa za genotipizaciju prema uputama proizvođača. 20 ng genomske DNA umnoženo je u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 10 µL na uređaju 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*.

3.14 Analiza metilacije molekule DNA

Analiza metilacije DNA provedena je metodom pirosekvenciranja DNA tretirane bisulfitom (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 – netranslatirane regije, tamno zeleno – translatirane regije), bijeli pravokutnici predstavljaju polimorfizme duljine, bijeli trokute označavaju polimorfizme pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), a ljubičasti pravokutnici predstavljaju regije u kojima je analizirana metilacija molekule DNA. TSS – mjesto početka transkripcije (engl. *transcription start site*, TSS), ATG – mjesto početka translacije (kodon ATG). Genomske koordinate analiziranih polimorfizama navedene su u poglavlju 3.13 (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
	21	17	Chr17: 30 235 448	5489	250	-13489
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 (engl. *transcription start site*, TSS) 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).

3.14.1 Tretiranje genomske DNA bisulfitom

Pretvorba nemetiliranih citozina u uracil provedena je tretmanom genomske DNA bisulfitom (engl. *bisulfite conversion*). Tretiranje genomske DNA bisulfitom i njezino naknadno pročišćavanje provedeno je uz pomoć 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 tretirane bisulfitom je u zadnjem koraku inkubirana 10 min s 16 μ L otopine za eluiranje, nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem.

3.14.2 Umnažanje ciljnih odsječaka DNA tretirane bisulfitom

Ciljane regije DNA tretirane bisulfitom umnožene su uz pomoć kompleta (PyroMark PCR Kit) i početnica specifičnih za pojedini odsječak DNA. Nukleotidni sljedovi početnica i duljine amplicona gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A* prikazani su u **Tablici 3.3**. Sastavi reakcijskih smjesa prikazani su u **Tablici 3.17.**, **Tablici 3.18.** i **Tablici 3.19.**, a uvjeti reakcija u **Tablici 3.20**. Specifičnost PCR-a potvrđena je elektroforezom produkata 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*

3.14.3 Pirosekvenciranje i obrada rezultata

Umnoženi sljedovi DNA tretirane bisulfitom pirosekvencirani su uz pomoć 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. Uz pomoć programskog paketa PyroMark Q24 Software, za pojedinačnu analiziranu regiju, na temelju specifičnog slijeda za analizu (prije modifikacije bisulfitom), generiran je slijed za dodavanje nukleotida (engl. *dispensation order*). Zadani slijedovi 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 generiran uz pomoć 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.

3.15 Eksperimenti u kulturi stanica

3.15.1 Uzgoj stanica

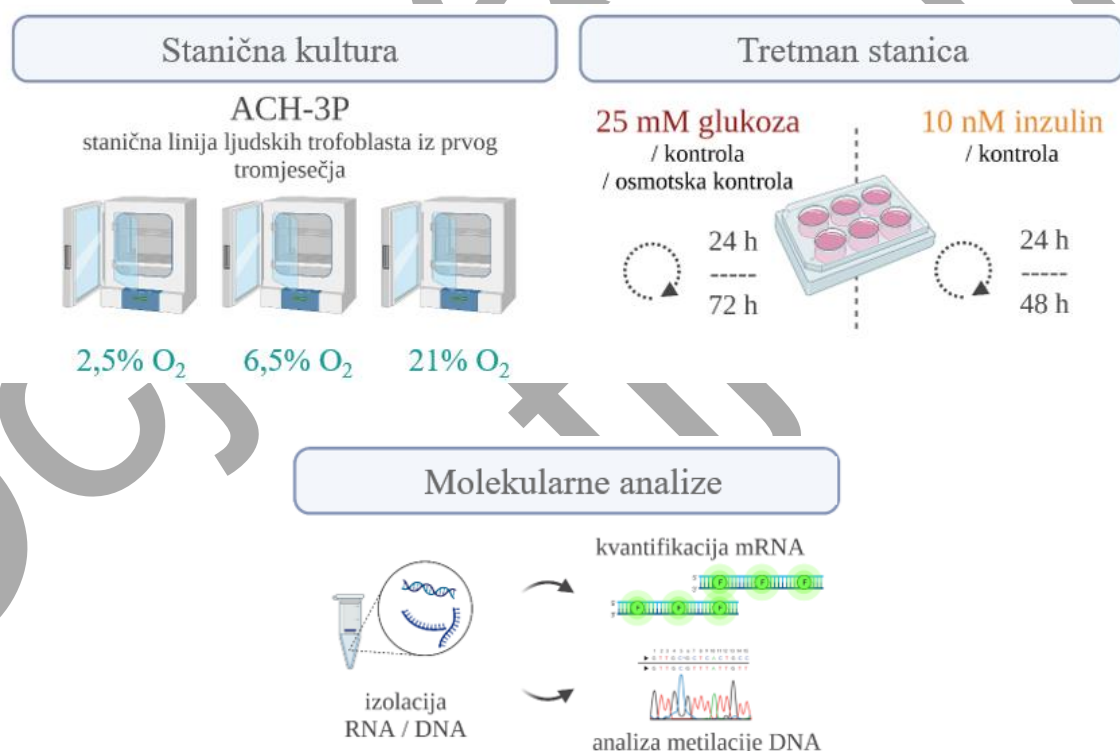
Stanice ACH-3P uzgajane su u bočicama za staničnu kulturu površine 75 cm², u mediju DMEM koji je sadržavao D-glukozu (5,5 mM), L-glutamin i natrijev piruvat (u pokusima tretmana s glukozom) ili u Hamovom mediju F-12 koji je sadržavao L-glutamin (u pokusima tretmana s inzulinom), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) i 1% penicilina/streptomicina. Stanice su održavane na 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 XVIVO inkubacijskom sustavu (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 selektirali trofoblasti i spriječilo prerastanje stanica koriokarcinoma.

3.15.2 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 utjecaje inzulina, glukoze i serotonina prisutnih 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 3 dana prije tretmana pod uvjetima 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 (npr. (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 2 dana prije tretmana pod uvjetima s niskim sadržajem seruma (2% FBS) u mediju Ham F-12, a zatim su inkubirane u odsutnosti (kontrola) ili prisutnosti 10 nM inzulina, na 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 dotična 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; Qiagen) s dodatkom 1% β-merkaptioetanol. Uzorci lizata stanica pohranjeni su pri -20°C do daljnje obrade. Daljnje molekularne analize uključivale su izdvajanje nukleinskih kiselina (opisano u poglavlju 3.8), analize ekspresije mRNA (opisano u poglavlju 3.9) te analize metilacije molekule DNA pirosekvenciranjem DNA tretirane bisulfitom (opisano u poglavlju 3.14).

3.16 Statistička obrada rezultata

Statističke analize provedene su pomoću računalnih programa GraphPad Prism v.8 i IBM SPSS Statistics. Odstupajuće vrijednosti su pretražene korištenjem metode robusne regresije i uklanjanja odstupajućih vrijednosti (engl. *robust regression and outlier removal*, ROUT) sa vrijednošću Q (engl. *maximum false discovery rate*) postavljenom na 1% (Motulsky i Brown, 2006) ili metode po Grubbs-u (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 dviju nezavisnih varijabli provedena je uz pomoć dvosmjernog ANOVA testa. Kontinuirane varijable korelirane su Pearsonovim ili Spearmanovim testom korelacije (ovisno o normalnosti raspodjele podataka). Za kontrolu mogućih utjecaja kovarijabli korištena je multipla linearna regresija. Pomoću programa G*power (Faul i sur., 2009), određena je minimalna veličina uzorka od 192 za razinu efekta 0.10, vjerojatnost α pogreške od 5%, statističku jakost od 90 % i 6 prediktora.

Za određivanje utjecaja glukoze, inzulina i kisika te njihove interakcije 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, provedena je naknadna ANCOVA radi usporedbe između grupa. Statistički značajnim se smatrao $p < 0,05$.

Ocjena rada
u tijeku

Ocjena rada u tijeku

4 **REZULTATI**

4.1 Podaci o sudionicima u kliničkom dijelu istraživanja

Klinički dio doktorskog rada proveden je na podskupini sudionika (parova majka i novorođenčće) kohorte rođenih (engl. *birth cohort*) PlaNS. Analize razina mRNA odabranih regulatornih gena serotonina u uzorcima tkiva posteljice provedene su u dva uzorka, otkrivajućem (engl. *discovery*; $n = 123$) i replikacijskom (engl. *replication*; $n = 93$) uzorku. Uzorci su ciljano formirani 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 dijagnostičkih 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 dobiveni slični rezultati u otkrivajućem i replikacijskom uzorku, 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, NGT i GDM skupina se nisu razlikovale s obzirom na pITM (**Tablica 4.1.**) te s obzirom na udio žena s različitim pred-gestacijskim statusom tjelesne mase i udio muške i ženske novorođenčadi (**Tablica 4.2.**).

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

Karakteristika	NGT (n = 109)	GDM (n = 107)	p-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 NGT i GDM skupina. Sudionice u NGT

skupini su imale 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 NGT i GDM skupina (**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 majčin status tolerancije glukoze (kategoričke varijable).

Karakteristika	NGT (n = 109)	GDM (n = 107)	p-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 %)	
Pušenje u trudnoći^a			
da	79 (75,2 %)	75 (72,8 %)	0,753 ^c
ne	26 (24,8 %)	28 (27,2 %)	

Prikazani su podaci 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 egzaktni test

4.2 Povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninog sustava posteljice

Da bismo istražili povezanost metaboličkog stanja majke i homeostaze serotoninog sustava posteljice, usporedili smo razine mRNA regulatornih gena serotoninina 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 kod 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.

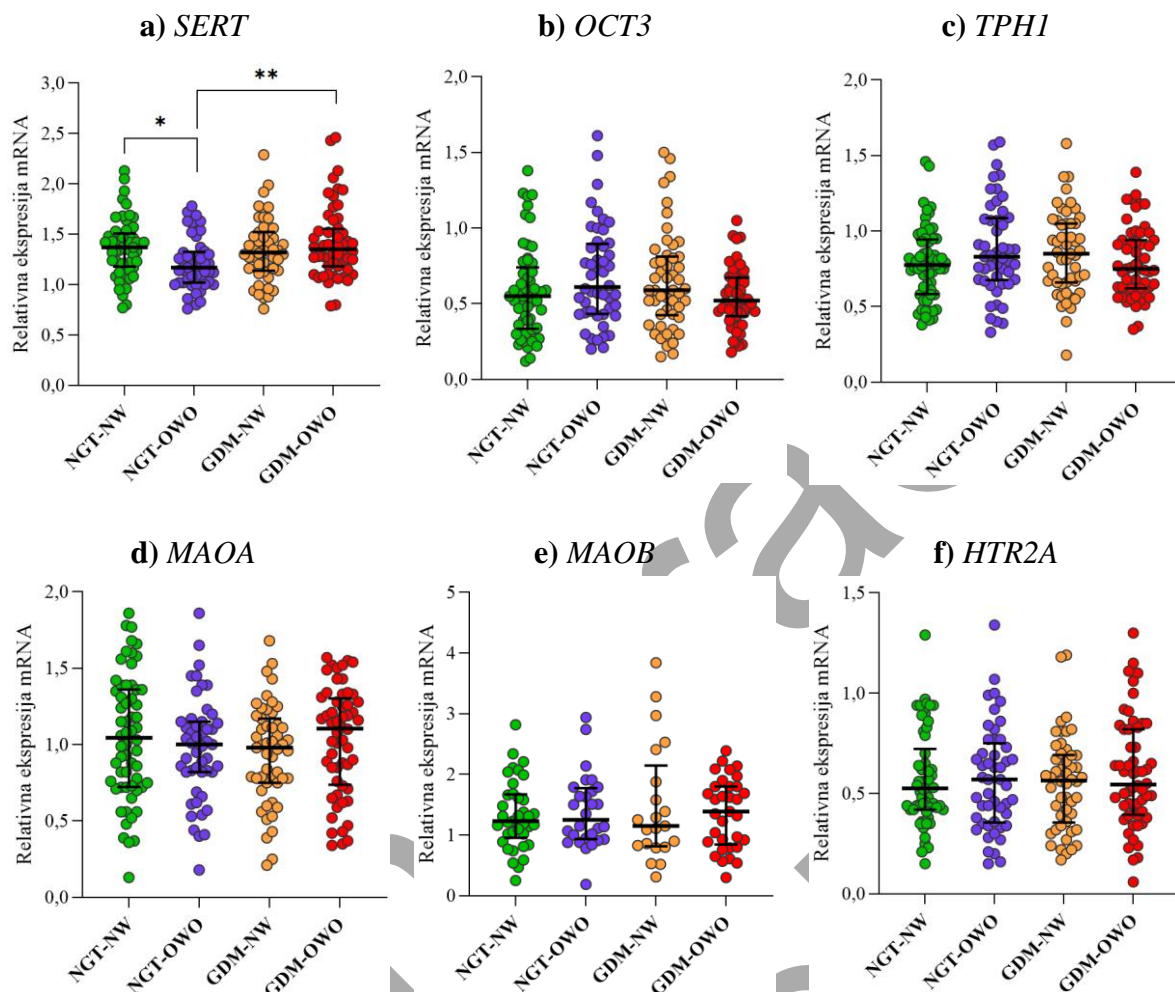
4.2.1 Razine mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici kod različitih metaboličkih skupina sudionica

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 skupinu NGT-NW (za 14,6%, $p = 0,013$) i skupini GDM-OWO (za 13,3%, $p = 0,008$). Sumarno, 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 ($C_q > 45$), 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 *TPH1* kodira perifernu izoformu ključnog sintetskog enzima serotonina. Razine mRNA ovog gena u posteljici bile su relativno niske (C_q između 25,9 i 29,3) i nisu se statistički značajno razlikovale između istraživanih skupina (**Slika 4.1.c**).

Gen *MAOA* kodira izoformu ključnog kataboličkih enzima serotonina s preferentnim 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 majčin status tjelesne mase 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 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 među skupinama 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 istraživanih skupina (Slika 4.1.e). S obzirom na manji značaj *MAOB* u katabolizmu serotonina i opažene vrlo niske razine mRNA ove izoforme, 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 vrlo visoku inter-individualnu varijabilnost (C_q između 27,5 i 33,1) i nisu se statistički značajno razlikovale među metaboličkim skupinama (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 kod 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* kod sudionica s NGT-om, dok takve korelacije nije bilo kod 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 lipidnom profilu 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*. Zasebne analize na podskupinama sudionica s NGT-om i GDM-om indicirale su da je korelacija koncentracije triglicerida s razinom mRNA *SERT* prisutna samo kod sudionica s GDM-om, a HDL kolesterola s razinom mRNA *OCT3* samo kod sudionica s NGT-om (**Tablica 4.4**). Sumarno, 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.

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.

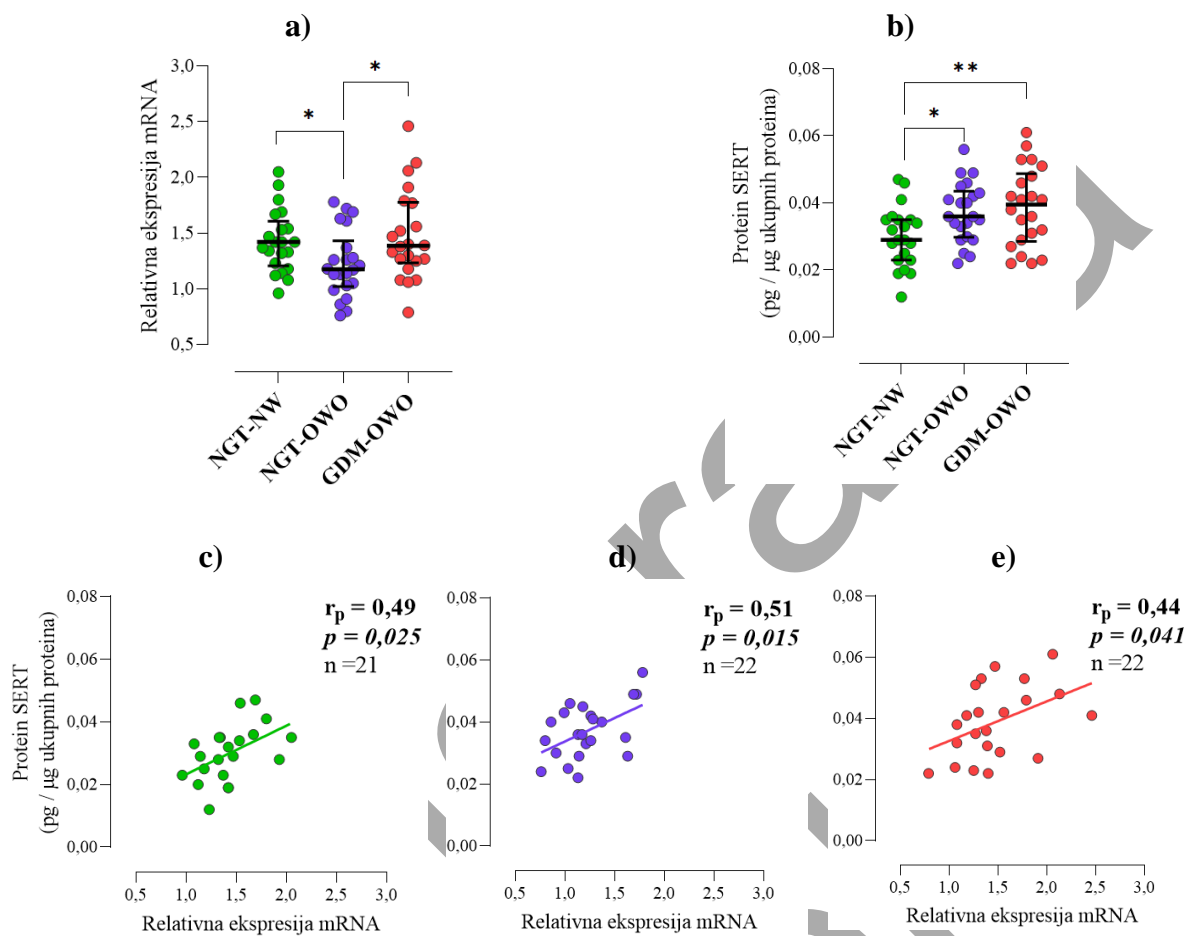
4.2.4 Razina proteina SERT u posteljici

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 5 do 6 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 4.2.a**) bile su niže u skupini NGT-OWO nego skupinama NGT-NW ($p = 0,049$) i GDM-OWO ($p = 0,015$), dok se nisu razlikovale između NGT-NW i GDM-OWO ($p = 0,652$). Međutim, suprotno našem očekivanju, razine proteina *SERT* (**Slika 4.2.b**) su bile 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).

U svim metaboličkim skupinama – NGT-NW (**Slika 4.2.c**), NGT-OWO (**Slika 4.2.d**) i GDM-OWO (**Slika 4.2.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 potencijalno posljedica pokušaja 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.

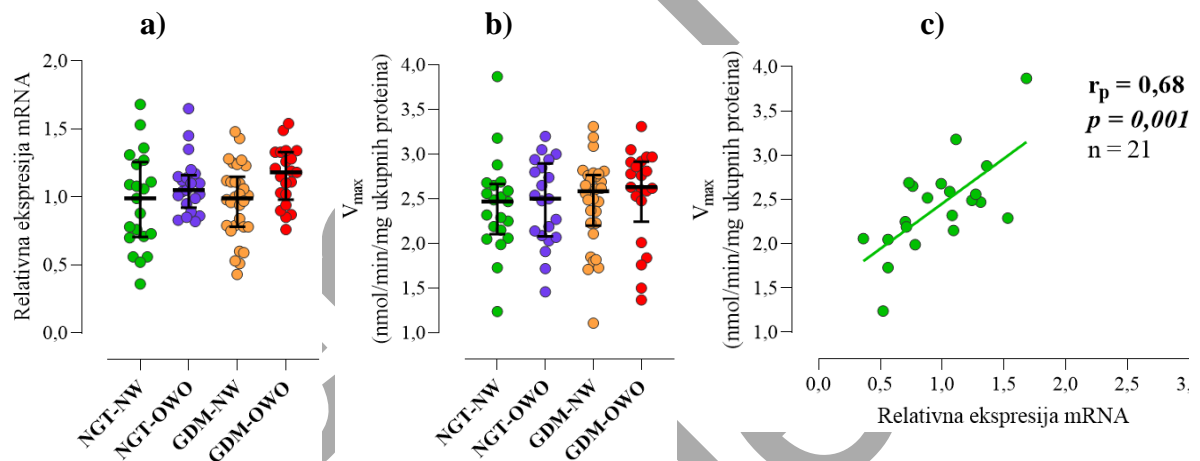


Slika 4.2. Razine **a)** mRNA *SERT* i **b)** proteina *SERT* te korelacija razine mRNA *SERT* i proteina *SERT* u posteljici u skupinama **c)** NGT-NW, **d)** NGT-OWO i **e)** GDM-OWO. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razina proteina 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.

4.2.5 Enzimska aktivnost MAOA u posteljici

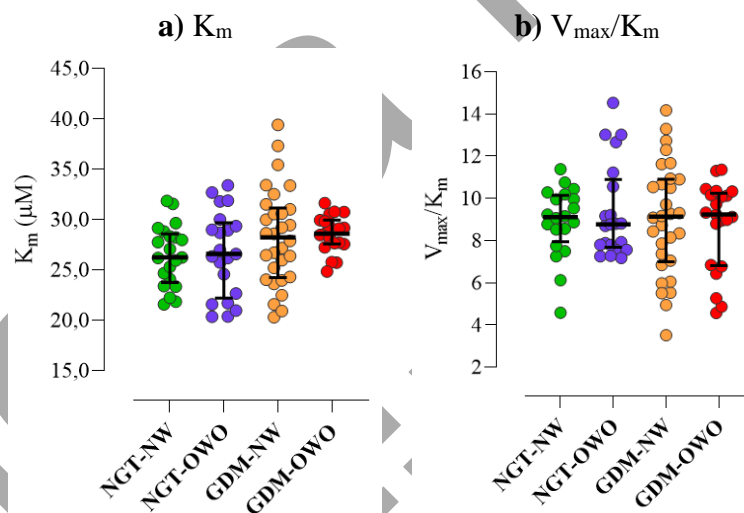
U replikacijskom uzorku ($n = 94$), odredili smo enzimsku aktivnost MAOA u posteljici kako bismo istražili potencijalne razlike u enzimskoj kinetici između metaboličkih skupina te potencijalnu povezanost razine mRNA gena *MAOA* i maksimalne brzine enzimske reakcije (V_{max}) kao aproksimativne mjera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

Metaboličke skupine nisu se razlikovale u razini mRNA *MAOA* (Slika 4.3.a), u skladu s rezultatom na ukupnom uzorku (Slika 4.1.d). Nije bilo razlika među skupinama niti u maksimalnoj brzini enzimske reakcije (V_{\max}), kao aproksimativnoj mjeri ukupne količine aktivnog proteina *MAOA* (Slika 4.3.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 4.3.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 4.3. 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 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 među skupinama 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 mjere funkcionalnosti enzima MAOA između metaboličkih skupina. Michaelisova konstantu (K_m), mjera afiniteta enzima za supstrat, značajno se razlikovala između metaboličkih skupina ($R^2 = 0,06$, $p = 0,002$, **Slika 4.4.a**). Budući da *post-hoc* test nije pokazao statistički značajne razlike među pojedinim skupinama (svi $p > 0,05$), rezultate smo analizirali i dvosmjernom analizom varijance (ANOVA). Analiza je pokazala statistički značajan glavni 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 sugerira da je afinitet enzima MAOA prema supstratu snižen u posteljicama iz trudnoća s GDM-om. Katalitička efikasnost enzima, izračunata kao omjer V_{max} i K_m nije se značajno razlikovala između metaboličkih skupina ($R^2 = 0,01$, $p = 0,318$, **Slika 4.4.b**).



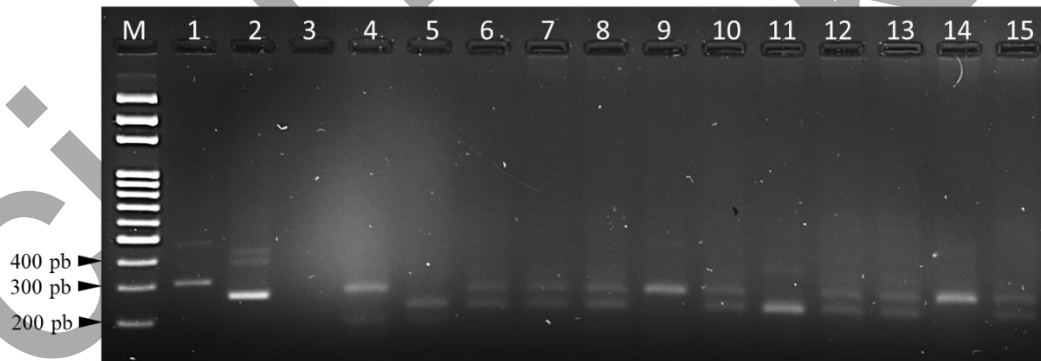
Slika 4.4. Funkcionalnost proteina MAOA u posteljici: **a)** Michaelis-Mentenina konstanta (K_m) i **b)** katalitička efikasnost enzima (V_{max}/K_m); s obzirom na majčin status tjelesne mase prije trudnoće i status tolerancije glukoze u trudnoći. Aktivnost enzima određena je reakcijom uz prisutnost 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. Razlike među skupinama analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyev *post-hoc* test.

4.3 Povezanost polimorfizama i razina mRNA regulatornih gena serotonina u posteljici

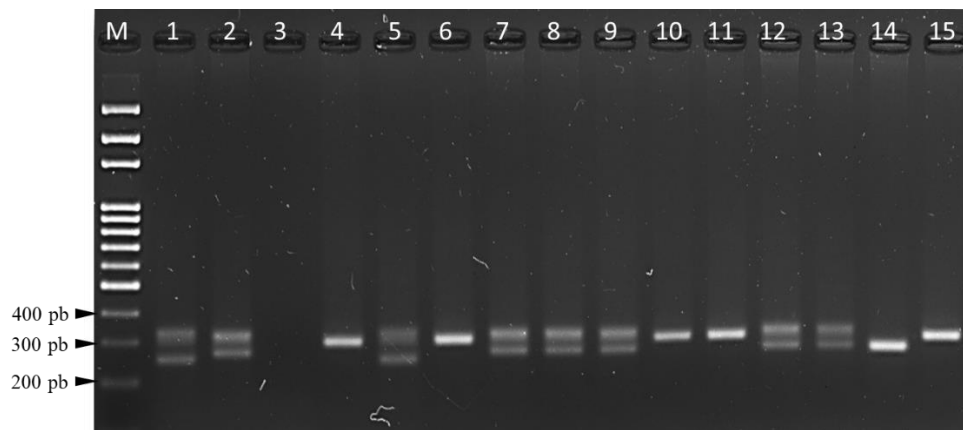
Da bismo istražili povezanost polimorfizama u nukleotidnom slijedu gena *SERT*, *MAOA* i *HTR2A* s njihovom ekspresijom u posteljici, prvo smo usporedili učestalosti genotipova između novorođenčadi majki s NGT-om i majki s GDM-om, a zatim smo usporedili razine mRNA pojedinog gena u posteljici između 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 4.5.**) te jedan polimorfizam duljine u drugom intronu (*STin2*, **Slika 4.6.**). 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 4.5. Produkti lančane reakcije polimerazom (jažice 1-3) i razgradnje produkata 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.



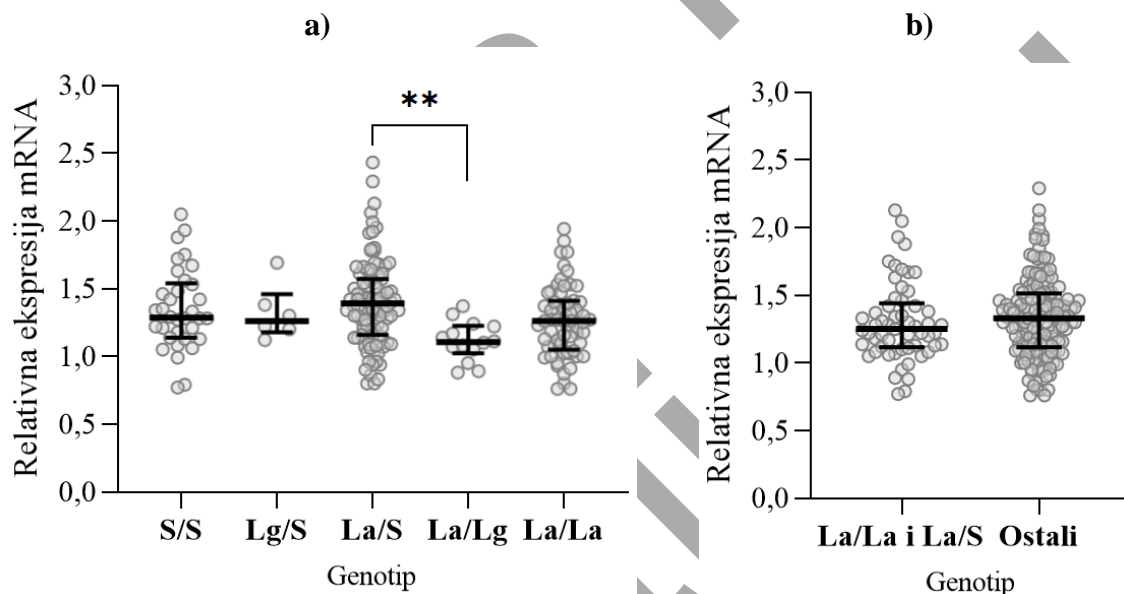
Slika 4.6. Produkti lančane reakcije polimerazom u svrhu određivanja polimorfizma *STin2* gena *SERT*. Elektroforeza je provedena u gelu agaroze (3%). Jažice 1 i 5 – genotip 12/9, jažice 2, 7, 8, 9, 12 i 13 – genotip 12/10, jažica 3 – negativna kontrola, jažice 4, 6, 10, 11 i 15 – genotip 12/12, jažica 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* kod novorođenčadi majki s normalnom tolerancijom glukoze (NGT) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

Polimorfizam	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.

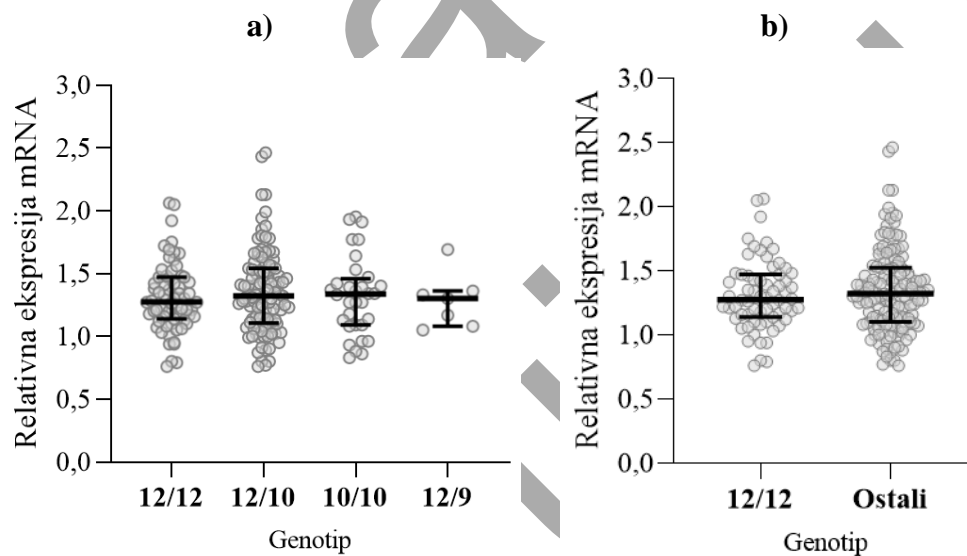
Na **Slici 4.7.a** prikazane su razine mRNA *SERT* u posteljici u skupinama genotipova trialelnog sustava (*5HTTLPR/rs25532*) promotorskog polimorfizma gena *SERT*. Razina mRNA *SERT* u posteljici značajno se razlikovala među skupinama genotipova ($KW = 17,36$; $p = 0,002$). *Post-hoc* test je pokazao 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 4.7.a**). U nastavku smo genotipove grupirali u skupinu s visokom ekspresijom i skupinu s niskom ekspresijom. S obzirom 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 grupirali u skupinu s niskom ekspresijom.



Slika 4.7. 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 među skupinama 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 grupirali sukladno opažanju na ispitivanom uzorku (**Slika 4.7.a**), tj. genotip La/S smo grupirali u skupinu genotipova s visokom ekspresijom, dok smo genotip La/Lg grupirali u skupinu genotipova s niskom ekspresijom. S obzirom na takvo grupiranje, na ispitivanom uzorku nije uočena razlika u razini mRNA među skupinama ($p = 0,336$; **Slika 4.7.b**).

Razina mRNA *SERT* u posteljici nije se razlikovala s obzirom na genotip polimorfizma *STin2* (KW = 0,77 $p = 0,9429$, **Slika 4.8.a**). Razina mRNA nije se razlikovala ($p = 0,615$) niti među skupinama grupiranim sukladno literaturnim podacima (Hranilovic i sur., 2004) u visoko ekspimirajući (12/12) i nisko ekspimirajuće (12/10, 10/10, 12/9) genotipove (**Slika 4.8.b**).



Slika 4.8. 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 promotorskoj regiji (Slika 4.9.), koji se sastoji od sekvence duljine 30 pb prisutne 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 među skupinama NGT i GDM (Tablica 4.6.)

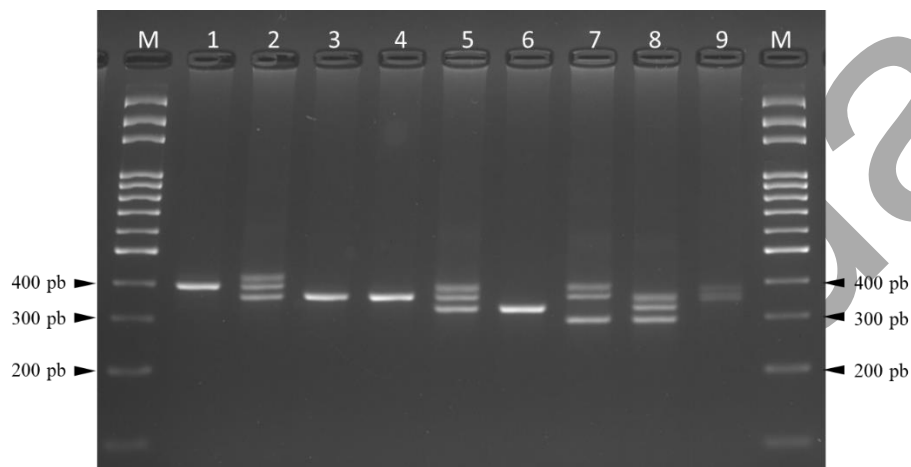
Tablica 4.6. Učestalosti genotipova polimorfizma *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* kod novorođenčadi majki s normalnom tolerancijom glukoze (NGT) i gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

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 %)	

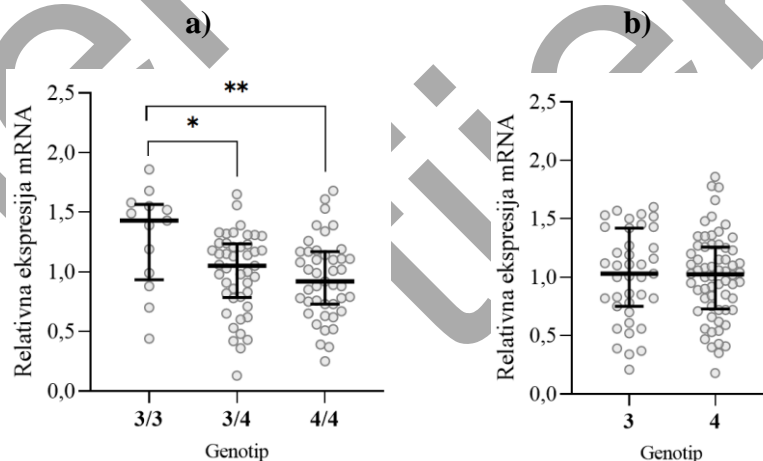
Prikazani su broj (n) i postotak (%). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus. ^a hi-kvadrat test.

Usporedbe razine mRNA u posteljici s obzirom na polimorfizam *uVNTR* u promotoru gena *MAOA* provedene su samo za učestale genotipove, koji su bili detektirani kod više od pet sudionika (specifično, genotipovi 3/3, 3/4 i 4/4 za žensku te 3 i 4 za mušku novorođenčad). Kod 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 4.10.a**). Kod muške novorođenčadi, nije bilo razlike u razini mRNA između hemizigotnih genotipova 3 i 4 ($p = 0,936$, **Slika 4.10.b**).



Slika 4.9. 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. *Kod heterozigota se u gelu agaroze predočava dodatni produkt iznad odsječaka očekivanih duljina koji predstavlja heterodupleks kraćeg i duljeg lanca DNA.



Slika 4.10. 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* kod **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*

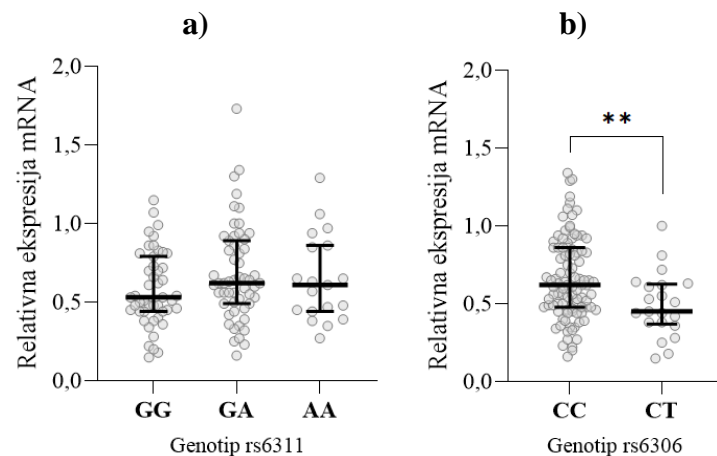
U genu *HTR2A* analizirali smo dvije varijacije pojedinačnog nukleotida u promotorskoj regiji: *rs6311* (-1438 G > A) i *rs6306* (-1421 C > T). Analize *HTR2A* polimorfizama provedene su samo u otkrivajućem uzorku (n = 123). Učestalosti genotipova obaju polimorfizama bile su u skladu s očekivanjem prema 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 *rs6306* u promotoru gena *HTR2A* kod 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 4.11.a**). U slučaju polimorfizma *rs6306*, razine mRNA *HTR2A* su bile niže (za 25,5 %) u posteljicama s rijetki genotipom CT u odnosu na genotip CC ($p = 0,007$, **Slika 4.11.b**).



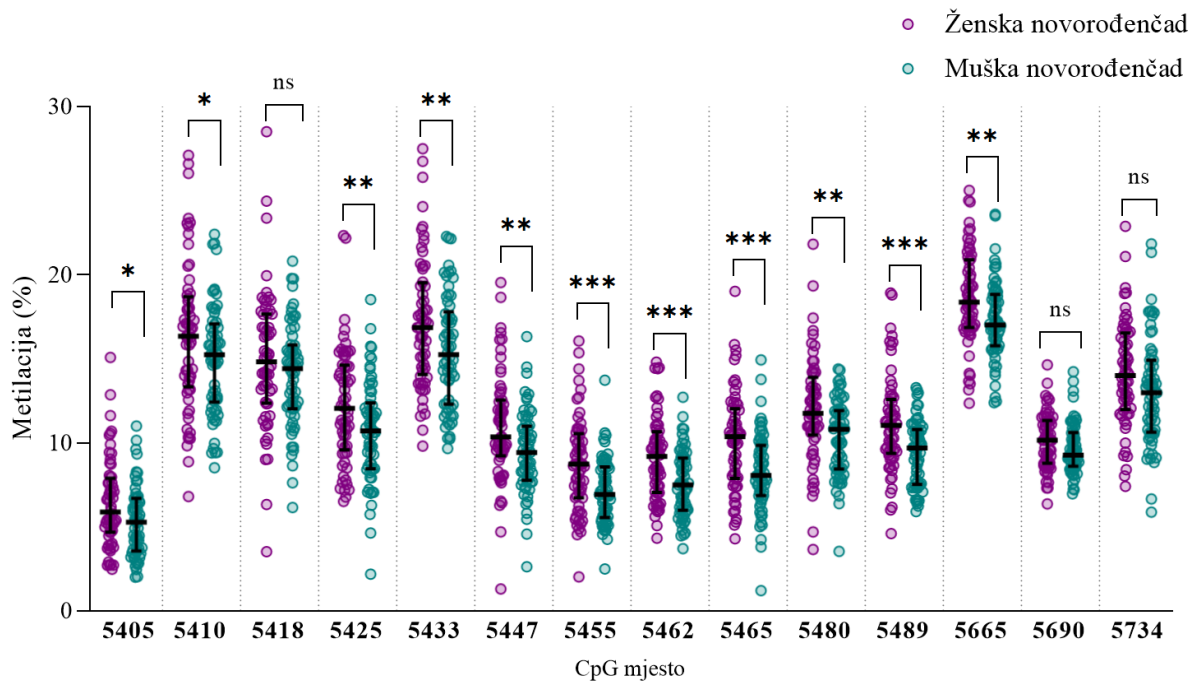
Slika 4.11. Razina mRNA gena *HTR2A* u posteljici u ovisnosti o polimorfizmima **a)** *rs6311* (-1438 G > A) i **b)** *rs6306* (-1421 C > T) u promotoru gena *HTR2A*. Relativna razina mRNA *HTR2A* u uzorcima posteljice određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*. Genotip 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 ovise 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 potencijalno interesantnim CpG mjestima u njihovim sekvencama. 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 4.12.**)



Slika 4.12. 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. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

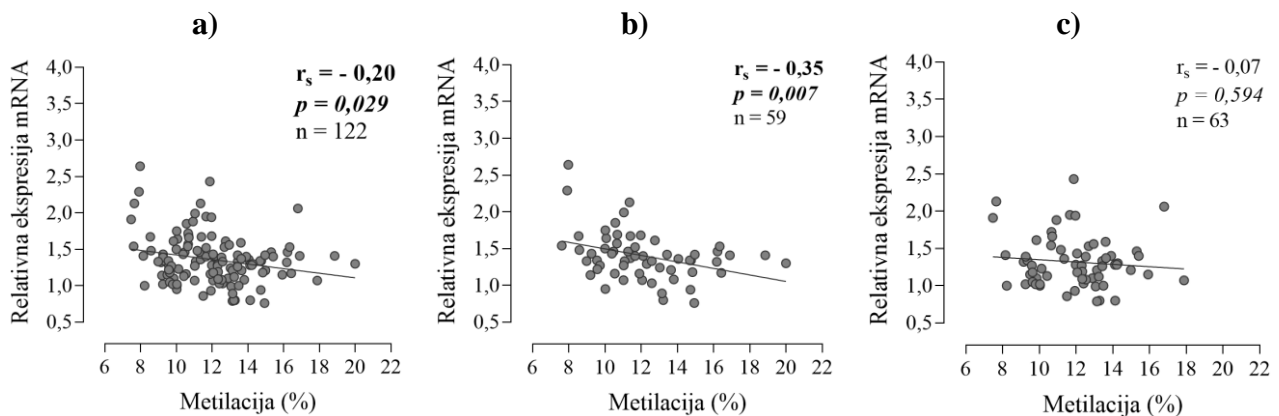
Razine metilacije na svim mjestima osim na mjestu 5405 bile su međusobno pozitivno korelirane (r od 0,35 do 0,88; svi $p < 0,0001$, **Tablica 4.8.**). Stoga smo izračunali srednju vrijednost metilacije svih mjesta osim mjesta 4505 i koristili smo je u daljnjim analizama kao integrativnu mjeru metilacije 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 4.13.**). 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 4.13.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 4.13.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.

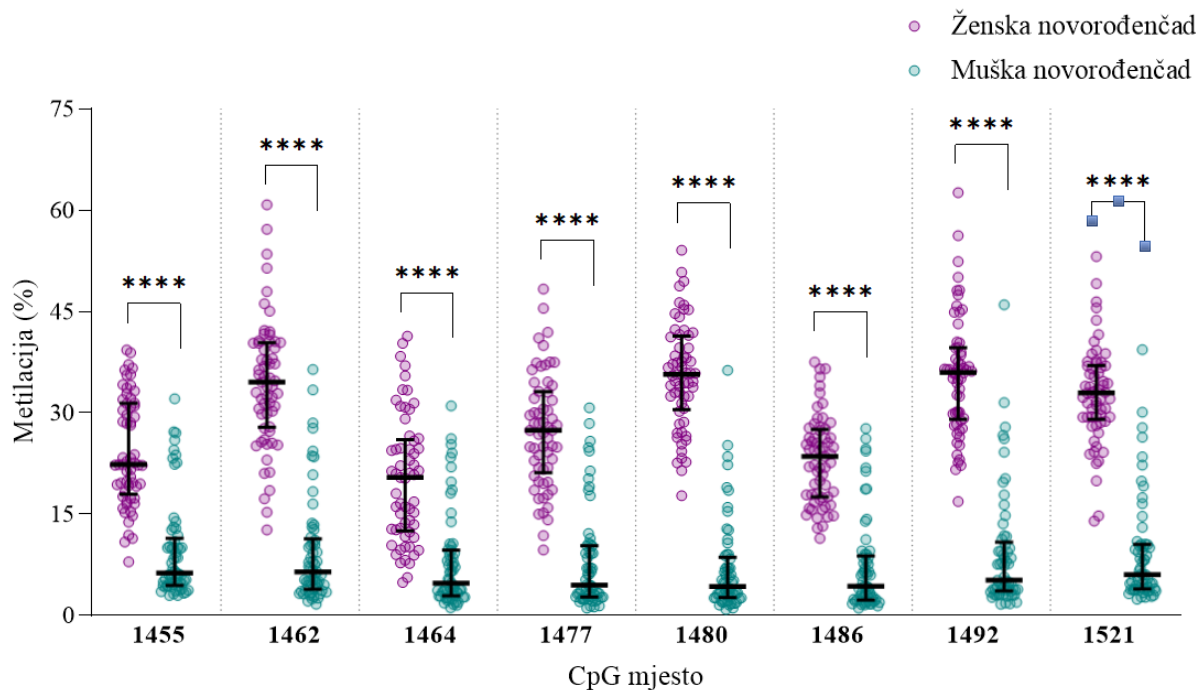


Slika 4.13. Korelacija metilacije i razine mRNA gena *SERT* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Analize su provedene u **a)** ukupnom uzorku 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 kod ženske nego muške novorođenčadi (**Slika 4.14.**), što se može povezati s inaktivacijom jednog kromosoma X kod ženske novorođenčadi. Stoga su sve daljnje analize provedene za svaki spol zasebno. Kod ženske novorođenčadi ($n = 61$), stupanj metiliranosti značajno se razlikovao između pojedinih CpG mjesta ($KW = 162$, $p < 0,0001$). Kod 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 ($p = 0,022$).

Kod 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. Kod 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.**). Kod ženske i muške novorođenčadi 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 4.14. Razine metilacije 8 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.

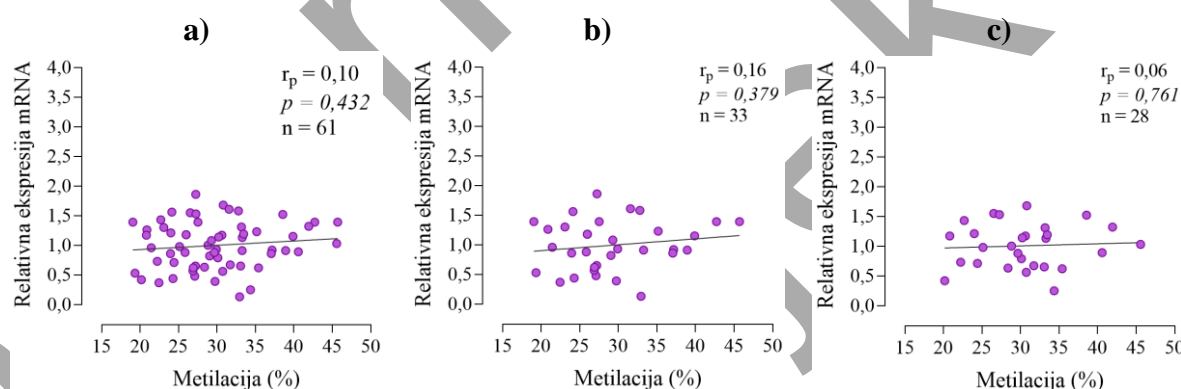
^a Spearmanov koeficijent korelacije, sve ostale vrijednosti se odnose na Pearsonov koeficijent korelacije. Statistički značajne p -vrijednosti su podebljane.

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.

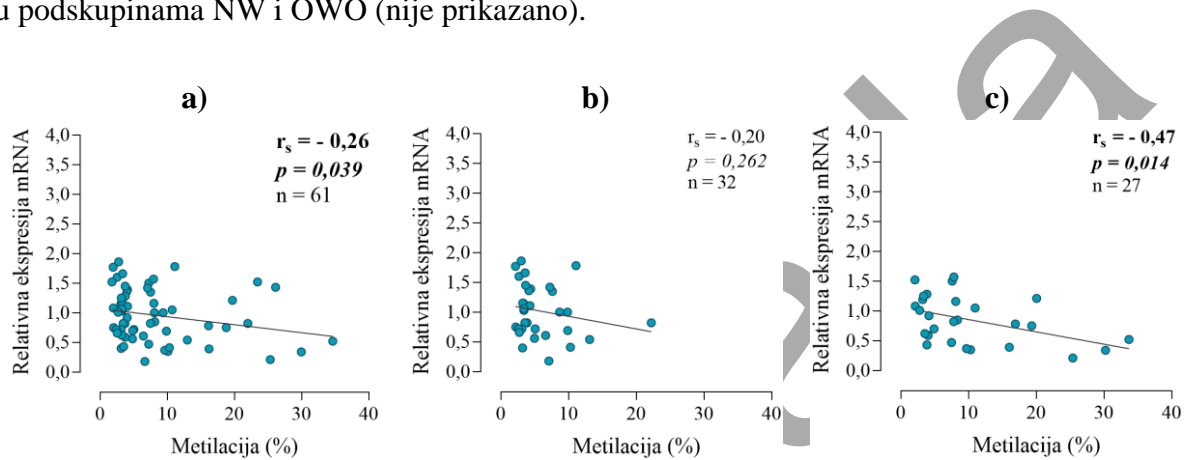
Kod ženske novorođenčadi, razine metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* u posteljici nisu bile korelirane na ukupnom uzorku (Slika 4.15.a), a niti kod zasebnih analiza skupine NGT (Slika 4.15.b) i GDM (Slika 4.15.c).



Slika 4.15. 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.

Kod 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 4.16.a), pri čemu su niže razine metilacije bile povezane s višim razinama mRNA. Daljnja analiza podataka je pokazala da 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 4.16.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 4.16.c**). Korelacije metilacije *MAOA* i mRNA *MAOA* nije bilo u podskupinama NW i OWO (nije prikazano).



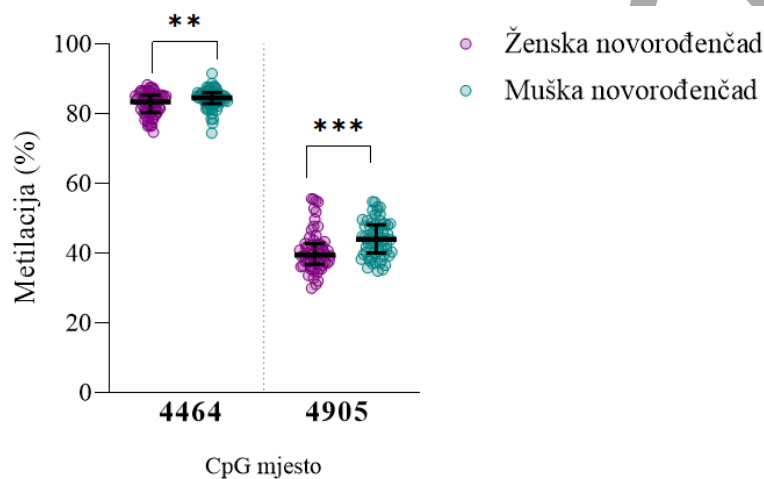
Slika 4.16. Muška novorođenčad: Korelacije metilacije i razine mRNA gena *MAOA* u posteljici. Relativna razina mRNA određena je metodom RT-qPCR i normalizirana s obzirom na razinu mRNA *YWHAZ*, a razine metilacije određene su metodom pirosekvenciranja DNA modificirane bisulfitom. Analize su provedene 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*

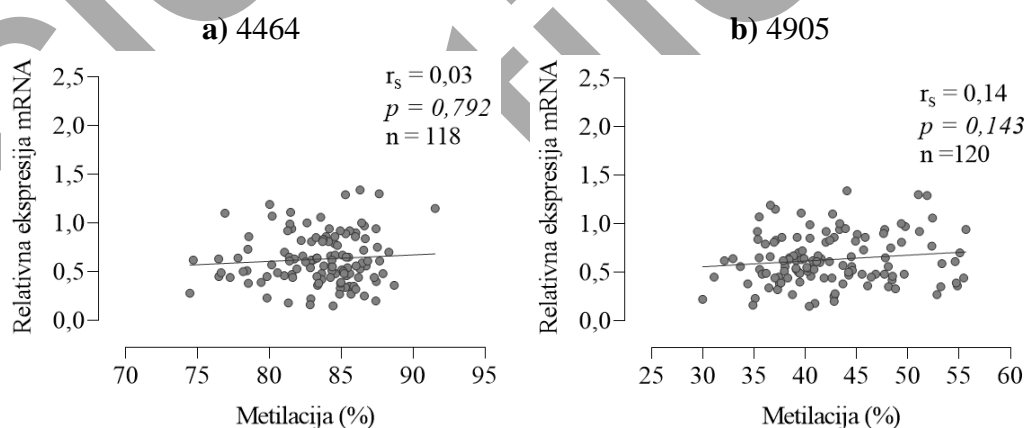
Metilacijske analize gena *HTR2A* obuhvatile su četiri CpG mjesta u promotoru (**Tablica 3.16**). Analiza metilacije na mjestu 4464 za dva uzorka nije bila uspješna te su oni isključeni iz analize. Metilacija na CpG mjestima 4691 i 4709 bila je pod snažnim utjecajem genotipova *rs6311* i *rs6306*. Naime, polimorfizam *rs6311* rezultira supstitucijom gvanina u adenin u slijedu CpG na mjestu 4691, dok polimorfizam *rs6306* rezultira supstitucijom citozina u timin 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 4.17**).

Na ukupnom uzorku, stupanj metiliranosti CpG mjesta 4464 ($r = 0,03$, $p = 0,792$, $n = 118$, **Slika 4.18.a**) i 4905 ($r = 0,14$, $p = 0,143$, $n = 120$, **Slika 4.18.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 4.11.), korelacije su istražene i zasebno u skupinama genotipa CC i CT, no nije pronađena korelacija s razinom metilacije niti na CpG mjestu 4464 ni 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 4.17. Razine metilacije dvaju 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 4.18. 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
SERT	-0,19	0,005	-0,15	0,029	-0,07	0,343
OCT3	0,12	0,094	0,07	0,295	0,07	0,308
TPH1	0,03	0,634	0,13	0,062	-0,10	0,160
MAOA	0,05	0,499	0,04	0,519	0,04	0,591
MAOB ^a	0,06	0,536	0,15	0,108	-0,09	0,340
HTR2A	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*, *TPH1*, *MAOA*, *MAOB* i *HTR2A*) u posteljici nisu bile korelirane 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, a model je objasnio 12% varijance u izlaznoj varijabli (**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			Ponderalni indeks 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.

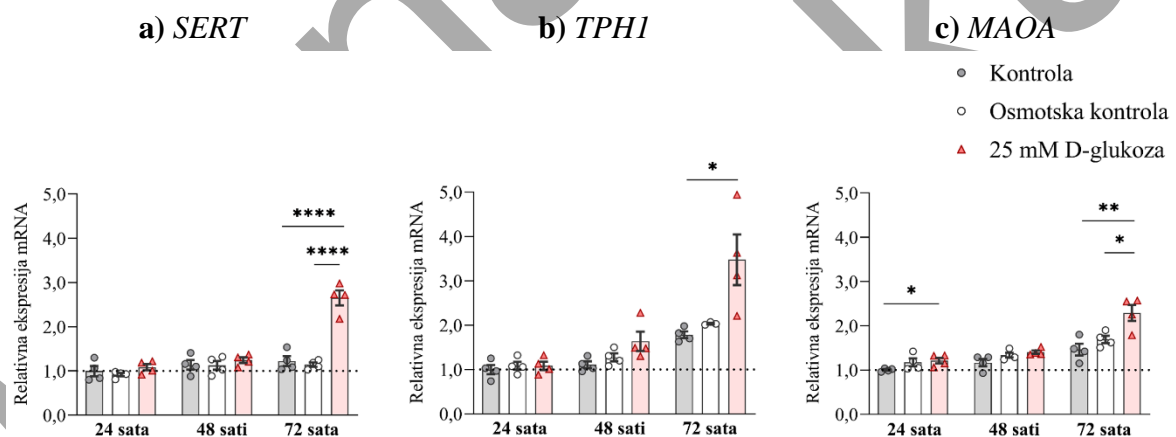
4.6 *In vitro* istraživanja učinaka metaboličkih abnormalnosti na serotoninski sustav posteljice

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 %

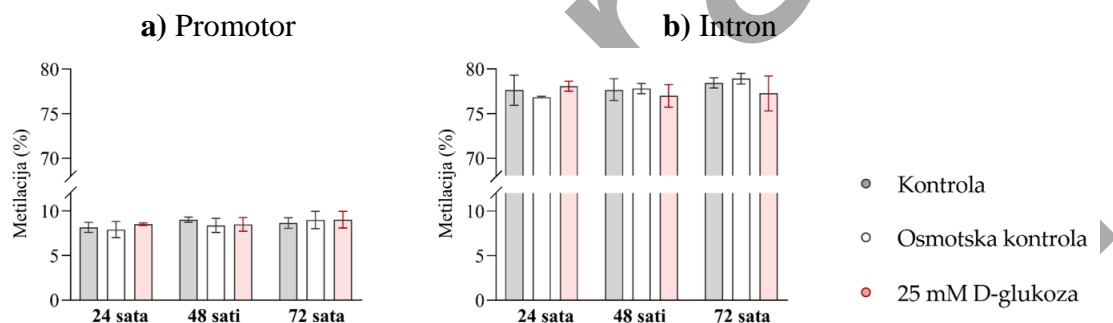
Stanice ACH-3P smo inkubirali u uvjetima atmosferske razine kisika (21,0%) tijekom 24, 48 ili 72 sata, u prisutnosti 5,5 mM D-glukoze (kontrola), 5,5 mM D-glukoze s dodatkom 19,5 mM L-glukoze (osmotska kontrola) ili 25 mM D-glukoze (hiperglikemija). Nakon provedenih tretmana, izdvojili smo nukleinske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

Visoka koncentracija glukoze nije imala statistički značajan učinak na razinu mRNA gena *SERT* (Slika 4.19.a), *TPHI* (Slika 4.19.b) i *MAOA* (Slika 4.19.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 4.19.). Ovi rezultati sugerirali su da produžena (72 h) izloženost povišenim razinama glukoze pri atmosferskoj razini kisika potiče transkripcijsku aktivnost sva tri testirana gena u trofoblastima.



Slika 4.19. 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 4.13.), 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 Slika 4.19. Stupanj metiliranosti promotora (Slika 4.20.a) i introna (Slika 4.20.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* putem učinka na razini metilacije DNA.



Slika 4.20. 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).

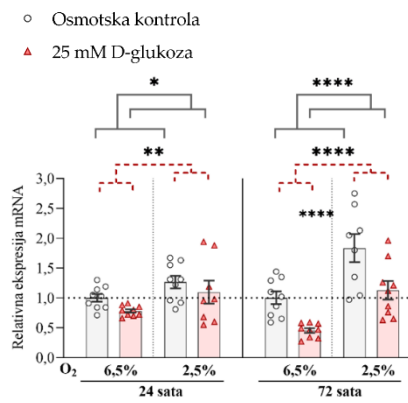
4.6.2 Učinci glukoze na ekspresiju regulatornih gena serotonina pri razinama kisika od 6,5% i 2,5%

Kako bismo istražili učinke glukoze pri razinama kisika kakve su prisutne *in vivo*, stanice ACH-3P smo inkubirali tijekom 24 ili 72 h u prisutnosti različitih koncentracija glukoze pri uvjetima kisika od 6,5% ili 2,5%. Slika 4.21. 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 4.21.a**). Nakon 72 sata, uočena je granično značajna ($p = 0,051$) statistička interakcija između 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 ($p = 0,186$).

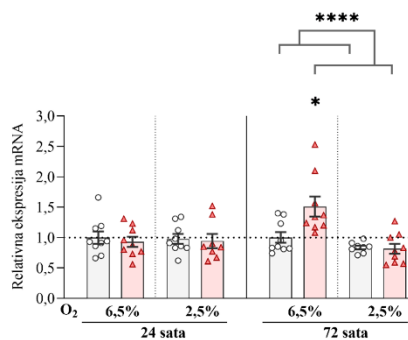
Nakon 24 sata inkubacije, razina mRNA gena *TPHI* (**Slika 4.21.b**) nije se značajno razlikovala ovisno o razini glukoze ili kisika, niti je postojala statistička interakcija između ova dva parametra. Međutim, nakon 72 sata inkubacije, razina mRNA *TPHI* bila je snižena u uvjetima niže razine (2,5%) kisika u odnosu na višu razinu (6,5%) kisika ($p < 0,0001$). Osim toga, uočena je značajna statistička interakcija između kisika i glukoze 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 4.21.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 4.21.c**). Ovaj rezultat sugerira da kisik u rasponu razina prisutnih *in vivo* nema učinak na ekspresiju gena *MAOA*, za razliku od opaženog učinka na ekspresiju gena *SERT* (**Slika 4.21.a**) i *TPHI* (**Slika 4.21.b**).



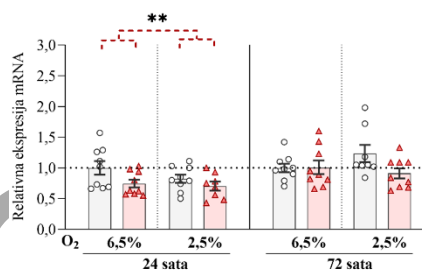
a) *SERT*

Izvor varijacije	24 sata		72 sata	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Glukoza	21,4	0,008	47,7	<0,0001
Kisik	14,2	0,034	53,3	<0,0001
Interakcija	0,0	0,928	12,1	0,051



b) *TPH1*

Izvor varijacije	24 sata		72 sata	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Glukoza	1,6	0,492	8,2	0,113
Kisik	0,0	0,947	41,2	<0,0001
Interakcija	0,0	0,992	21,0	0,008



c) *MAOA*

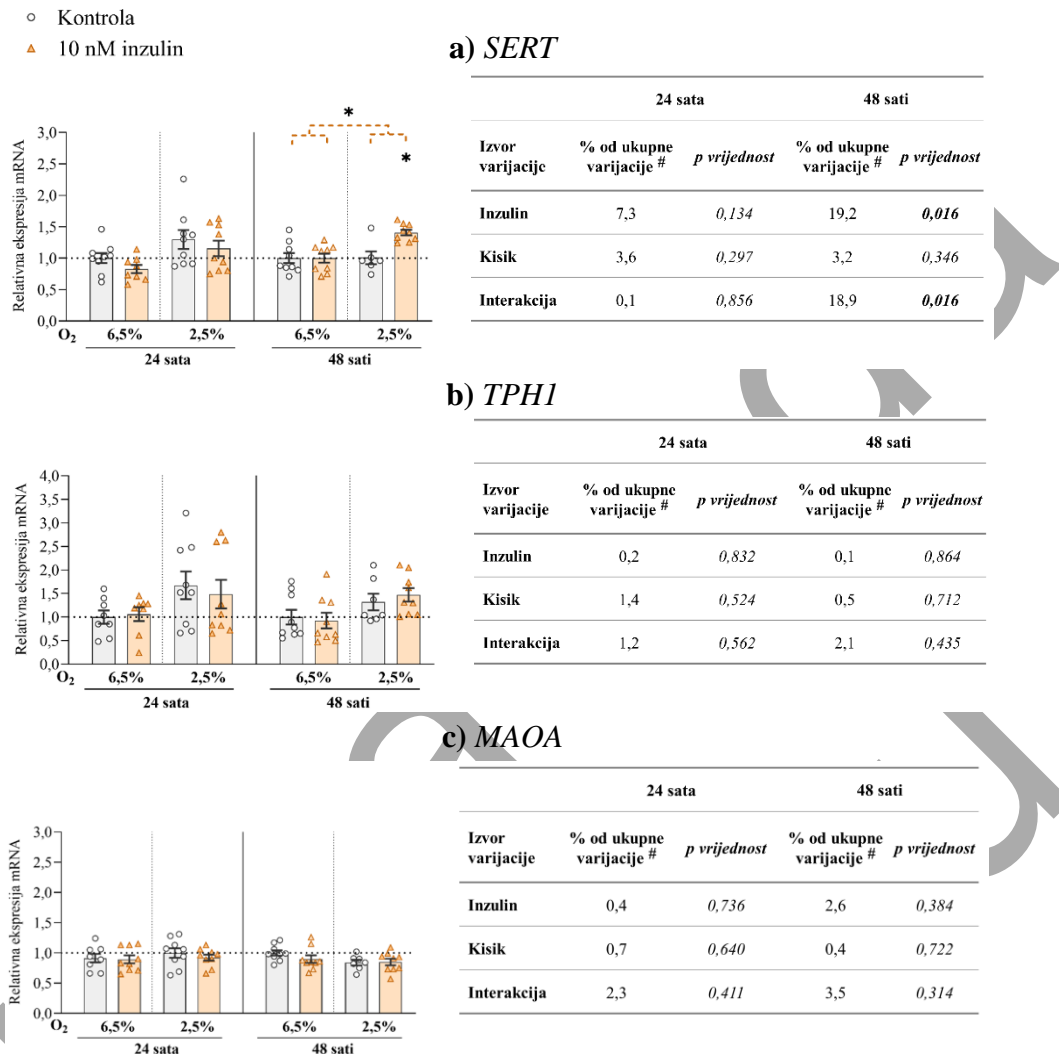
Izvor varijacije	24 sata		72 sata	
	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost	% od ukupne varijacije #	<i>p</i> vrijednost
Glukoza	20,7	0,009	11,5	0,058
Kisik	7,6	0,128	1,2	0,544
Interakcija	0,4	0,747	8,1	0,114

Slika 4.21. 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 4.22.**).

Razine mRNA gena *SERT* (**Slika 4.22.a**) nisu se nakon 24 sata inkubacije statistički značajno razlikovale u ovisnosti o koncentraciji inzulina ili razini kisika niti njihovoj interakciji. 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 inzulina i kisika ($p = 0,016$; **Slika 4.22.a**), pri čemu je koncentracija inzulina značajno povisila razinu mRNA *SERT* samo pri uvjetima od 2,5% kisika (za 8%, $p = 0,011$). Kisik i inzulin ili njihova interakcija nisu imali učinka na razine mRNA gena *TPHI* (**Slika 4.22.b**) i *MAOA* (**Slika 4.22.c**) ni nakon 24 sata ni nakon 48 sati.



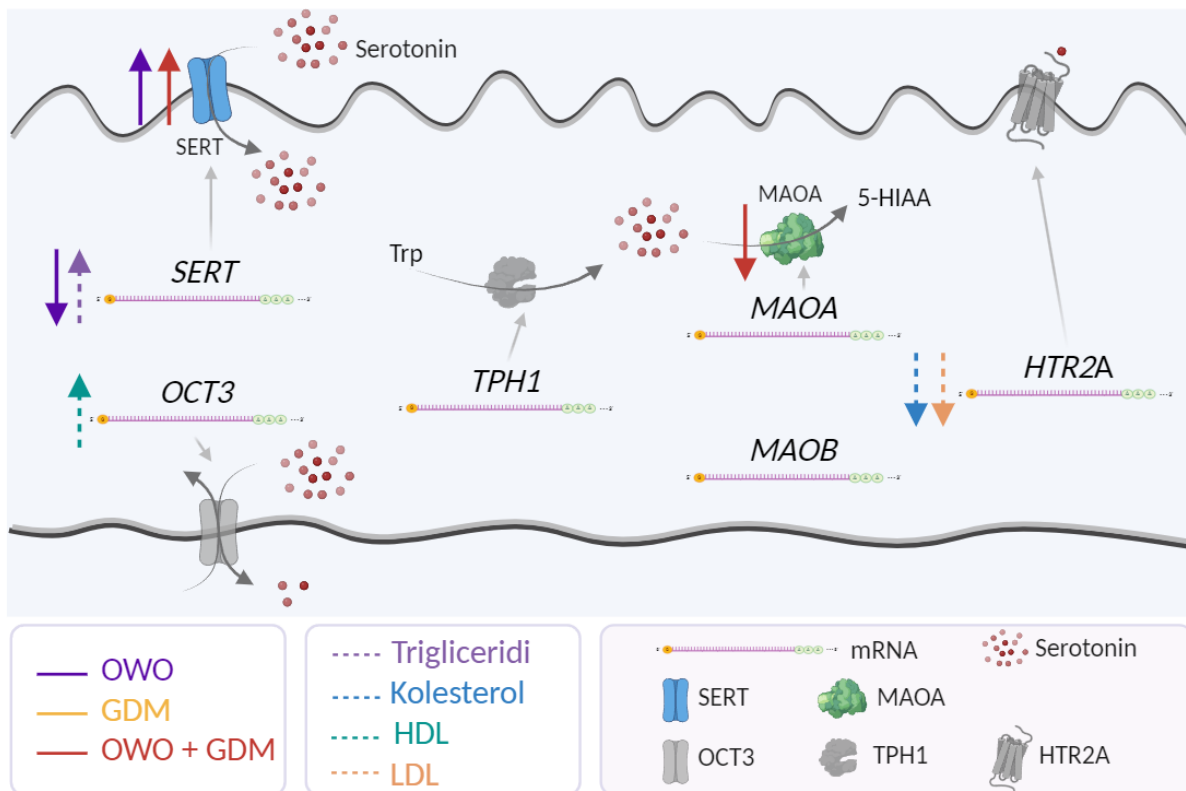
Slika 4.22. Učinak inzulina i kisika na razinu mRNA regulatornih gena serotonina u stanicama ACH-3P pri razinama kisika kave su prisutne *in vivo*. Stanice su uzgajane u odsutnosti (kontrola, sivi stupci) ili u prisutnosti inzulina (10 nM, hiperinzulinemija, narančasti stupci) pri 6,5% O₂ ili 2,5% O₂ 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).

Ocjena rada u tijeku

Serotoninski sustav posteljice igra važnu ulogu u regulaciji razvoja i različitih funkcija posteljice (Perić i sur., 2022). Također osigurava 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 okolinskih čimbenika i genetičkih varijacija. Majčina predgestacijska debljina (prekomjerna tjelesna masa i pretilost) i GDM povezani su s nizom 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 te 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 serotoninske homeostaze u posteljici čovjeka. Na skupini parova majka – novorođenče istražila sam 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 regulacije ključnih regulatornih gena serotonina u posteljici te odredili povezanost serotoninske homeostaze 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 njihove interakcije na ekspresiju ključnih regulatornih gena serotonina.

5.1 Klinički dio istraživanja

Ključni rezultati kliničkog dijela istraživanja 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 više 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 dotičnog parametra s razinom pojedine mRNA/proteina ili s enzimskom aktivnošću. OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće, GDM – gestacijski dijabetes melitus, SERT – serotoninski transporter, OCT3 – prijenosnik organskih kationa tipa 3, TPH1 – triptofan hidroksilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, MAOB – monoaminoksidaza B, HTR2A – receptor serotonina tipa 2A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindoloctena kiselina. Učinak na enzimsku aktivnost MAOA odnosi se na afinitet enzima prema supstratu (K_m); maksimalna brzina enzimске 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 istraživani. Izrađeno uz pomoć Biorender.com

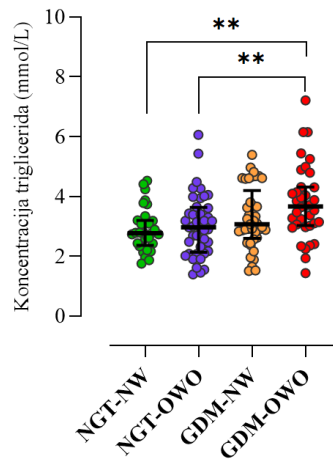
5.1.1 Serotoninski prijenosnik – SERT

Membranski prijenosnik visokog afiniteta i specifičnosti za serotonin – SERT – visoko je eksprimiran 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 kompleksnu povezanost majčinog predgestacijskog statusa tjelesne mase i statusa tolerancije glukoze u trudnoći s regulacijom ekspresije gena *SERT* u posteljici s kraja trudnoće. Konkretno, kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći, predgestacijska debljina je bila povezana sa sniženom razinom mRNA *SERT*, dok se kod 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 kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze, dok kod sudionica s GDM-om nije bilo korelacije između ova dva parametra (**Tablica 4.3.**). Kolektivno, ovi rezultati sugeriraju da je predgestacijska debljina povezana sa sniženom ekspresijom gena *SERT* u posteljicama žena s normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći, dok su kod žena s GDM-om vjerojatno prisutni i neki dodatni čimbenici koji djeluju suprotno od debljine na ekspresiju gena *SERT* u posteljici. 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 kod žena s GDM-om (**Tablica 4.4.**). Prema literaturnim podacima trigliceridi se na kraju trudnoće ne razlikuju ovisno o debljini kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze (O'Malley i sur., 2020), ali su povišeni kod 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 pretelih (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 ($p = 0,003$ za NGT-NW i $p = 0,008$ za NGT-OWO, **Slika 5.2.**). Ti rezultati zajedno sa literaturnim podacima, sugeriraju da trigliceridi povisuju mRNA *SERT* samo u posteljicama sudionica s prekomjernom tjelesnom masom i GDM-om. Ako debljina, kao što je pokazano kod normoglikemičnih trudnoća, snižava mRNA *SERT* i u GDM posteljicama, suprotni učinak triglicerida bi konačno rezultirao normalnom razinom mRNA.



Slika 5.2. Koncentracija triglicerida 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. ** $p < 0,01$

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. 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), nedavno istraživanje pronašlo je značajno povišene razine 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 podržava zaključak kako je prilagođena prehrana povoljno djelovala na GWG u skupini trudnoća s GDM-om i s time potencijalno poništila negativni učinak debljine na serotoninsku ravnotežu 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 4.2.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 4.2.b**). Snižena razina mRNA *SERT* u posteljicama sudionica s predgestacijskom debljinom i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći potencijalno je 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 među metaboličkim skupinama, očekivali smo nedostatak korelacije između tih parametara. Međutim, u svim metaboličkim skupinama razine mRNA *SERT* bile su slabo do umjereno, no statistički značajno korelirane s razinama proteina SERT (**Slika 4.2.c-e**). Međusobna paralelnost regresijskih pravaca (**Slika 4.2.c-e**) upućuje na zaključka da je efikasnost translacije podjednaka u svim metaboličkim skupinama, a da su povišene razine proteina SERT povezane sa njegovom sniženom razgradnje u skupinama s predgestacijskom debljinom. Prethodna studija na kliničkim uzorcima terminske posteljice pronašla 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) kao posljedice 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 i naši sadašnji rezultati upućuju na još jednu važnu ulogu *SERT*-a u posteljici – regulaciju prijenosa nutrijenata.

Ponderalni indeks novorođenčadi predstavlja jednu od mjera adipoziteta, analognu ITM-u kod 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 bit 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 4.7.b) niti među genotipovima polimorfizma *STin2* (Slika 4.8.). Sumarno, ovi rezultati sugeriraju da funkcionalni polimorfizmi gena *SERT* nemaju značajan učinak na regulaciju transkripcije ovog gena u posteljici čovjeka pri kraju trudnoće.

S druge strane, analize metilacije DNA sugerirale su 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 4.13.). Ovi rezultati su u skladu s generalnim mehanizmom utišavanja ekspresije gena putem metilacije DNA, koja remeti vezivanje transkripcijskih faktora na regulatorne regije 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 tolerancijom glukoze, dok je u skupini sudionica s GDM-om 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 narušavaju 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 (Blazevic i sur., 2017). U navedenom istraživanju, metilacija u udaljenoj regiji promotora gena *SERT* također je bila negativno korelirana s razinom *SERT* mRNA. Nadalje, koncentracije glukoze u plazmi majke u drugom tromjesečju trudnoće bile su u negativnoj korelaciji s metilacijom DNA u promotoru gena *SERT* (Blazevic i sur., 2017). Metilacija DNA predstavlja potencijalni mehanizam putem kojeg majčino metaboličko stanje regulira ekspresiju gena *SERT* u posteljici, stoga će naše daljnje analize dublje 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.

Razine metilacije DNA istraživane regije u posteljici (**Slika 4.12.**) odgovaraju razinama metilacije ove regije u uzorcima krvi pupkovine (Bečeheli i sur., 2024; Dukat i sur., 2015). Dodatno, u skladu s oba prethodna istraživanja (Bečeheli i sur., 2024; Dukat i sur., 2015), razine metilacije bile su značajno više u uzorcima ženske nego muške novorođenčadi (**Slika 4.12.**). U skladu s tim, u somatskim tkivima, većina diferencijalno metiliranih regija ima više razine metilacije u ženskim u odnosu na muške uzorke (McCarthy i sur., 2014). Obrnuto, u posteljicama su diferencijalno metilirane regije većinom više metilirane u posteljicama muške novorođenčadi (Inkster i sur., 2021), što sugerira da je spolno specifični uzorak metilacije regije introna gena *SERT* u posteljici sličniji somatskim tkivima.

5.1.2 Monoaminoksidaza A – MAOA

Posteljica ekspirira niz 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), razgradni enzim monoamina s preferentnim 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 s kraja 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 pronašli 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 sugeriraju 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 4.3.). 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 4.4.a). Povišena vrijednost K_m sugerira 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 s kraja trudnoće metabolizira oko 75% serotonina iz medija (Karahoda i sur., 2020b). Rezultati ovih istraživanja upućuju na ulogu enzima MAOA u terminskoj posteljici

Enzimska 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 5 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 sugerira 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 upoznali 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 spolne razlike u povezanosti ovog polimorfizma i ekspresije gena *MAOA* u posteljici. Kod 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 4.10.a**). Kod 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 kod 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. Skupno, rezultati genotipizacije polimorfizma *uVNTR* gena *MAOA* sugeriraju da mRNA *MAOA* u posteljicama muške novorođenčadi nije regulirana duljinom polimorfne regije *uVNTR*, dok kod 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 među rezultatima 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 spolne razlike u povezanosti metilacije *MAOA* i razine mRNA *MAOA*. Kod muške novorođenčadi, više razine metilacije bile su povezane s nižim razinama mRNA *MAOA* (**Slika 4.16.a**), dok kod ženske novorođenčadi nije bilo korelacije između ova dva parametra (**Slika**

4.15.a). Ovi rezultati sugeriraju da je u posteljicama muške novorođenčadi metilacija DNA uključena u regulaciju transkripcijske aktivnosti gena *MAOA*. Metilirani konstrukti ove regije transfecirani u model stanica embrionalnog bubrega čovjeka HEK293 pokazali su sniženu promotorsku aktivnost (Checknita i sur., 2015) što jasno sugerira regulatornu ulogu ove regije. 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 iste regije 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 sugerira 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 moždanu aktivnost MAOA kod 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 enzimski aktivnost MAOA ($n = 5$), bilo bi potrebno proširiti istraživanje kako bi se potvrdilo navedena pretpostavka.

U našem istraživanju, razina metilacije je bila izrazito viša u posteljicama ženske nego muške novorođenčadi na svim CpG mjestima (**Slika 4.14.**). Viša razina metilacije prvog egzona kod žena u odnosu na muškarce uočena je u nekoliko prethodnih studija (Checknita i sur., 2018; Melas i Forsell, 2015), što se može povezati s 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 analizirane regije gena *MAOA* u našem istraživanju (**Slika 4.14.**).

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 (Wadhwa 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 međuođnos vrijedilo istražiti na većem uzorku i osobito u kontekstu različitog statusa tolerancije glukoze u trudnoći.

Istraživanja sugeriraju 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 sugerirati i 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 4.11.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 4.11.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 4.17.**). 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 4.18.a**) i 4905 (**Slika 4.17.b**) s razinom ekspresije gena *HTR2A* u posteljici. To sugerira da u posteljici postoje alternativni mehanizmi, 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 razgradnog enzima monoamina s niskim afinitetom za serotonin – *MAOB*.

Razina mRNA *OCT3* u posteljici nije se razlikovala među metaboličkim skupinama (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 kod žena s GDM-om nego kod žena s normalnom tolerancijom glukoze (Ryckman i sur., 2015). Prema našim podacima, koncentracije HDL kolesterola bile su niže u krvi žena s debljinom ($p = 0,001$), dok dijagnoza GDM-a nije bila povezana s njegovim razinama ($p = 0,256$, dvosmjerna ANOVA). Studija Ryckman i sur. (2015) nije u analizu uključila majčin status debljine što je moglo pridonijeti uočenim razlikama. Naši rezultati sugeriraju kompleksnu povezanost koncentracija HDL kolesterola s razinom mRNA *OCT3* u ovisnosti o statusu tjelesne mase i GDM-a koju je potrebno dublje 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 rezultat sugerira 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 staničnim modelima trofoblasta (Prasad i sur., 1996), kao i rezultati o nedostatku mRNA obiju izoformi 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 putem egzocitoze (De-Miguel i Trueta, 2005; Leon-Pinzon i sur., 2014; Reed i sur., 2000). Mehanizmi iznosa unutarstaničnog serotonina koji nije pohranjen u vezikulama manje su poznati. Jedan mogući put iznosa 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 iznosa serotonina iz posteljice prema fetusu, što ga čini zanimljivom metom daljnjih istraživanja u posteljici.

Razina mRNA *TPHI* u posteljici nije se razlikovala između metaboličkih skupina sudionica (**Slika 4.1.c**) niti je bila povezana s majčinih 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 s kraja trudnoće, što je u skladu s prethodnom imunohistokemijskom studijom koja je detektirala prisutnost samo sporadičnih slabih signala proteina TPH1 u terminskim posteljicama (Kliman i sur., 2018). Nekoliko drugih istraživanja izvjestilo je o prisutnosti mRNA *TPHI* (Karahoda i sur., 2020a; Laurent i sur., 2017; Ranzil i sur., 2019) i aktivnosti enzima TPH (Ranzil i sur., 2019) u posteljici čovjeka na kraju trudnoće. Međutim, analiza transkriptoma pojedinačnih stanica nije detektirala mRNA *TPHI* u stanicama terminske posteljice čovjeka (Pavličev i sur., 2017), što sugerira 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, bilo kakvi pronalasci vezani za razinu mRNA *MAOB* vjerojatno ne bi imali veliku važnost u kontekstu regulacije serotonininske homeostaze u posteljici. Sva istraživanja mRNA *MAOB* su stoga bila ograničena na otkrivajuću kohortu.

5.2 *In vitro* istraživanja

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

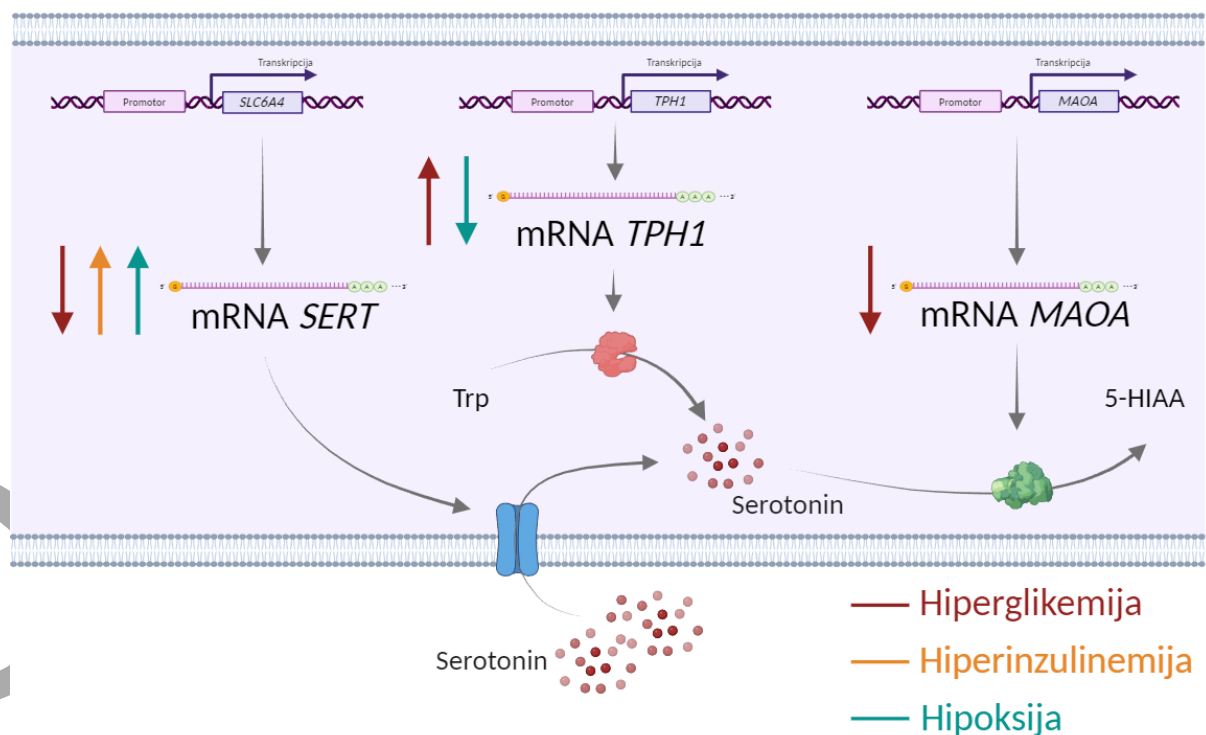
5.2.1 Učinci glukoze na ekspresiju i metilaciju regulatornih gena serotonina pri atmosferskoj razini kisika

Istraživanje učinaka glukoze na modelu stanica trofoblasta ACH-3P iz prvog tromjesečja trudnoće započeli smo pri uvjetima atmosferskoj razine kisika (21,0%, **Slika 4.19**). 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 s kraja trudnoće pokazali su da je metilacija DNA u intronu gena *SERT* bila negativno korelirana s ekspresijom mRNA gena *SERT* (**Slika 4.13**). Metilacija DNA je epigenetički mehanizam osjetljiv na okolišne promjene (Bianco-Miotto i sur., 2017). Prethodno je istraživanje sugeriralo da metilacija gena *SERT* potencijalno posreduje učinke 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 tretiranih glukozom (**Slika 4.20**), što sugerira da metilacija DNA ne igra ulogu u učincima kratkotrajne izloženosti glukozi na ekspresiju mRNA gena *SERT* u trofoblastima.

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

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 5.3**. Ukratko, pokazali smo da visoka razina glukoze snižava razinu mRNA *SERT*, dok niska razina kisika ili visoka razina inzulina povišuju 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, što sugerira granična značajnost interakcije ($p = 0,051$) i rezultati *post-hoc* testa. S druge strane, inzulin je povišio razinu mRNA *SERT* samo pri 2,5% kisika. Ovo zajedno sugerira da su već rano u trudnoći trofoblasti osjetljivi na majčine metaboličke promjene.



Slika 5.3. Učinak glukoze, inzulina i kisika na ekspresiju regulatornih gena serotonina u trofoblastima čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće. SERT – serotoninski transporter, TPH1 – triptofan hidrosilaza 1, MAOA – monoaminoksidaza A, Trp – triptofan, 5-HIAA – 5-hidroksiindolooctena kiselina, ↑ povišena razina, ↓ snižena razina. Izrađeno uz pomoć Biorender.com.

Učinak povišene koncentracije glukoze na funkciju proteina SERT istraživana je do sad 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 korelaciju 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 sugeriraju 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 povisila 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 tretmana 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 kisik, 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 *TPHI* se povisila u odgovoru na tretman stanica glukozom pri uvjetima kisika od 6,5% (**Slika 4.21.b**). Iako ne postoje studije koje su ispitivale učinke glukoze na ekspresiju *TPHI* u modelima stanica posteljice, visoka razina glukoze izrazito je povisila razinu ekspresije *Tph1* u stanicama gušterače štakora, kako *in vitro* tako i *in vivo* (Zhang i sur., 2017). Spomenuto istraživanje sugerira ulogu enzima TPH1 u glukozom inducirano potenciranju funkcije β -stanica gušterače (Zhang i sur., 2017).

Prethodna studija otkrila je da je razina mRNA *TPHI* povišena u uvjetima hipoksije u plućnim endotelnim stanicama čovjeka (Ciuculan 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 inducirano 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 4.21.b**). Ovo sugerira 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 povratnom spregom 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. Ovo nagađanje zahtijeva daljnje istraživanje.

Poput razine mRNA *SERT*, razina mRNA *MAOA* u stanicama ACH-3P je bila snižena u uvjetima hiperglikemije (**Slika 4.21.c**). U prethodnom istraživanju, kratkotrajna izloženost visokoj glukozi povisila je ekspresiju *MAOA* u vaskularnim prstenovima arterija dojke (Lascu i sur., 2022). Osim što se ti rezultati odnose na drukčiji eksperimentalni model od našeg, ti su učinci primijećeni 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 kisik nema učinak na razinu mRNA *MAOA* (**Slika 4.21.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 4.22.b) ili *TPHI* (Slika 4.22.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 5.3), mogu sugerirati moguće (patofiziološke 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 serotoninskih 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 implikacijama na biološke učinke putem serotonilacije unutarstaničnih proteina (Chan i sur., 2024; Farrelly i sur., 2019; Paulmann i sur., 2009).

Naši rezultati sugeriraju da je ekspresija gena *MAOA* u trofoblastima iz prvog tromjesečja trudnoće snižena u uvjetima hiperglikemije. Aktivnost enzima MAOA jedan je od glavnih generatora reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) 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 bilo s osmotskom kontrolom ili normoglikemičnom kontrolom, što

sugerira da je na ekspresiju *SERT*, *TPH1* i *MAOA* izravno utjecala visoka glukoza, a ne povišeni osmotski tlak. Također je bitno istaknuti da u našim eksperimentima s inzulinom, za razliku od eksperimenta s glukozom, nismo uočili statistički značajan učinak kisika na ekspresiju niti jednog analiziranog 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 zbunjujući učinci gestacijske dobi ili načina poroda na rezultate. Također, uključivanje samo planiranih carskih rezova 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 prisutne 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 eksperimentalnom postavu. 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 buduće studije proširiti na vaginalne porode. Posljednje, naši rezultati su ograničeni samo na novorođenčad u normalnom rasponu porođajne mase. Kako bi se odredila povezanost istraživanih promjena u čitavom rasponu porođajnih masa novorođenčadi, u budućnosti će biti potrebno uključiti i novorođenčad izvan istraživanih raspona porođajne mase.

Naše *in vitro* istraživanje 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 inzulinske receptore (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 (Ciuculan 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 naše *in vitro* studije 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 embrij/fetus ili su posljedica nesposobnosti posteljice da se prilagodi promjenama u okolini. Nemogućnost prilagodbe bi mogla 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 kod trudnoća kompliciranih 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 naponi 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 naponi 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.

Ocjena rada
u tisku

Cilj ovog rada bio je pridonijeti boljem razumijevanju homeostaze serotonina posteljice u trudnoćama kompliciranim majčinom debljinom i/ili gestacijskim dijabetesom melitusom (GDM).

U kliničkom dijelu rada, detaljno smo istražili odnos između majčinih metaboličkih parametara i regulatornih gena serotonina u terminskoj posteljici. Također smo ispitali potencijalnu ulogu genetičkih i epigenetičkih mehanizama u regulaciji navedenih gena.

Majčina debljina bila je povezana s povišenim razinama proteina SERT u terminskoj posteljici, dok je odnos majčine debljine i razine mRNA *SERT* ovisio o majčinom statusu tolerancije glukoze. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je u trudnoćama kompliciranim debljinom smanjena razgradnja proteina SERT te da u uvjetima normalne tolerancije glukoze, ali ne i u GDM-u, postoji kompenzatorno smanjenje transkripcije gena *SERT*. U regulaciji transkripcije gena *SERT* u posteljici, epigenetički mehanizmi dominiraju nad genetičkim polimorfizmima. Pronađena je povezanost razine mRNA *SERT* u posteljici s porođajnom masom i duljinom novorođenčeta, što podupire ulogu ovog gena u regulaciji fetalnog rasta, koja je prethodno pokazana na animalnom modelu.

Koncentracije pojedinih lipida u krvi majke nisu bile povezane s razinama mRNA za metaboličke enzime serotonina *TPHI* i *MAOA* u terminskoj posteljici, ali je uočena slaba korelacija s razinama mRNA za prijenosnike serotonina *SERT* i *OCT3* te receptor serotonina *HTR2A*. Dijagnoza GDM-a povezana je sa smanjenim afinitetom enzima *MAOA* u posteljici, neovisno o statusu tjelesne mase. Regulacija ekspresije gena *MAOA* razlikuje se među spolovima – kod ženske novorođenčadi dominiraju genetički mehanizmi, a kod muške novorođenčadi epigenetički mehanizmi.

Istraživanja *in vitro* su pokazala da glukoza i kisik reguliraju ekspresiju gena *SERT*, *MAOA* i *TPHI* u modelu stanica trofoblata čovjeka iz prvog tromjesečja trudnoće, dok inzulin regulira ekspresiju samo gena *SERT*. Dobiiveni rezultati sugeriraju 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 kod 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.

Ocjena rada u tijeku

Ocjena rada
u tisku

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. *Schizophrenia Research* 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> (accessed 9.15.23).
- 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., 2007. Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Andersson-Hall, U.K., Järvinen, E.A.J., Bosaeus, M.H., Gustavsson, C.E., Härsmar, E.J., Niklasson, C.A., Albertsson-Wikland, K.G., Holmång, 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. Elsevier B.V., 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., Bećeheli, 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. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7807. <https://doi.org/10.3390/ijms22157807>
- Balkovetz, D.F., Tiruppathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V., 1989. Evidence for an Imipramine-sensitive Serotonin Transporter in Human Placental Brush-border Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 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. *Frontiers in Endocrinology* 11. <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. *Frontiers in Genetics* 13.
- 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. *Annual Review of Medicine* 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. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 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. *Molecular Pharmacology* 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. *Clinical Chemistry* 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. *Human Mutation* 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. *Journal of Molecular Biology* 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. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 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.semcdb.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. *Reproductive BioMedicine 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 (accessed 1.30.24).
- Delmiš, J., 2019. Razvoj posteljice. *Gynaecologia et perinatologia : journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics* 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. *The 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 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. *Circulation Research* 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 (accessed 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, in: 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. (Eds.), *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. *The American Journal of Pathology* 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> (accessed 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. *Nutritional Neuroscience* 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. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 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 Metabolism and Pharmacokinetics* 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 Developmental Biology* 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. *Molecular Aspects of Medicine, 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>
- 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 feto-placental unit. *Molecular and Cellular Endocrinology* 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. *Biology of Sex Differences* 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. *Physiological Reviews* 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. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 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. *The American Journal of Pathology* 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 Sciences* 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: The Journal of Head and Face Pain* 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 Pharmaceutica Sinica 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. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 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 Physiologica* 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. *Journal of Biological Chemistry* 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. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E5697–E5705. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416675112>
- Lillicrop, 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. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11.
- 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., Djelms, 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. *International Journal of Molecular Sciences* 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 Research* 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 and 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. *Neuropsychopharmacol* 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. 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. *Current Opinion in Pharmacology, Neurosciences* 11, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.02.008>

- Naoui, 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. *Frontiers in Physiology* 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 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 Medical Weekly* 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. *Frontiers in Endocrinology* 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 and Child Development* 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. *Frontiers in Endocrinology* 13. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fendo.2022.1061317>
- 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. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 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. *Journal of Neuroscience Research* 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. *Journal of Biological Chemistry* 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. *Journal of Neural Transmission* 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). *Journal of Biological Chemistry* 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., Roumiguié, 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. *International Journal of Molecular Sciences* 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. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 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. Presented at the 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. Presented at the 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. *Frontiers in Endocrinology* 11.
- 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. *Journal of Neuroendocrinology* 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., Joobar, 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. *Journal of Receptor Research* 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. *Neurogastroenterology & Motility* 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 für 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. *Reproductive BioMedicine 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>
- Wadhwa, 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. *Journal of Clinical Lipidology* 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., Arikan, 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. *Behavioural Brain Research* 73, 19–29.
- 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>

Ocjena rada u tisku

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.

Rezultati dobiveni na uzorcima tkiva posteljice iz detaljno karakteriziranih trudnoća su pokazali 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*), a povišena je razina njegovog proteina, te je snižen afinitet razgradnog enzima serotoninina MAOA. Majčino metaboličko stanje nije povezano s razinama mRNA gena sintetskog enzima serotoninina *TPHI*. 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* dominiraju epigenetički nad genetičkim mehanizmima, dok je razina mRNA *HTR2A* povezana s rijetkom genetičkom varijantom. *In vitro* istraživanje 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 više 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 što 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.

Ocjena rada u tijeku

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 and with 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 the newborn, 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 that in pregnancies complicated by maternal obesity and/or GDM, the regulation of two key components of the placental serotonin system was altered. Specifically, the serotonin transporter (*SERT*) mRNA level was decreased, the level of its 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, 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 with 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 mother's 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 glukoze
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
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

ACTB	<i>actin beta</i> , beta-aktin
CK7	<i>cytokeratin 7</i> , citokeratin 7
HTR2A	<i>5-hydroxytryptamine receptor 2A</i> , serotoninški receptor 2A
MAOA	<i>monoamine oxidase A</i> , monoaminoksidaza A
MAOB	<i>monoamine oxidase B</i> , monoaminoksidaza B

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

Stipendije i priznanja

- 2022.: Stipendija za pohađanje virtualnog 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 serotoninski 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