

EPIGENETIČKE ZNAČAJKE GENA NR3C1 I RAZINA KORTIZOLA U POPULACIJI TRUDNICA NA OTOCIMA I KOPNU

Mrdjen-Hodžić, Rafaela

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:545262>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Rafaela Mrdjen-Hodžić

**EPIGENETIČKE ZNAČAJKE GENA
NR3C1 I RAZINA KORTIZOLA U
POPULACIJI TRUDNICA NA OTOCIMA I
KOPNU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Rafaela Mrdjen-Hodžić

**EPIGENETIC CHARACTERISTICS OF
THE NR3C1 GENE AND CORTISOL
LEVELS IN POPULATIONS OF
PREGNANT WOMEN
ON ISLANDS AND MAINLAND**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Centru za primijenjenu bioantropologiju Instituta za antropologiju u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Natalije Novokmet i Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sofie Ane Blažević, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su prikupljeni u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost "Croatian Birth Cohort Study (CRIBS)" voditelja izv. prof. dr. sc. Saše Missonija (HRZZ-UIP-2014-09-6598). Istraživanje je financirano iz Potpore Sveučilišta u Zagrebu znanstvenim istraživanjima 2022 i 2023 (106-F23-00030) te HRZZ projekta "Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja guštera *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR)" voditeljice izv. prof. dr. sc. Sofie Ane Blažević (HRZZ-UIP-2019-04-8469).

ZAHVALA

Zahvalu dugujem mnogima koji su, svatko na svoj način, bili uključeni u izazove ovog rada počevši od akademika Pavla Rudana koji mi je otvorio vrata antropologije, velikog oceana u kojem je ovaj rad samo mala kap. Potom, izv. prof. dr. sc. Saši Missoniju, prethodnom ravnatelju i voditelju projekta CRIBS hvala na ustupanju vrijednih uzoraka iz projekta. Sadašnjem ravnatelju prof. dr. sc. Damiru Marjanoviću hvala na potpori u dovršavanju započetog rada.

Mojoj mentorici s Instituta doc. dr. sc. Nataliji Novokmet koja je bile uz mene, uvidjela i cijenila moju strast za znanošću i bila poticaj i podrška. Hvala što je sa mnom svladavala brojne prepreke na koje sam nailazila te nerijetko gubila nadu koju je vraćalo njezino ukazano povjerenje.

Mentorici izv. prof. dr. sc. Sofii Ani Blažević hvala na nesebično prenesenom znanju, iskazanom beskrajnom strpljenju i uloženom vremenu koje je provela sa mnom u laboratoriju i izvan njega. Hvala joj što je u meni vidjela i prepoznala sposobnosti kojih ni sama nisam do kraja svjesna.

Zahvaljujem objema na dugim razgovorima, slušanju i razumijevanju kada je bilo teško. Uz vas sam otkrila dio sebe koji prije nisam poznavala. Bolje mentorice nisam mogla poželjeti.

Članovima Povjerenstva: nasl. prof. dr. sc. Marijani Peričić Salihović, prof. dr. sc. Domagoju Đikiću, izv. prof. dr. sc. Ani Katušić iskreno hvala na korisnim savjetima i svim konstruktivnim kritikama koje su poboljšale ovaj rad.

Veliko hvala svim kolegama iz Instituta na poticajima i potpori, a posebno Jeleni i Dubravki koje su sa mnom dijelile moju nervozu i strepnje.

Hvala dr. sc. Olgi Malev na pomoći i svim savjetima, Dunji, Matei B. i Matei M. s kojima sam dijelila "muke po Dejvidu" i stekla nova prijateljstva.

Hvala i svim prijateljima koji su na različite načine pratili ovo moje nastojanje. Naposljetku, posebna zahvala ide mojoj obitelji, suprugu i djeci na bezuvjetnoj ljubavi, duhovnoj i svakoj drugoj potpori. Hvala što su imali razumijevanja za sve one sate i sate koje je bilo potrebno uložiti za dovršenje ovog rada, kao i na strpljivom podnošenju mojih (ne)raspoloženja.

Bez vas ne bih sada pisala ove retke.

Epigenetičke značajke gena *NR3C1* i razina kortizola u populaciji trudnica na otocima i kopnu

RAFAELA MRDJEN-HODŽIĆ

Centar za primjenjenu bioantropologiju Instituta za antropologiju, Lj. Gaja 32, Zagreb

Stresna iskustva uključujući i ona doživljena tijekom osjetljivog razdoblja prenatalnog rasta povezuju se s disregulacijom HPA osi, koja rezultira s povišenim razinama kortizola u plazmi. Kohortna studija rođenih na istočnojadranskim otocima (CRIBS) proučava trudnice i njihovu djecu za utvrđivanje ranih odrednica zdravlja i bolesti, koje se javljaju još u fetalnom razdoblju i djetinjstvu. U ovom istraživanju proučeni su antropometrijski parametri majke i djeteta, razina kortizola u plazmi majki u drugom tromjesečju i metilacija 1F promotora *NR3C1* gena na uzorku ovisno o geografskoj lokaciji (kopno-otok). Za analizu kortizola prilagođena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Metilacija je analizirana sangerovim sekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije i umnažanjem specifičnog promotora. Kod ispitanica na otocima (Braču i Hvaru) u odnosu na kopno (Split i okolica), utvrđena je viša težina prije trudnoće, viša razina kortizola i veće razlike u porođajnoj težini, duljini i opsegu glave djece s obzirom na spol djeteta. Potvrđena je viša razina kortizola kod trudnica koje nose žensko dijete bez obzira na geografsku lokaciju. Ustanovljena je metilacija na 10 CpG mjesta promotorske 1F regije *NR3C1* gena bez povezanosti s ostalim varijablama. Stanovanje na otoku za vrijeme trudnoće povezuje se s razlikama u antropometriji djeteta i razinama kortizola majki tijekom trudnoće.

(106 stranica, 33 slike, 14 tablica, 194 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: stres, HPA-os, HPLC, antropometrija

Mentor 1: Natalija Novokmet, doc. dr. sc.

Mentor 2: Sofia Ana Blažević, izv. prof. dr. sc.

Ocjenjivači: nasl. prof. dr. sc. Marijana Peričić Salihović, znan. savjetnica

prof. dr. sc. Domagoj Đikić

izv. prof. dr. sc. Ana Katušić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Epigenetic characteristics of the *NR3C1* gene and cortisol levels in populations of pregnant women on islands and mainland

RAFAELA MRDJEN-HODŽIĆ

Center for applied bioanthropology, Institute for Anthropological Research, Lj. Gaja 32,
Zagreb

Stressful experiences, including those experienced during the sensitive period of prenatal growth, are associated with dysregulation of the HPA axis, resulting in elevated plasma cortisol levels. The Eastern Adriatic Islands Birth Cohort Study (CRIBS) studies pregnant women and their children to explore early determinants of health and disease, which occur as early as the fetal period and childhood. In this study, the anthropometric parameters of the mother and child, the level of cortisol in the mothers' plasma in the second trimester and the methylation of the 1F promoter of the *NR3C1* gene were studied in the sample in relation to place of residence (mainland-island). A high-performance liquid chromatography method was adapted for cortisol analysis. Methylation was analyzed by Sanger sequencing after bisulfite conversion and amplification of the specific promoter. Among the subjects on the islands (Brač and Hvar) compared to the mainland (Split and its surroundings), a higher pre-pregnancy weight, a higher cortisol level and greater differences in the birth weight, length and head circumference of children with regard to the gender of the child were found. A higher cortisol level was confirmed in pregnant women carrying a female child regardless of their place of residence. Methylation was found at 10 CpG sites of the promoter 1F region of the *NR3C1* gene without association with other variables. Living on an island during pregnancy is associated with differences in child anthropometry and maternal cortisol levels during pregnancy.

(106 pages, 33 figures, 14 tables, 194 references, original in croatian)

Keywords: stress, HPA axis, HPLC, anthropometry

Supervisor: Natalija Novokmet, doc. dr. sc.

Co-supervisor: Sofia Ana Blažević, associate prof. dr. sc.

Reviewers: titular Prof. Marijana Peričić Salihović, scientific advisor with tenure

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Associate Prof. Ana Katušić, PhD

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. SVRHA RADA	2
1.2. CILJ RADA.....	3
1.3. OPSEG RADA	3
1.4. METODE	4
1.5. POLAZNA HIPOTEZA	4
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. STRES	5
2.1.1. <i>Stres u ranom razdoblju</i>	8
2.2. OS HIPOTALAMUS - HIPOFIZA - NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE (HPA OS)	10
2.2.1. <i>Kortizol</i>	12
2.2.1.1. <i>11β-hidroksisteroid dehidrogenaza tip 2 (11β-HSD 2)</i>	14
2.3. EPIGENETIKA	15
2.3.1. <i>Gen NR3C1</i>	16
2.4. ANTROPOMETRIJA	19
2.4.1. <i>Indeks tjelesne mase (Body Mass index-BMI)</i>	19
2.4.2. <i>Antropometrija novorođenčadi</i>	20
2.4.2.1. <i>Porodajna težina</i>	21
2.4.2.2. <i>Porodajna duljina</i>	21
2.4.2.3. <i>Opseg glave</i>	21
2.4.2.4. <i>APGAR ocjena</i>	21
2.5. HRVATSKI OTOCI BRAČ I HVAR	22
2.5.1. <i>Brač</i>	23
2.5.2. <i>Hvar</i>	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. UZORAK.....	26
3.1.1. <i>Plazma i serum</i>	27
3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR	28
3.2.1. <i>Kemikalije potrebne za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti</i>	28
3.2.2. <i>Kemikalije potrebne za određivanje metilacije 1F promotora NR3C1 gena:</i>	28

3.2.3. Tehnička pomagala i pribor:	29
3.3. METODE.....	30
3.3.1. Metoda za analizu kortizola Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (<i>engl. High performance Liquid Chromatography; HPLC</i>).....	30
3.3.1.1. Sastavni dijelovi HPLC-a.....	30
3.3.1.2. Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)	32
3.3.1.3. Upotreba internog standarda (IS)	32
3.3.1.4. Priprema standardnih otopina.....	33
3.3.1.5. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	35
3.3.1.6. Prilagodbe metode po Piwowarskoj i validacija metode	36
3.3.1.7. Identifikacija pikova.....	37
3.3.1.8. Validacija metode.....	38
3.3.1.9. Pribor – plastika vs staklo	41
3.3.1.10. Određivanje koncentracije kortizola	43
3.3.2. Analiza metilacije DNA.....	44
3.3.2.1. Metoda ekstrakcije DNA isoljavanjem	44
3.3.2.2. Analizu koncentracije i kakvoće ekstrahiranje DNA.....	44
3.3.2.3. Bisulfitna konverzija	46
3.3.2.4. Dizajniranje i testiranje početnica za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA promotorske regije NR3C1 gena.....	50
3.3.2.5. Lančana reakcija polimerazom – PCR.....	56
3.3.2.6. Sangerovo sekvenciranje.....	57
3.3.3. Analiza podataka i statistička obrada.....	58
4. REZULTATI.....	60
4.1. INDEKS TJELESNE MASE	60
4.2. ANTROPOMETRIJA NOVOROĐENČADI.....	61
4.3. RAZINA KORTIZOLA	63
4.4. POVEZANOST ANTROPOMETRIJE I RAZINA KORTIZOLA MAJKI	65
4.4.1. Antropometrija i razina kortizola majke.....	65
4.4.2. Antropometrija djeteta i razina kortizola majke.....	68
4.5. RAZINE METILACIJE U 1F REGIJI PROMOTORA NR3C1 GENA.....	72
4.6. KORELACIJA METILIRANOSTI CPG MJESTA NR3C1 1F GENA.....	74

5. RASPRAVA.....	75
5.1. RAZLIKE IZMEĐU OTOČNIH I KOPNENIH POPULACIJA.....	75
5.1.1. Indeks tjelesne mase.....	76
5.1.2. Antropometrija novorođenčadi.....	76
5.2. KORTIZOL U TRUDNOĆI.....	77
5.3. METILACIJA 1F PROMOTORA <i>NR3C1</i> GENA	80
5.4. PREDNOSTI I NEDOSTACI EKSPERIMENTALNOG PRISTUPA.....	81
6. ZAKLJUČCI.....	84
7. LITERATURA.....	86
8. PRILOZI.....	102
9. ŽIVOTOPIS	106

POPIS SKRAĆENICA

11 β -HSDH	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza
APGAR	indeks vitalnosti novorođenčeta
AR	androgenski receptor
BMI	tjelesni indeks mase (engl. <i>body mass index</i>)
preBMI	indeks tjelesne mase prije trudnoće
postBMI	indeks tjelesne mase poslije trudnoće
ER	estrogenski receptor
ER β	estrogenski receptor β
GAS	opći adaptacijski sindrom
GR	glukokortikoidni receptor
GWG	gestacijsko povećanje težine (engl. <i>gestation weight gain</i>)
GDM	gestacijski dijabetes melitus (engl. <i>gestation diabetes melitus</i>)
HPA os	hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde os
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IS	interni (unutarnji) standard
MetS	metabolički sindrom
MR	mineralokortikoidni receptor
NR	nuklearni receptor
NR3C1	nuklearni receptor potporodica 3 grupa C član 1
NR3C1 1F	nuklearni receptor potporodica 3 grupa C član 1 ekson 1F
OG	opseg glave
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD	porođajna dužina
PR	progesteronski receptor
PT	porođajna težina
rpm	broj okretaja u minuti (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SR	receptor steroidnih hormona
STRs	kratki ponavljajući sljedovi (engl. <i>short tandem repeats</i>)
VNTR	varijabilni ponavljajući sljedovi (engl. <i>variable number tandem repeats</i>)

1. UVOD

Otočne populacije Hrvatske još uvijek pokazuju određeni stupanj reproduktivne izoliranosti zbog utjecaja geografskih i sociokulturnih barijera. Karakteriziraju ih specifični migracijski obrasci i obrasci životnog stila, izloženost sličnim okolišnim utjecajima i prehrambenim navikama gdje dolazi do izražaja miješanje tradicionalnih i suvremenih, tranzicijskih utjecaja. Takva svojstva čine otočne populacije prikladnim modelom za genetička i epigenetička istraživanja (Rudan i sur., 2004.). Rezultatima antropoloških istraživanja utvrđena je manja raznolikost otočnih populacija od one u ukupnoj populaciji (Rudan i sur., 1992.). Nadalje, analize genetičkih biljega VNTR-Variable Number Tandem Repeats (Martinović i sur., 1998.), STRs (Martinović i sur., 2005.; Vitart i sur., 2006.; Novokmet i sur., 2011.), Y kromosoma (Barać i sur., 2003.; Šarac i sur., 2016.) te mitohondrijske DNA (Tolk i sur., 2000.; Peričić i sur., 2005.; Jeran i sur., 2010.; Šarac i sur., 2012., 2014.) utvrdili su povećanu genetičku homogenost, odnosno smanjenu genetičku raznolikost unutar otočnih populacija, te visok stupanj različitosti između pojedinih otočnih populacija. Također, utvrđen je viši stupanj genetičke substrukturiranosti hrvatskih otočnih populacija u odnosu na populacije jugoistočne Europe što jasno dokazuje određeni stupanj genetičke izoliranosti, najvjerojatnije zbog visokog stupnja srođivanja unutar otočnih populacija (Novokmet i sur., 2011.; Novokmet i sur. 2022.a; Novokmet i sur. 2022.b).

Stoga su otočne populacije prepoznate kao dobar model za mapiranje obilježja Mendelove bolesti (Saftić i sur., 2006.), pronalaženje gena kandidata povezanih uz razvoj složenih bolesti (Rudan i sur., 2003.; Deko i sur., 2012.) i provođenje analize (e.g. Vitart i sur., 2006.; Barbalić i sur., 2009.; Karns i sur., 2012.; Karns i sur., 2013.), zatim istraživanja kroničnih nezaraznih bolesti, primjerice metaboličkog sindroma (MetS) za kojeg je utvrđena visoka prevalencija u općoj populaciji Hrvatske, uz posebno visoku stopu na hrvatskim otocima (Deko i sur., 2012.; Šarac i sur., 2022.). Navedene spoznaje omogućile su da se za mnoge bolesti i poremećaje koji se prepoznaju tijekom života pronade korijen njihovog nastanka u cilju prevencije njihovog razvoja.

Postnatalni razvoj uvelike ovisi o fetalnom okruženju u kojem se nalazi plod. Pretpostavlja se da je primarni mehanizam koji je uključen u fetalno programiranje kasnijih ishoda izlaganje majčinom kortizolu. Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da stres u ranom razvoju može utjecati na programiranje osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA os; O'Connor i sur., 2013.) te tako utjecati na ponašanje, neuroendokrine, neurofiziološke

i imunološke ishode. Specifičnije, visoka razina majčinog kortizola ima negativan učinak na fetalnu HPA os u razvoju što dovodi do manje od optimalnih ishoda. Također je uočena povezanost razine majčinog kortizola i metilacije *NR3CI* gena kod njihovih potomaka (Cao-Lei i sur., 2016.). Povezanost ova dva biološka parametra prvi je istražio Oberlander 2008. godine. Međutim, do sada nisu objavljena istraživanja koja opisuju povezanost razine kortizola i metilacije *NR3CI* gena kod trudnica. *NR3CI* gen koji kodira glukokortikoidni receptor (GR) ima ključnu ulogu u reguliranju funkcioniranja HPA osi. Smješten je na dužem kraku kromosoma 5 (5q31) i ima osam kodirajućih i devet nekodirajućih eksona (1A do 1F te 1H do 1J). Nekodirajući eksoni ponašaju se kao alternativni promotori gena. Eksoni 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C i 1H koji su smješteni unutar CpG otoka protegnuti duž 3 kb proksimalne promotorske regije gena *NR3CI*. Numeriranje koje nije u očekivanom abecednom rasporedu je poradi postupnog otkrivanja eksona koje se dogodilo u tri vremenski odmaknuta slijeda (Palma-Gudiel, 2015.b).

Kortizol je glavni hormon stresa i mjerljiv biokemijski parametar koji ima važnu ulogu u patogenezi raznih bolesti (Russell i Lightman, 2019.). Dosadašnja istraživanja razine kortizola kod trudnica pokazala su povezanost razine kortizola kod majki i prekomjerne težine u ranom postnatalnom životu djeteta (Entringer i sur., 2017.).

1.1. Svrha rada

Svrha rada je dati znanstveni doprinos u utvrđivanju međusobnih odnosa biokemijskih parametara (kortizola), antropometrije (porođajne težine, porođajne duljine, opsega glave) i epigenetičkih promjena na *NR3C1* 1F genu u korelaciji s različitim okolišnim uvjetima življenja na otocima Braču i Hvaru te pripadajućem kopnenom dijelu grada Splita i okolice. Razumijevanje ovih povezanosti omogućit će osmišljavanje usmjerenijeg, populacijski prilagođenog modela rane intervencije i prevencije nepovoljnih ishoda uzimajući u obzir utvrđene lokalne, socio-kulturne i okolišne specifičnosti populacije.

1.2. Cilj rada

Opći cilj ovog rada je istražiti korelaciju indeksa tjelesne mase (BMI), razine kortizola i epigenetičkih promjena na *NR3C1* genu u biološkom uzorku plazmi trudnica u populaciji Splitsko-dalmatinske županije (otocima Braču i Hvaru te Splitu) u odnosu na geografsku lokaciju stanovanja (kopno vs otoci).

Specifični ciljevi

1. Odrediti epigenetičke promjene analizom razine metilacije DNA izolirane iz uzoraka krvi sekvenciranjem bisulfitno konvertirane DNA;
2. Uspostaviti metodu analize kortizola iz bioloških uzoraka plazme i/ili seruma tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (High-performance liquid chromatography, HPLC);
3. Ispitati razlike razine kortizola kod trudnica na otocima (Braču i Hvaru) i kopnu (Split);
4. Utvrditi povezanosti između fenotipskog razvoja djeteta (APGAR, antropometrija djeteta) i razine kortizola kod trudnica;
5. Ispitati korelaciju geografske lokacije (kopno-otok) življenja majki i istraživanih parametara: razine kortizola kod trudnica, fenotipskog razvoja djeteta i epigenetičkih promjena *NR3C1* 1F gena.

1.3. Opseg rada

Uzorak na kojem je rađena analiza za disertaciju dio je prve kohortne studije provedene na populaciji trudnica Splitsko-dalmatinske županije, preciznije na otocima Braču i Hvaru te priobalju i zaleđu najvećeg dalmatinskog grada Splita. Hrvatske otočne populacije još uvijek su relativno izolirane, iz čega proizlaze specifične značajke populacije: obrasci životnog stila, slične prehrambene navike, izloženost sličnim okolišnim utjecajima te miješanje tradicionalnih i suvremenih kao i tranzicijskih utjecaja. Zbog navedenih značajki predstavljaju prikladan model za provedenu longitudinalnu studiju, kao i za buduća genetička i epigenetička istraživanja (Rudan i sur., 1999.; Rudan i sur., 2004.).

Institut za antropologiju u Zagrebu ima 5 desetljeća dugu tradiciju provođenja holističkih, antropoloških, interdisciplinarnih terenskih istraživanja ciljnih populacija hrvatskih otoka (Rudan i sur., 1999.; Rudan i sur., 2004.; Šarac i sur., 2023.). Stanovnici istočnojadranskih otoka tradicionalno su se bavili ribarstvom i zemljoradnjom u ruralnom okruženju te se pridržavali tradicionalne mediteranske prehrane (Rudan i sur., 1992.; Missoni, 2006.). Novija istraživanja hrvatskih otočnih populacija pokazuju da su se prehrambene navike ovih populacija značajno promijenile u odnosu na tradicionalnu mediteransku prehranu (Missoni, 2009.; 2012.; Sahay i sur., 2013.; Havaš Augustin i sur., 2022.; Šarac i sur., 2021.).

Rezultati provedenih istraživanja pokazala su da se na otoku Hvaru u većem postotku konzumira mediteranska prehrana nego na kopnu (Split), (Škreblin, 2003.). Neke se tendencije prekomjernoj tjelesnoj masi mogu prepoznati s obzirom na geografsku lokaciju. Viši postotak ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom je zabilježen u gradu Splitu u odnosu na Hvar (Peternel i Sujoldžić, 2009.). Psihološki čimbenici (stres i dobrobit) bili su povezani s prehrambenim navikama, prehrambenim ponašanjem i nezadovoljstvom vlastitim izgledom među adolescentima, ovisno o njihovom emigrantskom statusu, kod ispitanika s Hvara i iz Splita (Škreblin i Sujoldžić, 2003.).

1.4. Metode

Metode korištene za analizu koncentracije kortizola rađene su po protokolu opisanom u radu Piwowarska i sur., 2012. Ekstrakcija kortizola iz uzoraka plazme i seruma rađena je pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće i detektirana u HPLC-u. Kao interni standard (IS) je korišten 6 methylprednizolon, a detekcija je rađena na UV/VIS valnoj duljini 240 i 252 nm.

Za epigenetičku analizu gena NR3C1 1F genomska DNA je bisulfitno konvertirana uz pomoć DNA Methylation Gold kita (proizvođača Zymo Research). Nakon konvertiranja DNA, umnožen je segment od interesa NR3C1 promotorska regija eksona 1F pomoću dizajniranih početnica i Zymo Taq premiksa (proizvođača Zymo Research) lančanom reakcijom polimeraze. Dobiveni PCR produkt je poslan na Sangerovo sekvenciranje u Eurofins Genomics, Njemačka.

1.5. Polazna hipoteza

Različiti okolišni uvjeti (kopno *vs* otoci) imaju utjecaj na antropometrijske mjere novorođenčeta: porođajnu težinu, duljinu i opseg glave, razinu kortizola kod trudnica i epigenetičke markere *NR3C1* gena.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Stres

Stres intuitivno doživljavamo negativno kao osjećaj narušenosti duševnog i fizičkog blagostanja koje nam se u suvremenom društvu postavlja kao imperativ zdravlja. Stres je potrebno sagledati i kao mehanizam odgovora na stres odnosno adaptacije koji ima za cilj očuvanje integriteta organizma konstantno suočenog s vanjskim (okolišnim) i unutarnjim promjenama.

Pojam stres je poznat od 16. stoljeća iz područja mehanike, Robert Hook-ovom (1635.–1703.) zakonu elastičnosti koji kaže da je deformacija tijela (engl. *strain*) proporcionalna primijenjenoj sili (engl. *stress*) uz uvjet da se ne prijeđe granica elastičnosti tijela. Nešto kasnije se pojam počeo koristiti u engleskom govornom području za psihološku napetost (nervozu), a uočen je u djelima američkog fiziologa, utemeljitelja koncepta homeostaze Waltera B. Cannon (1871.-1945.) koji je za koncept homeostaze podlogu našao u opažanjima Clauda Bernarda (1813.-1878.) o potrebi očuvanja konstantnosti i stabilnosti unutrašnje sredine organizma (franc. *milieu intérieur*) (Cannon, 1932.). Cannon je prvi puta opisao i neurofiziološki odgovor koji ima adaptivnu funkciju i pripremu za borbu ili bijeg (engl. *fight or flight response*).

Kanadski endokrinolog Hans Selye (1907.-1982.), najzaslužniji za široko prihvaćanje riječi stres, je tijekom eksperimentiranja na životinjama primijetio trojaku reakciju njihovog organizma na različite nespecifične podražaje koja se očituje povećanjem kore nadbubrežne žlijezde, atrofijom timusa, slezene i limfnih čvorova te krvarenjem unutar gastrointestinalnog sustava (Selye, 1936.). Stresne reakcije ovise o mehanizmima prilagodbe kojima se pojedinac koristi za održavanje ili ponovnu uspostavu ravnoteže. Ukoliko se pojedinac ne može nositi s dugotrajnim djelovanjem stresora može doći do negativnih učinaka različitog intenziteta od neprilagođenog ponašanja do psihičkih ili tjelesnih poremećaja i bolesti (povišeni krvni tlak, kardiovaskularne bolesti, bolesti probavnog sustava, oslabljeni imunološki odgovor itd). Selye je na osnovu svojih promatranja prvi opisao gore navedenu reakciju organizma i formirao koncept općeg adaptacijskog sindroma (engl. *General Adaptation Syndrome, GAS*) (Hrv. Enc., 2013.) pri čemu, nakon izloženosti štetnom podražaju, organizam prolazi kroz adaptivne faze:

- kratku inicijalnu alarmnu reakciju koja može trajati nekoliko sati do dana. Tjelesna pohrana djeluje na nižim razinama učinkovitosti od normalnih nakon čega se mobiliziraju tjelesni resursi dok se ne povećaju aktivnosti nadbubrežne žlijezde,

respiratorne i kardiovaskularne funkcije.

- Nakon prve faze slijedi stadij otpora u kojem je stresni podražaj relativno konstantan no smanjuje se otpornost na druge podražaje.
- Stadij iscrpljenja slijedi ako je stresni podražaj produžen. Neuroendokrini sustav u ovoj fazi ima smanjeni kapacitet za izlučivanje hormona koji imaju zaštitnu ulogu organizma od stresa uslijed čega je organizam podložniji bolestima koje mogu imati i smrtni ishod.

Primijetio je kako opetovana izlaganja manjim stresorima povećavaju otpornost na snažnije stresore (Daruna, 2004.). Seyle je zaslužan za koncept stresa kao zajedničkog naziva za nespecifične adaptivne odnosno stresne reakcije u organizmu izazvane nekim agansom odnosno stresorom. Isto tako je radeći na animalnim modelima uočio da glukokortikoidi imaju značajnu ulogu u fiziološkom odgovoru na stresor. Studije na animalnim modelima su potvrdile da prenatalni majčin stres može imati dugoročne posljedice za potomstvo (Weinstock, 2001.).

Od samog začeća intrauterini okoliš uključuje i stres koji doživljava trudnica. Povijesno gledajući, populacije su iskustveno prepoznavale učinke načina življenja na potomstvo. Zanimljiv je primjer kulturološki uvjetovanih varijacija kod dvaju plemena s Nove Gvineje (Arapeši i Mundugamori) koje je 1930.-tih godina proučavala antropologinja Margaret Meade. Ova dva plemena su udaljena oko 150 kilometara i dijele mnoge društvene značajke no kulture su im posve različite. Arapeši su zadovoljni, nježni, neagresivni, povjerljivi i topli, a društvo im je utemeljeno na potpunoj suradnji. Brakovi su u najvećem broju slučajeva između jednog muškarca i jedne žene, a premda postoji određena podjela poslova između muškaraca i žena oboje skrbe o djeci. Djeca su povezana s rodbinom i sudjeluju u aktivnostima odraslih. Gaji se prijateljsko društveno okruženje prožeto ljubavlju, a agresivno ponašanje prema drugima nije prihvatljivo, već ga se eventualno izražava bezopasnim načinom poput udaranja palmine grane štapom. Mundugamori su nasuprot tome agresivni, vole se natjecati, ljubomorni su i nasilni. Vole se praviti važni i sukobljavati se. Postoji otvoreno rivalstvo među pripadnicima istog spola na svim razinama odnosa. Bogatstvo i moć dolazi ponajviše od toga da muškarac ima što veći broj žena do kojih dolazi mijenjajući ih za svoje sestre. Dojenčad nema fizičkog dodira s majkama već ih se drži u košarama od šiblja. U odgoju djeca imaju puno krutih pravila, a za njihovo kršenje su fizički kažnjavana. Senzorna deprivacija i fizičko kažnjavanje djece su najplodnija podloga za nasilno društvo (Mead, 1935.).

Još u 4 stoljeću prije Krista Spartanci su kraljevom odredbom tražili da se djeca doje do dvije godine starosti dok su adolescentice poticali na tjelovježbu kako bi rađale jake sinove (Pomeroy, 1994.).

Uzročnici samog stresa mogu biti različitog podrijetla: od brige za tijek trudnoće, rasta i razvoja djeteta, obiteljske i socio-ekonomske situacije do onih uzrokovanih hormonskim promjenama i psihofizičkom prilagodbom kao odgovorom na promjene specifične za trudnoću koja je zaista u pravom smislu riječi "drugo stanje" organizma. Uz porast količine stresa raste i rizik od komplikacija tijekom trudnoće, spontanog pobačaja, prijevremenog poroda, razvoja preeklampsije, zastoja u porodu koji mogu utjecati na zdravlje majke i novorođenčeta (Mulder i sur., 2002.; Huizink, 2000.).

Tijekom povijesti ljudskog roda zbog nedostupnost hrane nije bilo predispozicija za dio ljudskih bolesti povezanih s pretilošću za razliku od danas. Suvremene nomadske populacije koje se bave lovom i skupljanjem plodova i danas su pošteđene pretilosti i popratnih bolesti (Page i sur., 1974.; Phillips i Kubisch, 1985.). Nestašice hrane su u ljudskoj povijesti bile, a na žalost u dijelovima još uvijek jesu, jedan od važnijih stresnih čimbenika.

Prehrana je bila jedan od načina kontrole onih koji su bili na dnu socijalne hijerarhije, a potrebne su generacije kako bi se poništile biološke posljedice što predstavlja "metabolički geto" (Wells, 2010.). Na svim kontinentima nalazimo različite fizičke prepreke poput Hadrianovog zida koji razdvaja Englesku od Škotske, razne utvrde u kojima su se skrivale elitne obitelji i uživale u izobilju dok je oko njih vladala glad i razne bolesti. Ishodi ratova su ponajviše zavisili o dostupnosti hrane. Tako je turska vojska 1552. godine naišla na neočekivani otpor đurđevačkih branitelja pri pokušaju osvajanja đurđevačke utvrde pa su se odlučili na dugotrajnu opsadu s ciljem izgladnjivanja vojske i puka koji se sklonio u utvrdu. Legenda kaže da su jedinog preostalog pijetla stavili u top i ispalili ga na turski tabor. Turci su mislili da u utvrdi imaju toliko hrane da se mogu njom i razbacivati pa su odustali od opsade i napustili bojište. Sama spoznaja o dostupnosti odnosno nedostupnosti hrane ima velik psihološki utjecaj.

Godine 1917. u Engleskoj održan je *National Baby Week* čije održavanje je potaknula J. Halford, počasna tajnica *National Society for the Prevention of Infant Mortality* kako bi se obratila pozornost na važnost i nužnost zdravlja djeteta. Podatak koji je najviše odjeknuo bio je sljedeći: 1915. godine svakog sata na fronti je umiralo devet vojnika, a tog istog sata je u svojoj kući umiralo dvanaest beba. Opasnije je bilo biti beba u Engleskoj nego vojnik u Francuskoj

(Bryder, 2019.). I danas je cilj pokušati educirati što više žena ali i stručnjaka kako bi se minimalizirale negativne posljedice koje imaju utjecaja na cijeli ljudski rod.

Sir Mellanby, biokemičar i nutricionist davno je napisao "Sigurno je da značaj pravilne prehrane tijekom trudnoće ne počinje u samoj trudnoći ili čak u odrasloj ženi prije trudnoće. Ono je utkano u ženskom djetetu čim se rodi te uistinu i u njenom intrauterinom životu." (Mellanby, 1933.). Na tom tragu je i njegov suvremenik Mussey napisao: "Mora se imati na umu da prehrana određene generacije može utjecati na potomstvo nakon nekoliko generacija." (Mussey, 1949.). Rast i razvoj djevojčica u različitim fazama života je, uz dostupnost hranjivih tvari usko povezan sa zdravljem sljedeće generacije (Barker i sur., 2009.).

Evolucijski gledano posljedica prehrane je zamjetljiva u oblikovanju biologije i ponašanja ljudi, ali isto tako je, u kontekstu nejednake dostupnosti hrane, pretilost bila socijalni odabir zbog predstavljanja kulturnog simbola društvenog prestiža i kao sinonim dobrog općeg zdravlja (Brown, 1991.).

Današnjoj populaciji, koja je pretežno sjedilačkog načina života od najranije životne dobi i izobilja hrane, pretilost je postala u svjetskim razmjerima ozbiljan problem i uzročnik poremećaja zdravlja na različitim razinama i sustavima. Događa se disparitet između homeostatskog "metaboličkog kapaciteta" vitalnih organa i "metaboličkog opterećenja" uslijed svega prethodno navedenog. Tijekom trudnoće dolazi do fiziološke regulacije koja pomaže u smanjenju tog dispariteta te reguliranju rasta i razvoja djeteta tijekom gestacije i laktacije. Na taj način se omogućava potrebna zaštita potomstva od prehrambenih poremećaja. Majčini resursi uvelike utječe na obrasce rasta potomaka. To je posebno uočljivo tijekom ranih faza razvoja u kojima se oblikuju, a koji, ukoliko su pravilno oblikovani, omogućuju adaptivne odgovore na stresne čimbenike tijekom života. Količina majčinih resursa stječe se ili gubi kroz generacije i različite stope rasta fetusa i dojenčadi. Kod stanovništva koje je opterećeno lošim prehrambenim iskustvima gube se majčini resursi i dolazi do silaznih sekularnih trendova rasta. Ubrzanjem oporavka somatskih resursa dolazi do preopterećenja metaboličkog kapaciteta koji rezultira povećanom stopom bolesti u urbaniziranoj i emigrantskoj populaciji (Wells, 2010.).

2.1.1. Stres u ranom razdoblju

Različiti vanjski utjecaji i okoliš u kojem se razvijamo, rastemo i živimo ostavljaju trag na naše sposobnosti i zdravlje. Taj utjecaj je prisutan od samog začeća ili "in utero", a fetalno programiranje predstavlja adaptivni odgovor, odnosno pripremu organizma za vanjske faktore

kojima će rođenjem biti izložen.

Hipotezu "fetalno programiranje" je prvotno opisao Barker, a proučavana je intenzivno kod životinja (McArdle i sur., 2006.) i ljudi. Barker je uočio povezanost male porođajne mase s kasnijom pojavom srčanog udara i svoje opažanje je opisivao pojmom "fetalno programiranje". Tijekom vremena i daljnjih istraživanja Barkera i drugih znanstvenika uočena je povezanost usporenog i ubrzanog fetalnog rasta s pojavnosti mnogih kroničnih bolesti u odrasloj dobi (Barker i sur., 1986., 1989.a, 1989.b). Znanstvenici su tako uspostavili novo područje istraživanja uzroka bolesti, ukazujući na ključnu ulogu *in utero* okruženja za rast i razvoj ljudskog bića. Barker je prvi popularizirao koncept "fetal origins of adult disease (FOAD)" kojeg nazivamo i Barkerova hipoteza.

Razvoj bolesti kasnije tijekom života može djelomično biti uzrokovan okolišnim čimbenicima za vrijeme trudnoće, a ne samo genima jer je razvoj gotovo svih bolesti određen interakcijom genetike pojedinca i okoliša (Calkins i Devaskar, 2011.). Promjena nutritivnih, kardiovaskularnih i endokrinih uvjeta u placenti majke, koja je ujedno i prvi okoliš u kojem se razvija i raste fetus, utječu na ekspresiju njegovog genoma. Fetalno programiranje može utjecati na ekspresiju gena na više razina, a utjecaji se mogu raspodijeliti u nekoliko skupina (Cunningham i Cameron, 2003.):

1. Genski utisak (metilacija DNA/remodelacija kromatina)
2. Promjena u gustoći receptora na i u samoj stanici
3. Promjene u strukturi organa i tkiva
4. Ponovno postavljanje hormonskih osovina
5. Promijenjen odgovor na stres

Sve je više studija koje se bave istraživanjem prenatalnog razvoja i epigenetičkih promjena s naglaskom na DNA metilaciju. Jedna od takvih je i *Ice Storm* projekt u kojem se istraživao utjecaj prenatalnog majčinog stresa na razvoj u dječjoj dobi i adolescenciji (Cao-Lei i sur., 2016.).

2.2. Os hipotalamus - hipofiza - nadbubrežne žlijezde (HPA os)

HPA os je složeni robusni sustav kojeg čine hipotalamus, prednji režanj hipofize (adenohipofiza) i nadbubrežne žlijezde. Hipotalamus se sastoji od skupa specifičnih jezgara i njima pridruženih vlakana koje leže ispod talamusa. On je glavni dirigent našeg organizma. Glavna je poveznica endokrinog i autonomnog živčanog sustava. Izlučuje niz faktora koji djeluju na adenohipofizu, a ona luči faktore koji reguliraju lučenje ciljnih žlijezda. Glavna zadaća je održavanje homeostaze organizma u kontekstu stresa koji bilo fizičkim bilo psihološkim podražajem (stresorima) predstavlja izazov homeostazi sustava. Fiziološke promjene koje slijede predstavljaju odgovor organizma na stres (Kagias i sur., 2012.; Chu i sur., 2024.).

HPA os je ključna u reguliranju mobilizacije energije u organizmu. Odgovara na izazove i stresne okolnosti kaskadom aktivacije hormona koji dovode do izlučivanja glukokortikoida (GK) kortizola iz nadbubrežnih žlijezda kod ljudi (Nazzari i sur., 2022.). Povezanost i važnost između reproduktivnog razdoblja i HPA osi je još očitija promatrajući je kroz rast i razvoj žene. Hormoni jajnika tijekom menstrualnog ciklusa mijenjaju HPA osjetljivost i funkciju osi (Klusmann i sur., 2022.). Promjene su još očitije tijekom trudnoće kada se hipofiza udvostručava, a produkcija peptida se multiplicira napretkom trudnoće. HPA os majke prolazi kroz velike promjene uglavnom zbog razvoja posteljice koja je fetalnog podrijetla. Placenta otpušta CRH kojeg primaju i mama i beba. Suprotno inhibitornom djelovanju kortizola na CRH koji otpušta hipotalamus, majčin kortizol ima stimulirajući učinak na CRH iz placente stvarajući pozitivnu povratnu spregu. Do djeteta kroz placenta dolaze CRH iz placente ali i majčin CRH koji je dijelom blokiran zaštitnim enzimom iz placente 11 β -HSD-2. U kasnoj trudnoći opada njegova razina i omogućava majčinom kortizolu da prođe do djeteta kako bi pomogao u sazrijevanju pluća (Slika 1.).

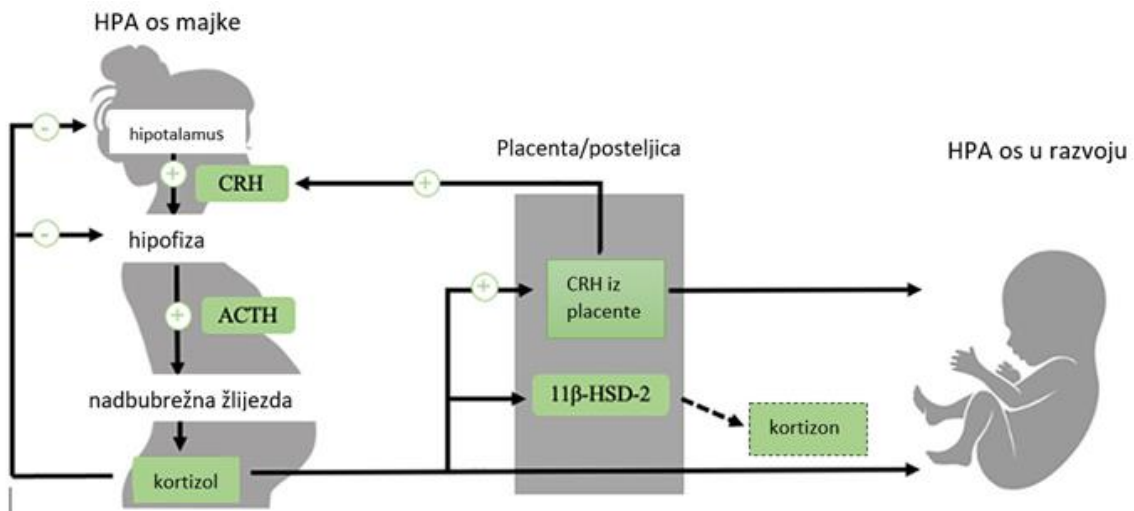
Razina glukokortikoida kortizola je tijekom trećeg tromjesečja jako varijabilna i može imati vrijednosti dva do pet puta više od razina kortizola žena koje nisu trudne (Dickens i Pawluski., 2018.). Modificirana majčina HPA os se nakon aproksimativno 12 tjedana vraća u svoje prvobitne postavke (Magiakou i sur., 1996.; Mastorakos i Ilias, 2003.).

Kada je HPA os potpuno zrela mobilizira psihološke i fizičke resurse tijela kako bi odgovorila na stres. Odgovor je reguliranje homeostatskih sustava u tijelu uključujući metabolički, imunološki, kardiovaskularni, reproduktivni i središnji živčani sustav (O'Connor

i sur., 2000.; Chrousos, 2000.; Yehuda i Seckl, 2011.). Tijekom prenatalnog razvoja dok je HPA os djeteta u izgradnji jako je podložna utjecajima prenatalnog ili fetalnog programiranja. pa ga istraživači predlažu kao primarni mehanizam kojim se rana iskustva povezuju s kasnijim zdravstvenim ishodima (Clark, 1998.). Programiranje HPA osi *in utero* je povezano s kardiovaskularnim bolestima, inzulinskom rezistencijom i dijabetesom koji se javljaju tijekom života (Ward i sur., 2004.; Phillips i sur., 2005.).

Studije provedene na animalnim modelima pokazale su da sintetski glukokortikoidi prolaze kroz placentu i utječu na fetalni razvoj HPA osi što dovodi do trajnih promjena u njevoj funkciji. Istraživači smatraju da su te promjene modulirane na razini mineralokortikoidnih i glukokortikoidnih receptora koji se nalaze u mnogim tkivima pa tako i u mozgu i hipofizi. Obzirom na interakciju HPA osi s mnogim drugim fiziološkim procesima, promjene koje se događaju u endokrinoj funkciji specifične su za spol i dob.

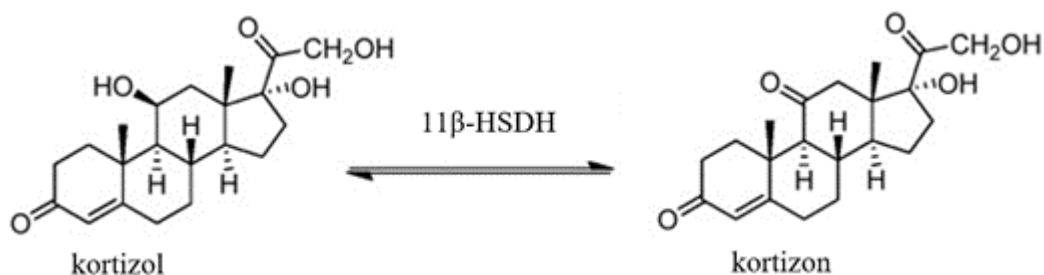
Kod animalnih modela primijećene su promjene u ponašanju, a posebice u lokomotornom sustavu nakon izloženosti sintetskim glukokortikoidima *in utero*. Čini se da su promjene u funkciji HPA osi i ponašanju nakon prenatalne izloženosti sintetskim glukokortikoidima transgeneracijske. Pretpostavlja se da uključuju epigenetičke mehanizme (Kapoor i sur., 2008.). Programiranje funkcije HPA osi i prilagođenog ponašanja sisavaca potrebno je zbog preživljavanja. Gravidna ženka izložena neprijateljskom okruženju zahtjeva povećanu budnost. Stresne "upute" se prenose na fetus programiranjem razvoja njegove HPA osi i stresom uvjetovano ponašanje s ciljem pojačane sposobnosti preživljenja nakon rođenja. Moguće je da smo kao ljudi naslijedili od naših predaka mehanizam za prilagodbu naših potomaka okruženju u kojem ćemo se roditi. Ako ovaj proces pokreće modificirana ili ugrožena trudnoća (primjerice stres, insuficijencija placenta, liječenje sintetskim glukokortikoidima) modificira se endokrina, bihevioralna i metabolička regulacija bez obzira na okolinu u kojoj će se potomak roditi (Kapoor i sur., 2006.). Morrison i O'Connor, 2005. su primijetili povećanu bazalnu aktivnost HPA osi djece stare 6 mjeseci, 5 i 10 godina povezanih s majčinom anksioznošću, depresijom i stresom tijekom intrauterinog razvoja.



Slika 1. Regulacija HPA osi tijekom trudnoće. Prilagođeno iz Deer i sur., 2023.

2.2.1. Kortizol

Kada smo pod utjecajem stresa reagira hipotalamus lučenjem hipofizeotropnog hormona koji potiče lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) prednjeg režnja hipofize. ACTH djeluje na koru nadbubrežne žlijezde, specifično na zonu fasciculatu koja luči glukokortikoide. Glavni predstavnici glukokortikoida su kortizol i kortizon (Slika 2.).



Slika 2. Kemijska struktura kortizola i kortizona.

Sam naziv za glukokortikoide je složenica od riječi gluko(za)+lat. *cortex*: kora (ster)oid (Hrv. Enc., 2021.). Najvažnije fiziološke funkcije su mu regulacija metabolizma ugljikohidrata i održavanje ravnoteže vode i elektrolita. U tijelu ima imunosupresivno i protuupalno djelovanje. Kod zdravih osoba kortizol djeluje mehanizmom negativne povratne sprege na lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH), pri čemu kora nadbubrežne žlijezde reagira na povišene koncentracije ACTH pojačanim izlučivanjem kortizola, dok hipofiza reagira na

povišene koncentracije kortizola smanjenom sintezom ACTH. Koncentracije kortizola u plazmi najviše su ujutro, a do večeri se snize približno na polovicu jutarnje vrijednosti (Whitley, 1994.). Trudnoća i estrogenska terapija znatno povisuju koncentracije kortizola. Kortizol se pojačano luči i u stresnim situacijama. Određivanje koncentracija kortizola koristi se za izravno praćenje statusa nadbubrežnih žlijezda i kao posredan pokazatelj pojačane ili smanjene funkcije hipofize. Povišene koncentracije kortizola povezane su s tumorom nadbubrežne žlijezde, tumorom hipofize i ektopičnim tumorima koji luče ACTH (Gold, 1979.). Najveći dio kortizola u plazmi vezan je na proteine, a približno 1% izlučuje se urinom u nepromijenjenom obliku (Stewart, 2003.). Općenito se smatra da je koncentracija kortizola u urinu pokazatelj koncentracije nevezanog (slobodnog) kortizola u plazmi koji je biološki aktivan. U slučaju prekomjerne sinteze kortizola zasićuju se globulini koji vežu kortizol, pa koncentracija slobodnog kortizola u plazmi nerazmjerno raste te se slobodni kortizol pojačano izlučuje urinom.

Kortizol je biokemijski parametar koji ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma (MetS), kojeg karakterizira pretilost i hipertenziju (Jeong, 2012.). Svjetska zdravstvena organizacija je 1999. godine prvi put službeno definirala metabolički sindrom prisutnošću inzulinske rezistencije ili njezinih surogata, poremećene tolerancije glukoze (IGT) ili DMT2, kao bitnih komponenti sindroma, uz još najmanje dva parametra: povišen krvni tlak, povišenu razinu triglicerida, nisku koncentraciju HDL (high-density lipoprotein) kolesterola, pretilost ili mikroalbuminuriju. International Diabetes Foundation (IDF) metabolički sindrom definira kao konstelaciju metaboličkih poremećaja koji uključuju abdominalnu pretilost, smanjenu koncentraciju HDL kolesterola, povišenu koncentraciju triglicerida, povišeni krvni tlak i hiperglikemiju.

Potencijalni mehanizmi koji pridonose patogenezi metaboličkog sindroma uključuju fetalno programiranje, dishomeostazu stresnog sustava te razvoj proupalnog i protrombotičnog stanja koji je rezultat proizvodnje citokina i/ili disregulacije iz prekomjernog adipoznog (masnog) tkiva (Rojas i sur., 2021.; Zimmet i sur., 2005.).

Istraživanja na animalnim modelima pretpostavljaju da stres u ranom razvoju može utjecati na programiranje osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA) (O'Connor i sur., 2013.) te tako utjecati na oblikovanje ponašanja, neuroendokrinih, neurofizioloških i imunoloških ishoda. Dosadašnja istraživanja razine kortizola kod trudnica su pokazala povezanost razine kortizola kod majki i prekomjerne težine u ranom postnatalnom životu djeteta (Entringer i sur., 2017.). Referentne vrijednosti kortizola (Tablica 1.) imaju širi raspon

unutar pojedinog tromjesečja nego između svakog tromjesečja (Abbasi-Ghanavati, 2009.; Marceau i sur., 2020.) te je potrebno pronaći način (metodu) uspostave graničnih vrijednosti kako bi se omogućila što ranija prevencija raznih zdravstvenih problema.

Tablica 1. Referentne vrijednosti za kortizol u trudnoći. Prilagođeno iz Abbasi-Ghanavati, 2009.

Mjerna jedinica	Odrasla žena	Trudnica		
		Prvi trimestar	Drugi trimestar	Treći trimestar
nmol/L	0-690	193-524	276-1159	331-1380

2.2.1.1. 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tip 2 (11 β -HSD 2)

Djelovanje glukokortikoida unutar stanica tkiva određeno je razinama steroida u krvi, gustoćom receptora ciljnih stanica i unutarstaničnim metabolizmom 11 β -HSD 2.

Tijekom intrauterinog razvoja u tkivima fetusa, uključujući i mozak vidljiva je visoka ekspresija 11 β -HSD 2 kojeg luči placenta, a štiti fetus od majčinog kortizola na način da konvertira majčin kortizol koji prolazi kroz placentu u inaktivnu formu kortizon (Balbi 2021.; Benediktsson i Seckl, 1998.). Rezultati dobiveni u studijama na animalnim modelima upućuju na to da prenatalni stres ima utjecaja na funkciju posteljice i ekspresiju 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (Welberg i sur., 2015.). Smanjena zaštita fetusa od viška glukokortikoida usporava rast i razvoj te aktivira adaptacijske promjene fetusa. Posljedice tih adaptivnih promjena mogu biti, osim hipertenzije, različiti kognitivni problemi i teškoće kao rezultat poremećaja struktura mozga. Lučenje 11 β -HSD 2 razlikuje se ovisno o spolu. Tako je utvrđeno da posteljica ženskih fetusa pruža bolju zaštitu od više razine glukokortikoida u usporedbi s posteljicom muških fetusa (Cottrell i sur., 2014.).

U svom radu Sarkar i sur., 2001. pokazali su da noradrenalin i adrenalin mogu regulirati 11 β -hydroxysteroid dehidrogenazu. To upućuje na vezu između kortizola kod majke i kortizola u amnionskoj tekućini koji djelomično ovise o noradrenalinu i adrenalinu. Postaje sve očitije kako vrijeme izlaganja prenatalnom stresu ima veliki učinak na prirodu fenotipskog ishoda. Promjene u endokrinoj funkciji uslijed opetovane izloženosti visokim koncentracijama kortizola od prenatalnog razdoblja u konačnici imaju učinka na zdravlje kod ljudske i životinjske populacije.

2.3. Epigenetika

Pojam „epigenetika“ složenica je grčke riječi "epi" i riječi "genetika". Sam prefiks "epi" (grč. *epi -na, preko, izvan*) upućuje da se promjene ne događaju u DNA sekvenci. Davne 1942. godine britanski znanstvenik C. H. Waddington uveo je pojam epigenetike kako bi pojasnio uzročnu interakciju između gena i njihovih produkata koji dovode do fenotipa.

Prefiks "epi" u molekularnoj epigenetici označava "preko" jer u molekularnom procesu sjedi iznad i djeluje na gene. Ovo je bilo značajno otkriće budući da je Avery dvije godine poslije (1944.) otkrio da DNA, a ne proteini kako se do tada smatralo, nosi genetičku informaciju. Sve stanice u organizmu sadrže istu DNA, ali epigenetičke modifikacije utječu na ekspresiju gena koja je specifična za svaku stanicu te na taj način omogućuju diferencijaciju odnosno imaju ulogu u uspostavljanju jedinstvenog staničnog identiteta. Te promjene su stabilne jer određuju tip stanice za razliku od promjena koje se javljaju usljed odgovora na utjecaje iz okoliša i reverzibilne su (Tronick i Hunter, 2016.).

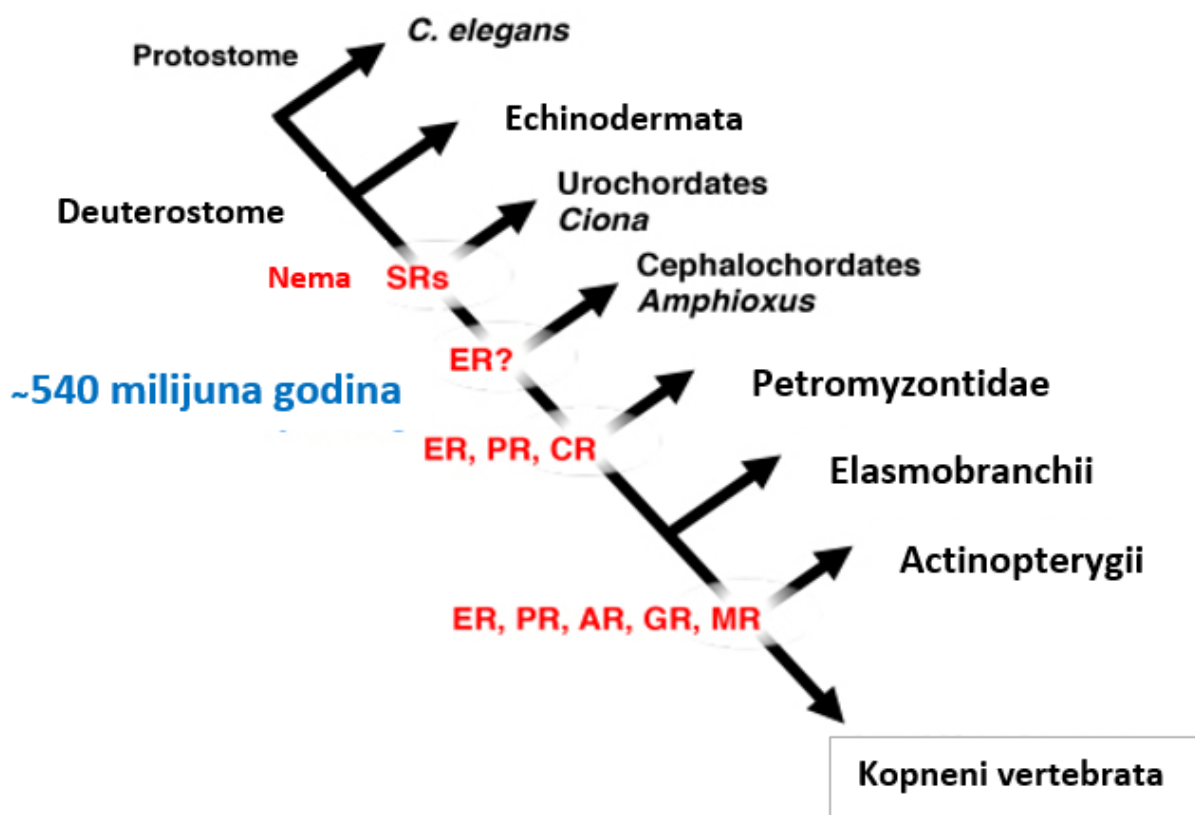
Epigenom je dinamičan i fleksibilan u odgovoru na podražaje unutar i izvan stanica za razliku od konzistentnog genoma te omogućuje organizmu prilagodbu na okolišne podražaje ekspresijom određenih karakteristika ili fenotipa. Epigenetičke modifikacije aktiviraju ili inaktiviraju dijelove genoma i tako omogućuju akomodaciju stanica na promjene kojima su izložene. Razumijevanje transgeneracijskog prijenosa epigenetičke informacije omogućilo bi djelovanje u smislu prevencije i liječenja raznih složenih bolesti (Weinhold, 2006.). Epigenetički putevi vjerojatno imaju ulogu u posredovanju utjecaja izloženosti okolišnim uvjetima tijekom trudnoće na majčin i djetetov fenotip, ali su još uvijek nedovoljno poznati. Teško je odrediti u kojem razvojnog dobu je taj utjecaj vidljiviji te su stoga prirodne katastrofe, ratovi i pandemije jedinstvene prigode kako bi se odredio taj vremenski raspon (Nazzari i sur., 2022.).

Epigenetičke mehanizme čine modifikacija histonskih proteina, djelovanje nekodirajućih molekula RNA i konformacije kromatina koje utječu na fizički kontakt određenih kromatinskih područja. Jedan od najbolje istraženih epigenetičkih mehanizama je metilacija citozina u molekuli DNA i to unutar CpG nukleotida (Zhang i Pradhan, 2014.). Upravo tim mehanizmom, u kojem je citozin kemijski modificiran dodatkom metilne skupine (CH₃) na petom atomu ugljika u pirimidinskom prstenu, nastaje 5-metilcitozin (5mC). Zastupljenošću od 60-80% najčešći je mehanizam u sisavaca dok se ostali mehanizmi većinom nalaze u genomima

biljaka i nekih gljiva (Smith i Meissner, 2013.). Obzirom na visoku zastupljenost 5-metilcitozin smatra se petom bazom DNA molekule. Dinukleotidi CpG se nalaze široko rasprostranjeni u genomu. Područja u genomu koja su bogatija CpG dinukleotidima nazivamo CpG-otoci koji čine njegova specifična područja, a u njima su najčešće nemetilirani citozini (Illingworth i Bird, 2009.). Funkcija koju CpG otoci imaju najčešće je promotorska i oko 50% CpG-otoka je pronađeno u područjima inicijacije transkripcije dok se ostatak nalazi između ili unutar gena u dijelovima tzv. inter- i intragenjskim CpG-otocima čija funkcija još nije razjašnjena iako neki primjeri ukazuju da i s njih dolazi do inicijacije transkripcije (Deaton i Bird, 2011., Macleod i sur., 1998., Sleutels i sur., 2002.) pa po nekim istraživanjima takvi CpG-otoci ukazuju na promotorsku funkciju (Illingworth i sur., 2010.).

2.3.1. Gen *NR3C1*

Djelovanje glukokortikoida je na staničnoj razini posredovano unutarstaničnim receptorskim proteinom, glukokortikoidnim receptorom (GR) koji je evolucijski očuvan protein iz superporodice nuklearnih receptora (NR), a posreduje u različitim djelovanjima glukokortikoida. Nuklearni hormonski receptori (NR) tvore jako očuvanu obitelj proteina uočenu i kod jednostavnih metazoa. Filogenetski su pod pritiskom evolucijske selekcije diferencirani u 7 potporodica i aktivni su u suvremenoj ljudskoj populaciji (Mackeh i sur., 2017.). Glukokortikoidni receptor spada u receptore steroidnih hormona potporodicu 3 nuklearnih receptora, koje u vertebrata čini šest evolucijski povezanih receptora steroidnih hormona (SR): dva za estrogene (ER i ER β), po jedan za androgeni receptor (AR) i progesteronski receptor (PR), glukokortikoidni (GR) i mineralokortikoidni receptor (MR) (Mangelsdorf i sur., 1995.). Steroidni receptori su evoluirali iz loze Chordata nakon što su se razdvojili Deuterostome i Protostome prije otprilike 540 milijuna godina. Prvi predak koji je blizak pradavnom estrogenskom receptoru (ER) pojavio se prije ~540 milijun godina. Kod Petromyzontidae su se pojavila tri receptora ER, pradavni receptor koji veže androgene, receptor za progesterone ili progesteron i androgen zajedno (PR) i kortikoidni receptor (CR). Od Actinopterygii-a, sva tri pradavna receptora se serijom dupliranja umnažaju pa imamo ER u dva oblika (ER i ER β), progesteronski receptor (PR), androgeni receptor (AR), glukokortikoidni receptor (GR) i mineralokortikoidni receptor (MR) (Slika 3.).



Slika 3. Pojavnost receptora steroidnih hormona (SR) serijom dupliciranja tijekom evolucije loze Chordata. Prilagođeno iz Baker, 2004.

Glukokortikoidi utječu na gensku kontrolu proizvodnje proteina. Promjenom enzimskih aktivnosti događaju se promjene u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i masti u vidu proteolize, razgradnje proteina na aminokiseline, glukoneogeneze kada se izgrađuje glukoza iz neugljikohidratnih molekula (npr aminokiselina) i lipolize kada se ragrađuju neutralne masti na masne kiseline i glicerol. Glukoneogeneza i smanjeno iskorištavanje glukoze u stanicama pod utjecajem glukokortikoida uzrokuju hiperglikemiju pa možemo reći da imaju i dijabetogen učinak. Također imaju utjecaj na reaktivnost krvnih žila na kateholamine, metabolizam vode, djeluju na krvne stanice smanjenjem broja eozinofila ili limfocita i drugo (Medicinski leksikon, 1992.).

Gen *NR3C1* koji kodira glukokortikoidni receptor je glavni kandidat za epigenetički utjecaj na ishode i ima ključnu ulogu u reguliranju funkcioniranja osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA os). Smješten je na dužem kraku kromosoma 5 (5q31) i ima osam kodirajućih eksona numeriranih od 2-9 i devet nekodirajućih eksona (1A – 1F i 1H - 1J). Nekodirajući eksoni se ponašaju kao alternativni promotori gena. Eksoni 1A, 1J, 1E, 1B, 1F i

1H koji su smješteni u *NR3C1* proksimalnoj regiji se nalaze unutar CpG otoka (Slika 4.) koji su osjetljivi na metilaciju (Palma-Gudiel i sur., 2015.a i 2015.b). Receptor se obično nalazi u citoplazmi ali se nakon što se veže za ligand transportira u jezgru. Uključen je u staničnu proliferaciju, diferencijaciju u ciljnim tkivima i upalnim reakcijama. Generalizirana rezistencija na glukokortikoide se povezuje s mutacijom u ovom genu. Kortizol i drugi kortikoidi vežu se na glukokortikoidni receptor NR3C1 "Nuclear Receptor subfamily 3, group C, member 1" (nuklearni receptor potporodice 3, grupa C, član 1).

Primarni mehanizam koji je vjerojatno uključen u fetalno programiranje kasnijih ishoda je izlaganje majčinom kortizolu. Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da visoka razina majčinog kortizola ima negativan učinak na fetalnu HPA-os u razvoju. Isto tako uočena je povezanost razine kortizola kod majki i metilacije na *NR3C1* genu kod njihovih potomaka (Cao-Lei i sur., 2016.). Međusobnu povezanost ova dva parametra prvi je istražio Oberlander i sur., 2008. godine.

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni radovi koji opisuju povezanost razine kortizola i metilacije *NR3C1* gena trudnica i/ili njihovih potomaka u korelaciji s mjestom življenja (kopno vs otok).



Slika 4. Struktura *NR3C1* gena. Prilagođeno iz Palma Gudiel i sur., 2015.

2.4. Antropometrija

Antropometrija je, gledajući grčku etimologiju (grč. *anthropos* = čovjek i *metrein* = mjeriti), istraživačka metoda antropologije s ciljem utvrđivanja dimenzija ljudskog tijela i njihovog prosuđivanja. Termin je prvi upotrijebio Quételet 1870. godine. Ova disciplina toliko je stara da možemo reći da je nastala u “predvečerje svih vremena” (Livi, 1900.). Potreba za mjerenjem čovjeka javila se u vrijeme kada se počela okupljati regularna vojska pa su stari Rimljani tako uspostavili minimum proporcija potreban za pristupanje vojsci. U određenom povijesnom razdoblju umjetnosti statue su bile jako čašćene pa je bilo prirodno da se naprave studije o dimenzijama ljudskog tijela koje su služile kao standard umjetnicima za izradu kipova. Poliklet koji je živio u vrijeme kada i Fidija (452. – 412. pr. Krista) izradio je kip *Dorifora* ili Kopljonoše. Njegove proporcije procijenjene su toliko savršeno da su, premda je originalna statua izgubljena, ostale kopije (od kojih je najljepša ona u Napulju) (Hrv. Enc., 2021.) kojima su na poleđini uklesane mjere koje su služile kao školski model i upute tjelesnih proporcija kiparima i slikarima. U novije vrijeme mnogi umjetnici poput Leona Battista Albertia, Leonarda da Vincia, Alberta Durerera pisali su o propozicijama ljudskog tijela ali iz čisto umjetničkog viđenja (Livi, 1900.).

Analize antropometrijskih karakteristika stanovništva koji obitavaju na određenom području mogu pomoći u određivanju morfoloških varijacija u promatranoj populaciji. Isto tako, uz povijesne činjenice mogu pomoći odrediti dinamiku migracija stanovništva promatranog područja. Iz antropometrijskih podataka možemo donijeti puno prosudbi o načinu života te procijeniti stanja djeteta tijekom njegovog rasta i razvoja (Maravić i Rudan., 1975.). Najčešće antropometrijske mjere koje se koriste su: tjelesna masa, tjelesna duljina, opseg glave, opseg prsnog koša, opseg trbuha.

2.4.1. Indeks tjelesne mase (Body Mass index-BMI)

Sredinom 1830-ih godina Lambert Adolphe Jacques Quételet (1796. – 1874.), belgijski flamanski astronom, statističar i sociolog je zbog statističke studije prikupljao podatke o visini i tjelesnoj težini muškaraca nadajući se da će na osnovu ovih podataka determinirati prosječnog čovjeka. Razvio je matematičku formulu za izračun indeksa tjelesne mase koja je po njemu nazvana Quéletova formula, a danas ju poznajemo kao indeks tjelesne mase koji se računa tako da se tjelesna težina pojedinca podijeli s kvadratom njegove visine. (Humphreys, 2010.). U ranim 1900 tim postalo je jasno da postoji jasna veza između poboljevanja i prekomjerne

tjelesne masnoće.

BMI je popularno i pouzdano antropološko oruđe za mjerenje pretilosti, procjenu nutritivnog i zdravstvenog statusa na neinvazivan, pristupačan način. Izravno je povezan s različitim utjecajima na ljudsko zdravlje bez obzira na starost, spol, socio-ekonomski status i etničku pripadnost (Mohajan i Mohajan, 2023.).

Tijekom vremena, problem prekomjerne tjelesne težine proširio se i na zemlje koje imaju niske prihode, a koje su prije bile opterećene pothranjenom populacijom sa zaostajanjem u rastu, premaloj težini te bila sklona zaraznim bolestima. I oni pothranjeni kao i ljudi s prekomjernom težinom i pretili zahtjevaju stručnu pomoć jer su, uz tjelesnu neaktivnost i nezdrave prehrambene navike, izloženi različitim vrstama bolesti. BMI je mjera ljudskog tijela bazirana na visini mjerenoj u centimetrima i tjelesnoj težini pojedinca mjerenoj u kilogramima. Idealni BMI može se naći u različitim tablicama i mrežnim stranicama. Iz podatka o indeksu tjelesne mase može se iščitati prehrambeni status pojedinca (Henriques i sur., 2019.).

Prekomjerna težina rastući je problem današnjice. Uz nezdravu prehranu, manjak kretanja, sjedilački način života svoj uzrok ima i u intrauterinom razvoju. Pretilost prije trudnoće može uzrokovati niz poteškoća kako za trudnicu tako i za intrauterini razvoj djeteta (Catalano i Shankar, 2017.) dok se sklonost pretilosti očituje i u odrasloj dobi (Adane i sur., 2019.). BMI je uz gestacijsku dob važan pokazatelj razvoja. Niski porođajni indeks vezan je uz niži kognitivni rezultat (Breslau, 1995.), hiperaktivnost i manjak koncentracije (Breslau i sur., 1996 ab.; Rice i sur., 2007.) te korelira s povećanim emocionalnim problemima. Zbog ovih veza gestacijska dob i porođajna težina mjera su novorođenčeta zdravlja nakon poroda (Balbi i sur., 2021.).

2.4.2. Antropometrija novorođenčadi

Mjere novorođenčeta neposredno nakon poroda ukazuju na zdravlje i stanje novorođenčeta. Mjere se uspoređuju s gestacijskom dobi. Na razlike antropometrijskih mjera novorođene djece utječe spol djeteta, redni broj poroda, konstitucija i zdravstveno stanje roditelja, rasa, geografski položaj, socio-ekonomski život roditelja i ostalo (Mardešić i suradnici, 2003.).

2.4.2.1. Porodajna težina

Prva studija uopće koja je provedena kako bi se istražilo razvojno porijeklo kroničnih bolesti provedena je prije više od 100 godina. U grofoviji Hertfordshire u Engleskoj su od 1911. godine, tijekom poroda kojima je prisustvovala primalja, bilježene porodajne težine novorođenčadi. Osim tih podataka, patronažne sestre dolazile su u medicinske posjete te zabilježile i podatak o težini s napunjenom prvom godinom života. Podaci su dali uvid o povezanosti pre i postnatalnog rasta i bolesti. Tako su djeca sporijeg intrauterinog i sporijeg rasta u dojenačkoj dobi kasnije razvila koronarnu bolest srca i dijabetes tipa 2, ali nakon tog sporog rasta uslijedilo je ubrzano povećanje indeksa tjelesne mase. Usporeni rast tijekom intrauterinog razvoja, dojenačkog doba i ranog djetinjstva povezan je s moždanim udarom u kasnijoj životnoj dobi (Barker i sur., 2009.). Genetička kontrola fetalnog rasta dominantna je u prvoj polovici gestacije dok ostali čimbenici imaju važniju ulogu u kasnijem razdoblju gestacije (Mikulandra i sur, 2001.; Miletić i sur, 2004.).

2.4.2.2. Porodajna duljina

Porodajna duljina kao i porodajna težina variraju ovisno o vremenu trajanja trudnoće od začeca, fiziologiji djetetovog i roditeljskog organizma te intrauterinim uvjetima u kojima je raslo. Prijevremeno rođena djeca obično imaju niže vrijednosti porodajne težine i dužine. Neka djeca koja su rođena mala za svoju gestacijsku dob pokazuju i kasnije u životu sklonost nižim vrijednostima težine i visine od djece čije su vrijednosti bile primjerene gestacijskoj dobi.

2.4.2.3. Opseg glave

U usporedbi s tijelom glava novorođenčeta relativno je velika. Kod odraslog čovjeka glava zauzima jednu sedminu ukupne visine tijela dok kod novorođenčeta zauzima oko jedne četvrtine. Opseg glave je mjera koja odražava veličinu mozga koja iznosi 25% veličine mozga odrasle osobe. Mozak intenzivno raste prvih 8 postnatalnih mjeseci tako da do 12 mjeseci doseže 75% veličine mozga odrasle osobe (Catwright, 2007.).

2.4.2.4. APGAR ocjena

APGAR ocjena je zbroj metoda procjene vitalnosti novorođenčeta unutar 10 min, (po potrebi i 20 min) po rođenju. 1952. godine na sastanku strukovnih udruženja američka anesteziologinja i pedijatrica Virginia Apgar predložila je novu jednostavnu metodu koja obuhvaća praćenje 5 parametara kojima se procjenjuju: A (engl. *Appearance*) boja kože, P

(engl. *Pulse*) kakvoća pulsa, G (engl. *Grimace*) tonus mišićne mase, A (engl. *Activity*) frekvencija srca i refleksna podražljivost i R (engl. *Respiration*) disanje.

Svaki od navedenih parametara boduje se ocjenom od 0-2, a njihov zbroj daje APGAR ocjenu vitalnosti novorođenčeta po rođenju i odgovora na reanimaciju. Ova procjena je prihvaćena do danas, a po njoj je i dobila naziv. Djeca koja imaju APGAR zbroj od 8-10 se u pravilu smatraju stabilnima i ne trebaju dodatne posebne mjere. Zbroj 4-7 označava djecu umjerenog rizika, a kada je zbroj manji od 3 djeca su visokog rizika s teško ometenim životnim funkcijama kojima su potrebne dodatne posebne mjere (Mardešić i sur., 2003.).

2.5. Hrvatski otoci Brač i Hvar

Hrvatska je zemlja 1000 otoka ili točnije 1244 otoka, otočića, hridi i grebena koji zauzimaju 5,8% površine hrvatskog kopna, a njih 50 stalno naseljeno. Svaki od njih nosi svoje specifičnosti. Osim što se neće određivati kopnom, otok se ne poistovjećuje ni sa susjednim otocima, "na Zemlji postoji više od 500.000 otoka. No, osim činjenice da su svi okruženi morem, ništa na njima nije jednako." (Skračić, 1997.). Na Braču se na 778 m nadmorske visine nalazi Vidova gora, najviši vrh na otoku, a ujedno i najviši otočki gorski vrh na cijelom Jadranu. Hvar je sa 67,5 km najdulji, a obzirom na razvedenost obale jedan od dva najrazvedenija hrvatska otoka. Oba otoka geografski pripadaju skupini srednjodalmatinskih otoka ali i najnapučenijim otocima (uz otoke Krk iz skupine kvarnerskih otoka i Korčulu koja spada u južnodalmatinske otoke) (Lajić i Mišetić, 2013.).

Život na otocima tijekom povijesti najčešće obilježavaju periodi bolesti, ratova i gladi koji utječu na fluktuaciju populacije koja živi na njima, ali ti vanjski utjecaji oblikuju genetičko naslijeđe izoliranih populacija pa one imaju svoje specifičnosti. Otok je kada ga se promatra s kopna izolirana zemlja bez povezanosti sa svijetom, osuđena na vječnu osamljenost (Perinić Lewis, 2017.).

Postoje varijacije unutar različitih populacija koje nastaju na različite načine. Stalan broj stanovnika i migracija uvjeti su koje je teško zadovoljiti, a genetička struktura je ovisna o migraciji potomaka i mjesta života roditelja. Unutar otoka postoje granice među otočnim naseljima koje se prostiru i kopnom i morem. Nekada su te granice vidljive svima u jeziku, običajima, mentalitetima, a katkada su znane samo otočanima. "Kada otočanin mora napustiti

svoje mjesto, kada najčešće iz egzistencijalnih razloga mora seliti u drugi kraj, lakše mu je donijeti odluku da živi na drugom kraju svijeta nego na drugom kraju Otoka." (Božanić, 1997.).

Starosjedioci su se bavili ribarstvom, uzgojem vinove loze i stoke sitnog zuba. Različite povijesno društvene kulturne situacije utjecale su na raseljavanje i naseljavanje određenih dijelova otoka. U nekim selima došljaci su bili dobrodošli dok su druga ostajala izolirana, a samim tim i sklonija određenim kompleksnim bolestima (Rudan i sur., 1999.). U pojedinim dijelovima su vrsta prehrane i način života uspijevali do neke razine održavati populaciju relativno zdravom. Istraživanja provedena na hrvatskim otocima pokazuju kako je i na njima sve veći postotak obolijevanja od metaboličkog sindroma (MetS). Populacija otoka Brača i Hvara predmet su antropoloških istraživanja već 50 godina i predstavljaju dobro definiranu populaciju za različite vrste istraživanja (Šarac i sur., 2022.).

2.5.1. Brač

Otok Brač je treći po veličini jadranski otok. Naziv mu dolazi od drevne ilirske riječi *brentos* što znači jelen. Rimljani su preuzeli taj naziv. Grci su otok nazivali *Elaphus* što ustvari znači jelenji otok. Ovaj otok je bio naseljen još u prapovijesnim razdobljima. Tako postoje nalazi iz epipaleolitičkog, mezolitičkog, brončanog, željeznog razdoblja. Nađene su i ladanjske vile iz antičkog doba. Slaveni su otok Brač počeli naseljavati u 6. i 7. stoljeću naše ere, a do XV. stoljeća naselja su bila u unutrašnjosti otoka zbog gusarskih napada, a uz obalu su se nalazili samo pastirski stanovi. Uspostavom vlasti Mletačke Republike od 1420. godine prestale su opasnosti od gusara pa su se od pastirskih stanova razvila nova naselja, a stara su se raselila (Hrv. Enc., 2013.). Bježeći pred invazijom Turaka sigurnost je na otoku Braču potražilo stanovništvo iz kontinentalnog dijela većinom Makarske krajine i Poljica. Neki su se miješali sa stanovništvom koje su zatekli na otoku, a neki su osnovali vlastita naselja što im je omogućilo zadržavanje privilegija oslobođenja plaćanja raznih daća, služenja na galijama i ostalih olakšica dobivenih od mletačke vlasti.

2.5.2. Hvar

Otok Hvar je površinom od 299,7 kvadratnih kilometara i dužinom od 67,8 kilometara naš najduži otok. Dijeli se na istočni i zapadni dio otoka koji se međusobno razlikuju po geografskom izgledu, ekološkim posebnostima i društvenom značenju koje proizlaze iz nje. Blaga klima omogućava bujnu floru i bavljenje poljoprivredom što uz ribarstvo omogućuje prehranu stanovništvu koji ga naseljava već od 4. tisućljeća prije naše ere u vrijeme visoke

neolitske kulture. Početkom 2. tisućljeća prije naše ere na Hvar su dospjeli indoeuropski narodi s područja Istočne Europe i Azije. Za Ilire koji su stigli krajem 3. tisućljeća prije Krista smatra se da su prekinuli razvoj hvarske neolitske kulture (Glamuzina i Fuerst-Bjeliš, 2015.).

Grčki kolonisti s egejskog otoka Parosa su 384. godine prije Krista osnovali grad Pharos na mjestu današnjeg Starog Grada. Pharos je imao gradsku jezgru i pripadajući agrarni teritorij koji su kolonisti međusobno podijelili tehnikom suhozida. Brojni arheološki nalazi svjedoče o bogatoj prošlosti življenja na tom prostoru gdje je postojala kovnica novca i proizvodnja keramike. Starogradsko polje i povijesna jezgra Staroga Grada su na UNESCO-voj Listi svjetske baštine (Hrv.Enc., 2013.).

Tijekom velike seobe naroda na dalmatinsko kopno doselili su Južni Slaveni, a između 7. i 8. stoljeća Hrvati su postupno zamijenili postojeće stanovništvo i naselili otoke. Tada je, gledajući kulturološki aspekt, Hvar koji je gotovo pet stoljeća bio pod Rimljanima postupno slaviziran.

Tijekom povijesti izmjenjivale su se vlasti na otoku od Bizanta preko Mlečana, bosanskih kraljeva i Dubrovačke Republike. Turski ratovi su izazvali velike migracije stanovništva iz kontinentalnih krajeva u Makarsko primorje i na otoke. Broj došljaka je rastao a posebno nakon pada Bosne 1463. godine i kandijskog rata od 1645. do 1669. godine. Narod je molio i dobio zemlju kako bi mogao normalno živjeti. Mletačka Republika trebala je ljude za obranu od Turaka pa je davala posebne privilegije tzv. "privilegije Paštrovića" novopridošlim obiteljima koje su oslobodile pridošlice plaćanja raznih daća, javnih radova i služenja na galijama te su imali privilegij uvoznih carina što je pojačalo animozitet starosjedilaca i došljaka. Obzirom da su se te privilegije gubile sklapanjem brakova sa starosjedilačkim stanovništvom to je utjecalo na reproduktivnu izolaciju otočana (Čolak, 1959.). Netrpeljivost i neprekidna borba između došljaka i starosjedilaca trajala je sve do dolaska francuske vlasti koja je 1804. godine ukinula sve privilegije.

Posljedice migracija za vrijeme turskih ratova su primjetne u kvalitativnim i kvantitativnim svojstvima otočne populacije. Starosjedioci pripadaju mediteranskom tipu. Većinom govore čakavskim dijalektom, pretežno se bave zemljoradnjom i obitavaju na zapadnom dijelu otoka. U jugoistočnom dijelu uglavnom obitavaju doseljenici koji izgledom liče dinarskom stanovništvu Makarskog primorja. Govore štokavskim dijalektom, pretežno se bave uzgojem smokava i vinogradarstvom, a manje ribarstvom. U 18. stoljeću iz Francuske je

na otok Hvar stigla i lavanda odakle se proširila na druge otoke i priobalje. Lavanda se danas smatra domaćom biljkom (Benyovsky Šoštarčić, 2010.). Od davnina su je koristili kao sredstvo za dezinfekciju, ublažavanje mnogih bolesti. Drevni Egipćani su je koristili za mumificiranje, a Arapi i Feničani su od nje pripremali parfeme.

Ekonomska kriza uvjetovana bolešću vinove loze krajem 19. i početkom 20. stoljeća natjerala je mnoge da odu s naših otoka u potragu za boljim životom. Mnogi su se tako odselili u daleku Australiju i Ameriku, a na otocima je ostala populacija intrigantna istraživačima raznih područja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORAK

Kohortna studija rođenih na istočnojadranskim otocima (CRIBS) je prva kohortna studija u jugoistočnoj Europi, obavljena u sklopu istoimenog projekta Hrvatske zaklade za znanost (UIP-214-09-6598). Provedena na reprezentativnom uzorku sudionica i njihove djece do dvije godine starosti iz priobalnog područja Splita i okolice i pripadajućih otoka Brača i Hvara, s ciljem procjene prevalencije poznatih čimbenika rizika (bioloških, ekoloških i ponašajnih) za MetS u populaciji Splitsko-dalmatinske županije konkretno, otocima Braču i Hvaru te priobalju Splitu i okolici. Ove populacije su odabrane zbog visoke prevalencije MetS-a koja je utvrđena u prethodnim istraživanjima otočnih populacija (Deka i sur., 2012.).

Uzorak je odabran metodom sustavnog slučajnog uzorkovanja među trudnicama za vrijeme trajanja projekta u razdoblju između studenog 2015. i listopada 2018. godine. Ispitanice su uključene u liječničkim ginekološkim ordinacijama i Klinici za ženske bolesti i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Split. Na prvom posjetu ginekologu sve trudnice su bile informirane o ciljevima studije. Uključivanje u istraživanje je bilo dobrovoljno u razdoblju od 12-14 tjedna trudnoće. Sve sudionice su potpisale informirani pristanak. Kriteriji za uključivanje bili su: trudnica starija od 18. godina, jednoplodna trudnoća nakon 12. tjedna, začće prirodnim putem. Kriteriji za isključivanje iz istraživanja bili su: dijagnosticirana akutna ili kronična medicinska stanja (bubrežne, endokrine, neurološke, psihijatrijske, infektivne ili kardiovaskularne bolesti, rak), višeplodna trudnoća, krvarenje u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće, trudnoća s predležecom posteljicom nakon 26. tjedna gestacije, insuficijencija cerviksa ili povijest pobačaja. Djeca su po rođenju prvi puta uključena u istraživanje. U njihovo ime informirani pristanak su potpisale majke.

Kroz šest upitnika prikupljeni su opsežni podaci. Od toga dva upitnika ispunjavale su ispitanice za vrijeme trudnoće, a četiri nakon rođenja djeteta. Upitnici su sadržavali sveobuhvatna pitanja o obitelji, demografiji, socioekonomskim obilježjima, rodoslovlju, prehrani, ponašanjima vezanim uz zdravlje i psihosocijalnim obilježjima. Iz navedenih upitnika koristili smo podatke o geografskoj lokaciji i godinu rođenja. Podaci o tjelesnoj visini i težini upisani su u trudničku knjižicu od strane medicinskog osoblja nakon potpisivanja informiranog pristanka. Podaci o antropometrijskim mjerama novorođenčadi prikupljeni su iz medicinske

dokumentacije. Sve ispitanice su se porodile u Kliničkom bolničkom centru Split.

Vrijednosti preBMI izračunate su iz vrijednosti o visini (cm) i težini (kg) prije trudnoće koje su prijavile same ispitanice. Ti podaci su uspoređeni s mjerama koje su uzete u zdravstvenoj ustanovi od strane medicinskog osoblja prilikom prvog prenatalnog posjeta. BMI je analiziran kao kontinuirana varijabla.

Uzorak krvi uzet je tijekom redovnog zdravstvenog kontrolnog pregleda. U Laboratorijima zdravstvene skrbi domova zdravlja Brač i Hvar te u Kliničkom bolničkom centru Split iz pune venske krvi je nakon uzorkovanja odvojena plazma kod mama te iz pupčane vrpce novorođenčadi u Kliničkom bolničkom centru Split nakon poroda. Biološki uzorci su čuvani u hladnjacima Zavoda za medicinsko-kemijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split. Uzorci su potom transportirani do Biobanke Instituta za antropologiju u Zagrebu gdje su skladišteni na temperaturi od -80 °C. Svi uzorci su dodatno šifrirani slučajnim odabirom. Potrebna količina od 1 ml plazme ili seruma odvojena je za provedbu analize koncentracije kortizola. Od sveukupno 360 dostupnih uzoraka plazme i seruma, plazma je činila 337 uzoraka od čega je 188 bilo s Brača i Hvara, a 149 iz Splita i okolice. Kako bismo povezali razine kortizola s metilacijom *NR3C1* gena, između uzoraka mama za koje smo odredili razinu kortizola tražili smo dostupne DNA mama i beba. Od dostupnih uzoraka DNA, bilo je 40 dijada mama-beba.

Provedeno istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju (Ur. broj: 1.14-20211313) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. broj: 380-59-10106-21-111/226, Klasa: 641-01/21-02/01).

3.1.1. Plazma i serum

Krvna plazma i krvni serum se međusobno razlikuju utoliko što plazma sadržava faktore zgrušavanja od kojeg je najvažniji fibrinogen i krvne stanice. Plazma je tekući dio krvi koji preostaje nakon centrifugiranja krvi s antikoagulansom i volumenom čini 60% ukupne krvi. Serum je defibrinirana plazma (Medicinski leksikon, 1992.).

Od ukupnog broja 360 bioloških uzoraka za 17 uzoraka bila je dostupna i plazma i serum, a za 21 uzorak samo serum. Usporednom analizom uzoraka za koje je postojala i plazma i serum nije pronađena korelacija pa podaci dobiveni analizom seruma nisu korišteni za daljnje analize. Konačni broj analiziranih uzoraka plazmi za analizu kortizola je 337. Uzorci su se

očekivano međusobno jako razlikovali po boji i viskoznosti ali nije uočena poveznica između vizualnog izgleda i koncentracije kortizola.

3.1.2. DNA

Od ukupnog uzorka 40 dijada mama-beba dobiveni su rezultati metilacije DNA za 37 dijada. Za tri dijade sekvence nisu bile čitljive pa su izuzete iz daljnje analize.

3.2. Kemikalije i pribor

3.2.1. Kemikalije potrebne za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Kemikalije korištene za pripremu mobilne faze:

- metanol MeOH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- tetrahidrofuran (THF) (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu standardnih otopina:

- hidrokortizon čistoće 98,9% (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- 6-alfa prednizolon čistoće >98% (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za ekstrakciju:

- natrij hidroksid (NaOH) u granulama (Merck)
- metanol MeOH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- diklormetan (DCM) (Honeywell, Njemačka)
- dušik (Messer)

3.2.2. Kemikalije potrebne za određivanje metilacije 1F promotora *NR3C1* gena:

- Zymo Taq Premix (Zymo Research, kat br E2004, Njemačka)
- Dream Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Litva, kat br EP0701)
- GoTaq Polymerase (Promega, kat br M3001, SAD)
- H₂O bez nukleaza (bez DEPC) (Ambion, SAD)
- agaroz (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

- AmpliTaq DNA polimeraza (250 U, 5 U/μL (Applied Biosystems, SAD)
- Pufer za nanošenje (6 x koncentriran, TaKaRa, kat br 9156)
- SYBR™ Safe boja za gel (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
- 0,5 x TBE pufer: 45 mM TRIS baza (C₄H₁₁NO₃), Mr = 121,14 (Applichem GmbH, Njemačka) 45 mM Borna kiselina (H₃BO₃), Mr = 61,83 (Gram-Mol, Hrvatska) 1 mM EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ X 2H₂O) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) d H₂O
- TE pufer pH 8.0 (Ambion, SAD)

Komercijalni kompleti:

- EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, kat br D5005, Njemačka)
- EZ-96 DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, kat br D5007, Njemačka)

3.2.3. Tehnička pomagala i pribor:

- sustav HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, SAD):
 - kvaterna pumpa Agilent G7111B
 - injektorski modul Agilent Q7129A s petljom za ubrizgavanje od 100 μL
 - UV-DAD detektor Agilent Q7115A
- analitička kolona Waters Symmetry C18, veličine pora 100 Å, 5 μm, dimenzija 150 mm x 4.6 mm, (WAT 045905) s predkolonom Waters C18 (Waters Corporation, Velika Britanija)
- centrifuga Micro 21 R (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- vortex genius 3 (IKA, Njemačka)
- vortex LLG labware (uniTEXER, Njemačka)
- mješalica IKA®KS 130 basic (IKA, Njemačka)
- digitalna vaga, EG 220-3NM, d = 0,001 g: 220 g (Kern, Njemačka)
- uparivač sa strujom dušika REACTI-THERM I#TS-18822 (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- automatska pipeta (HandyStep electronic, BRAND, Njemačka)
- BioSpec-nano spektrofotometar (Shimadzu, Japan)
- PCR uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD)
- qPCR uređaj qTower3 (Analytik Jena, Njemačka)

3.3. METODE

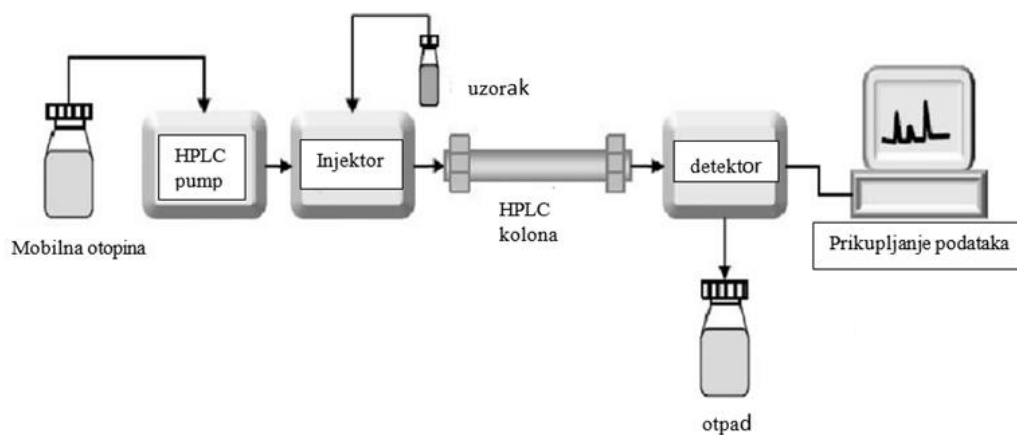
3.3.1. Metoda za analizu kortizola Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High performance Liquid Chromatography*; HPLC)

Početak dvadesetog stoljeća ruski botaničar Michail Semjonowitch Tswett je primijenio tehniku za separaciju otopine biljnih pigmenta, klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Pokus je rezultirao odijeljenim sastojcima na koloni u obliku obojenih vrpca prema kojima je primijenjena tehnika dobila ime kromatografija (grč. *chroma* = boja i *graphein* = pisati) (Altova i sur., 2022.).

1941. godine, A. J. P. Martin i R. L. M. Synge su u *Biochemical Journal*-u objavili rad pod naslovom „A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases“. U radu su opisali kako su koristili silikonske male čestice s vodom kao nepokretnu fazu, a druga tekućina, organsko otapalo kloroform, je tekla kroz kolonu. Na taj način su uspjeli odvojiti komponente smjese. Te komponente su se ovisno o afinitetu prema nepokretnoj fazi širile i postajale sve više udaljene jedna od druge toliko da su se mogle odvojeno prikupiti nakon prolaska kroz kolonu. Ovaj novi oblik kromatografije je mogao dovesti do učinkovitog odvajanja. Za svoj rad su 1952. godine dobili Nobelovu nagradu za kemiju (Whelan, 2001.; Hall, 2019.). Vremenom se metoda razvijala, a aparati su postajali sve složeniji.

3.3.1.1. Sastavni dijelovi HPLC-a

Osnovni dijelovi HPLC kromatografskog sustava su: spremnici otapala, komore za miješanje otapala pokretne faze, pumpa i otplinjač (*degaser*), sustav za unošenje uzoraka (injektor), predkolona ili zaštitna kolona (engl. *guard column*), analitička kolona, detektor te sustav za obradu podataka (Slika 5.). Predkolona nije neophodna ali je njena uloga, kao zaštitne kolone koja zaustavlja nečistoće, neupitna u očuvanju funkcionalnosti i dugotrajnosti analitičke kolone.



Slika 5. Shematski prikaz principa rada HPLC kromatografa. Prilagođeno iz Ali AH, 2022.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je složena analitička metoda odjeljivanja i analiziranja tvari koja se zasniva na različitoj apsorpciji sastojaka na prikladnom apsorbensu. Zbog visoke osjetljivosti i analize širokog spektra, koristi se i za analizu nekih bioloških uzoraka. Kromatografski sustav Agilent 1260 Infinity II je sastavljen od kvaterne pumpe (Agilent G7111B), injektorskog modula (Agilent Q7129A) s petljom za ubrizgavanje od 100 μL i UV-DAD detektora (Agilent Q7115A). Koristila sam analitičku kolonu Waters Symmetry C18, veličine pora 100 Å, 5 μm , dimenzija 150 mm x 4.6 mm, (WAT 045905) s predkolonom Waters C18.

Tri su glavna koraka koja se odvijaju u HPLC-u: razdvajanje, identifikacija i mjerenje. Osnovni principi rada HPLC-a se sastoje od injektiranja uzorka (analita) koji je otopljen u prikladnom otapalu i ubrizgava se automatski u protok mobilne faze. Otapala koja se koriste trebaju biti visoke čistoće (HPLC čistoća). Potom ga visokotlačna pumpa tjera zajedno s mobilnom fazom koja struji kroz kolonu pri kontroliranoj brzini protoka. Predkolona zadržava nečistoće a kolona pruža kontrolirano okruženje za interakciju između mobilne i stacionarne faze. Sastav mobilne faze je ključan za postizanje optimalnog odvajanja komponenata. Komponente iz uzorka se odvajaju na temelju razlike u interakciji sa stacionarnom fazom koja je fiksirana u koloni dok se mobilna faza s analitom kreće kroz stacionarnu fazu. Na proces separacije utječu dimenzije kolone i gustoća pakiranja čestica stacionarne faze. Eluirane komponente se detektiraju osjetljivim detektorom koji generira signal proporcionalan koncentraciji analita. Rezultat detekcije je kromatogram koji daje vizualni prikaz razdvajanja i

iščitava retencijsko vrijeme odnosno vrijeme za koje će analit proći kroz kromatografski sustav. Procesor podataka isto tako daje kvantitativnu analizu komponenti analiziranog uzorka.

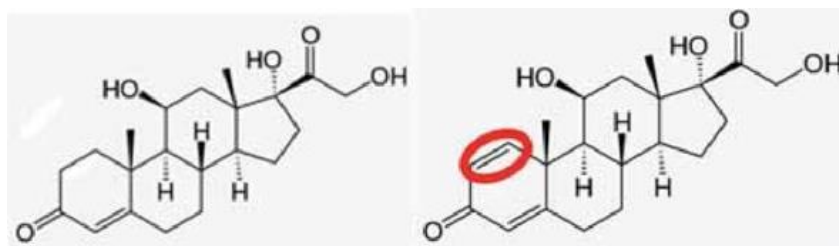
3.3.1.2. *Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)*

Za razdvajanje u tekućinskoj kromatografiji, korištena je tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. *reverse-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). Mobilna faza je polarna sačinjena od jednog ili više organskih otapala, vode odnosno pufera dok je stacionarna faza nepolarna. Stacionarnu fazu čini najčešće silikagel na koji je kemijski vezana faza. Kod ovako postavljenog kromatografskog sustava iz kolone najprije izlazi najpolarnija komponenta analita, a slijedi ju manje polarna komponenta. Zadržavanje polarnih analita je jače što je manji udio organskog otapala u mobilnoj fazi (Skoog i sur., 2014.).

Razdvajanje analita može bit izokratno ili gradijentno. Razlika je što se kod gradijentnog razdvajanja koriste više otapala uz promjenjivi udio otapala koja se miješaju u mobilnoj fazi dok se kod jednostavnije izokratne metode upotrebljava jedno otapalo ili nepromjenjiva mješavina otapala.

3.3.1.3. *Upotreba internog standarda (IS)*

Unutarnji ili interni standard (IS) je kemijski spoj koji se dodaje u istoj koncentraciji svim uzorcima, slijepoj probi i standardnim otopinama (kalibratorima), tijekom pripreme za ekstrakciju. Glavni kriterij za odabir IS se temelji na rezoluciji – spoj ne smije biti prirodno prisutan u analiziranom uzorku, ne smije imati interakciju s njim te se mora dobro razdvajati od traženog analita. U uzorak se dodaje prije bilo kakvog predtretmana kako bi sve varijacije tijekom samog procesa ekstrakcije utjecale na analit i IS na isti način. Korištenjem IS omogućuje se identifikacija nasumičnih i sustavnih pogrešaka tijekom analize čime se pospješuje preciznost rezultata. U odabranoj metodi, koristi se 6- α prednizolon. Kemijski gledano standard kortizola hidrokortizon i IS (6- α prednizolon) se razlikuju samo u dvostrukoj vezi na prvom ugljikovom atomu (Slika 6.) te odvajanje ova dva spoja jako ovisi o instrumentu HPLC-u i C18 koloni.



Slika 6. Struktura kortizola (hidrokortizon, $C_{21}H_{30}O_5$) i prednizolona (IS, $C_{22}H_{30}O_5$). Razlikuju se u dodatnoj dvostrukoj vezi na prvom ugljikovom atomu prednizolona. Slika preuzeta iz Williams, 2016.

3.3.1.4. Priprema standardnih otopina

Za pripremu standardnih otopina koristila sam: hidrokortizon čistoće 98,9% proizvođača Sigma-Aldrich za standardne otopine kortizola i 6- α prednizolon čistoće >98% istog proizvođača za standardnu otopinu internog standarda (IS). Za oba standarda koristila sam vodu HPLC čistoće proizvođača Honeywell.

Kako bi kreirala kalibracijsku krivulju pripremila sam standardne otopine kortizola početne (stock) otopine koncentracije 125 $\mu\text{g/mL}$ tako da sam izvagala masu potrebnog standarda u aluminijskom šeširiću za vaganje. Odvagu standarda sam otopila u potrebnom volumenu vode HPLC čistoće. Na isti način sam pripremila otopinu internog standarda (IS). Za 1 molarnu (1M) otopinu natrijevog hidroksida sam izvagane granule otopila u vodi. Potrebni volumeni i odvage su navedeni u tablici 2.

Tablica 2. Priprema koncentriranih otopina IS-internog standarda (6- α prednizolona), kortizol standarda (hidrocortizona) i natrij hidroksida (NaOH) potrebnih za ekstrakciju uzoraka plazme.

	STOCK otopine	masa (mg)	volumen (mL)	Krajnja koncentracija
Otopiti u MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	IS Interni standard	4,25	20	212,5 $\mu\text{g/mL}$
	kortizol	2,5	20	125 $\mu\text{g/mL}$
Otopiti u H ₂ O	NaOH	199	50	0,1 M

Kalibratori su standardne otopine kortizola poznatih koncentracija koji su pripremljeni razrijeđenjima početne otopine, a kalibrator 5 (K5) je pripremljen u dvije probe. Izabran je K5 jer je koncentracija kortizola u uzorcima najbliža toj vrijednosti. Pripremanje koncentracije K5 u dvije probe služi kao dodatna kontrola kalibratora i samog procesa ekstrakcije. Osim kortizola i otopina internog standarda (IS) je razrijeđena kako je navedeno u tablici 3.

Tablica 3. Priprema razrijeđenja otopina IS-internog standarda (6- α prednizolona) i kortizol standarda (hidrokortizona) za kalibracijsku krivulju.

razrijeđenja								
	mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/mL	ng/mL
IS	1	100	2	50			0,000085	85
Kortizol								
K1	5	100	2	50	1	20	0,0000125	12,5
K2					1	10	0,000025	25
K3					2	10	0,00005	50
K4					4	10	0,0001	100
K5						0,00025	250	
K6			4			0,0005	500	
K7			8			0,001	1000	
Radna otopina	WS1		WS2		WS3			

Uspostavila sam metodu analize kortizola slijedeći protokol kako je opisan u radu Piwowska i suradnici (2012.) uz manje modifikacije koje se odnose na radnu otopinu internog standarda i volumen uzoraka. Vidljivost internog standarda nije bila zadovoljavajuća kada je dodan volumen 50 μ L radne otopine 2 (WS2, c=85 ng/mL) kako je u navedenom protokolu. Testirala sam više različitih volumena i radnih otopina te se usuglasili da najbolje funkcionira radna otopina WS1, c=2,125 μ g/mL. Obzirom na volumen uzoraka plazme koji nam je bio dostupan, koristila sam 250 umjesto 500 μ L navedenih u protokolu kako bi imali mogućnost ponavljanja u koliko bi bilo potrebno.

Potrebne otopine i njihovi volumeni udjeli za pripremu diluenta u kojem sam otopila kalibratore i ekstrahirani suhi talog kortizola u vijalama nakon uparivanja u struji dušika mobilne otopine koja je provodila uzorak do analitičke kolone te otopine za čišćenje kolone i injekcijske igle su navedene u tablici 4.

Tablica 4. Priprema otopina diluenta, mobilne faze te čišćenje kolone i injekcijske igle.

	MeOH	HPLC voda	Tetrahidrofur- THF
Diluent	1	1	
Mobilna (pokretna) faza	40	44	1
Otopina za čišćenje kolone i injekcijske igle	9	1	

3.3.1.5. Ekstrakcija tekuće-tekuće

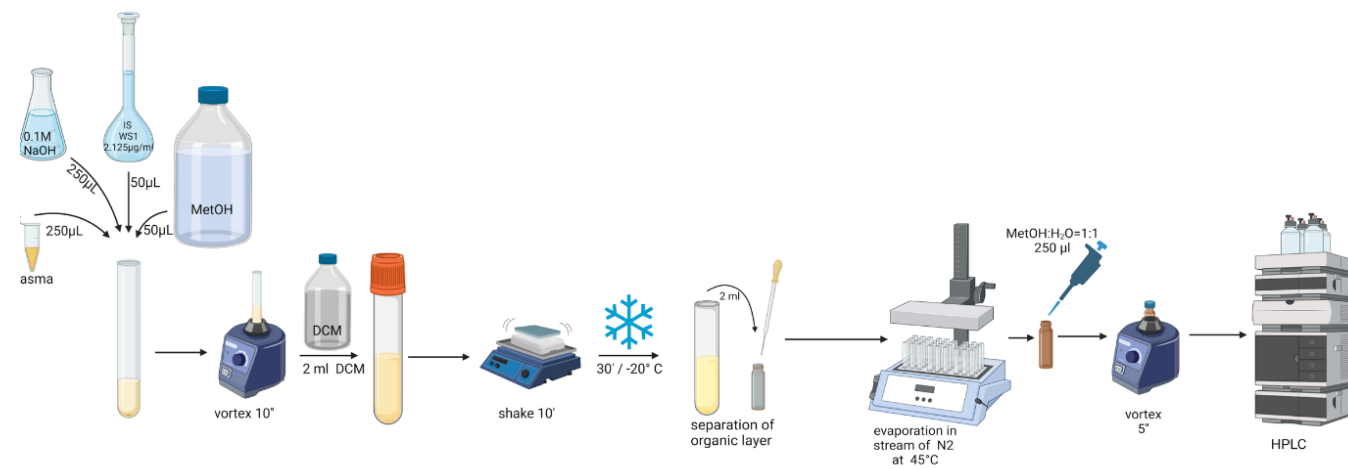
Kod ekstrakcije tekuće-tekuće imamo dvije tekuće faze koje se ne miješaju. Najčešće su to vodeno i organsko otapalo u kojima se sastavnice analita raspodjele. Kod odabira otapala važno je paziti da otapala budu inertna odnosno da ne reagiraju s tvarima koje ekstrahiraju. Tražena tvar se otapa ili u organsku ili u vodenoj fazi dok većina ostalih komponenti ostaje u drugoj fazi.

Uzorke plazme sam odmrznula na sobnoj temperaturi i kratko vorteksirala (par sekundi) kako bi se uzorak homogenizirao. U staklene označene epruvete volumena 15 ml sam otpipetirala po 250 μ L plazme te im automatskom pipetom dodavala po: 250 μ L NaOH (0,1 M); 50 μ L MeOH; 50 μ L IS WS1 ($c=2,125 \mu\text{g/mL}$). Na isti način je pripremljeno i svih sedam koncentracija kalibratora s tim da sam kalibrator 5 pripremila svaki put u dvije probe. Volumen svakog od kalibratora za kalibracijsku krivulju je 500 μ L, a dodano je po 100 μ L IS WS1 ($c=2,125 \mu\text{g/mL}$). Smjesu sam vorteksirala 10 sekundi te u nju dodala 2 ml diklormetana (DCM) i dobro zatvorila plastičnim pripadajućim čepovima.

DCM je organsko otapalo koje služi za ekstrakciju kortizola iz plazme. Kortizol je topiv u DCM-u dok njegovi metaboliti zaostaju u vodenom sloju koji se odvaja kao nadsloj. Kako bi se što bolje ekstrahirao kortizol epruvete su pretresene na miješalici (IKA, Njemačka) 10 min nakon čega su bile 30 min u zamrzivaču na -20°C kako bi se lakše razdvojili vodeni nadsloj i organski sloj DCM s otopljenim kortizolom. Staklenom kapaljkom sam ušla kroz formirani обруч vodenog sloja i odvojila organski sloj u staklene HPLC viala za analizu. Volumen organskog sloja odgovara dodanom volumenu DCM-a oko 2ml.

Otopljen kortizol u DCM-u sam uparavala pod protokom dušika pri temperaturi od 45°C do suha. Obzirom da je sada kortizol zalijepljen za stijenke viala suhi ostatak koji sadrži kortizol se otapa (resuspendira) u 250 μ L diluenta (MeOH: H₂O, 1:1, v/v). Slijedi kratko vorteksiranje kako bi se sav suhi ostatak otopio.

Uz navedene kalibratore u sedam koncentracija treba pripremiti slijepu probu (B-blank). Slijepa proba je diluent, otopina u kojoj su rastopljeni uzorci. Kako bi imali referentno retencijsko vrijeme (RT) za IS koristimo diluent sa internim standardom (B+IS). Isti postupak slijedi za kalibratore, slijepu probu bez i sa IS. Prije analiziranja je potrebno još pripremiti vialu samo sa diluentom, koji nije prošao proces ekstrakcije i služi kao dupla slijepa proba, kako bi se detektirali pikovi na kromatogramu koji ne potječu od traženog analita iz uzorka (Slika 7.).



Slika 7. Shematski prikaz ekstrakcije kortizola iz uzorka plazme te priprema za HPLC analizu. Kreirala u programu BioRender.

3.3.1.6. Prilagodbe metode po Piwowarskoj i validacija metode

Prema Piwowarskoj (2012.), kromatografsko izokratno odvajanje sam napravila s metanol: voda: tetrahidrofur (THF)= 100: 110: 2,5; v/v/v. Volumen injektiranja uzorka je bio 100 µL, kolona je održavana na sobnoj temperaturi 25°C, a vrijeme rada je bilo 18 minuta. Detekcija valnih duljina je bila postavljena na 252 nm i 254 nm kako je navedeno u tablici 6. Vrijeme zadržavanja kortizola je bilo RT= 7,17 min i RT= 12,9 min za interni standard (IS, 6- α prednizolon). Primijenjeni kromatografski uvjeti nalaze se u tablici 5.

Tablica 5. Kromatografski uvjeti.

Kromatografska kolona	Waters Symetry C18 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m
Mobilna faza	Metanol: voda: tetrahidrofur (100:110:2.5, v/v/v) 100 mL: 110mL: 2,5 mL izokratna metoda
Otopina za pranje injekcijske igle	Metanol:voda (9:1, v/v) 90 mL: 10 mL
Protok	1,35 mL/min
Vrijeme analize	18 min
Post run	7 min 3 min pranje u metanolu + 4 min ekvilibracija u mobilnoj fazi
Temperatura kolone	Sobna temperatura
Volumen injektiranja	100 μ L
Valne duljina očitavanja UV/VIS	252 nm \pm 12 nm za kortizol 243 nm za 6- α -metilprednizolon
Interni standard	6- α -metilprednizolon

U odnosu na metodu po Piwowarskoj prilagođen je volumen i koncentracija internog standarda koji sam koristila kod pripreme uzoraka te protok.

3.3.1.7. Identifikacija pikova

Obzirom da smo na kromatogramu imali očitane pikove unutar prvih 5 minuta analizirali smo pojedinačno svaku sastavnicu korištenih otopina kako bi ustanovili da li očitavanja koja vidimo na kromatogramu dolaze od naših uzoraka ili otopina u kojima su uzorci diluirani. U vijale sam ulila po 1 mL otopina i pustila kroz program metode za analizu uzoraka kortizola. Obzirom na sastav otopina, volumene za testiranje sam prilagodila kako je navedeno u tablici 6.

Tablica 6. Testiranje otopina korištenih za analizu kortizola.

Otopina	Sastav	RT / min	Volumen injektiranja
Mobilna faza	Metanol: voda: tetrahidrofuran (40:44:1)	4	100 μ L
THF	Tetrahidrofuran	1.5 – 4.5	2 μ L
MeOH	Metanol	1,5; 2,5; 3,8-4,2	2 μ L
H ₂ O	Voda	1,5 – 4,7	100 μ L
diluent	metanol: voda (1:1)	1,5 – 4,7	100 μ L

Obzirom da su se pikovi za kortizol i IS javljali u dovoljno odmaknutom RT da su jasno mogli biti uočeni i izmjereni ovaj test je poslužio kako bi potvrdili izvor šumova koji su se javljali unutar prvih 5 min.

Kako bi se spriječila kontaminacija nakon injektiranja svakog uzorka za analizu programirali smo kratko pranje u metanolu u trajanju od 3 min kako bi se isprali eventualni ostaci uzorka s kolone. Dodali smo i ekvibraciju u trajanju od 4 min kako bi se kolona pripremila za ponovno vožnju uzoraka izokratnom metodom u mobilnoj fazi koju koristimo.

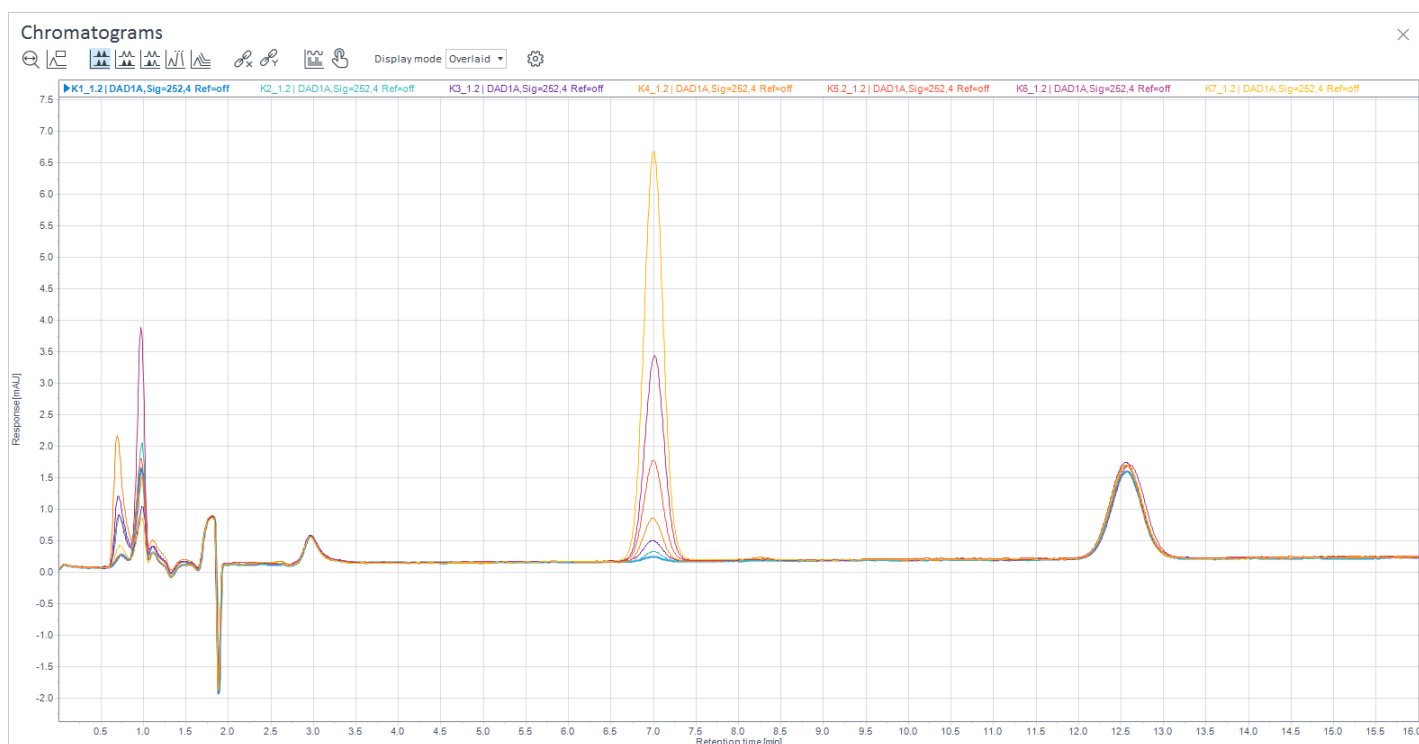
3.3.1.8. Validacija metode

Nakon višekratnog testiranja, validirali smo metodu kroz tri uzastopna dana. detektirajući iste vrijednosti za svaku provedenu analizu na kalibratorima i kontroli. Validacija je postupak kojim se određuje je li određena metoda prikladna za analizu željenog analita. Validacija osigurava veću pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Svaku metodu prije korištenja treba validirati. To se ne odnosi samo na metode koje nove uvodimo već i na metode razvijene u vlastitom laboratoriju, a želimo ih primijeniti na novom uređaju, izvode je različiti analitičari ili modificiramo neku postojeću metodu kao što je to ovdje bio slučaj. Da bi validacija bila dobro provedena treba omogućiti iste uvjete kako za kalibratore tako i za uzorke. Potrebno je imati uvijek dovoljan broj kalibracijskih standardnih otopina u dostatnom rasponu koncentracija. Isto tako treba paziti na stabilnost otopina koje se koriste kao standardi.

Selektivnost metode je zadovoljena kada je prisutno dobro razlučivanje i simetrija pikova spojeva analita od interesa. *Linearnost* kao komponenta validacije se određuje mjerenjem odziva signala na različite poznate koncentracije standarda, a procjenjuje se grafički i matematičkom formulom $y=a \cdot x+b$ jednadžbe pravca. Ukoliko je koeficijent korelacije ≥ 0.98 smatra se da je linearnost metode zadovoljena. Za *preciznost* metode, odnosno ponovljivost, potrebno je dobiti iste rezultate uzastopnim testiranjem ako su uzorci i standardi manipulirani

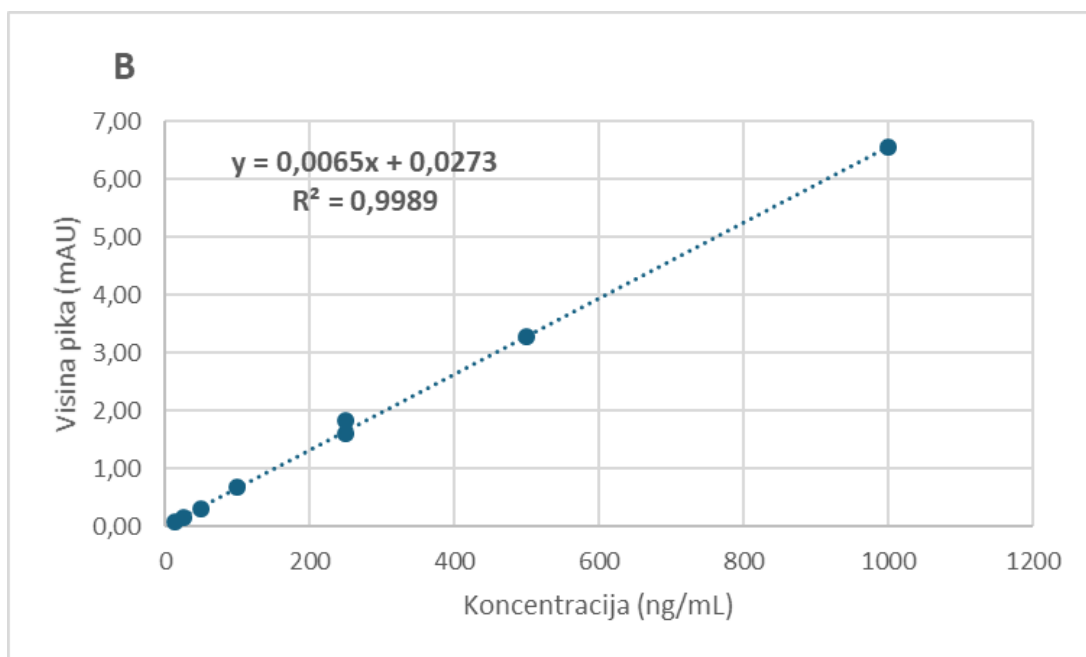
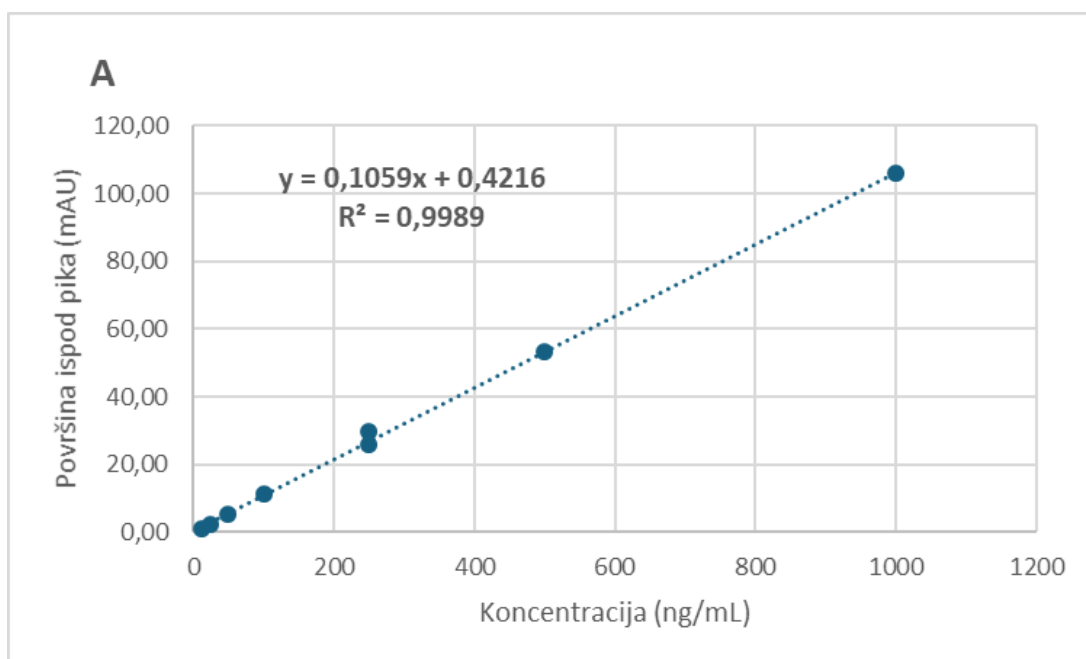
na isti način. Analizu smo proveli u tri uzastopna dana. Svaki put smo analizirali svih 7 koncentracija kalibratora, slijepu probu s IS (B+IS ex), slijepu probu (B ex) i neekstrahiranu slijepu probu (B neex). Prvi dan smo analizirali navedeno tri puta, a potom iduća dva dana po jedan put. Rezultat preciznosti izražava se kao prosjek postotaka relativne standardne devijacije (%RSD) za svih 7 koncentracija analita.

Dobro razlučivanje i simetrija pikova spojeva kortizola i prednizolona u smjesi standardnih otopina ukazuje na zadovoljavajuću selektivnost metode. To je vidljivo i iz Slike 8. koja prikazuje preklapljene kromatograme smjesa 7 različitih koncentracija standardnih otopina.



Slika 8. Preklapanje kromatograma svih 7 različitih koncentracija standarda kortizola i preklapanje IS dodanog u istoj koncentraciji u svim uzorcima.

Linearnost sam izračunala iz kalibracijskih krivulja površine i visine pika pojedinog analita ovisno o odgovarajućoj koncentraciji (Slika 9.). Uzela sam srednju vrijednost površine i visine pika za svaku koncentraciju određena u triplikatu te s njima radila krivulju standarda. Linearnom metodom najmanjih kvadrata sam odredila nagib, presjek i koeficijent korelacije. Kalibracijska krivulja pripremljena sa 7 različitih koncentracija pokazuje dobru linearnost, to jest koeficijent korelacije je, (R^2) >0,99.



Slika 9. Linearnost izračunata iz kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti površine pika (slika **A**) i visine pika (slika **B**) o koncentraciji standardnih otopina kortizola u koncentracijama od 12,5; 25; 50; 100; 250, 500 i 1000 ng/mL.

Metoda je pokazala dobru preciznost. Relativne standardne devijacije (%RSD) svih 7 koncentracija kortizola prikazane su u tablici 6., većina je $\leq 5\%$.

Tablica 6. Relativne standardne devijacije 7 koncentracija kortizola.

standard	koncentracija	RSD površine ispod pika	RSD visina pika
K1	12,5	6%	4%
K2	25	3%	2%
K3	50	3%	3%
K4	100	2%	3%
K5.1	250	1%	3%
K5.2	250	0%	3%
K6	500	0%	3%
K7	1000	0%	3%

3.3.1.9. Pribor – plastika vs staklo

Obzirom na dostupnost plastičnih konusnih epruveta s čepom probali smo ih koristiti za prve testne ekstrakcije kortizola. Ekstrakcija se pokazala uspješnom. Promjenom dobavljača plastičnih epruveta, sljedeći isti postupak ekstrakcije, pojavilo se dodatni pik na kromatogramima. Kako bi bili sigurni da dodatni pik potječe od plastičnih epruveta napravila sam usporedni test istovremene ekstrakcije kortizola svih koncentracija, slijepe probe (diluenta) i dva uzorka u plastičnim i staklenim epruветama. Zbog pikova nepoznatog porijekla u plastičnim epruветama, a bez obzira što se javljalo uvijek u istom RT bez preklapanja s analitima, odlučili smo se za staklene epruветe. Retencijska vremena koja smo dobili usporednom analizom u plastičnim i staklenim epruветama za slijepe probe, kalibratore i dva uzorka plazme za kortizol i IS su navedeni u tablici 7.

Tablica 7. Testiranje staklenih i plastičnih epruveta za ekstrakciju kortizola iz uzoraka plazme po prilagođenoj metodi po Piwowarkoj.

uzorak	Staklene epruvete			Plastične epruvete		
	RT kortizol		RT IS	RT kortizol	RT* ?	RT IS
Blanck/diluent	9,8		17,77	9,53	12,8	17,18
K1	9,7		17,53	9,53	12,8	17,16
K2	9,67		17,43	9,53	12,8	17,19
K3	9,62		17,35	9,53	12,8	17,18
K4	9,59		17,28	9,53	12,8	17,18
K5.1	9,56		17,23	9,52	12,8	17,18
K5.2	9,55		17,20	9,53	12,8	17,18
K6	9,54		17,19	9,53	12,8	17,13
K7	9,47		17,14	9,52	12,8	17,09
CRIBS 003	9,54		17,17	9,55	12,8	17,19
CRIBS 134	9,55		17,20	9,54	12,8	17,17

* Retencijsko vrijeme (RT) u kojem je HPLC očitao pik nepoznatog porijekla samo u plastičnim epruvetama za koji pretpostavljamo da je spoj nastao reakcijom plastike i DCM-a.

Nadalje, oblik epruveta je također utjecalo na efikasnost razdvajanja. Većina dostupnih komercijalnih staklenih epruveta imaju okruglo dno. Pri pipetiranju razdijeljene organske faze sa dna od vodenog nadsloja ekstrahiranih kalibratora i uzoraka u staklenim epruvetama okruglog dna je bilo jako zahtjevno. Kod kalibratora je poteškoću stvaralo vizualno raspoznavanje faza koje je bilo otežano zbog okruglog dna. Kod uzoraka su se faze bolje razaznavale jer je vodeni nadsloj mutan i u nijansama bjelkaste, žućkaste, bež boje dok je donji organski sloj kortizola otopljenog u DCM-u bio proziran. Okruglo dno je otežavalo prikupljanje cijelog organskog sloja jer je bio raširen po dnu epruvete. Rješenje je bilo u ručno rađenim staklenim konusnim epruvetama dovoljno širokim za lakše pipetiranje s dobro prijanjajućim čepom. Širina je pospješila da se nadsloj formira u obliku prstena uz rub te je prijanjanje nadsloja uz staklenu kapaljku minimalizirano, a konusno dno je omogućilo da se organski sloj cjelokupnije odpipetira u vialu.

3.3.1.10. Određivanje koncentracije kortizola

Nakon provedene HPLC analize kortizola u uzorcima plazme trudnica, kreirala sam kalibracijsku krivulju ovisnosti omjera visine pika analita u uzorku i visine pika IS o koncentraciji standardnih otopina za svaku turu. Zatim sam pomoću jednadžbe pravca određivala koncentracije kortizola u uzorcima te izražavala kao ng kortizola po mL plazme.

3.3.2. Analiza metilacije DNA

3.3.2.1. Metoda ekstrakcije DNA isoljavanjem

Koristila sam uzorke DNA iz Biobanke Instituta za antropologiju, prethodno izolirana u sklopu projekta CRIBS. DNA je ekstrahirana iz uzoraka krvi, u tu svrhu koristila se metoda isoljavanja opisana od Miller-a i suradnika 1988. Metoda uključuje isoljavanje (engl. *salting out*) staničnih proteina dehidracijom i precipitacijom u zasićenoj otopini natrijevog klorida (NaCl). Često se koristi jer je jednostavna, brza i sigurna metoda. Slojevi stanica s jezgrom koji su dobiveni iz antikoagulirane krvi (u epruvetama sa EDTA-kemikalija za sprečavanje zgrušavanja uzoraka) se odvajaju. Uzorak je resuspendiran u 15 mL polipropilenskim epruvetama sa 3 mL pufera za lizu jezgri (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl i 2 mM Na₂EDTA, pH 8,2). Lizati stanica su preko noći ostavljeni na temperaturi od 37°C s 0,2 mL 10% SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*-natrijev dodecil sulfat) i 0,5 mL otopine proteaze K (1 mg proteaze K u 1% SDS i 2 mM Na₂EDTA). Nakon što je završila digestija, 1 mL zasićene NaCl (približno 6M) je dodan u svaki uzorak uz snažno protresanje epruvete 15 sekundi. Nakon toga je uslijedilo centrifugiranje u trajanju od 15 min pri 2500 rpm (engl. *revolutions per minute*; okretaja po minuti). Peleta s proteinima je zaostala na dnu epruvete a supernatant u kojem se nalazi DNA je izdvojen u posebnu epruvetu i precipitirana apsolutnim alkoholom na sobnoj temperaturi. Iz epruvete je pipetom izdvojena DNA u novu epruvetu i otopljena u TE puferu te pohranjena u Biobanku Instituta za antropologiju na -80°C.

3.3.2.2. Analizu koncentracije i kakvoće ekstrahirane DNA

U postupku bisulfitne konverzije potrebno je koristiti poznatu koncentraciju DNA, te s obzirom na vrijeme proteklo od ekstrakcije DNA, nužno je bilo nanovo odrediti njezinu koncentraciju u uzorcima. Nadalje, obzirom na primijećene nakupine i hemolizu u pojedinim uzorcima napravila sam testiranje za najoptimalnije procesuiranje DNA. Kao probu koristila sam TE pufer (pH 8,0; sastava: 10 mM Tris pH 8,0 i 1 mM EDTA pH 8,0, Ambion, Thermo Fisher) kojeg sam prethodno odvojila u eppendorf epruvetu da se temperira (čuva se na +4°C), a slijepa proba je bila nf H₂O (nf, *nuclease free water*). Uzorak sam, nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, kratko prstima pretresla i laganim okretanjem pod kutem od 90° promiješala. Potom sam ga centrifugirala 1min/15000 x g (centrifuga Micro 21 R, Thermo Scientific). Pipetirala sam volumen od 15 µL iz sredine epruvete. Potom sam ostatak vorteksirala 5sek/1400 rpm, centrifugirala 1min/15000 x g i pipetirala volumen od 15 µL iz

sredine i sa vrha. Najbolji rezultat se pokazao nakon postupka: pretresanje, okretanje, vortex, centrifuga te uzorkovanje iz sredine epruvete.

Za mjerenje koncentracije DNA u uzorcima koristila sam BioSpec-nano spektrofotometar (Shimadzu, Japan). Spektrofotometrijom se mjeri količina svjetlosti koju neka tvar apsorbira kada kroz nju prolazi zraka svjetlosti. Mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 i 280 nm moguće je utvrditi čistoću DNA odnosno prisutnost RNA i proteina u uzorku, dok izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 230 nm utvrđuje prisutnost spojeva koji kontaminiraju DNA poput ugljikohidrata, peptida, fenola, itd. Poželjne vrijednosti omjera apsorbanciji prikazane su u tablici 8.

Tablica 8. Određivanje čistoće DNA omjerom vrijednosti očitanih na 260/280 i 260/230 nm

omjer valnih duljina u nm	vrijednost	značenje izmjerenih vrijednosti
260/280 nm	~1,8	čista DNA
	≤1,6	onečišćenja poput fenola, proteina ili drugih
	>1,8	kontaminacija s RNA
260/230 nm	2,0 – 2,2	niže od ovih vrijednosti pokazuje onečišćenje uzorka

Pipetom sam nanijela 2 μ L uzorka, odabrala opciju za mjerenje koncentracije DNA i dobila rezultate u obliku numeričkih vrijednosti i grafički prikaz (Slika 8.). Svaki uzorak je mjeran najmanje dva puta, a po potrebi je napravljeno i treće mjerenje (u slučajevima kada je bila prevelika razlika u očitanim vrijednostima). Kao završnu vrijednost uzela sam aritmetičku sredinu mjerenja. Pri prvom mjerenju umjesto uzorka stavila sam 2 μ L pufera u kojem se nalazi izolirana DNA kao nultu vrijednost. Uzorci su bili vrlo različiti obzirom na boju (neki su bili u različitoj mjeri hemolizirani), viskoznost, prisutne nakupine. Primjer izmjerenog uzorka BJ-004_02 je na slici 10.

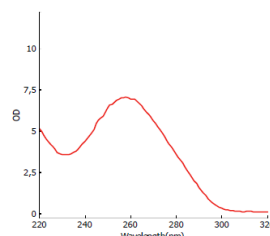
No. : 21
 Sample Name : BJ004-02.2
 Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
 Analyte : dsDNA
 DateTime : 24.02.08 12:47:13

Nucleic Acid Conc : 343,66 ng/μL

OD260/280 : 1,96

OD260/230 : 1,97

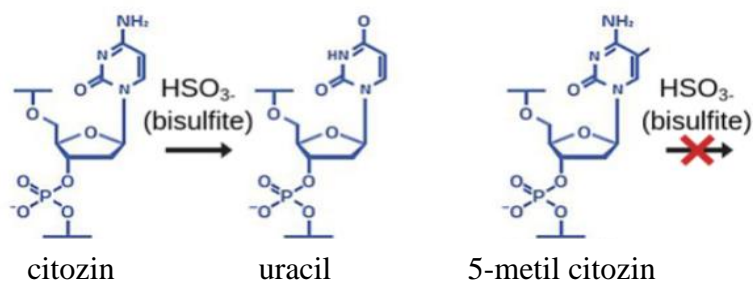
Item	Result
OD260	6,978
OD280	3,617
OD230	3,596
OD320	0,104
Pathlength (mm)	0,191
Dilution	1,000



Slika 10. Rezultat mjerenja koncentracije DNA iz uzorka plazme BJ004-02.

3.3.2.3. Bisulfitna konverzija

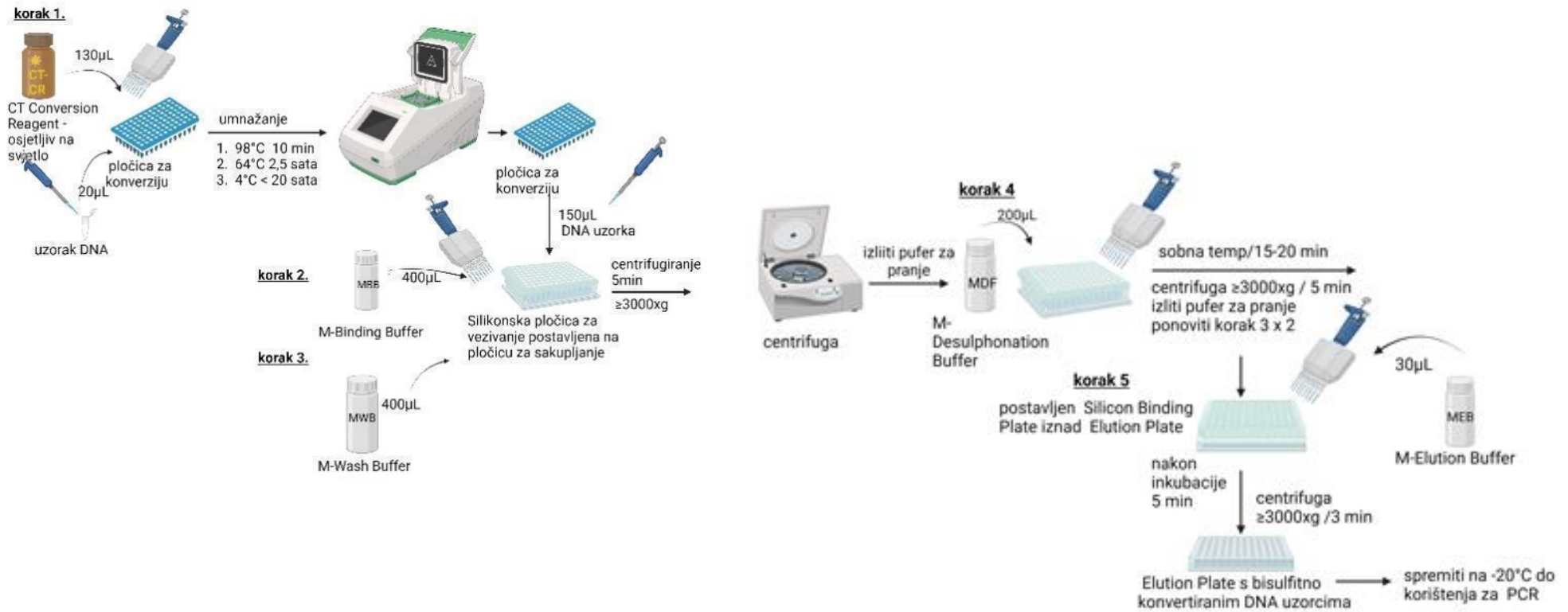
Bisulfitna konverzija (slika 11.) je najčešće korištena metoda za analizu metiliranosti DNA. Osnova ove metode je u kemijskoj pretvorbi, deaminaciji nemetilirane baze citozina u uracil dok su metilirane baze citozina zaštićene od ove promjene (slika 12.). Prilikom umnažanja bisulfitno konvertirane DNA, citozin koji je promijenjen u uracil se spoji s adeninom i u daljnjim ciklusima umnažanja se promjeni u timin. Svi nemetilirani citozini pretvaraju se u timin i samo ostaju metilirani citozini što omogućuje određivanje metilacije DNA na razini jednog nukleotida (slika 10.). Lančanom reakcijom uz polimerazu dobijemo dostatnu količinu DNA potrebnu za daljnju analizu.



Slika 11. Bisulfitna konverzija citozina. Preuzeto i prilagođeno s <https://theory.labster.com/dna-methylation/>

kako bi se dodavanjem M-Elution pufera i centrifugiranjem eluirala bsDNA.

Bisulfitno konvertirana DNA se može koristiti odmah ili se može čuvati na temperaturi od -20°C za kasnije korištenje. Shematski prikaz čitavog postupka prikazan je na Slici 13.



Slika 13. Shema bisulfitne konverzije uzoraka DNA na pločici koristeći Zymo EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit. Kreirala u programu BioRender.

3.3.2.4. Dizajniranje i testiranje početnica za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA promotorske regije NR3C1 gena

Početnice za umnažanje bisulfitno konvertirana DNA sam dizajnirala uz pomoć mrežnih stranica: *Bisulfite Primer Seeker Program* (Zymo research) te ih provjerila na programu BLAST (NCBI; National Center for Biotechnology Information). Korištena je verzija genoma čovjeka GRCh38.p14: 5 : 143403638:143404621, te ciljana regija za određivanje metilacije je 1F promotor NR3C1 receptora za kortizol (Slika 14.).

>hg38_DNA range=chr 5: 143,403,938-143,404,621

AGTGTGAGCACATTGGGCGGGAGGGGTGGGGGTGAACTGGCAGGCGGCGCCTCCTTCTGCC
GCCGCGCGCCTCGCAGACTCGGGGAAGAGGGTGGGGGACGGTGGGGCGCGGGGGAGGGT
GGTCTGCTTTGCAACTTCTCTCCAGTGCGAGAGCGCGGCGGCGGCAGCTGAAGACCCGGC
CGCCAGATGATGCGGTGGTGGGGACCTGCCCGGCACCGGACTCCCCCGGGCCAAAGTAC
GTATGCGCGACCCCGCTATCCCGTCCCTTCCCTGAAGCCTCCCCAGAGGGCGTGTCAAGCC
GCCCGGCCCGAGCGCGGCCGAGACGCTGCGGCACCGTTTCCGTGCAACCCCGTAGCCCCTTT
CGAAGTGACACACTTCACGCAACTCGGCCCGGCGGCGGCGCGGGCCACTCACGCAGCTC
AGCCGCGGGAGGCGCCCGGCTCTTGTGGCCCGCCCGCTGTACCCCGCAGGGGCACTGGCGGC
GCTTGCCGCCAAGGGGAGAGCGAGCTCCCGAGTGGGTCTGGAGCGCGGAGCTGGGCGGGG
GCGGGAAGGAGGTAGCGAGAAAAGAACTGGAGAACTCGGTGGCCCTCTTAAACGCGCCCC
AGAGAGACCAGGTGGCCCCCGCGCTGCCCGCCACCCCTTTTCTGGGGAGTTGGGGGGCG
GGGGGCGAAGCGCGGCGCACCGGGCGGGGCGGCCACGCCAGGGGACGCGGGCGTGCAGGCG
CCGTGGGGCCGGGGTGGCGGGGCCCGCGCGGAGGGCGTGGGGGCAGGGACCGCGGGCGCC
CTGCAGTTGCCAAGCGTCACCAACAGGTTGCATCGTTCCCGCGGCGCCCGCGCGGCCCTCG
GGCGGGGAGCGGCCGGGGTGGAGTGGGAGCGCGTGTGTGCGAGTGTGTGCGCGCCGTGGCG
CGCCTCCACCCTCCCGCTCGGTCCCGCTCGCTCGCCAGGCCGG

Slika 14. NR3C1 1F regija s crveno označenim CpG mjestima. Neosjenčani parovi baza su sekvenca od interesa. Prilagođeno iz Palma-Gudiel i sur., 2015.

Obzirom na veličinu sekvence bilo je potrebno dizajnirati dva para početnica kako bi se obuhvatila cijela sekvenca od interesa (Tablica 9). Svaka početnica je komplementarna početku (5' kraju) lanca na kojem će hibridizirati. Prilikom dizajniranja početnica vodila sam se smjernicama o veličini početnica koja bi trebala biti 17-28 nukleotida, postotak G-C parova između 40-60%, temperatura denaturacije (T_m) bi se trebala kretati između 55-60°C.

Važno je da 3' krajevi početnica ne budu međusobno komplementarni kako ne bi došlo

do stvaranja dimera početnica, ali isto tako treba izbjegavati komplementarnost početnice samoj sebi da ne bi došlo do stvaranja sekundarnih struktura kao što su primjerice ukosnice. Unutar početnica, ukoliko to nije moguće izbjeći, može biti jedan G-C par na 5' kraju sekvence od interesa (Innis i Gelfand, 1990.). Dizajniranje je kompleksan, vremenski zahtjevan proces. Početnice koje teoretski dizajniramo, primijenjene u praksi nisu nužno optimalne. Naručili smo početnice prema tablici 9. Liofilizirane početnice (IDT-integrated DNA Technologies) sam pripremila otapanjem u TE puferu prema uputama proizvođača do krajnje koncentracije od 10 μ M. Dobivene volumene sam dalje razrijedila 10x i razdijelila po volumenima od 200 μ L kako bi se prevenirala kontaminacija istih. Liofilizirane početnice su postojane na sobnoj temperaturi ali otopljene u TE puferu se moraju čuvati na temperaturi od -20°C. Za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA, ukoliko početnica ima CpG dinukleotid za koji nismo sigurni kakav mu je metilacijski status koriste se mješovite baze R kao zamjena za baze G/A i Y kao zamjena za C/T.

Tablica 9. Parovi početnica za sekvenciranje *NR3C1 IF* gena.

PCR početnice BsDNA	
Forward A	5' TTT TTT TGA AGT TTT TTT AGA GGG YGT G 3'
Reverse A	5' AAA AAA ACC ACC RAA TTT CTC CAA TTT C 3'
Forward B	5' GAA ATT GGA GAA ATT YGG TGG TTT TTT T 3'
Reverse B	5' CCT ATT AAT AAC RCT TAA CAA CTA CAA AA 3'

Kako bi provjerila kompatibilnost početnice s uzorcima DNA napravila sam PCR umnažanje u tubicama koristeći reakcijsku smjesu koristeći polimerazu GoTaq (Promega, SAD) prema tablici 10.

Tablica 10. Priprema reakcijske smjese za testiranje PCR produkata.

Primer	forward	0,5 μ L	Reakcijska smjesa 9 μ L	BsDna 1 μ L
	reverse	0,5 μ L		
d NTP		1 μ L		
pufer		1 μ L		
Go Taq		0,05 μ L		
nf H ₂ O		5,95 μ L		
Ukupni volumen				

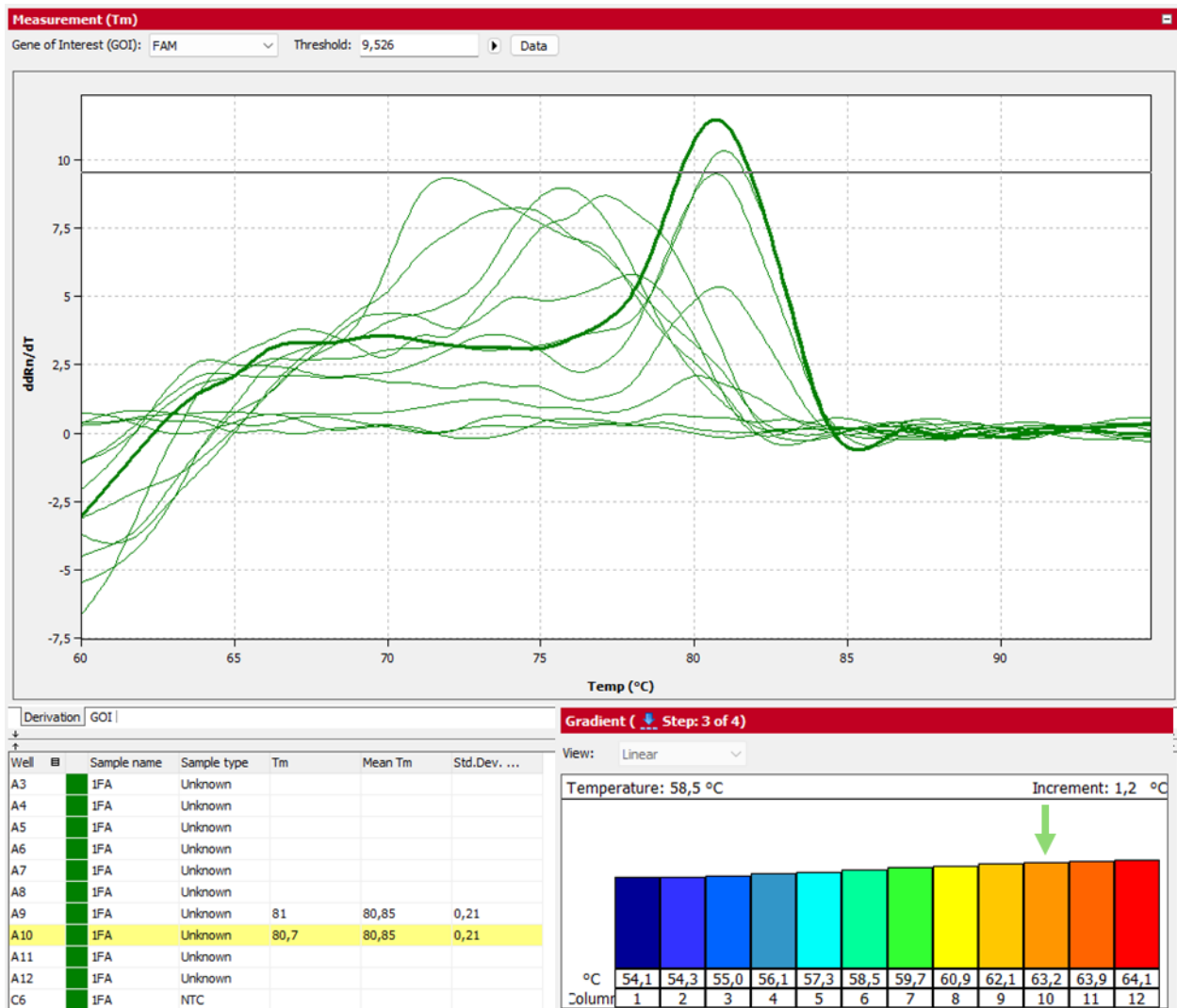
Odlučili smo testirati i gotovi Zymo Taq premiks preporučen od strane Zymo proizvođača jer sam koristila njihov kit za bisulfitnu konverziju. Priprema reakcijske smjese je nešto jednostavnija: 2 uL od svakog primera, 25 uL ZymoTaq i 21 uL bsDNA i vode. Nakon usporedbe iste uzorke umnožene Dream Taq-om i Zymo premiksom, odlučila sam se za Zymo premix zbog jednostavnijeg korištenja i smanjene mogućnosti pogreške tijekom pripreme uslijed manjeg broja potrebnog pipetiranja. Nakon testiranja s više različitih volumena bisulfitno konvertirane DNA od 1 te 4,5 i 6 μL odlučila sam se za volumen od **4,5 μL** jer se na testnom agaroznom gelu pokazao kao najoptimalnija količina. Svaki put kad sam radila PCR umnažanje koristila sam i negativnu kontrolu, tj. kontrola bez kalupa (NTC; engl. *No Template Control*) koje je u biti reakcijska smjesa bez dodanog uzorka (bisulfitno konvertirane DNA) kako bi se detektirale potencijalne kontaminacije sastavnica koje ulaze u postupak umnažanja PCR-om.

Nadalje, pomoću metode temperaturnog gradijenta testirala sam optimalnu temperaturu vezanja početnica uzevši u obzir očekivanu najnižu i najvišu temperaturu taljenja početnica (engl. *melting temperature*, T_m) koje su navedene na informacijskom listu. Temeljem navedenog odredila sam temperaturni gradijent od 54,1°C do 64,1°C. Svrha je da isti uzorak (smjesa DNA) prođe umnažanje na 12 različitih temperatura kako bi se utvrdila optimalna temperatura za naše početnice u praksi jer je teoretska temperatura već navedena na popratnoj listi početnica. Pripremila sam smjesa DNA s 9 uzoraka za koje sam napravila bisulfitnu konverziju u kolonicama pomoću komercijalnog seta reagensa *EZ DNA Methylation - GoldTM Kit* (Zymo Research, Freiburg, Njemačka), vidi 3.3.2.3. U epruvetu zapremine 500 μL otpipetirala sam volumen 13,5 μL nf H_2O i dodala po 1,5 μL svakog od 9 bisulfitno konvertiranih uzoraka DNA. Sveukupni volumen je bio 27 μL . Potom sam napravila reakcijsku smjesu u dvije pripreme, jednu za primer A i jednu za primer B u sljedećem sastavu: 5 μL GoTaq (Promega, SAD), 0,5 μL od svakog primera i 3 μL nf H_2O . Iz reakcijske smjese s dodanim početnicama A i reakcijske smjese s dodanim početnicama B najprije sam u PCR epruvete postavljene na jažice hladne ploče otpipetirala 9 μL za kontrolu NTC_A (engl. *NTC- no template control*) i 9 μL NTC_B . U ostatak volumena od 112,5 μL reakcijske smjese A i 112,5 μL reakcijske smjese B dodala sam volumen od po 12,5 μL smjesa DNA. Potom sam otpipetirala volumene od po 10 μL reakcijske smjese A i smjesa DNA u 12 jažica te po 10 μL reakcijske smjese B i smjese DNA u drugih 12 jažica. Nakon što sam dobro zatvorila i označila PCR epruvete programirala sam PCR instrument. Početna inkubacija se odvijala na temperature od 95°C kroz 2 minute. Potom je uslijedilo 40 ciklusa inkubacije na temperaturi denaturacije od 95°C kroz 15 sekundi te inkubacija na 12 različitih temperatura (54,1-64,1°C) u trajanju od 1 minute. Nakon svakog

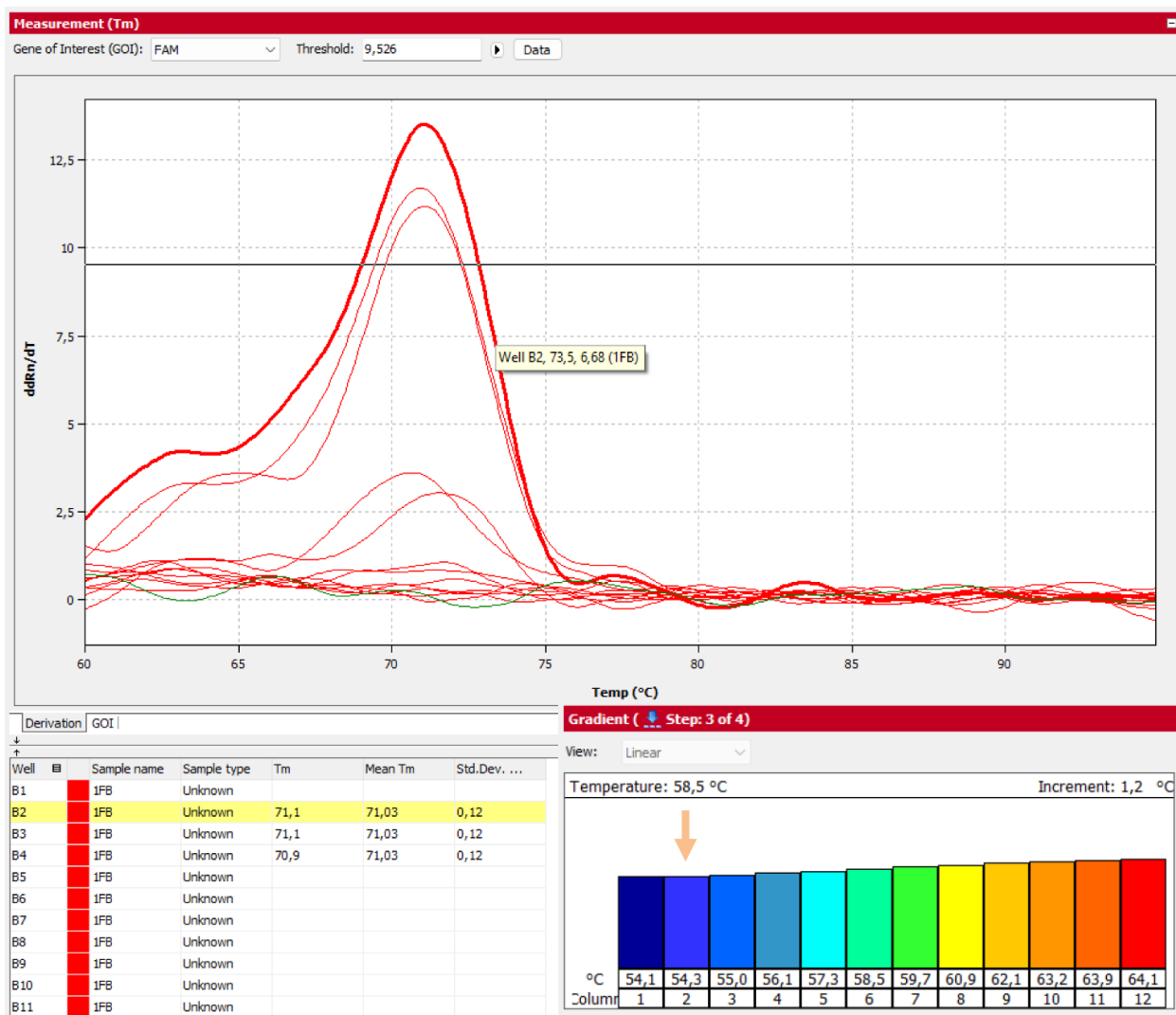
završenog ciklusa očitana je fluorescencija. Kako bi dobili krivulju taljenja završna inkubacija je bila u gradijentu od 60 do 95°C s promjenama temperature od 1°C u 15 sekundi. Nakon završenog procesa amplifikacije PCR produkte sam testirala na agaroznom gelu.

Prisutnost PCR produkata provjerena je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu koji sam pripremila otapanjem 0,9 g granula agara (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u 60 ml 0,5% TBE pufera (0.09 M Tris-borat i 0.01 M EDTA). Zagrijala sam smjesu u mikrovalnoj pećnici dok se granule nisu otopile pazeći da smjesa ne zakipi. U prohlađenu otopinu gela dodala sam 6 µL Syber Safe boje (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva) te izlila gel u pripremljen kalup s češljicom kako bi se formirale jažice za nanošenje uzoraka. Kako bi mogli pratiti kako PCR produkt putuje kroz gel uzorcima treba dodati pufer s bojom prije nanošenja u jažice. Pufer za nanošenje sam pripremila razrjeđivanjem koncentriranog pufera za nanošenje (proizvođač TaKaRa, 9156) s nf H₂O u omjeru 1:5, v/v. Prije nanošenja u jažice pomiješala sam pipetiranjem 4 µL boje i 3 µL uzorka te volumene od 7 µL za svaki uzorak otpipetirala u jažicu. Elektroforeza se odvijala tijekom 30 minuta pri 80V. Gel je vizualiziran pod UV svjetlom, a PCR produkti pohranjeni na -20°C do upotrebe.

Na agaroznom gelu je uočeno da je najkvalitetniji PCR produkt bio amplificiran na temperaturi od 63,2°C za par početnica A (Slika 15.), dok je za par početnica B bio PCR produkt amplificiran na temperaturi od 54,3°C (Slika 16.).



Slika 15 Prikaz temperaturnog gradijenta i optimalne temperature umnažanja bsDNA sa setom početnica A (zeleno boja). U donjem desnom dijelu prikazan je temperaturni gradijent amplifikacije (zeleno strelica označava najoptimalniju temperaturu), dok su u donjem lijevom dijelu prikazane brojčane vrijednosti vezane uz temperaturu taljenja (Tm) s označenom optimalnom temperaturom.



Slika 16. Prikaz temperaturnog gradijenta i optimalne temperature umnažanja bsDNA sa setom početnica B (crvena boja) U donjem desnom dijelu prikazan je temperaturni gradijent amplifikacije svakog seta početnica (zelena strelica označava najoptimalniju temperaturu), dok su u donjem lijevom dijelu prikazane brožčane vrijednosti vezane uz temperaturu taljenja (Tm).

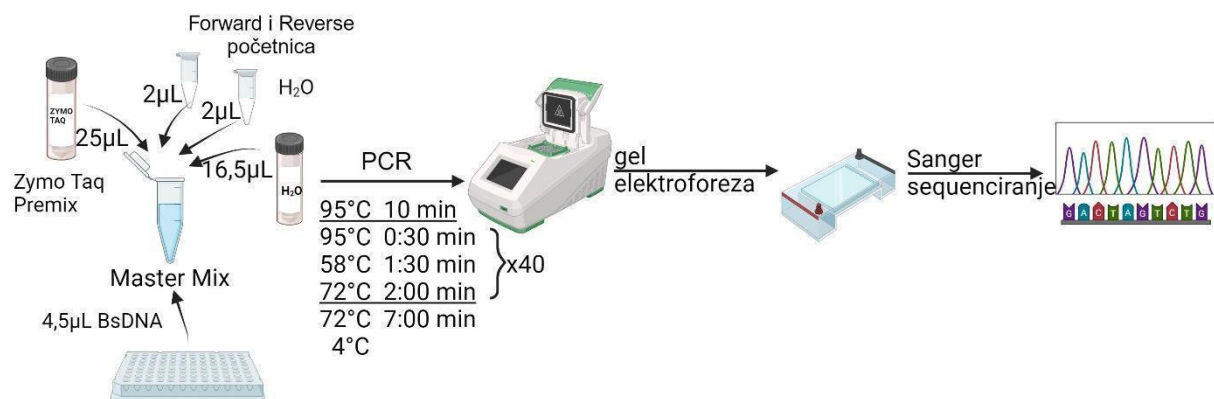
3.3.2.5. Lančana reakcija polimerazom – PCR

Bisulfitno konvertiranu DNA sam koristila za amplifikaciju specifičnih fragmenata koristeći kreirane početnice prema protokolu u tablici 11. i reakcijskoj smjesi u tablici 10. Umnažanje ciljane regije je potrebno radi efikasnije sekvenciranja i potom identifikacije metiliranih mjesta.

Tablica 11. Protokol umnažanja segmenta od interesa.

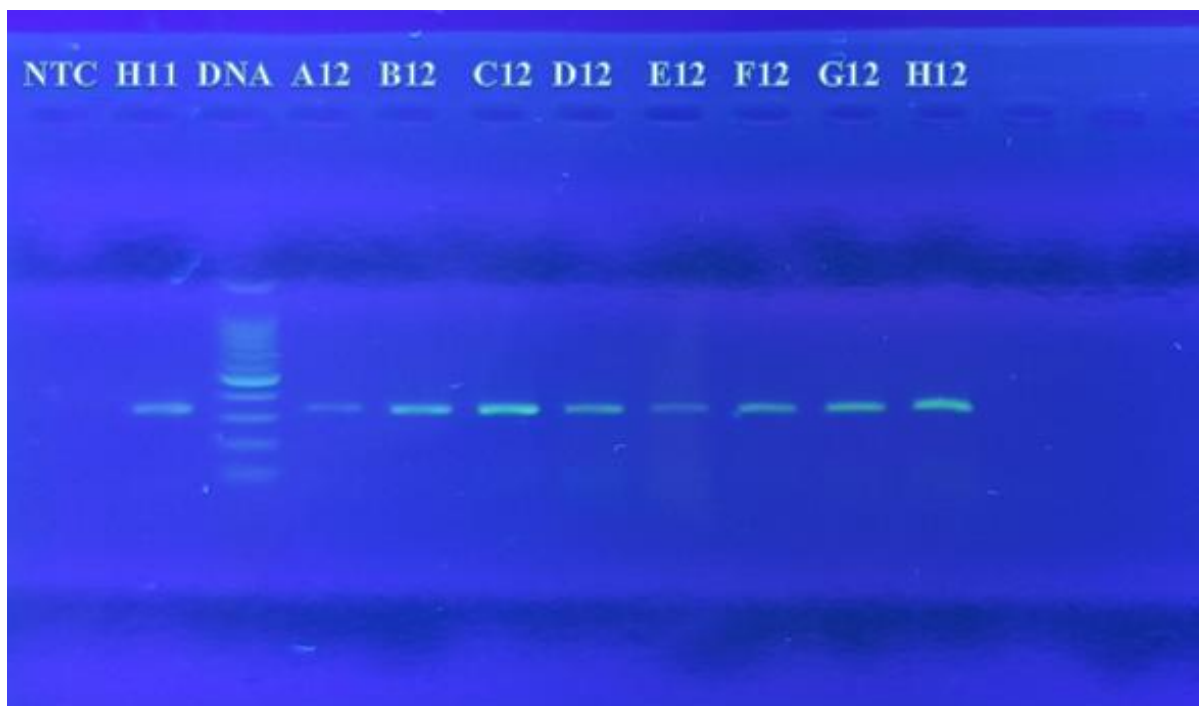
Temperatura °C	Vrijeme/minute	broj ciklusa
95°C	10	
95°C	0:30	} x 40
58°C	1:30	
72°C	2:00	
72°C	7:00	
4°C	∞	

Prisutnost PCR produkta sam provjerila elektroforezom u 1,5%-tnom agaroznom gelu prema protokolu opisan u prethodnoj točki. Prva jažica je sadržavala NTC, a jedna jažica DNA (100 bp Promega Corporation, G8291) referentna veličina Slika 18.). Uzorke koji nisu bili vidljivi na gelu smo izostavili od slanja na Sanger sekvenciranje. Postupak umnažanja bisulfitno konvertirane DNA i provjere na gelu te sekvenciranja sažeto je na slici 17. Umnažanje je bilo uspješno samo s početnicama A, te stoga nismo nastavili pokuse s početnicama B.



Slika 17. Shematski prikaz pripreme DNA uzoraka za umnažanje uz pomoć početnica, PCR umnažanje, testiranje na agaroznom gelu i Sangerovo sekvenciranje.

Kreirala u programu BioRender.



Slika 18. Gel elektroforeza PCR produkata bsDNA uzoraka. Prva jažica je kontrola (NTC), a treća jažica kontrolna DNA. H11 i A12-H12 su uzorci.

3.3.2.6. Sangerovo sekvenciranje

Epigenetičku analizu sam provela na dijelu uzorka ispitanica (N=37) uključenih u analizu razine kortizola zbog dostupnosti DNA uzoraka majke i bebe te zadovoljavajućih uvjeta izolirane DNA.

Sangerovo sekvenciranje je brza, financijski povoljna metoda za određivanje manjih sekvenci genoma. Metodu je razvio F. Sanger sa svojim suradnicima 1977. godine kada je objavio sekvencu virusnog genoma veliku 5000 parova baza (Sanger i sur., 1977.). Temelji se na terminaciji elongacije DNA lanca korištenjem obilježenih dideoksinukleotida (ddNTP) fluorescentnom bojom. Ugradnjom ddNTP-ova zaustavi se daljnje umnažanje fragmenta. Rezultat takvog obilježavanja je smjesa različite veličine fragmenta koje završavaju s različitim označenim bazama. Sekvenca se očitava pomoću lasera koji očitava fluorescenciju tijekom elektroforetskog razdvajanja kapilarnom elektroforezom. Automatizirana Sangerova metoda spada u tehnologije prve generacije (engl. *first generation sequencing*) ali se još uvijek smatra zlatnim standardom za validaciju genetskih varijanti i bitnim korakom u dijagnostičkoj rutini posebice kada se radi o specifičnim poremećajima povezanih s jednobaznim promjenama (De

Cario i sur., 2020.; Soraru i sur., 2022.).

PCR produkte bisulfitno konvertirane DNA uzoraka sam poslala uz forward i reverse primer A na Sangerovo sekvenciranje u Macrogen i Eurofins Scientific. Dobivene rezultate u obliku abi datoteke analizirala sam pomoću računalnih programa Mutation Surveyer, BiQ Analyser i BioEdit. Obzirom na posebnosti svakog uzorka te potencijalne propuste računalnih programa napravila sam dodatno poravnanje (alignment) u programu BioEdit ručno za svaki uzorak pojedinačno.

3.3.3. Analiza podataka i statistička obrada

Antropometrijske mjere preuzete su iz liječničkog kartona. Samo su analizirani podaci za ispitanice i djece za koje smo imale sve potrebne pristanke. U nekim slučajevima, imali smo pristanak za majku ali ne za dijete, te su ti uzorci isključeni iz daljnje obrade.

Razina kortizola je određena u odnosu prema internom standardu i prema krivulji standarda određivana istog dana kao i uzorak. Analizirana je površina ispod krivulje i visina krivulje, te sam odlučila koristiti visinu krivulje za određivanje koncentracije kortizola u uzorcima plazme trudnica (ng/mL plazme) zbog bolje ponovljivosti rezultata (vidi tablicu 6.).

Sekvence dobivene od laboratorija Eurofins sam analizirala računalnim programima Mutation Surveyer, BiQ Analyser i BioEdit. Završnu provjeru detekcije metilacije sam napravila ručnim poravnavanjem u programu BioEdit. Metilacije na pojedinim mjestima analizirane su Spearmanovim r koeficijentom korelacije s geografskom lokacijom i razinom kortizola.

Sve statističke analize napravila sam u programu GraphPad Prism 10.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Uzorci s odstupanjima su eliminirani ako su bila veća od dvije standardne devijacije od srednje vrijednosti. Normalnost distribucije sam provjerila D'Agostino-Pearsonovim omnibus testom normalnosti. Za usporedbu dvije skupine podataka, ovisno o normalnosti distribucije, korišten je student t-test ili Mann-Whitney test. Izvorne ili transformirane vrijednosti svih parametara analizirane su dvosmjernom analizom varijanci (2-way ANOVA), a kao glavni učinci su uzeti geografska lokacija i spol novorođenčadi. Za višestruku usporedbu korišten je Fisherov LSD test. Korelacije su utvrđene Spearmanovim r faktorom korelacije. Broj uzoraka je varijabilan ovisno o dostupnim podacima u upitnicima ili gubitkom tijekom obrade. Stupanj značajnosti postavljen je na $p < 0,05$. Podaci s normalnom

distribucijom prikazani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija dok su ostali podaci prikazani kao medijan s 95% interval pouzdanosti.

Parametri za koje izračunat Spearmanov koeficijent korelacije obuhvaćaju: starost mama, geografsku lokaciju življenja (kopno ili otoci), BMI vrijednost prije i nakon trudnoće, te razliku u BMI vrijednosti navedenih mjerenja, razinu kortizola izraženu u ng/mL. Spearmanov koeficijent je izračunat i za antropometrijske mjere novorođenčadi: porođajne težine (PT), porođajne duljine (PD), opsega glave (OG) korigiranih s tjednima trudnoće te APGAR ocjenom na porodu.

Za biološke varijable tumačenje koeficijenta korelacije po Coltonu (1974.) je sljedeće:

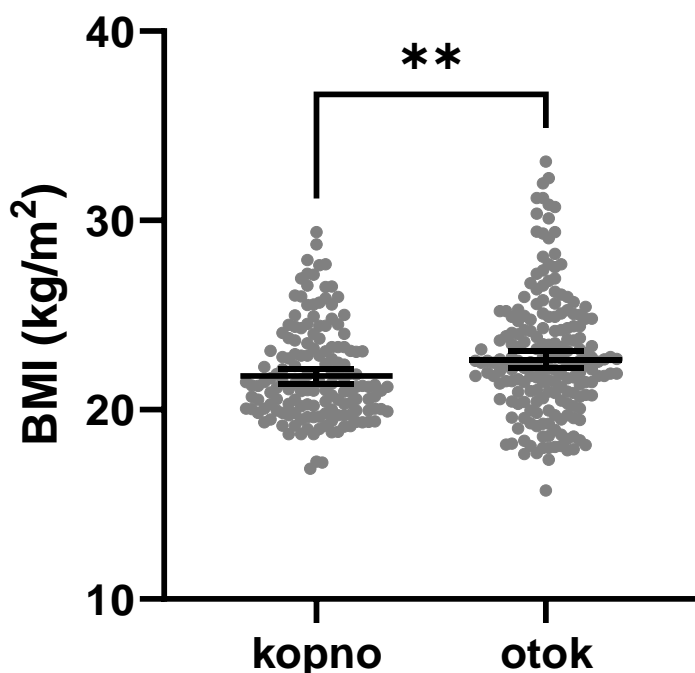
- $r = 0$ do $\pm 0,25$: nema povezanosti,
- $r = \pm 0,26$ do $\pm 0,50$: slaba povezanost,
- $r = \pm 0,51$ do $\pm 0,75$: umjerena do dobra povezanost
- $r = \pm 0,76$ do ± 1 : vrlo dobra do izvrsna povezanost
- $r = \pm 1$: matematička povezanost

4. REZULTATI

4.1. Indeks tjelesne mase

Vrijednosti indeksa tjelesne mase prije trudnoće (preBMI) su izračunati iz vrijednosti koje su prijavile ispitanice o visini i težini prije trudnoće. Ti podaci su uspoređeni s mjerama koje su uzete u zdravstvenoj ustanovi od strane medicinskog osoblja prilikom prvog prenatalnog posjeta (između 12-14 tjedna trudnoće). BMI je analiziran kao kontinuirana varijabla. Uzorak je brojao sveukupno 344 ispitanice za koje smo imali podatke o BMI.

Od ukupnog broja 44,48% (N=153) su bile ispitanice s kopna, a 55,52% (N= 191) sa otoka. Ispitanica sa otoka su imale značajno veći (Mann-Whitney U= 12056; p=0.0053) preBMI naspram ispitanica koje žive na kopnu (Slika 19.). Zanimljivo je da statistički značajnu razliku nismo našli u indeksu tjelesne mase nakon poroda (postBMI; Man-Whitney U= 10100; p=0,1363) niti u promjeni indeksa tjelesne mase prije i nakon poroda (promjena BMI; Student t= 0,5810, df=300; p=0,5616).

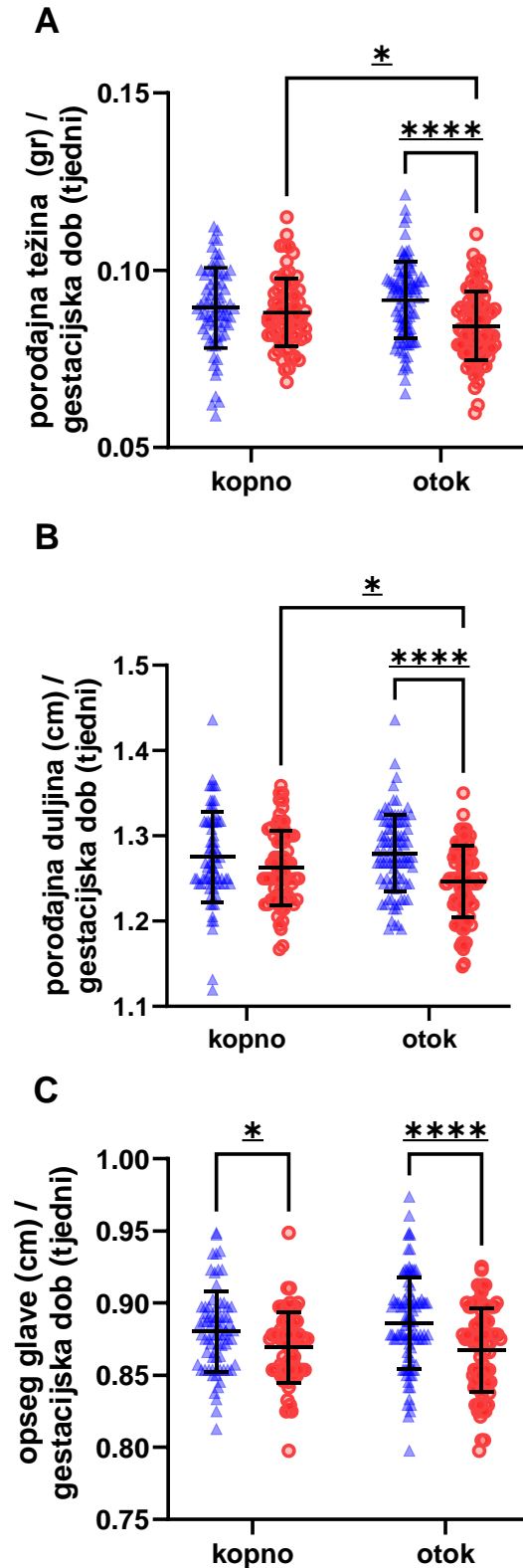


Slika 19. Indeks tjelesne mase u prvom prenatalnom pregledu (preBMI) ovisno o geografskoj lokaciji ispitanica (kopno vs otok). Mann-Whitney test, p= 0,0053. Podaci su prikazani kao medijan s 95% intervalom pouzdanosti.

4.2. Antropometrija novorođenčadi

Antropometrijski podaci o novorođenčadi su dobiveni iz otpusnog pisma. Prijevremeno rođena novorođenčad je isključena iz daljnje analize. Radi bolje usporedbe, antropometrijske mjere su prikazane u omjerima prema gestacijskom tjednu poroda (Slika 20.).

Analizirajući antropometriju novorođenčadi, dvosmjerna analiza varijanci je za porođajnu težinu pokazala značajnu interakciju spola djeteta i geografske lokacije ($F(1, 331) = 6,750$; $p = 0,0098$). Utjecaj samog spola novorođenčadi ima još veću značajnost ($F(1, 331) = 14,23$; $p = 0,0002$). Sama geografska lokacija nije pokazala utjecaj na PT ($F(1, 331) = 0,5236$; $p = 0,4698$). Što se tiče porođajne duljine rezultati su slični kao za porođajnu težinu. Dvosmjerna analiza varijanci pokazuje značajnu interakciju između spola i geografske lokacije ($F(1, 331) = 4,169$; $p = 0,0420$), s velikim utjecajem spola ($F(1, 331) = 20,60$; $p < 0,0001$), dok geografska lokacija nije imala značajni utjecaj na PD ($F(1, 331) = 1,315$; $p = 0,2524$). Dvosmjerna analiza varijanci je za mjere opsega glave pokazala visoki utjecaj spola ($F(1, 322) = 22,60$; $p < 0,0001$), ali ne za geografsku lokaciju ($F(1, 322) = 0,3718$; $p = 0,5424$) niti interakcije spol i geografska lokacija ($F(1, 322) = 1,435$; $p = 0,2318$).

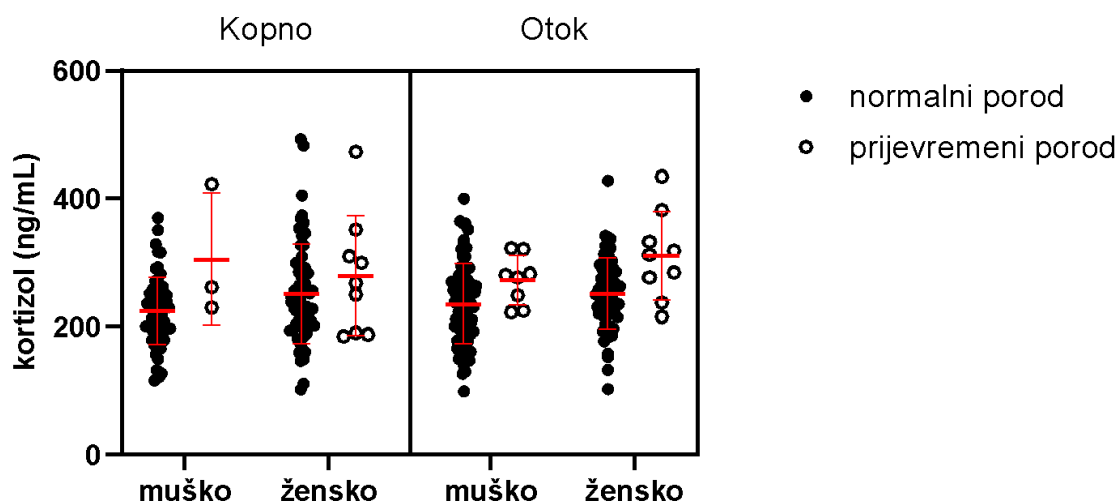


Slika 20.: Antropometrija muške (\blacktriangle) i ženske (\bullet) novorođenčadi prema mjestu geografske lokacije majki. A) Porođajna težina; B) porođajna duljina i C) opseg glave. Dvosmjerna analiza varijanci; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. Prikazani su podaci sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom.

4.3. Razina kortizola

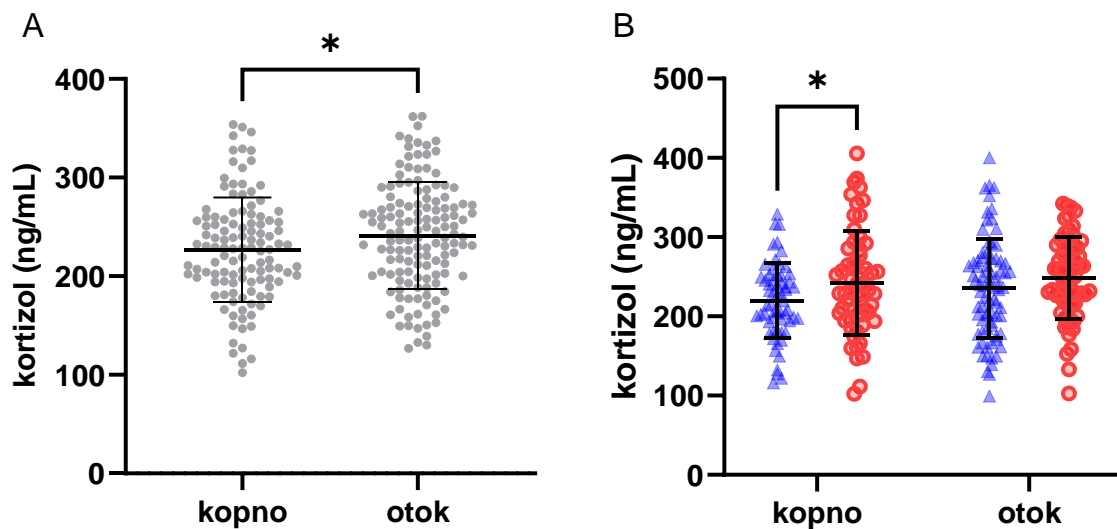
Koncentracije kortizola su uspješno određene kod 337 ispitanica koje su podijeljene u dvije skupine ovisno o geografskoj lokaciji. Prebivalište na kopnu je imalo 149 (44,21%) ispitanica, a otočanki je bilo 188 (55,79%).

Razdvojili smo razine kortizola majki u odnosu na spol djeteta, geografsku lokaciju i vrijeme poroda odnosno da li je porod bio u terminu ili prijevremeni (Slika 21.). Trosmjernom analizom varijanci dobili smo utjecaj vremena poroda na razinu kortizola ($F(1, 286) = 13,80$; $p = 0,0002$). Ispitanice koje su imale prijevremeni porod imale su i više razine izmjerene razine kortizola u drugom tromjesečju. Međutim, nije bio značajni utjecaj razlike obzirom na geografsku lokaciju, spol djeteta i niti jedne promatrane interakcije. Vrijednosti prijevremeno rođenih beba smo nadalje isključili iz analize.



Slika 21. Trosmjerna analiza varijanci razine kortizola kod ispitanica obzirom na geografsku lokaciju (kopno ili otok), spol novorođenčeta i vremena poroda (normalna trudnoća ili prijevremeni porod). Statistički značajna razlika se pokazala samo između normalnog i prijevremenog poroda uz $F(1, 286) = 13,80$; $p = 0,0002$. Prikazani su podaci sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom.

Razine kortizola tijekom drugog tromjesečja su bile statistički značajno više kod ispitanica s prebivalištem na otocima u odnosu na ispitanica s prebivalištem na kopnu (Student $t= 2,103$; $df=251$; $p=0,0364$; Slika 22. A). U prijašnjim radovima je kod ispitanica koje nose žensku djecu detektirana viša razina kortizola te smo odlučili analizirati povezanosti geografske lokacije ispitanica i spola djeteta. Očekivana viša razina kortizola kod ispitanica koja nose žensko dijete je detektirana samo kod ispitanica na kopnu (Slika 22. B). Otočanke su imale višu razinu kortizola kada su nosile dijete muškog spola, te je zbog toga izgubljena razlika u razini kortizola ovisno o spolu kao što je detektirano na kopnu. Dvosmjernom analizom varijanci (Slika 19. B), spol djeteta je imao vrlo značajan učinak ($F(1, 289)= 10,90$; $p=0,0011$) na razinu kortizola ali geografska lokacija ($F(1, 289)=1,574$; $p=0,2107$) i interakcija između spola i geografske lokacije ($F(1, 289)=0,4898$; $p=0,4846$) nisu pokazale značajni utjecaj.

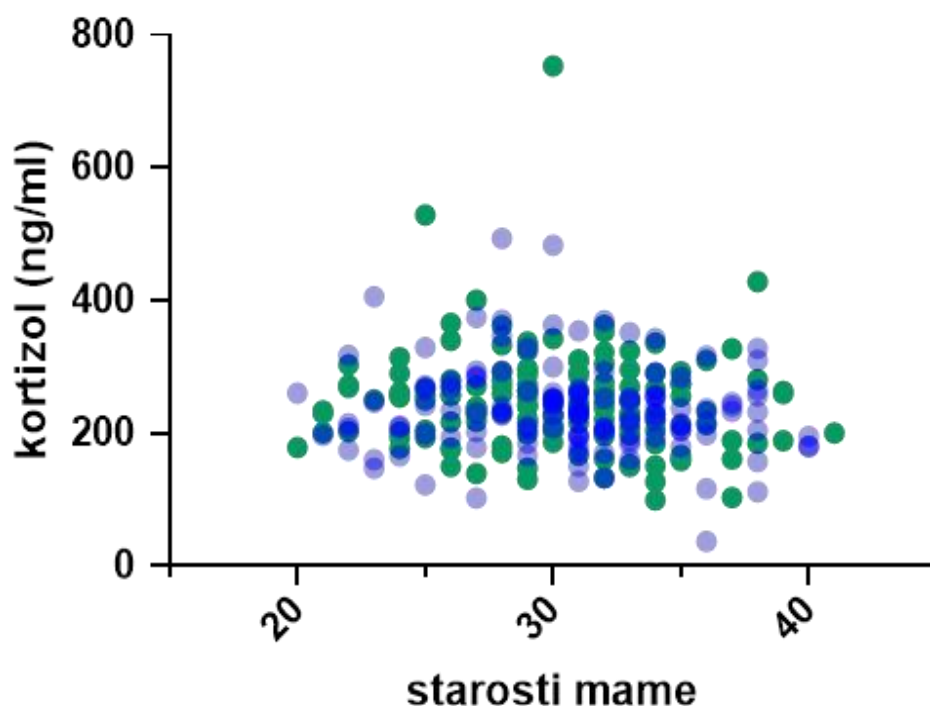


Slika 22. Razlika u koncentraciji kortizola između ispitanica s prebivalištem na kopnu i otocima (A) Student t-test* $p<0,05$; i ovisno o spolu (B) Dvosmjerna analiza varijanci ($F(1, 289)= 10,90$; $p=0,0011$). Na slici B plavi trokutići ▲ označavaju razinu kortizola kod trudnica koje nose dijete muškog, a crveni kružići ● ženskog spola. Prikazani su podaci sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom.

4.4. Povezanost antropometrije i razina kortizola majki

4.4.1. Antropometrija i razina kortizola majke

Indeksi tjelesne mase prije trudnoće i poslije trudnoće pokazali su visoku korelaciju (Tablica 12. i Slika 24.) na obje geografske lokacije (kopno i otok). Međutim, ni jedan od ispitanih antropometrijskih parametara majke (starosti majke, pre-BMI, post-BMI i promjena BMI) nisu korelirali s razinom kortizola (Slika 22. A; B; C). Starost ispitanica bila je podjednako raspoređena na obje geografske lokacije, a ispitana populacija imala je srednju vrijednost od 30,38 godina uz $SD=0,78549$. Starost majki ne korelira s razinom kortizola (Slika 23.).

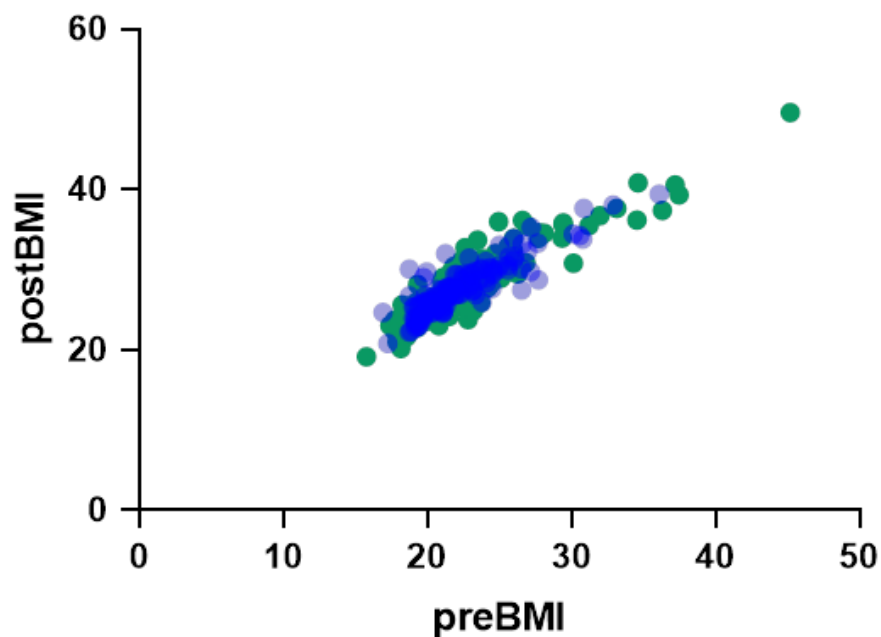


Slika 23. Povezanost razine kortizola u ng/mL i starosti mama obzirom na geografsku lokaciju (kopno ili otok). Navedene varijable ne pokazuju međusobnu povezanost. Zelene točke ● pokazuju na mjerene vrijednosti ispitanica na kopnu kao geografskoj lokaciji, a plave ● predstavljaju ispitanice na otoku.

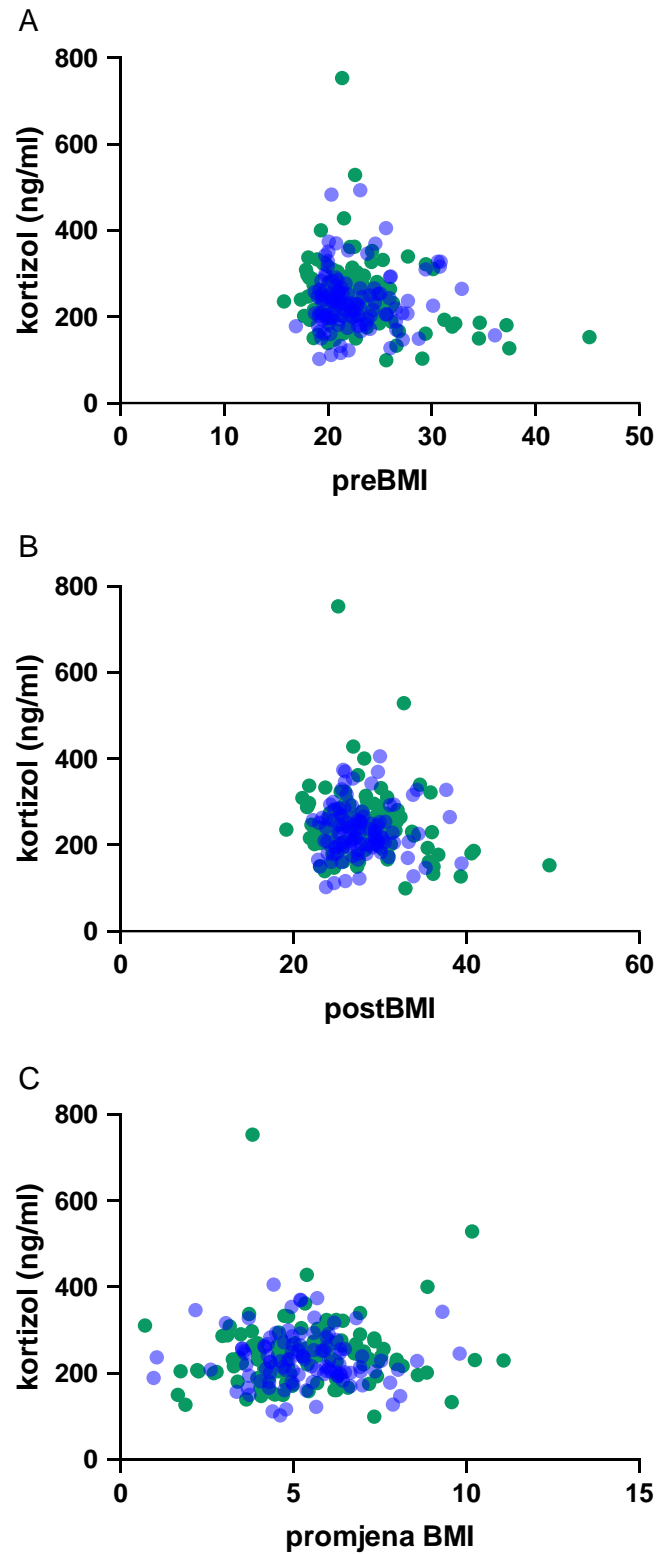
Tablica 12. Indeksi tjelesne mase prije i nakon trudnoće na obje geografske lokacije. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije i p-vrijednosti u zagradi.

Spearmanov koeficijent korelacije (p vrijednost)	postBMI	promjena BMI
preBMI	0,88 (1,14E-89)	0,05
postBMI		0,44 (1,19E-14)

Majke s visokim preBMI imale su i visoki postBMI, vrijednosti $r = 0,88$ ukazuje na jaku povezanost oba parametara. Međutim, korelacija između postBMI i promjene u BMI bila je slabija ($r = 0,44$).



Slika 24. Odnos indeksa tjelesne mase prije (preBMI) i poslije trudnoće (post BMI).



Slika 25. Odnos indeksa tjelesne mase i razine kortizola u plazmi izražene u ng/mL prije trudnoće (A), nakon trudnoće (B) i promjenu u indeksu tjelesne mase (razlika između pre i post BMI (C)). Zelene točke ● pokazuju na mjerene vrijednosti ispitanica na kopnu kao geografskoj lokaciji, a plave ● ispitanice na otoku.

Analiza antropometrijskih podataka majki u odnosu na razinu izmjerene razine kortizola (Slika 25.) nije uputila na povezanost navedenih parametara izraženima Spearmanovim koeficijentom korelacije, ali p vrijednost upućuje na povezanost starosti mama i preBMI (Tablica 13.). Značajnost uz $p \leq 0,05$ pokazuje samo starost majki u odnosu na indeks tjelesne mase prije trudnoće (preBMI).

Tablica 13. Spearmanov koeficijent vrijednosti i p-vrijednosti starosti majki, promatranih antropometrijskih parametara majke i razine kortizola.

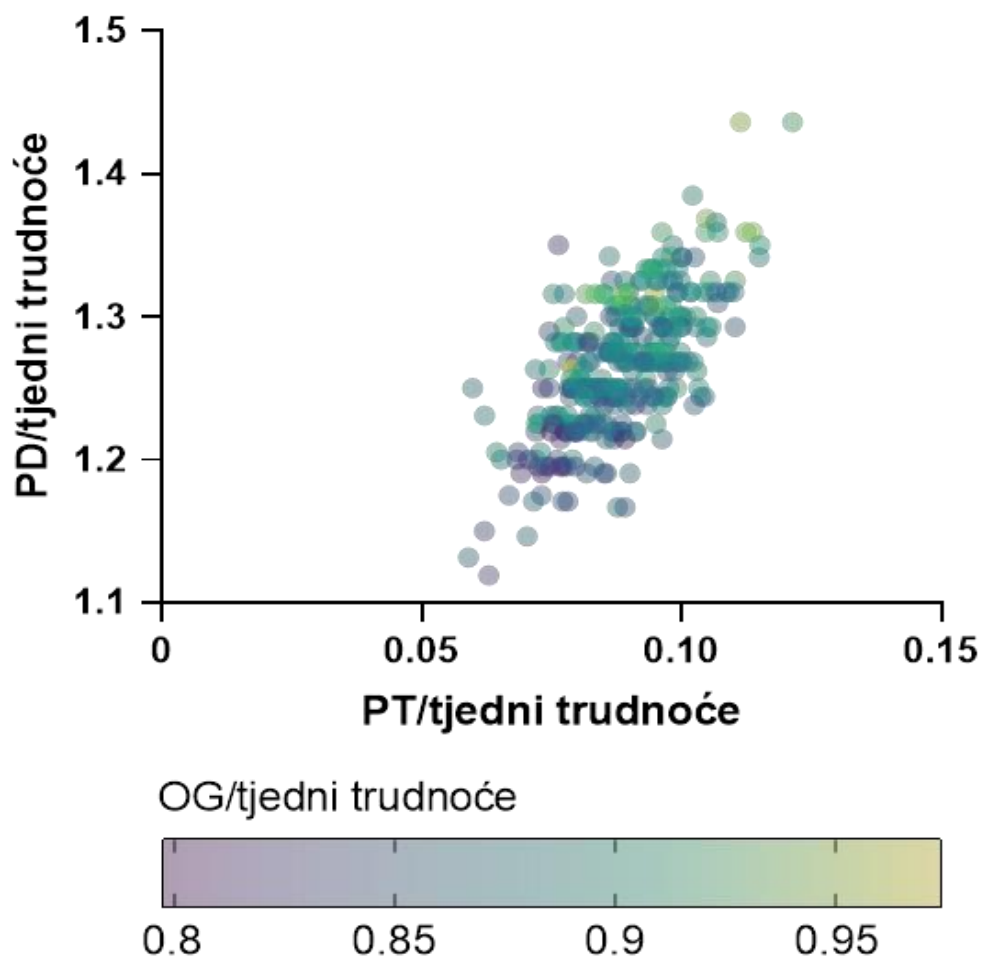
Spearmanov koeficijent korelacije r (p vrijednost)	Geografska lokacija	preBMI	postBMI	promjena BMI	Kortizol/ ng/mL
Starost mama	0,08 (0,12)	0,12 (0,03)	0,09 (0,14)	-0,08 (0,17)	-0,11 (0,14)

4.4.2. Antropometrija djeteta i razina kortizola majke

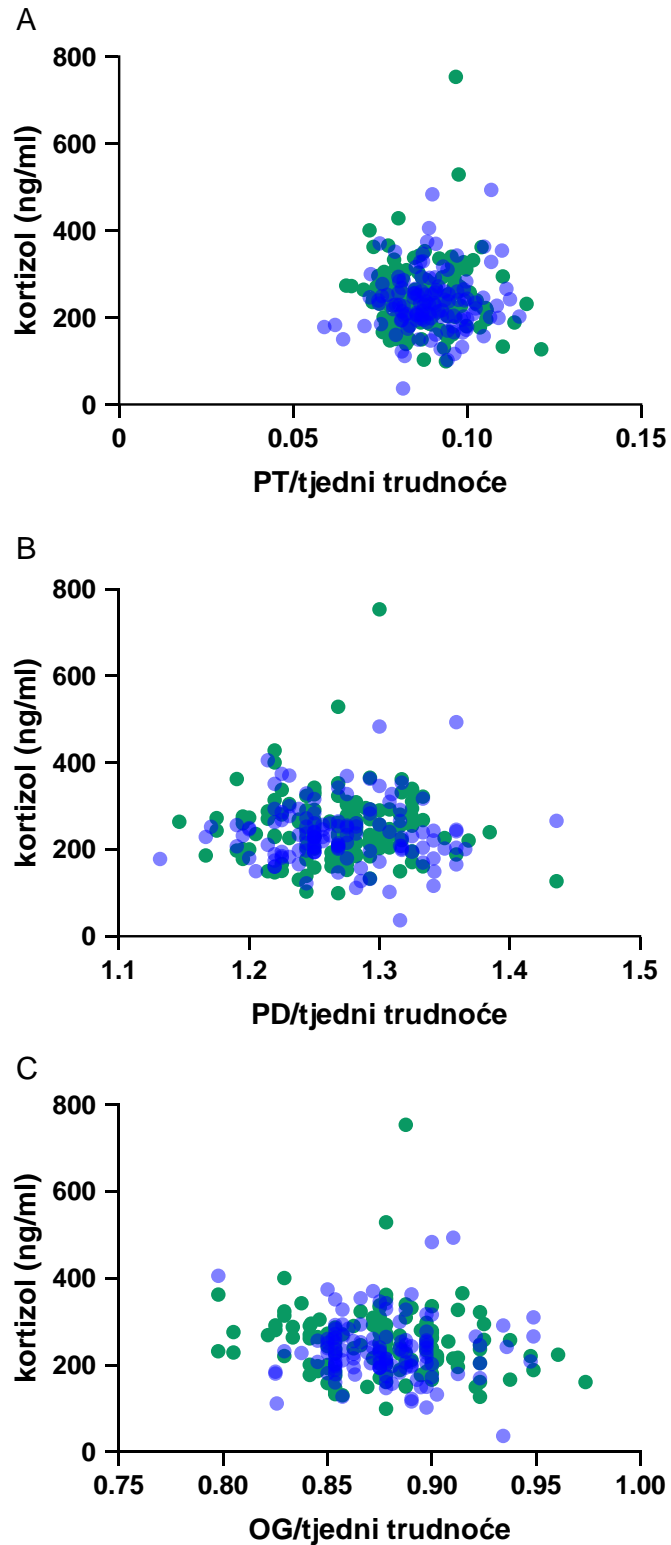
Porodajne težine, porodajne duljine i opsega glave novorođenčadi su, kao što je očekivano u visokoj međusobnoj korelaciji (Slika 26.) međutim nisu pokazali statistički značajnu povezanost s razinom kortizola u plazmi izmjerenog kod majki u drugom tromjesečju (Slika 27.). Vrijednosti APGAR-a ne pokazuju povezanost niti s jednim parametrom (Tablica 14.).

Tablica 14. Spearmanov koeficijent i p-vrijednosti APGAR-a i povezanost antropometrijskih parametara novorođenčadi i razina kortizola majke.

Spearmanov koeficijent vrijednost r (p vrijednost)	PT/tjedni trudnoće	PD/tjedni trudnoće	OG/tjedni trudnoće	Kortizol/ ng/mL
APGAR	0,03 (0,57)	0,07 (0,20)	-0,03 (0,60)	-0,07 (0,05)

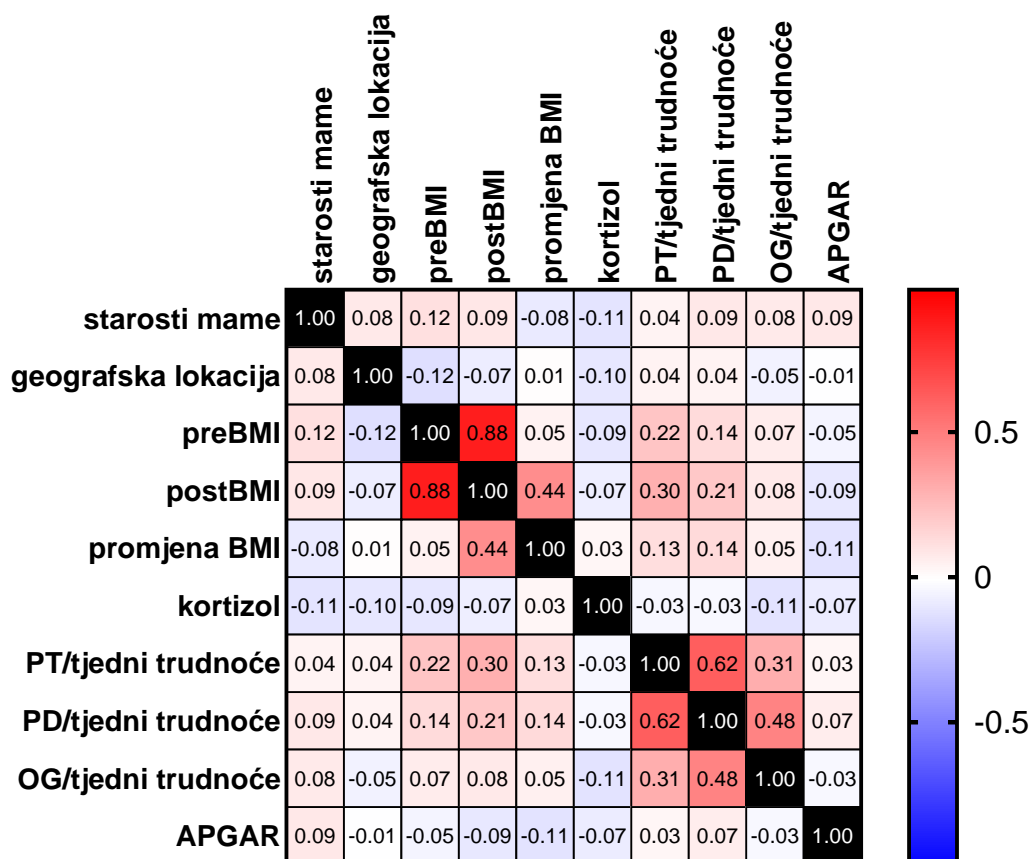


Slika 26. Međusobni odnos antropometrije djece korigirane s tjeđnima trudnoće: porođajna težina (PT), porođajna duļjina (PD) i opseg glave (OG). Nijanse boje ukazuju na promjene vrijednosti za opseg glave.



Slika 27. Antropometrijske mjere djece korigirane s tjeđnima trudnoće u odnosu na razinu kortizola izmjerena u plazmi majki: A. porođajna težina (PT), B. porođajna duljine (PD) i C. opseg glave (OG). Zelene točke ● pokazuju vrijednosti ispitanica na kopnu kao geografskoj lokaciji, a plave ● ispitanice na otoku.

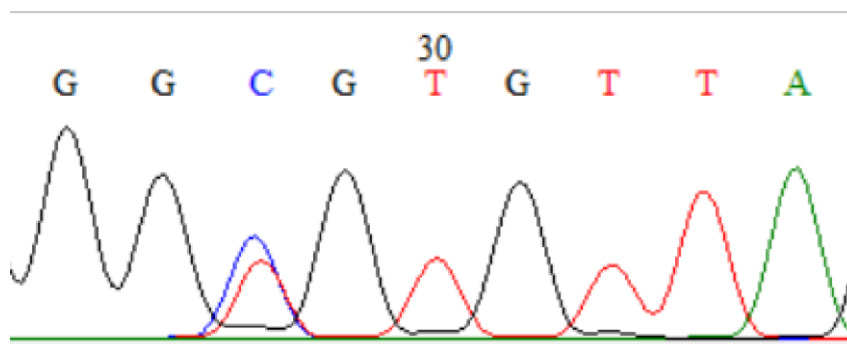
Sveukupni podaci vrijednosti Spearmanove korelacije navedeni su na slici 28.



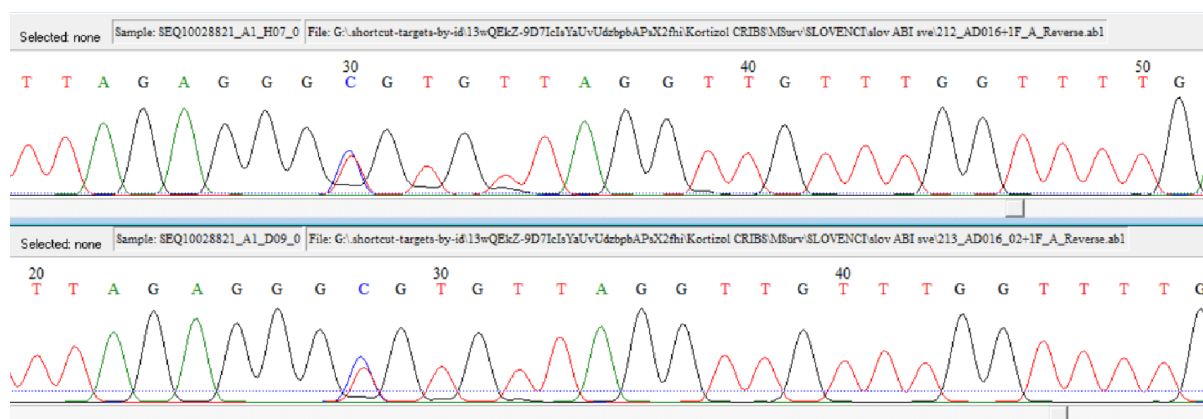
Slika 28. Korelacije starosti ispitanica, geografske lokacije (kopno ili otok), indeksa tjelesne mase prije (preBMI) i nakon trudnoće (postBMI) te razlike među njima (promjena BMI), razine kortizola, porođajne težine (PT), porođajne duljine (PD), opsega glave (OG) korigirana obzirom na tjedne trudnoće te APGAR nakon poroda. Crvena boja označava pozitivnu, a plava negativnu korelaciju uz graduiranje boje ovisno razini korelacije. Prikazane su vrijednosti Spearmanovog r koeficijenta korelacije.

4.5. Razine metilacije u 1F regiji promotora *NR3C1* gena

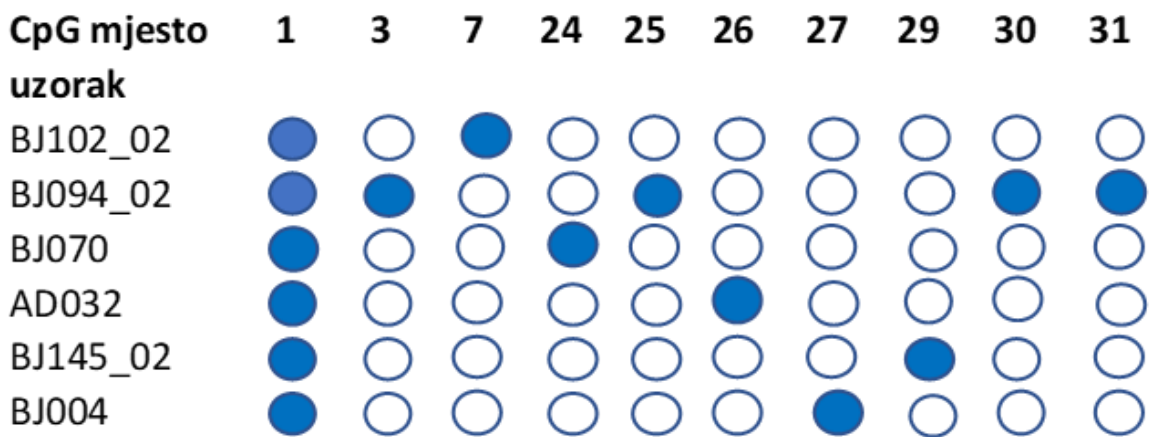
Metilaciju 38 CpG mjesta na 1F promotoru *NR3C1* gena sam analizirala na 37 parova mama-beba. Većina uzoraka, njih 71 su bili metilirani samo na jednom CpG mjestu (Slika 29.). Većina parova je imalo metilirano prvo CpG mjesto (Slika 30.). 28 CpG mjesta nisu bila metilirana niti u jednom uzorku. Ukupno 10 CpG mjesta je bilo metilirano u barem jednom uzorku i to na 3, 7, 24-27, 29-31 CpG mjestu (Slika 31.). U nekim slučajevima su se razlikovale metilirana mjesta u paru majba-bebe (Slika 32.).



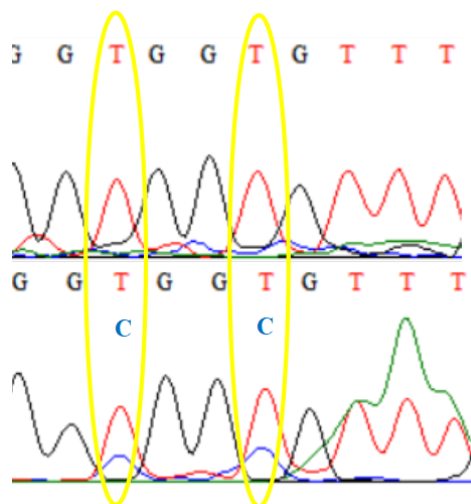
Slika 29. Uzorak AD016_02 i metilirano prvo CpG mjesto (Sliku napravila u programu BioEdit Sequence Alignment).



Slika 30. Uzorci AD016 i AD016_02 s metilacijom na prvom CpG mjestu. (Sliku napravila u programu BioEdit Sequence Alignment.)



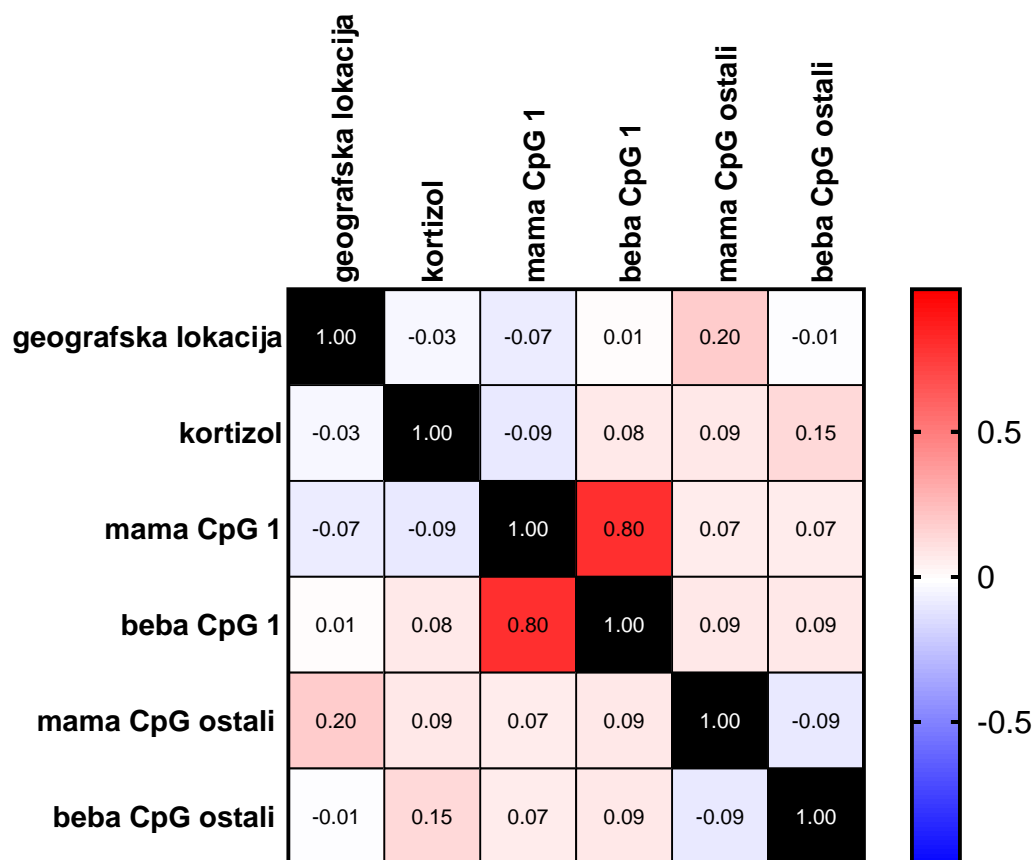
Slika 31. Metilirana CpG mjesta koja smo detektirali na 74 uzorka (37 parova). Od sveukupno analiziranih 38 CpG mjesta 10 je metiliranih CpG mjesta.



Slika 32. Diferencijalna metilacija para mama-beba. Na 30 i 31 CpG mjestu uzorak mame (BJ094) je nemetiliran, a kod djeteta (BJ094_02) metiliran. (Sliku napravila u programu BioEdit Sequence Alignment.)

4.6. Korelacija metiliranosti CpG mjesta NR3C1 1F gena

Analizirajući poduzorak od 37 dijada mama-beba uz geografsku lokaciju i razine kortizola u plazmi kod majki nisam našla korelaciju sa metilacijom analiziranih CpG mjesta (Slika 33.).



Slika 33. Korelacija geografske lokacije (kopno vs otok), razine kortizola kod ispitanica te metiliranosti NR3C1 1F na prvom CpG mjestu i ostalim detektiranim CpG mjestima u uzorcima dijada mama-beba. Crvena boja označava pozitivnu, a plava negativnu korelaciju uz graduiranje boje ovisno o vrijednostima. Prikazane su vrijednosti Spearmanove r koeficijenta korelacije.

5. RASPRAVA

5.1. Razlike između otočnih i kopnenih populacija

Biomedicinska istraživana populacija već duži niz godina zaokuplja znanstvenike, smatra se da bi tim istraživanjima dokučili koji parametri i na koji način utječu na rast, razvoj te sklonost određenoj grupi bolesti (Šarac i sur., 2022.). Život u mediteranskom podneblju za populaciju koja obitava na tom geografskom prostoru bi očekivano trebao doprinijeti zdravlju. Usporedba populacije na pet srednjodalmatinskih otoka (Brač, Hvar, Korčula, Vis i Lastovo) u usporedbi sa stanovništvom Koprivničko-križevačke županije u sjeverozapadnom dijelu kontinentalne Hrvatske pokazale su značajno niže incidencije gastričnih i pankreatičnih oblika raka u otočnoj populaciji. Mediteranska prehrana bi uz prisutne ekološke faktore poput klimatskih uvjeta mogla imati zaštitni učinak protiv raka želuca i gušterače (Vuletić Mavrinc i Mujkić, 2006.).

Ovo je istraživanje imalo za cilj ispitati povezanost BMI majke, razine kortizola tijekom trudnoće i antropometrijskih mjera novorođenčadi iz CRIBS kohorte. Otočje smo smatrali mjestom mirnijeg, manje stresnog načina života i kvalitetnije prehrane (Randić, 2001.) te smo očekivali da će specifična otočna populacija ispitanica biti manje podložna dodatnom stresu. U studiji samoprocjene zdravlja hrvatskih otočnih populacija je pokazala kvalitetnije fizičko funkcioniranje, vitalnost i podnošenje boli u odnosu na kopnenu populaciju. Moguće pojašnjenje je da se u otočnim populacijama odvija prirodna selekcija na način da se osobe potrebne specijalizirane zdravstvene skrbi odsele s otoka u ranijim životnim fazama. Tako na otoku do starosti ostaju fizički jače osobe. Poteškoće s kojima se otočani susreću su vezane uz mentalno zdravlje zbog ograničenog sociokulturnog kontakta pa su poteškoće izraženije što je populacija izoliranija (Vuletić Mavrinc i Mujkić, 2006.). Međutim, razni utjecaji s kopna su tijekom posljednjih desetljeća jako utjecali na tradicionalni način života otočana (Perinić Lewis i sur., 2019.).

Način života i prehrana su se u tolikoj mjeri promijenili (Zajc Petranović i sur., 2018.) da se, čini kako je život na otocima postao izvorište dodatnog stresa. Prethodni rezultati studije CRIBS pokazali su da pridržavanje mediteranske prehrane ovisi o socioekonomskim čimbenicima kao što su obrazovanje i prihodi kućanstva te da ne pokazuju značajnu korelaciju s komplikacijama u trudnoći ili antropometrijom djeteta (Havaš Auguštin i sur., 2020.).

5.1.1. Indeks tjelesne mase

Analizirajući indeks tjelesne mase ispitanica prije trudnoće (preBMI) uočili smo da je kod većine ispitanica bio u normalnom rasponu dok su ekstremne vrijednosti poput premale tjelesne težine, prekomjerne tjelesne težine i pretilosti primijećene s većom učestalošću kod otočanki u odnosu na ispitanice s kopna. Dobiveni podaci se nastavljaju na prethodnu studiju provedenu na ukupno 308 ispitanica i to 146 iz Splita i okolice te 162 s otoka (Braća i Hvara) gdje se pokazalo da ispitanice na otocima imaju više vrijednosti preBMI i krvnog tlaka u odnosu na ispitanice koje žive na kopnu (Šarac i sur., 2019.). U našem uzorku se očitovala značajna razlika koja je iznosila $p=0,0053$ u korist većeg preBMI žena koje žive na otocima.

Ovaj podatak važan je zbog uočavanja važnosti rezultata, a potom i preveniranja potencijalnih faktora rizika za razvoj zdravstvenih problema. Moguće objašnjenje bismo mogli razmotriti u socio-ekonomskom pogledu. Žene na otocima imaju u prosjeku nižu edukaciju od ispitanica na kopnu što je vjerojatno posljedica nedostatka obrazovnih institucija na otocima (Babić i Lajić, 2001.), te niže prihode i ne adekvatnu prehranu (Perinić Lewis i sur., 2019.; Zajc Petranović i sur., 2018.). Uočena majčina pretilost, hormonske promjene koje se događaju tijekom trudnoće uz različite društvene, socijalne i ekonomske čimbenike doprinose prekomjernom gestacijskom debljanju (engl. *GWG, gestation weight gain*). Tako se povećava rizik od gestacijskog dijabetesa melitusa (engl. *GDM, gestation diabetes mellitus*), povećava rizičnost trudnoće te ima postporođajne posljedice za majke i djecu. Čini se da preBMI ima veći utjecaj na perinatalne ishode za majke i dojenčad nego korigiranje tjelesne težine za vrijeme trudnoće (Zhang i sur., 2023.).

5.1.2. Antropometrija novorođenčadi

Porođajna težina novorođenčadi usklađena je s gestacijskom dobi, a nedonoščad smo izuzeli iz korelacija. Naša studija je također pokazala da najveću porođajnu težinu ima upravo muška novorođenčad otočnih ispitanica koje su imale statistički značajno višu razinu kortizola od ispitanica s kopna. Sve je više literature koja sugerira mogućnost specifičnog mehanizma fetalnog programiranja ovisnog o spolu (Braithwaite i sur., 2018.). Zanimljiv je podatak Wirral Child Health and Development Study (WCHADS) kohorte o pozitivnom i značajnom odnosu razine majčinog prenatalnog kortizola i fetalnog rasta kod muške djece te posljedično i porođajne težine muške novorođenčadi dok je povezanost za žensku novorođenčad bila negativna (Braithwaite i sur., 2018.). Međutim od jedanaest studija koje su analizirali Cherak i

suradnici (2019.) deset je pokazalo negativnu korelaciju između razine kortizola mjenog u slini tijekom trudnoće i porođajne težine za oba spola.

Postoji nedosljednost u izvješćima između stresa tijekom trudnoće i fetalnog rasta gledajući mjere porođajne težine i opsega glave. Kohortna studija provedena u Amsterdamu (ABCD) otkrila je, nakon korekcije o vremenu vađenja krvi, da su više razine kortizola kod majki negativno povezane s nižom tjelesnom masom i pozitivno s većim rizikom za malu gestacijsku dob (SGA) ali samo kada je krv vađena do 9 sati ujutro (Goedhart i sur., 2010.).

Opetovana nedosljednost i kontradiktornost do sada provedenih studija naglašavaju metodološke izazove u proučavanju stresa tijekom trudnoće kroz analizu razine kortizola u krvi u smislu bioloških uzoraka, vremena uzorkovanja, različitih metoda analiza i brojnih socio-kulturnih i okolišnih čimbenika. Iako su mjere psihološkog stresa majke ili hormona stresa povezane s nepovoljnim ishodom trudnoće, izravna korelacija između stresa i njegovih ishoda rijetko je potvrđena zbog kompleksnosti samog biološkog odgovora na okolišne uvjete.

U literaturi nije pronađena studija koja je uz spol djeteta uzela u obzir i mjesto prebivališta kao čimbenik potencijalne razlike u razini kortizola. Obzirom da život na kopnu i otocima ima svoje specifičnosti htjeli smo pronaći potencijalne razlike za vrijeme intrauterinog razvoja, a koje bi za posljedicu mogle imati niz zdravstvenih problema koji se sve više primjećuju i očituju od najranije dobi.

Kod analiziranja antropometrije novorođenčadi čije smo vrijednosti porođajne težine, porođajne duljine i opsega glave korigirali s tjednima gestacije nismo našli povezanost s razinom kortizola izmjenog kod majki. Vrijednosti APGARA novorođenčadi bile su dosta jednoznačne i nije bilo koreliranja s razinom kortizola. Sama vrijednost APGAR-a je bila između 8 i 10 što je značilo zdravo novorođenče. Nedonoščad smo izuzeli iz promatrane analize. U literaturi nalazimo studije koje povezuju loš APGAR rezultat s povišenom razinom stresa (Horsch i sur., 2019.).

5.2. Kortizol u trudnoći

Trudnoća je u svakom smislu riječi drugo stanje, vrijeme u kojem se kontinuirano događaju razne promjene, a nedostupnost određenih usluga kao što je zdravstvena skrb i/ili prometna povezanost postaje prioritet i potencijalni izvor nelagode, nesigurnosti i stresa (Delale i sur., 2021.). Kortizol kao važan pokazatelj odgovora na stres privukao je značajnu

pozornost u brojnim kohortnim studijama zbog svojih potencijalnih učinaka tijekom trudnoće. Tako uz prirodni porast razine kortizola uvjetovanog promjenama u ženinom tijelu imamo i dodatni uvjetovan promjenom prioriteta odnosno potreba. Sve potrebno za rast i razvoj djeteta crpi se iz majčinog tijela i to se razlikuje ovisno o tjednu gestacije i razvoju pojedinih organa. Cijeli neuroendokrini sustav odgovora na stresa je promijenjen. Neki organi poput hipofize udvostruče se veličinom, proizvodnja hipofiznih peptida se povećava, a posteljica postaje aktivni endokrini organ (Glynn i sur., 2013.; Sandman i sur., 2012.). Razina estrogena koju posteljica proizvodi stimulira proizvodnju jetrenog globulina koji veže kortikosteroide (CBG) koji stimulira produkciju kortizola. Također, nađena je povišena razina plazma ACTH u plazmi za održavanje odgovarajuće razine slobodnog kortizola u serumu (Lindsay i Nieman, 2005.).

Važna uloga kortizola koju ima u podlozi razvoja mozga i ostalih organskih sustava očitovana je u ekspresiji glukokortikoidnih receptora koja se nalaze u većini fetalnih tkiva a neophodni su za preživljavanje (Sapolsky, 2000.). Spolno-specifične povezanosti između autonomnog i glukokortikoidnog funkcioniranja objavljene su i u drugim studijama (Cowell, 2021., Wright, 2019.). Rast koncentracije kortizola može pogodovati razvoju živčanog sustava (Kapoor i sur., 2006.), ali prekomjerne razine mogu ugroziti razvoj mozga zbog potencijalnih neurotoksičnih učinaka (Uno i sur., 1990.; Bruschetti i sur., 2006.).

Projekt *Ice Storm* osmišljen je kako bi istražio učinke prirodne nepogode poput one iz 1998. godine kada je nevrijeme u vidu kiše, leda i snijega pogodilo kanadsku provinciju Quebec i ostavilo milijune stanovnika bez električne energije usred zime. Dugotrajna odsječenost, nestanak električne energije za neke i do dva tjedna, nastale mnogobrojne štete usred zime su bili jaki okidači stresa. Mnoge trudnice su bile među stanovništvom. Studija provedena kako bi se istražili učinci proživljenog stresa dali su uvid u učinke prenatalnog majčinog stresa ovisno o tromjesečju izloženosti. Izloženost u prvom tromjesečju bila je povezana s manjim opsegom glave u odnosu na porođajnu duljinu muške djece i utjecala je na kognitivni razvoj; izloženost u drugom tromjesečju utjecala je na kognitivni i jezični razvoj u dobi od 2 godine, a izloženost u trećem tromjesečju je utjecala na motorički razvoj (King i sur., 2012.). Dodatna istraživanja pokazuju da su prenatalne razine kortizola kod majke povezane s anksioznim simptomima kod djece (McGuinn i sur., 2022.) i mogu utjecati na motorički i kognitivni razvoj (Avishai-Eliner i sur., 2002.; Huizink, 2000.). Konkretnije više razine kortizola u drugom tromjesečju značajno su povezana s nižim motoričkim i neuralnim razvojem dojenčadi (Davis i Sandman, 2010.; O'Connor i sur., 2013.; Werner i sur., 2013.). Uočen je također i linearan

odnos između koncentracije kortizola kod majki i fetusa (Baibazarova i sur., 2013.). Neke studije izvjestile su o trajnoj povezanosti čak i u djetinjstvu i adolescenciji u obliku fizičkih i psihičkih zdravstvenih problema, nižeg kvocijenta inteligencije, poremećaja pažnje, regulacije emocija (Clavarino i sur., 2010.; LeWinn i sur., 2009.; Gutteling i sur., 2006.) i kliničke stope poremećaja pažnje i hiperaktivnosti (ADHD) (Barker i sur., 2009.; O'Connor i sur., 2003.; Rice i sur., 2007.; Ronald i sur., 2011.).

Rezultati studija sugeriraju da bi smanjenje broja stresora koje žena doživljava tijekom trudnoće moglo utjecati na smanjenje nekih od prethodno navedenih poremećaja. Longitudinalne studije nam pokazuju vezu prenatalnog stresnog okruženja, razine kortizola i utjecaja na razvoj sa suprotnim učincima ovisno o spolu djeteta (Fleck i sur., 2023.). Studije provedene na ljudima i animalnim modelima podjednako sugeriraju da je to izuzetno osjetljivo razdoblje promjene osjetljivosti na prenatalni stres (Majer i sur., 2023.; Nath i sur., 2017.; Lewis i sur., 2015., DiPietro, 2012.; Lazinski i sur., 2008.; O'Connor i sur., 2005.; Avishai-Eliner i sur., 2002.).

U ovom istraživanju utvrđeno je da su razine kortizola kod majki značajno više u žena koje žive na otocima nego na kopnu ($p=0.046$). Napravili smo i dvosmjernu analizu varijance kako bi razlučili doprinosi li i spol djeteta toj razlici. Rezultati su pokazali da uistinu i geografska lokacija i spol zajedno doprinose uočenim razlikama u razini kortizola među ispitanicama na kopnu ($p=0.0011$) i imaju statističku značajnost, ali ne i među ispitanicama s otoka. Zanimljivo je da su žene koje su nosile žensko dijete imale višu razinu kortizola od onih koje su nosile muško dijete bez obzira na geografsku lokaciju življenja (otoci ili kopno). Ovu razliku, vjerojatno uzrokovanu spolnim hormonima djeteta, pokazale su i druge studije kao što je kohorta djece rođene u Amsterdamu i njihov razvoj – ABCD (Vrijkote i sur., 2023.). Obzirom na povišenu razinu kortizola kod ispitanica koje su nosile muško dijete na otoku u odnosu na ispitanice s kopna, čime se izgubila statistički značajna razlika u odnosu na ispitanice koje su nosile žensko dijete, život na otoku bi mogao predstavljati dodatni stres u trudnoći. Međutim, DiPietro i sur. (2011) su, mjereći majčinu razinu kortizola iz sline počevši od 24-30 tjedna gestacije, uočili da žene koje nose mušku djecu imaju višu razinu kortizola od onih koje nose žensku djecu. Rezultati kohortne studije provedene u Ghani na 783 trudnice su pokazali da povezanost visoke razine kortizola, mjerene u prvom i drugom tromjesečju kod majki, utječe na kraću trudnoću i tri puta povećava rizik preranog poroda ali samo kod muške djece (Oaks i sur., 2022.). Povezanost muškog spola djeteta i preranog poroda potvrdile su i druge studije

primjerice Challis i sur. (2013.). Studija koju je provela Marino-Narvaez i sur. (2023.) je također pokazala da prenatalni kortizol ima različite utjecaje na neurološki razvoj ovisno o spolu djeteta. Rezultati upućuju na to da su način života i prethodno spomenuta prehrana i socio ekonomski uvjeti koji su se promijenili u svim segmentima doprinijeli ovakvom rezultatu analiza.

Očekivano, u slučaju prijevremenog poroda naših ispitanica pokazalo se kako majke imaju višu razinu kortizola i to neovisno o spolu djeteta. Slične rezultate s povišenom razinom majčinog kortizola našli smo u rezultatima studije koju je provela Oaks i sur., 2022. s time da su tu poveznicu primarno našli kod žena koje su nosile dijete muškog spola. Ta je studija rađena na specifičnoj populaciji u Gani pa bi svakako studiju trebalo proširiti i istražiti na većem uzorku kako bi se mogli dati precizniji zaključci. Još nije potpuno razjašnjeno djelovanje kortizola, primjerice kod nedonoščadi primijećena je povišena razina kortizola kod majki ali se ne zna što uzrokuje to povišenje, majčin ili dječji metabolizam.

5.3. Metilacija 1F promotora *NR3C1* gena

Postoje brojni dokazi o utjecaju stresa na regulaciju ekspresije gena. Stres povezan s razinama kortizola i metilacijom određenih CpG otoka *NR3C1 1F* gena opisan je u više znanstvenih studija, a povezan je različitim traumama i stresnim stanjima majke (Oberlander i sur., 2008., Palma Gudiel 2015. a,b). Osim stresnih stanja kod majki, hipermetilacije su nađene u 70% studija provedenih na animalnim modelima i kod 89% studija vezanih uz rane životne nepovoljne okolnosti (Cicchetti i Handley, 2017.).

Metiliranost na 10 CpG mjesta, od sveukupno 38 analiziranih, koja smo detektirali u našim uzorcima. Obzirom na razlike u razinama kortizola prema geografskoj lokaciji, očekivali smo razlike u metiliranosti promotora, međutim nismo otkrili povezanost metilacije s nijednim izmjerenim parametrom.

CpG mjesto koje je po Palma Gudiel označeno kao **1** CpG mjesto nađeno je metilirano u skoro svim našim uzorcima mama i novorođenčadi. Kao što je navedeno u literaturi, metilacija ovog CpG mjesta kod novorođenčadi povezana je s anksioznošću majki tijekom trećeg tromjesečja (Hompeš i sur., 2013.). Nadalje, Hompeš i suradnici opisali su hipometilaciju na **30** i **31** CpG mjestu, nađenu kod prenatalno stresirane novorođenčadi.

Metilirano **27** CpG mjesto povezano je s rezultatom glavne komponente Upitnika

anksioznosti povezane s trudnoćom (PRAQ, Pregnancy-related Anxiety Questionnaire) i njegovom subskalom o strahu za integritet u prvom i drugom tromjesečju. Isto tako povezano je sa subskalom straha od rađanja tijekom drugog tromjesečja te rezultatima Upitnika stanja anksioznosti tijekom prvog trimestra (STAI, The State-Trait Anxiety Inventory). Međutim u našem uzorku nije pronađena povezanost, prvenstveno jer je metilacija na 27 mjestu nađena samo u jednom uzorku mame.

Van de Knaap i suradnici pronašli su pozitivnu vezu između metilacije **29** i hipermetilacije **30** CpG mjesta i izloženosti jednokratnom i opetovanom spolnom zlostavljanju, ponavljanoj izloženosti fizičkom zlostavljanju i drugim traumama te brojem stresnih životnih situacija doživljenih tijekom adolescencije i prije 15. godine (van der Knaap i sur, 2014.). Nemamo informaciju o ovakvoj povijesti za uzorak kod kojeg smo našli metilirano **29** CpG mjesto. Ostala metilirana mjesta u našem uzorku na **3, 7, 24, 25** i **26** CpG mjestu nađena su u po jednom od analiziranih uzoraka, nisu povezana s drugim parametrima u našem uzorku, a u literaturi nemaju povezanost sa specifičnim utjecajem na zdravstveni sustav kod čovjeka. U našoj analiziranoj skupini imali smo jedan intrigantan uzorak novorođenčeta BJ094_02 koji je imao metilaciju na ukupno 5 CpG mjesta i to **1, 3, 25, 30** i **31** mjestu. Hipometilacija na **30** i **31** CpG mjestu se povezuje s prenatalnm stresom novorođenčadi (Hompeš i sur., 2013.).

U ovoj studiji smo htjeli razjasniti postoji li povezanost geografske lokacije, razine kortizola i metilaciju, i posljedično regulaciju, promotora *NR3C1 1F* gena. Međutim, u našoj analiziranoj podgrupi, zbog malog broja diade-mame bebe, nismo otkrili povezanosti između navedenih parametara.

5.4. Prednosti i nedostaci eksperimentalnog pristupa

Primijenjeni eksperimentalni pristup koji je korišten u ovoj disertaciji ima nekoliko prednosti:

1. Uzorak čiji dio je analiziran u ovom radu, prikupljen je u okviru prve kohortne studije provedene u jugoistočnoj Europi s ciljem utvrđivanja prevalencije promjenjivih čimbenika rizika (bioloških, okolišnih, bihevioralnih) za razvoj metaboličkog sindroma koji pogađa sve veći dio stanovništva. Kohortne studije nam pomažu kako bismo što bolje razumjeli i mogli pratiti čimbenike povezane sa zdravljem majki i djece. Najveći broj kohortnih studija provodi se u zemljama sjeverozapadne i srednje Europe (Šunić i sur., 2021.). Prethodna istraživanja pokazala su iznenađujuće visoku stopu obolijevanja od MetS na hrvatskim otocima

(Deka i sur., 2012.) pa su samim tim vrijedan uzorak.

2. U literaturi nismo pronašli studiju koja promatra analizirane čimbenike s obzirom na mjesto življenja (kopno vs otok) te je ova studija nastavak istraživanja i produblivanja eksperimentalnog pristupa koji uzima u obzir okolišne razlike. Život na udaljenim područjima kao što je otok može utjecati na otežanu prilagodbu zbog slabije povezanosti s primjerice zdravstvenom infrastrukturom, osobito za trudnice (Delale i sur., 2021.).

3. Na uzorku od 344 ispitanica dobili smo rezultate sukladne prethodnim analizama provedenim na 266 sudionica kohorte CRIBS (Havaš Auguštin i sur, 2020). BMI prije trudnoće je veći kod ispitanica koje žive na otocima od ispitanica koje žive na kopnu. Vrijednosti preBMI izračunate su iz vrijednosti o visini (cm) i težini (kg) prije trudnoće koje su prijavile same ispitanice. Ti podaci uspoređeni su s mjerama koje su uzete u zdravstvenoj ustanovi od strane medicinskog osoblja prilikom prvog prenatalnog posjeta. BMI je analiziran kao kontinuirana varijabla. Jedan od razloga za veći preBMI kod ispitanica s otoka može se pripisati trendovima globalizacije i vrsti prehrane. Međutim, po prethodno provedenoj studiji čini se da je prehrana povezana više uz socio-ekonomski status nego uz trudnoću. Bolji socioekonomski status vezan je uz zdraviju prehranu i na otocima i na kopnu (Havaš Auguštin i sur., 2020.).

4. Uvedena je metoda analize kortizola iz plazme (modificirana metoda po Piwowarskoj 2012.) pomoću HPLC-a, a dobivene vrijednosti uspoređene su obzirom na mjesto življenja ispitanica. Uvođenje metode je bilo dugotrajno i zahtjevno. Iziskivalo je praćenje puno parametara počevši od samog laboratorijskog pribora za ekstrakciju do aparature, prilagodbu optimalnog volumena analita, optimalnog protoka struje dušika, protoka kroz kolonu i tako dalje, a kako bismo dobili vjerodostojne rezultate. Ova validirana uspostavljena metoda omogućava analiziranje više uzoraka kortizola odjednom.

Nedostaci eksperimentalnog pristupa:

1. Uzorci plazme i seruma uzeti su samo jednom tijekom drugog tromjesečja. Bilo bi korisno uzorkovati biološki uzorak još par puta kako bi se mogle preciznije odrediti razine kortizola. Obzirom da koncentracija ovisi o brojnim čimbenicima, uzorak kose bi bio prikladniji jer je razina kortizola stabilnija nego u plazmi/serumu, slini ili urinu i pokazuje očekivani porast razine kortizola tijekom trudnoće te korelira s mjerama kortizola u slini i

kroničnim stresom (Kirschbaum i sur., 2009.; D'Anna-Hernandez i sur., 2011.). Poteškoća bi se mogla javiti kod uzorka za novorođenčad jer se ne rađa sva novorođenčad s kosom pa je dostupnije uzeti krv iz pupkovine iz koje smo dobili DNA za potrebe analize metiliranosti CpG mjesta kao što je rađeno u studijama (Balbi i sur., 2021.).

2. Analizu metilacije DNA uspjela je u malom broju dijada majka-dijete otežavajući analizu povezanosti varijabli istraživanja. Potrebno bi bilo imati veći broj diada. Također krv iz koje je izolirana DNA korištena za analizu metilacije CpG otoka prikupljena je i transportirana u više navrata kroz tri godine odnosno za vrijeme trajanja projekta. Čuvana je u Kliničkom bolničkom centru u Splitu te je transportirana do Biobanke Instituta za antropologiju gdje je čuvana na -80°C do uporabe. Vjerojatno je manipulacija i transportiranje u prijenosnim spremnicima te duže stajanje utjecalo na kvalitetu samih uzoraka.

3. Veći broj sudionica bio je s otoka Brača. Iako imaju zajedničkih obilježja, obzirom na specifičnosti otoka Hvara, bilo bi zanimljivo imati veći uzorak ispitanica s otoka Hvara. Neki pokazatelji na koje smo naišli tijekom analiza podataka daju naslutiti razlike među ispitanicama s dva promatrana otoka Brača i Hvara.

6. ZAKLJUČCI

Antropometrija

- PreBMI (tjelesni indeks mase prije trudnoće) pokazao se statistički značajno veći na otocima u odnosu na kopno.
- Porođajna težina statički značajno ovisi o spolu novorođenčeta u otočnoj populaciji. Ženska novorođenčad s otoka ima najmanju porođajnu težinu.
- Porođajna duljina je veća kod ženske novorođenčadi na kopnu u odnosu na otoke.
- Opseg glave je ovisan samo o spolu i to značajnije kod novorođenčadi na otoku nego na kopnu.
- Antropometrijska obilježja djeteta (porođajna težina, duljina i opseg glave) pokazuju spolne razlike, koje su naglašenije na otoku.

Kortizol

- Razina kortizola testiranog u drugom tromjesečju razlikuje se ovisno o geografskoj lokaciji kopno vs otok.
- Suprotno očekivanom, utvrđena je statistički značajno viša razina kortizola kod trudnica koje žive na otocima u odnosu na razinu kortizola trudnica s prebivalištem na kopnu.
- Razlika u razinama kortizola ovisno o spolu djeteta pronađena u uzorku kopna nije nađena kod trudnica koje žive na otocima.

Epigenetika

- U dijelu kohorti analiziranih u ovom radu kod 37 dijada majka-dijete nađena je metilacija na 10 CpG mjesta.
- Učestalost za prvo CpG mjesto je najveća dok su ostalih 9 metiliranih mjesta ustanovljena u po samo jednom uzorku.
- Nije uočena povezanost između geografske lokacije, razine kortizola, spola djeteta i razine metilacije na testiranim CpG mjestima.

Potvrđena je postavljena hipoteza da različiti okolišni uvjeti (otoci i kopno) imaju utjecaj na razlike u razini kortizola kod trudnica i antropometriji novorođenčadi. Unatoč zahtjevnom postupku prikupljanja uzoraka kod osjetljive populacije trudnica, analizirani uzorak bi bilo potrebno proširiti u daljnjim istraživanjima da bi se moglo utvrditi postojanje ili izostanak metilacije CpG otoka u promatranoj 1F regiji *NR3C1* gena ali i ostalih promatranih parametara. Radi dobivanja preciznijih rezultata trebalo bi provesti replikacijsku studiju na proširenom uzorku.

7. LITERATURA

- Abbassi-Ghanavati M**, Greer LG, Cunningham FG (2009) Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol.* 114(6): 1326-31.
- Adane AA**, Tooth LR, Mishra GD (2019) The role of offspring's birthweight on the association between pre-pregnancy obesity and offspring's childhood anthropometrics: a mediation analysis. *J Dev Orig Health Dis.* 10: 570-7.
- Ali AH** (2022) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Ann Adv Chem.* 6: 010-020.
- Altova EP**, Hargittai I (2022) Mikhail S. Tsvet – pioneer of chromatography – 150 years from his birth, *Structural Chemistry* 33:1-3.
- Avishai-Eliner S**, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ (2002) Stressed-out, or in (utero)? *Trends Neurosci.* 25(10):518-24.
- Babić D**, Lajić I (2001) Dilema mladih otočana: ostanak ili odlazak s otoka. Primjer šibenskih otoka. *Sociologija sela* 39: 61-82
- Baibazarova E**, van de Beek C, Cohen-Kettenis PT, Buitelaar J, Shelton KH, van Goozen SH (2013) Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology* 38(6): 907-15.
- Baker ME** (2004) Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 215: 55-62.
- Balbi A1**, Gomez ME, Gonzalez D, Fritzler A, Ibar C, Jamardo J, Jacobsen D, Perazzi B, Repetto EM, Berg G, Fabre B (2021) Association between Umbilical Cord Blood Cortisol and Maternal Cortisol during pregnancy. *Austin Journal of Obstetrics and Gynecol.* 8(3): 1171.
- Barać L**, Peričić M, Klarić IM, Rootsi S, Jančićević B, Kivisild T, ... Rudan P (2003) Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. *European Journal of Human Genetics*, 11(7): 535–542.
- Barbalić M**, Narancić NS, Skarić-Jurić T, Salihović MP, Klarić IM, Lauc LB, ... Rudan P (2009) A quantitative trait locus for SBP maps near KCNB1 and PTGIS in a population isolate. *American Journal of Hypertension*, 22(6): 663–668.
- Barker DJP**, Osmond C (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*

- Barker DJP**, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ (1989 a) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet*
- Barker DJP**, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ (1989 b) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*
- Barker DJP**, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG (2009) Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Annals of Human Biology*, 36:5:445-458.
- Benediktsson R**, Seckl JR (1998) Understanding human parturition. *Lancet*. 344: 77-81.
- Benyovsky Šoštarić K** (2010) *Zeleni kvadrat: zdravlje iz organskog vrta*, Profil, Zagreb
- Božanić J**, *Terra maritima*, Glasje, IV, 7/8, 97-100.
- Brač; Hvar. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 2.9.2024. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/9137>
- Braithwaite EC**, Hill J, Pickles A, Glover V, O'Donnell K, Sharp H (2018) Association between maternal prenatal cortisol and fetal growth are specific to sex: Findings from the Wirral Child Health and Development Study.
- Breslau N**. Psychiatric sequelae of low birth weight. *Epidemiol Rev.* 1995; 17: 96-106.
- Breslau N**, Brown GG, DelDotto JE, Kumar S, Ezhuthachan S, Andreski P, i sur (1996 a) Psychiatric sequelae of low birth weight at 6 years of age. *J Abnorm Child Psychol.* 24: 385-400.
- Breslau N**, Chilcoat H, DelDotto J, Andreski P, Brown G (1996 b) Low birth weight and neurocognitive status at six years of age. *Biol Psychiatry.* 40: 389-397.
- Brown P J** (1991) Culture and the evolution of obesity. *Inc New York Human Nature.* 2(1): 31-57.
- Bruschettini M**, van den Hove D, Timmers S et al. (2006) Cognition- and Anxiety-Related Behavior, Synaptophysin and MAP2 Immunoreactivity in the Adult Rat Treated with a Single Course of Antenatal Betamethasone. *Pediatr Res* 60: 50–54.
- Bryder L** (2019) Mobilising Mothers: The 1917 National Baby Week. *Med Hist.* 63(1): 2-23.
- Calkins K**, Devaskar SU (2011) Fetal Origins of Adult Disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 41(6):158-176
- Cannon W B** (1932). *The wisdom of the body*. W W Norton & Co.
- Cao-Lei L**, Laplante DP, King S (2016) Prenatal Maternal Stress and Epigenetics: Review of the Human Research. *Curr. Mol. Bio. Rep.* 2: 16-25.

- Catalano PM**, Shankar K (2017) Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ*
- Cartwright CC**, Wallace DC (2007) *Nursing care of the pediatric neurosurgery patient..* Springer. Berlin. ISBN 978-3-540-29704-8. OCLC 184984568
- Challis J**, Newnham J, Petraglia F, Yeganegi M, Bocking A (2013) Fetal sex and preterm birth. *Placenta*. 34(2): 95-99.
- Chrousos GP** (2000). The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24(2): S50–5.
- Chu B**, Marwaha K, Sanvictores T, Awosika AO, Ayers D (2024) *Physiology, Stress Reaction*. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Cicchetti D**, Handley ED (2017) Methylation of the glucocorticoid receptor gene, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1), in maltreated and nonmaltreated children: Associations with behavioral undercontrol, emotional lability/negativity, and externalizing and internalizing symptoms. *Dev Psychopathol*. 29(5): 1795-1806.
- Clark PM** (1998) Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the fetal origins of adult disease hypothesis. *Eur J Pediatr*. 157S1: S7-10.
- Clavarino AM**, Mamun AA, O'Callaghan M, Aird R, Bor W, O'Callaghan F, Williams GM, Murrin C, Najman JM, Alati R (2010) Maternal anxiety and attention problems in children at 5 and 14 years. *J Atten Disord*. 13(6): 658-67.
- Cherak SJ**, Malebranche ME, Wynne-Edwards K, Williamson T, Giesbrecht GF (2021) Quantitative meta-analysis of maternal prenatal salivary cortisol and newborn birth weight does not identify the effect of fetal sex. *Psychoneuroendocrinology*. 2019 Aug;106:117-121. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.03.036. Epub 2019 Apr 4. Erratum in: *Psychoneuroendocrinology*. 131:105338.
- Colton T** (1974) *Statistics in medicine*. Little, Brown & Co, Inc, Boston
- Cottrell EC**, Seckl JR, Holmes MC, Wyrwoll CS (2014) Foetal and placental 11 β HSD2: A hub for developmental programming. *Acta Physiol*. 210: 288-95.
- Cowell W**, Khoury JE, Petty CR, Day HE, Benítez BE, Cunningham MK, Schulz SM, Ritz T, Wright RJ, Enlow MB (2021) Integrated and diurnal indices of maternal pregnancy cortisol in relation to sex-specific parasympathetic responsiveness to stress in infants. *Developmental Psychobiology*, 63(2): 350–363.

- Cunningham S**, Cameron IT (2003) Consequences of fetal growth restriction during childhood and adult life. *Current Obstetrics & Gynaecology*. 13: 212-217.
- Čolak N** (1959) Iz života iseljenika Makarske i njenog Primorja na srednje dalmatinskom otočju u XVII. i XVIII. stoljeću. U: *Prilozi povijesti otoka Hvara* 1(1): 87-121.
- D'Anna-Hernandez KL**, Ross RG, Natvig CL, Laudenslager ML (2011) Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiology & behavior*. 104: 348–53.
- Daruna JH** (2004) *Introduction to Psychoneuroimmunology (First Edition)*. Elsevier Inc.
- Davis EP**, Sandman CA (2010) The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child Dev*. 81(1): 131-48.
- Deaton AM**, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 25(10): 1010–22.
- De Carlo R**, Kura A, Suraci S, Magi A, Volta A, Marcucci R, Gori AM, Pepe G, Giusti B, Sticchi E (2020) Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? *Front Genet*. 11: 592588.
- Deer LBK**, Su C, Thwaites NA, Davis EP, Doom JR (2023) A framework for testing pathways from prenatal stress-responsive hormones to cardiovascular disease risk. *Frontiers in Endocrinology*
- Deka R**, Duraković Z, Niu W, Zhang G, Karns R, Smolej-Narančić N, Missoni S, Carić D, Carić T, Rudan D, Salzer B, Chakraborty R, Rudan P (2012) Prevalence of metabolic syndrome and related metabolic traits in an island population of the Adriatic. *Annals of Human Biology*
- Delale EA**, Novokmet N, Fuchs N, Dolanc I, Mrdjen-Hodžić R, Karelović D, Janković S, Milanović SM, Cameron N, Missoni S. Stress, locus of control, hope and depression as determinants of quality of life of pregnant women: Croatian Islands' Birth Cohort Study (CRIBS). *Health Care Women Int*. 2021
- Dickens MJ**, Pawluski JL (2018) the HPA axis during the perinatal period : implications for perinatal depression. *Endocrinology* 159(11): 3737-46.
- DiPietro JA**, Costignan KA, Kivlighan KT, Chen P, Laudenslager ML (2011) Maternal salivary cortisol differs by fetal sex during the second half of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 36 (4), 588–591.
- DiPietro JA** (2012) Maternal stress in pregnancy: considerations for fetal development. *J*

Adolesc Health. 51(2): S3-8. doi: 10.1016/j.jadohealth.2012.04.008.

Dorifor. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Dostupno na <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=15995>. Pristupljeno 22. 3. 2022.

Entringer S, Buss C, Rasmussen JM, Lindsay K, Gillen DM, Wadhwa D (2017) Maternal Cortisol During Pregnancy and Infant Adiposity: A Prospective Investigation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 102(4): 1366-1374

Fleck L, Fuchs A, Sele S, Moehler E, Koenig J, Resch F, Kaess M (2023) Prenatal stress and child externalizing behavior: effects of maternal perceived stress and cortisol are moderated by child sex. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*. 17(1): 94.

Glamuzina N, Fuerst-Bjeliš B (2015) *Historijska geografija Hrvatske*, Filozofski fakultet Split, Split

Glicksman K (2015) Recent work on Roman quarries near Korčula and on Brač. *Vjesnik za arheologiju i povijest dalmatinsku*

Glukokortikoidi. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013.–2024. Dostupno na <https://www.enciklopedija.hr/clanak/glukokortikoidi>. Pristupljeno 10.9.2024.

Glynn LM, Davis EP, Sandman CA (2013) New insights into the role of perinatal HPA-axis dysregulation in postpartum depression. *Neuropeptides*. 47(6): 363-70.

Goedhart G, Vrijkotte TG, Roseboom TJ, van der Wal MF, Cuijpers P, Bonsel GJ (2010) Maternal cortisol and offspring birthweight: results from a large prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology*

Gold EM (1979) The Cushing syndromes: changing views of diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 90: 829-44.

Gutteling BM, de Weerth C, Zandbelt N, Mulder EJ, Visser GH, Buitelaar JK (2006) Does maternal prenatal stress adversely affect the child's learning and memory at age six? *J Abnorm Child Psychol*. 34(6): 789-98.

Hall K (2019) „In Praise of Wool“: The development of partition chromatography and its under-appreciated impact on molecular biology. *Endeavour*. 43(4)

Havaš Auguštin D, Šarac J, Lovrić M, Živković J, Malev O, Fuchs N, Novokmet N, Turkalj M, Missoni S (2020) Adherence to Mediterranean Diet and Maternal Lifestyle during Pregnancy: Island–Mainland Differentiation in the CRIBS Birth Cohort. *Nutrients* 12(8): 2179.

- Henriques A**, Azevedo A, Lunet N, Moura-Ferreira P, do Carmo I, Silva S (2019). Obesity-Related Knowledge and Body Mass Index: A National Survey in Portugal. *Eating and Weight Disorders*, 25(5): 1437-1446.
- Hompes T**, Izzi B, Gellens E, Morreels M, Fieuws S, Pexsters A, Schops G, Dom M, Van Bree R, Freson K, Verhaeghe J, Spitz B, Demyttenaere K, Glover V, Van den Bergh B, Allegaert K, Claes S (2013) Investigating the influence of maternal cortisol and emotional state during pregnancy on the DNA methylation status of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter region in cord blood. *J Psychiatr Res*. 47(7): 880-91.
- Horsch A**, Gilbert L, Lanzi S, Kang JS, Vial Y, Puder JJ (2019) Prospective associations between maternal stress during pregnancy and fasting glucose with obstetric and neonatal outcomes. *Journal of Psychosomatic Research*
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013 – 2024. Dostupno na <https://www.enciklopedija.hr/clanak/stres>. Pristupljeno 1.2.2024.
- Huizink AC** (2000), Prenatal stress and its effect on infant development. ISBN: 90-393-2497-2
- Humphreys S** (2010) The unethical use of BMI in contemporary general practice. *British Journal of Genral Practice*. 60(578): 696-687.
- Illingworth RS**, Bird AP (2009) CpG islands - "A rough guide." *FEBS Lett*. 583(11): 1713–20.
- Illingworth RS**, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, i sur. (2010) Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 6(9)
- Innis MA**, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. U: Innis, Gelfand, Sninsky White (ur.): PCR Protocols. Academic Press, New York , 3-12
- Jeong I-K** (2012) The Role of Cortisol in the Pathogenesis of the Metabolic Syndrome. *Diabetes and Metabolism Journal*
- Jeran N** (2010) Genetic diversity and structure of eastern Adriatic islanders revealed by mitochondrial DNA analysis. PhD thesis. University of Zagreb, Faculty of Science.
- Kagias K**, Nehammer C, Pocock R (2012) Neuronal responses to physiological stress *Front Genet* 3: 222.
- Kapoor A**, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG (2006) Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol* 572(1): 31–44.

- Kapoor A**, Petropoulos S, Matthews SG (2008) Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev.* 57(2): 586-95.
- Karns R**, Zhang G, Sun G, Rao Indugula S, Cheng H, Havaš-Auguštin D, ... Deka R (2012) Genome-wide association of serum uric acid concentration: Replication of sequence variants in an island population of the Adriatic coast of Croatia. *Annals of Human Genetics*, 76(2): 121–127.
- Karns R**, Succop P, Zhang G, Sun G, Indugula SR, Havaš-Auguštin D, ... Deka R (2013) Modeling metabolic syndrome through structural equations of metabolic traits, comorbid diseases, and GWAS variants. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(12): E745–E754.
- King S**, Dancause K, Turcotte-Tremblay A-M, Veru F, Laplante DP (2012) Using Natural Disasters to Study the Effects of Prenatal Maternal Stress on Child Health and Development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 96: 273–288.
- Kirschbaum C**, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L (2009) Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 34: 32–7.
- Klusmann H**, Schulze L, Engel S, Bücklein E, Daehn D, Lozza-Fiacco S, i sur. (2022) HPA axis activity across the menstrual cycle - a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Front Neuroendocrinol* 66:100998.
- Lajić, I.** i Mišetić, R. (2013). Demografske promjene na hrvatskim otocima na početku 21. stoljeća. *Migracijske i etničke teme*, 29 (2): 169-199.
- Lazinski MJ**, Shea AK, Steiner M (2008) Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health* 11: 363–375.
- LeWinn KZ**, Stroud LR, Molnar BE, Ware JH, Koenen KC, Buka SL (2009) Elevated maternal cortisol levels during pregnancy are associated with reduced childhood IQ. *Int J Epidemiol.* 38(6): 1700-10.
- Lewis AJ**, Austin E, Knapp R, Vaiano T, Galbally M (2015) Perinatal Maternal Mental Health, Fetal Programming and Child Development. *Healthcare* 3(4): 1212-1227.
- Livi R**, (1900) *Antropometria*, Ulrico Hoepli, Editore-libraio della Real Casa, Milano
- Lindsay JR**, Nieman LK (2005) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment. *Endocr Rev.* 26(6): 775-99.
- Mackeh R**, Marr AK, Dargham SR, Syed N, Fakhro KA, Kino T (2017) Single-Nucleotide

- Variations of the Human Nuclear Hormone Receptor Genes in 60,000 Individuals. *J Endocr Soc.* 2(1): 77-90.
- Macleod D**, Ali RR, Bird A (1998) An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands. *Mol Cell Biol.* 18(8): 4433–43.
- Magiakou MA**, Mastorakos G, Rabin D, Margioris AN, Dubbert B, Calogero AE et al. (1996) The maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the third trimester of human pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 44: 419-428.
- Majer AD**, Paitz RT, Tricola GM et al. (2023) The response to stressors in adulthood depends on the interaction between prenatal exposure to glucocorticoids and environmental context. *Sci Rep* 13: 6180.
- Mangelsdorf DJ**, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6): 835-9.
- Maravić Ž**, Rudan P (1975) Praktikum biološke antropologije. Antropometrija, 1
- Marceau K**, Wang W, Robertson O, Shirtcliff EA (2020) A systematic Review of Hair Cortisol during Pregnancy: reference ranges and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*
- Marino-Navarez C**, Puertas-Gonzalez JA, Romero-Gonzalez B, Gonzalez-Perez R, Peralta-Ramirez MI (2023) How prenatal cortisol levels may differentially affect the neurodevelopment of boys and girls. *Early Human Development* 187: 105874.
- Mardešić D** i sur. (2003) Pedijatrija, Školska knjiga, Zagreb
- Martinović I**, Mastana S, Jančićević B, Jovanović V, Paphia SS, Roberts DF, Rudan P (1998) VNTR DNA variation in the population of the island of Hvar, Croatia. *Annals of Human Biology* 25(5): 489–499.
- Martinović Klarić I**, Perićić M, Lauc LB, Jančićević B, Kubat M, Pavčić D, Rudan I, Wang N, Jin L, Chakraborty R, Deka R, Rudan P (2005) Genetic variation at nine short tandem repeat loci among islanders of the eastern Adriatic coast of Croatia. *Hum Biol.* 77(4): 471-86.
- Mastorakos G**, Ilias I (2003) Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci.* 997: 136-49.
- McArdle HJ**, Andersen H S, Jones H, Gambling L (2006) Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. *Placenta* 27: S56-60.

- McGuinn LA**; Tamayo-Ortiz M, José Rosa M, Harari H, Osorio-Valencia E, Schnaas L, Hernandez-Chavez C, Wright RJ, Klein DN, Téllez-Rojo MM, Wright RO (2022) The influence of maternal anxiety and cortisol during pregnancy on childhood anxiety symptoms. *Psychoneuroendocrinology* 139
- Mead M** (1935) Sex and temperament in Three Primitive Societies. In M. Kimmel, ed *The Gendered Reader*
- Medicinski leksikon (1992), mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2024. Pristupljeno 23.9.2024.
- Mellanby E**, (1933) Nutrition and child-bearing. *Lancet* 2: 1131-1137.
- Mikulandra F**, Tadin I, Grgurij J, Zakanj Z, Perija M (2001) *Coll Antropol* 59
- Miletić T**, Mikulandra F, Stoini E, Anić J, Periša M, Tomić N (2004) *Gynaecol. Perinatol.* 13.
- Miller SA**, Dykess DD, Poelsky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 16(3)
- Missoni S** (2006) Nutritional Studies in Croatia – A Century of Research. *Collegium antropologicum* 30(3): 673-696.
- Missoni S** (2009) Nutritional Habits of the Inhabitants of the Island of Vis. *Coll. Antropol.* 4:1273–1279.
- Missoni S** (2012) Nutritional Habits of Croatian Island Populations—Recent Insights. *Coll. Antropol.* 36: 1139–1142.
- Mohajan D**, Mohajan HK (2023) Body Mass Index (BMI) is a Popular Anthropometric Tool to Measure Obesity Among Adults. *Journal of Innovations in Medical Research* 2(4)
- Morrison R**, O'Connor R.C (2005) Predicting psychological distress in college students: the role of rumination and stress. *Journal of clinical psychology* 67: 447-460
- Mulder E JHM**, Robles De Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH (2002) Prenatal maternal stress: Effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum. Dev.* 70: 3-14.
- Mussey RB** (1949) Nutrition and human reproduction: An historical review. *Am Journal Obstetric Gynecol.* 57: 1037-1048.
- Nath A**, Murthy GVS, Babu GR, Di Renzo GC (2017) Effect of prenatal exposure to maternal cortisol and psychological distress on infant development in Bengaluru, southern India: a prospective cohort study. *BMC Psychiatry* 17(1): 255.

- Nazzari S**, Grumi S, Mambretti F, Villa M, Giorda R, Provenzi L (2022) Maternal and infant NR3C1 and SLC6A4 epigenetic signatures of COVID-19 pandemic lockdown: when timing matters. *Translational Psychiatry* 12(1): 386.
- Novokmet N**, Marjanović D, Škaro V, Projić P, Lauc G, Grahovac B, ... Rudan P (2011) Genetic polymorphisms of 15 STR loci in the population of the island of Cres (Croatia). *Annals of Human Biology* 38(1): 12–21.
- Novokmet N**, Havaš Auguštin D, Šarac J, Perinić Lewis A, Missoni S, Rudan P (2018) Antropometric Measurements of hvar Islanders and Changes in Secular Trend of Height – Evidence From the Village of Gdinj. *Coll. Antopologicum* 42(3): 175-180.
- Novokmet N**, Peričić Salihović M, Škaro V, Projić P, Šarac J, Havaš Auguštin D, Rudan P, Primorac D, Marjanović D (2022 a) Influence of genetic substructuring of statistical forensic parameters on genetic short tandem repeat markers in the populations of Southeastern Europe. *Croat Med J.* 63(3): 244-256.
- Novokmet N**, Galov A, Škaro V, Projić P, Šarac J, Havaš Auguštin D, Rudan P, Primorac D, Marjanović D (2022 b) Genetic sub-structuring of Croatian island populations in the Southeastern European context: a meta-analysis. *Croat Med J.* 63(3): 231-243.
- Oaks BM**, Adu-Afarwuah S, Ashorn P i sur (2022) Increased risk of preterm delivery with high cortisol during pregnancy is modified by fetal sex: a cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* 22(1): 727.
- Oberlander TF**, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM (2008) Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* 3(2): 97-106.
- O'Connor TM**, O'Halloran DJ, Shanahan F (2000) The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 93(6): 323–33.
- O'Connor TG**, Heron J, Golding J, Glover V (2003) ALSPAC Study Team. Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis. *J Child Psychol Psychiatry* 44(7): 1025-36.
- O'Connor TG**, Ben-Shlomo Y, Heron J, Golding J, Adams D, Glover V (2005) Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biol Psychiatry* 58(3): 211-7.
- O'Connor TG**, Bergman K, Sarkar P, Glover V (2013) Prenatal Cortisol Predicts Infant Cortisol Response to Acute Stress. *Development Psychobiology* 55(2): 145-155.

- Page LB**, Damon A, Moellering RC (1974) Antecedents of Cardiovascular Disease in Six Solomon Islands Societies. *Circulation* 49: 1132-1146.
- Palma-Gudiel H**, Córdova-Palomera A, Eixarch E, Deuschle M, Fañanás L (2015 a) Maternal psychosocial stress during pregnancy alters the epigenetic signature of the glucocorticoid receptor gene promoter in their offspring: a meta-analysis, *Epigenetics* 10(10): 893-902.
- Palma-Gudiel H**, Córdova-Palomera A, Leza JC, Fañanás L (2015 b) Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 55: 520-535.
- Peričić M**, Barać Lauc L, Martinović Klarić I, Jančićjević B, Rudan P (2005) Review of Croatian genetic heritage as revealed by mitochondrial DNA and Y chromosomal lineages. *Croatian Medical Journal* 46(4): 502–513.
- Perinić Lewis A** (2017) Otoci otoka Hvara. Hrvatska sveučilišna naknada. 39-45.
- Perinić Lewis A** (2019) A sociodemographic profile of the participants in the Croatian Island's birth Cohort Study (CRIBS). *Hrv. Geo. Glasnik* 91(1): 83-105.
- Peternel L**, Sujoldžić A (2009) Adolescents Eating Behavior, Body Image and Psychological Well-Being. *Collegium antropologicum*, 33(1): 205-212.
- Phillips M**, Kubisch D (1985) Lifestyle Diseases of Aborigines. *Medical Journal of Australia* 143: 218.
- Phillips DI**, Bennet FI, Wilks R, Thame M, Boyne M, Osmond C, Forrester TE (2005) Maternal body composition, offspring blood pressure and the hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Paediatr Perinatal Epidemiol.* 19: 294-302.
- Piwowarska J**, Chimiak A, Matsumoto H, Dziklińska A, Radziwoń-Zaleska M, Szelenberger W, Pachecka J (2012) Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with fluoxetine. *Psychiatry Research* 198: 407-411.
- Pomeroy SB** (1994) *Goddesses, Whores, Wives and Slaves: Women in Classical Antiquity*, London: Pimlico, [ISBN 978-0-712-66054-9](https://doi.org/10.1017/9780712660549)
- Randić M** (2001) Nutrition on the Adriatic Islands an Ethnological View on Nutrition of the Croatian Adriatic Island population. *Sociologija i prostor* 39 (1/4 (151/154)): 319-341.
- Rice F**, Jones I, Thapar A (2007) The impact of gestational stress and prenatal growth on emotional problems in offspring: a review. *Acta Psychiatr Scand.* 115: 171-183.

- Rojas M**, Chávez-Castillo M, Pirela D, Parra H, Nava M, Chacín M, Angarita L, Añez R, Salazar J, Ortiz R, Durán Agüero S, Gravini-Donado M, Bermúdez V, Diaz-Camargo E (2021) Metabolic Syndrome: Is It Time to Add the Central Nervous System? *Nutrients* 13(7): 2254.
- Ronald A**, Pennell CE, Whitehouse AJO (2011) Prenatal maternal stress associated with ADHD and autistic traits in early childhood. *Front. Psychology, Sec. Developmental Psychology*
- Rudan I**, Campbell H, Rudan P (1999) Genetic epidemiological studies of eastern Adriatic Island isolates, Croatia: Objectives and strategies. *Coll Antropol.* 23(2): 531-546.
- Rudan I**, Rudan D, Campbell H, Carothers A, Wright A, Smolej-Narančić N, ... Rudan P (2003) Inbreeding and risk of late onset complex disease. *Journal of Medical Genetics* 40(12): 925–932.
- Rudan P**, Janićijević B, Jovanović V, Miličić J, Narančić NS, Sujoldžić A, Szivoczka L, Škarić-Jurić T, Lauc LB, Lauc T, Klarić IM, Peričić M, Rudan D, Rudan I (2004) Holistic anthropological research of Hvar Islanders, Croatia-from parish registries to DNA studies in 33 years. *Coll. Antropol.* 28(2): 321-343.
- Rudan P**, Sujoldžić A, Šimić D, Bennett LA, Roberts DF (1992) Population structure in the Eastern Adriatic: The influence of historical processes, migration patterns, isolation, and ecological pressures, and their interaction. U: *Isolation, Migration and Health*. Roberts DF, Fujiki N, Torizuka K (eds) 33rd Symposium Volume of the Society for the study of Human Biology. Cambridge, Cambridge University Press., 204 -218.
- Russel G**, Lightmann S (2019) The human response. *Nature Reviews Endocrinology* 15(9): 525-534.
- Saftić V**, Rudan D, Zgaga L (2006) Mendelian disease and conditions in Croatian island populations: historic records and new insights. *Croatian Medical Journal* 47(4): 543–552.
- Sahay RD**, Couch SC, Missoni S, Sujoldžić A, Novokmet N, Duraković Z, Marepalli B, Musić Milanović S, Vuletić S, Deha R, Rudan P (2013) Dietary Patterns in Adults from an Adriatic Island of Croatia and Their Associations with Metabolic Syndrome and Its Components. *Collegium antropologicum* 37 (2): 335-342.
- Sandman CA**, Davis EP, Buss C, Glynn LM (2012) Exposure to prenatal psychobiological stress exerts programming influences on the mother and her fetus. *Neuroendocrinology* 95(1): 7-21.

- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Sapolsky RM** (2000) Stress hormones: good and bad. *Neurobiol. Dis.* 7: 540–542.
- Sarkar S**, Tsai S, Nguyen TT, Plevyak M, Padbury JF, Rubin LP (2001) Inhibition of placental 11 β hydrogenase type 2 by catecholamines via α -adrenergic signalling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281(6): R1966-1974.
- Seyle H** (1936) A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138(32).
- Skoog DA**, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2014) *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed. Brooks/Cole, Belmont, CA
- Skračić V** (1997) Otoci i otočani. *Pogled s mula, Glasje, IV*, 7/8, 61-75.
- Sleutels F**, Zwart R, Barlow DP (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415(6873): 810–3.
- Smith ZD**, Meissner A (2013) DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 14(3): 204-220.
- Soraru J**, Chakera A, Isbel N, Mallawaarachichi A, Rogers N, Trnka P, Patel C, Mallett AJ (2022) The evolving Role of Diagnostic Genomics in Kidney Transplantation. *Kidney International Reports* 7: 1758-1771.
- Stewart PM** (2003) The adrenal cortex. U: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology* 10th ed. Saunders Company, 502-3.
- Šarac J**, Šarić T, Jeran N, Auguštin DH, Metspalu E, Vekarić N, ... Rudan P (2012) Influence of evolutionary forces and demographic processes on the genetic structure of three Croatian populations: A maternal perspective. *Annals of Human Biology* 39(2): 143–155.
- Šarac J**, Šarić T, Auguštin DH, Jeran N, Kovačević L, Cvjetan S, Lewis AP, Metspalu E, Reidla M, Novokmet N, Vidovič M, Nevajda B, Glasnović A, Marjanović D, Missoni S, Villems R, Rudan P (2014) Maternal Genetic Heritage of Southeastern Europe Reveals a New Croatian Isolate and a Novel, Local Sub-Branching in the X2 Haplogroup. *Annals of Human Genetics* 78: 178-194.
- Šarac J**, Šarić T, Havaš Auguštin D, Novokmet N, Vekarić N, Mustać M, ... Rudan P (2016). Genetic heritage of Croatians in the Southeastern European gene pool-Y chromosome analysis of the Croatian continental and Island population. *American*

Journal of Human Biology 28(6): 837–845.

Šarac J, Ilić S, Zajc Petranović M, Havaš Auguštin D, Novokmet N, Cameron N, Missoni S (2019) The association between maternal anthropometry and blood pressure in pregnancy . results from the Croatian Island's birth Cohort Study (CRIBS). *Molecular and Experimental biology in Medicine* 2(2): 33-39.

Šarac J, Havaš Auguštin D, Lovrić M, Stryeck S, Šunić I, Novokmet N, Missoni S (2021) A Generation Shift in Mediterranean Diet Adherence and Its Association with Biological Markers and Health in Dalmatia, Croatia. *Nutrients* 13(12): 4564.

Šarac J, Havaš Auguštin D, Lewis AP, Jarec M, Mrdjen Hodžić R, Novokmet N, Sujoldžić A, Rudan P (2022). Genetic landscape of the Hvar Island-highlight of a 50-year long bioanthropological research. *Anthropol Anz.* 79(4): 361-397.

Škreblin L (2003) Antropološko istraživanje prehrambenih navika i biometrijska procjena prehrambenog statusa adolescenata / Sujoldžić, Anita (mentor). Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Škreblin L, Sujoldžić A (2003.) Acculturation Process and Its Effects on Dietary Habits, Nutritional Behavior and Body-Image in Adolescents. *Collegium antropologicum* 27(2): 469-477

Šunić I, Novokmet N, Šarac J, Havaš Auguštin D, Fuchs N, Mrdjen-Hodžić R (2021) Pregnancy and birth cohorts in Europe: An overview. *Journal of Bioanthropology*

Tolk H-V, Perićić M, Barać L, Klarić IM, Janićijević B, Rudan I, ... Rudan P (2000) MtDNA haplogroups in the populations of Croatian Adriatic Islands. *Collegium Antropologicum* 24(2): 267–280.

Tronick E, Hunter RG (2016) Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Behavioural Neuroscience*

Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM (1990) Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 53(2): 157-67.

Van der Knaap L, Riese H, Hudziak J et. Al. (2014) Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) methylation following stressful events birth and adolescence. *The TRIALS Study. Transl. Psychiatry* 4, e381.

Vitart V, Biloglav Z, Hayward C, Janićijević B, Smolej-Narančić N, Barać L, ... Rudan I (2006) 3000 years of solitude: Extreme differentiation in the island isolates of Dalmatia,

- Croatia. *European Journal of Human Genetics*, 14(4): 478–487.
- Vrijkotte T**, de Rooij SR, Roseboom TJ, Twickler T (2023) Maternal serum cortisol levels during pregnancy differ by fetal sex. *Psychoneuroendocrinology*
- Vuletić Mavrinac G**, Mujkić A (2006) Mental health and health-related quality of life in Croatian island population. *Croatia Medical Journal* 47: 635-640.
- Ward AM**, Moore V, Steptoe A, Cockington R, Robinson JS, Philips DIW (2004) Size at birth and cortisol responses to psychological stress evidence for fetal programming. *J Hypertens* 122: 2295-2301.
- Weinhold B** (2006) Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect* 114: A160-A167.
- Weinstock M** (2001) Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65: 427-451.
- Welberg LAM**, Thiruvikraman KV, Plotsky PM (2005) Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11 β -hydroxysteroid hydrogenase type II activity. *J. Endocrinol.* 186: 7-12.
- Wells JC** (2010) Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. *Am J Hum Biol.* 22(1): 1-17.
- Werner E**, Zhao Y, Evans L, Kinsella M, Kurzius L, Altincatal A, McDonough L, Monk C (2013) Higher maternal prenatal cortisol and younger age predict greater infant reactivity to novelty at 4 months: an observation-based study. *Dev Psychobiol.* 55(7): 707-18.
- Whelan WJ** (2001) Partition Chromatography Revisited, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 51: 329-330.
- Whitley RJ**, Meikle AW, Watts NB (1994) *Endocrinology*. U: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1825-6.
- Williams EL**, Choudhury SM (2016) UPLC-MS/MS measurement of prednisolone in adrenal insufficiency. *Mass spectrometry*
- Wright N**, Hill J, Pickles A, Sharp H (2019) Callous-unemotional traits, low cortisol reactivity and physical aggression in children: findings from the Wirral Child Health and Development Study. *Transl Psychiatry* 9(1): 79.
- Yehuda R**, Seckl J (2011) Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis. *Endocrinology* 152(12): 4496–503.

- Zajc Petranović M**, Havaš Auguštin D, Novokmet N, Šarac J, Perinić Lewis A, Fuchs N, Cameron N, Schell LM, Demerath EW, Karelović D, Missoni S (2018) Mediterranean diet in pregnancy and its association with newborns' size in Dalmatia, Croatia – The preliminary results of the Croatian Islands Birth Cohort Study. *Coll. Antropol.* 42(3)
- Zhang G**, Pradhan S (2014) Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* 66(4): 240–56.
- Zhang J**, Zhang R, Chi J, Li Y, Bai W (2023) Pre-pregnancy body mass index has greater influence on newborn weight and perinatal outcome than weight control during pregnancy in obese women. *Arch Public Health* 13;81(1): 5.
- Zimmet P**, MM Alberti KG, Serrano Ríos M (2005) Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados [A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results]. *Rev Esp Cardiol.* 58(12):1371-6. Spanish. Erratum in: *Rev Esp Cardiol.* 59(2):185.

8. PRILOZI

Tablica P1. Broj uzoraka koji je korišten pri analizi interakcije navedenih parametara za starost ispitanica, geografsku lokaciju (kopno ili otok), preBMI, postBMI i promjenu BMI, razinu kortizola te PT , PD i OG novorođenčadi.

	starost mame	geografska lokacija	preBMI	post BMI	promjena BMI	kortizol P visina pika ng/mL	PT tjedni trudnoće	PD tjedni trudnoće	OG Tjedni trudnoće
starost mame	334	334	315	275	276	268	334	334	325
geografska lokacija	334	337	318	277	278	271	337	337	328
preBMI	315	318	318	277	278	252	318	318	309
postBMI	275	277	277	277	277	221	277	277	269
promjena BMI	276	278	278	277	278	221	278	278	270
kortizol P visina pika ng/mL	268	271	252	221	221	271	271	271	262
PT/tjedni trudnoće	334	337	318	277	278	271	337	337	328
PD/tjedni trudnoće	334	337	318	277	278	271	337	337	328
OG/tjedni trudnoće	325	328	309	269	270	262	328	328	328

Tablica P2. Broj uzoraka dijada mama-beba korištenih pri analizi korelacija stanovanja (kopno ili otok), razine kortizola izmjenog u biološkim uzorcima plazme majki, metilacije na prvom CpG mjestu, metilacija na ostalim CpG mjestima (3, 7, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31) u NR3C1 1F genu.

	geografska lokacija	kortizol	mama 1 Cp G	beba CpG 1	mama ostali Cp G	beba ostali Cp G
geografska lokacija	37	32	37	37	37	37
Kortizol	32	32	32	32	32	32
mama 1 CpG	37	32	37	37	37	37
beba CpG 1	37	32	37	37	37	37
mama ostali CpG	37	32	37	37	37	37
beba ostali CpG	37	32	37	37	37	37

Tablica P3. Šifrirani popis dijada mama-beba kojima je analizirana DNA obzirom na geografsku lokaciju.

OTOCI		KOPNO
1_BJ070		81_AD032
7_BJ062		155_BO004
28_BJ046		166_BO016
32_BJ043		168_BO017
53_BJ019		170_BO019
57_BJ017		172_NL028
60_BJ016		182_NL062
63_BJ012		202_AD001
94_BJ148		204_AD005
98_BJ145		212_AD016
110_BJ125		214_AD003
112_BJ113		215_AD008
120_BJ102		
130_BJ094		
134_BJ088		
137_BJ083		
139_BJ081		
141_BJ080		
145_BJ073		
147_BJ075		
149_BJ076		
192_TLL011		
198_TLL052		
200_TLL062		
224_BJ014		

9. ŽIVOTOPIS

Rafaela Mrdjen-Hodžić rođena je 17. kolovoza 1974. u Splitu. Srednjoškolsko obrazovanje završava u Zdravstvenom obrazovnom centru i Glazbenoj školi "Josip Hatze". Nakon završetka Konzervatorija glazbe – flaute u Italiji, upisuje studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomira 2003. godine s temom "Djelovanje tonske stimulacije na imunohematopoezu intoksiciranih miševa" pod mentorstvom prof. dr. sc. Oskara P. Springera.

Educira se na Papinskom Institutu Ivana Pavla II za brak i obitelj u Rimu, završila je program "Corso di Educazione Pre e post Natale con la Musica" u Milanu i "Music for unborn and newborn" na Silver Lake College, Manitowoc, SAD.

Bila je suradnica međunarodnog projekta "Blagotvorna glazba u prenatalnoj i perinatalnoj medicini i razvoju djeteta" u sklopu Međunarodne federacije udruženja studenata medicine (IFMSA).

Od 2009. radi na Institutu za antropologiju u Zagrebu na mjestu stručne suradnice, a od 2023. na mjestu stručne suradnice u znanosti. Poslijediplomski doktorski studij Biologije upisuje na Biološkom odsjeku PMF-a u prosincu 2018. godine.

Do sada je sudjelovala na međunarodnim kongresima s 4 postera navedenih u sažetcima skupova, a u koautorstvu je objavila 5 znanstvenih radova s međunarodnom recenzijom.

Član je Hrvatskog Antropološkog Društva, Međunarodnog društva za proučavanje ljudskog rasta i kliničke auksologije (ISGA).