

Polimorfizam gena, ekspresija i enzimaska aktivnost monoamin oksidaze A u ljudskoj posteljici

Nikolić, Kristina

Master's thesis / Diplomski 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:217:876433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Nikolić

**Polimorfizam gena, ekspresija i enzimska
aktivnost monoamin oksidaze A u ljudskoj
posteljici**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Kristina Nikolić

**Gene polymorphism, expression and enzyme
activity of monoamine oxidase A in human
placenta**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasminke Štefulj te komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je izrađen uz potporu Hrvatske zaklade za znanost, u okviru istraživačkog projekta IP-2018-6547 „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina (PlaNŠ)“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
rad

Diplomski

Polimorfizam gena, ekspresija i enzimska aktivnost monoamin oksidaze A u ljudskoj posteljici

Kristina Nikolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Posteljica je privremeni fetalni organ od presudne važnosti za normalan tijek trudnoće. Serotonin, hormon i neurotransmiter, sudjeluje u regulaciji razvoja i različitih funkcija posteljice. Ključni katabolički enzim serotonina je monoamin oksidaza (MAO), flavoenzim čija izoforma MAOA je bogato zastupljena u posteljici. Cilj ovog rada bio je doprinijeti boljem razumijevanju svojstava i regulacije MAOA u ljudskoj posteljici. U tu svrhu, skupini novorođenčadi ($n=143$) je genotipiziran polimorfizam *MAOA-uVNTR*, potencijalni kandidat za regulaciju transkripcijske aktivnosti gena *MAOA*. U uzorcima posteljice određene su razine mRNA *MAOA* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) te kinetički parametri (V_{max} , K_M) MAOA spektrofluorimetrijskom metodom uz uporabu kinuramina kao supstrata. Razine mRNA *MAOA* u posteljici se nisu razlikovale u ovisnosti o genotipu *MAOA-uVNTR*, sugerirajući da ovaj polimorfizam ne igra bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena *MAOA* u humanoj posteljici. Razina mRNA *MAOA* i kinetički parametri MAOA nisu se razlikovale između muške i ženske novorođenčadi. Uočena je pozitivna korelacija između razine mRNA *MAOA* i enzimске aktivnosti MAOA. Dobiveni rezultati pružaju temelj za daljnja istraživanja mehanizama regulacije gena *MAOA* u ljudskoj posteljici i potencijalne uloge ovog enzima u različitim komplikacijama trudnoće povezanim s nepravilnom funkcijom posteljice.

Ključne riječi: MAOA, placenta, 5-hidroksitriptamin, genska varijabilnost, enzimska aktivnost (39 stranica, 10 slika, 5 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Jasminka Štefulj
Komentor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Dubravka Hranilović
prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 08.02.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
thesis

Master

Gene polymorphism, expression and enzyme activity of monoamine oxidase A in human placenta

Kristina Nikolić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The placenta is a temporary fetal organ that is crucial for normal course of pregnancy. Serotonin, a hormone and a neurotransmitter, is involved in regulating the development and various functions of the placenta. A key catabolic enzyme of serotonin is monoamine oxidase (MAO), a flavoenzyme whose isoform MAOA is abundant in the placenta. The aim of this thesis was to contribute to a better understanding of the properties and regulation of MAOA in human placenta. For this purpose, a group of newborns (n=143) were genotyped for *MAOA-uVNTR* polymorphism, a potential candidate for regulation of transcriptional activity of *MAOA* gene. In placenta samples *MAOA* mRNA levels were determined using the reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) method and the kinetic parameters (V_{max} , K_M) of MAOA were determined by the spectrofluorimetric method using kynuramine as a substrate. Placental *MAOA* mRNA levels did not differ depending on the *MAOA-uVNTR* genotype, suggesting that this polymorphism does not play major role in the regulation of *MAOA* gene expression in the human placenta. *MAOA* mRNA level and MAOA kinetic parameters did not differ between male and female newborns. A positive correlation was observed between *MAOA* mRNA levels and MAOA enzyme activity. The obtained results provide a basis for further research into the mechanisms of *MAOA* gene regulation in the human placenta and the potential role of this enzyme in various pregnancy complications associated with impaired placental function.

Keywords: MAOA, placenta, 5-hydroxytryptamine, genetic variability, enzymatic activity
(39 pages, 10 figures, 5 tables, 53 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Jasminka Štefulj, PhD

Co-mentor: Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Reviewers:

Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted: 08.02.2024.

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasminki Štefulj na susretljivosti, pomoći i neizmjernoj stručnosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na komentorstvu i konstruktivnim sugestijama.

Također zahvaljujem cijelom timu Laboratorija za neurokemiju i molekularnu biologiju što su me prihvatili s toplinom i osigurali ugodnu atmosferu tijekom izrade istraživačkog rada. Posebno zahvaljujem neposrednoj voditeljici asistentici Maji Perić na ogromnom vremenu i trudu uloženom tijekom cijelog procesa i provedbe istraživanja.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci tokom cijelog ovog procesa. I konačno se zahvaljujem jednoj bliskoj osobi koja je tokom cijelog studija bila uz mene te me ohrabivala u pisanju ovog rada i završetku studija.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Posteljica i serotonin	1
1.2 Monoamin oksidaza.....	4
2. Cilj istraživanja.....	7
3. Materijali i metode.....	8
3.1 Oprema i pribor	8
3.2 Uzorci tkiva posteljice.....	9
3.3 Izolacija genomske DNA iz tkiva posteljice.....	9
3.4 Genotipizacija polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i>	10
3.5 Izolacija RNA	13
3.6 Reverzna transkripcija – kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	14
3.7 Izolacija ukupnih proteina iz tkiva posteljica.....	15
3.8 Određivanje koncentracije ukupnih proteina	16
3.9 Mjerenje enzimske aktivnosti MAOA u uzorcima posteljice.....	16
3.10 Statistička obrada podataka	18
4. Rezultati.....	18
4.1 Demografske i kliničke karakteristike sudionika istraživanja	18
4.2 Polimorfizam <i>MAOA-uVNTR</i>	19
4.3 Relativna razina mRNA <i>MAOA</i> u posteljici	22
4.4 Aktivnost MAOA u posteljici	23
4.5 Odnos između polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i> i relativne razine mRNA <i>MAOA</i> u humanoj posteljici.....	26
4.6 Odnos između razine mRNA <i>MAOA</i> i kinetičkih parametara MAOA	27
5. Rasprava	29
6. Zaključak	33
7. Literatura	33
8. Životopis	39

1. Uvod

Reprodukcija je jedna od temeljnih funkcija svih živućih vrsta koja omogućuje opstanak vrste. Razvoj novog organizma kod placentarnih sisavaca je složen proces reguliran brojnim okolišnim i endogenim faktorima. Već od trenutka oplodnje mijenja se lučenje različitih hormona u organizmu majke kako bi se omogućili opstanak i razvoj novooplođene jajne stanice i održavanje trudnoće. Majčin organizam prolazi kroz brojne promjene kako bi se prilagodio zahtjevima fetusa. Majčin bazalni metabolizam se povećava kako bi se zadovoljili energetske zahtjevi za razvoj i funkcioniranje posteljice i fetusa. Volumen plazme se postepeno povećava tijekom trudnoće sukladno potrebama posteljice i fetusa, a pod utjecajem hormona koje luči posteljica. Većina glukoze iz majčinog organizma preusmjerava se prema fetusu s ciljem ispunjavanja njegovih nutritivnih potreba te dolazi do odgovarajućih prilagodbi majčinog metabolizma. Mijenja se ekspresija različitih gena i dugih nekodirajućih RNA (lncRNA, od eng. *long non-coding* RNA) u organizmu majke (Wright i sur., 2023). Svi ovi procesi i još mnogi drugi su strogo regulirani i koordinirani kako bi se stvorili uvjeti za normalni razvoj fetusa, a uz to omogućili majci da pruži potrebnu zaštitu, nutrijente i faktore rasta potrebne za razvoj fetusa dok se aklimatizira na suživot s novim bićem.

1.1 Posteljica i serotonin

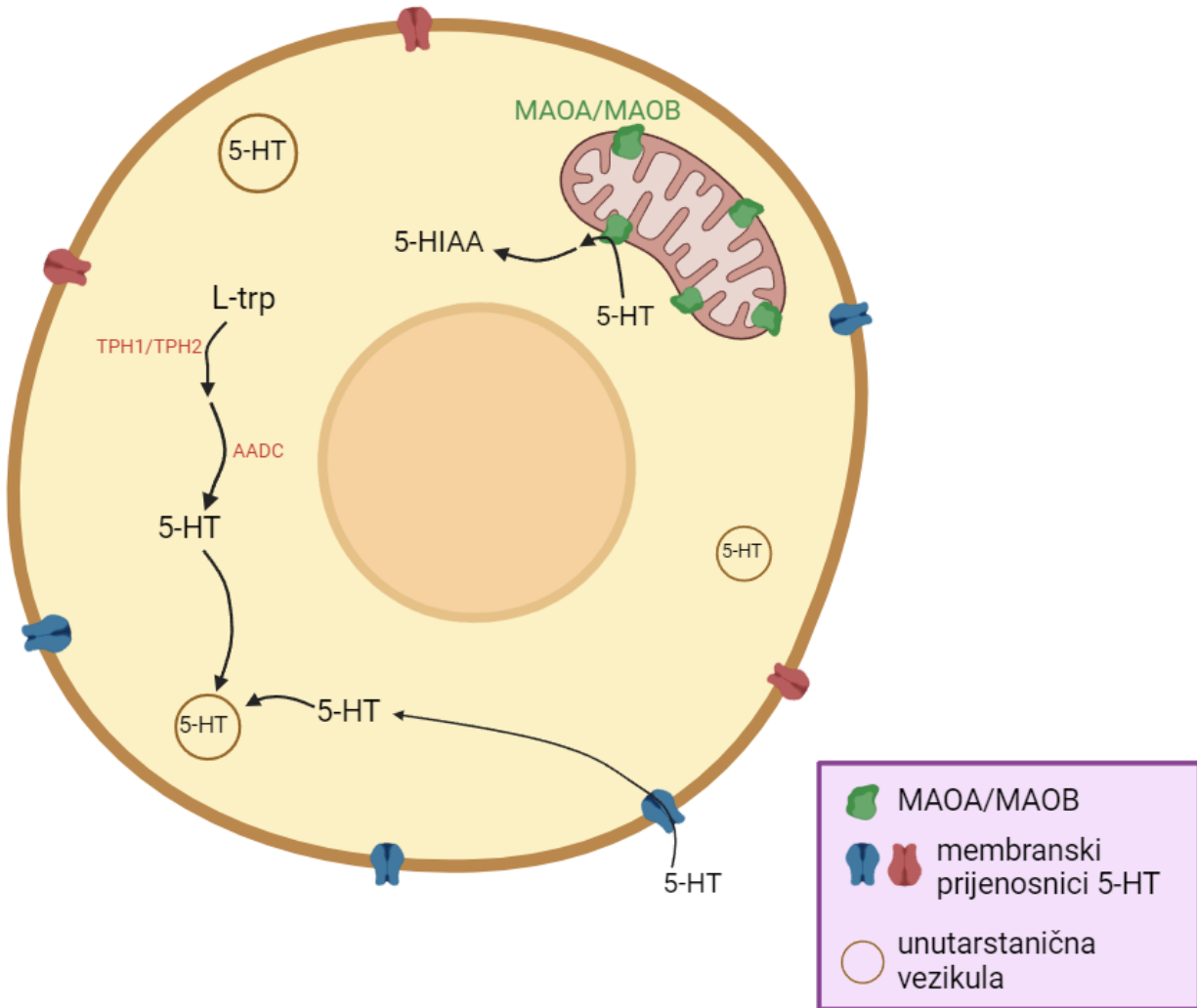
Posteljica (lat. *placenta*) je jedan od ključnih organa nužnih za razvoj fetusa u placentarnih sisavaca, uključujući čovjeka. Ona djeluje kao posrednik između majke i fetusa, izmjenjujući tvari i plinove između majčinog i fetalnog krvotoka te osiguravajući sigurnu okolinu za rastući fetus štiteći ga od vanjskih utjecaja i mogućih infekcija. Kao privremeni endokrini organ ujedno ima i funkciju proizvodnje različitih hormona koji su od ključne važnosti za tijek trudnoće i razvoj ploda. Nadalje, posteljica štiti embrij od imunološkog odgovora majke te također od različitih patogena. Razvoj posteljice počinje vrlo brzo nakon oplodnje (Đelmiš, 2019). Zigota uzastopnim diobama postaje morula, struktura od 16 stanica. Morula ulazi u materničnu šupljinu, dolazi do nakupljanja tekućine između stanica što posljedično dovodi do nastanka šupljine blastocela te morula postaje blastocista. Unutrašnji dio blastociste će se razviti u embrio (pa će stoga činiti

embrioblast), a vanjski sloj stanica tvori trofoblast koji je osnova za razvoj posteljice. Trofoblast će na kraju svoje diferencijacije tvoriti amnion, korion i posteljicu. Tijekom implantacije trofoblast prodire kroz površinski epitel endometrija, te se naknadno diferencira na sinciotrofoblast i citotrofoblast. Sinciotrofoblast čine višejezgrene stanice koje su odgovorne za funkcionalno djelovanje posteljice tijekom trudnoće, a citotrofoblasti čine jednojezgrene stanice koje luče enzime za razgradnju međustaničnih veza u endometriju kako bi sinciotrofoblast invadirao u stijenku endometrija. Kao rezultat invazije trofoblasta u endometriju dolazi do decidualne reakcije – funkcionalne i kompozicijske promjene tkiva endometrija koje okružuje blastocistu. Tom reakcijom nastaju morfološki promjenjene decidualne stanice koje formiraju tri ovojnice: bazalnu deciduu, kapsularnu deciduu koja obavija blastocistu, odnosno plod, i parijetalnu deciduu koja oblaže ostatak maternične šupljine. Valja naglasiti da je kod ljudi trofoblast placentarnih resica u izravnom kontaktu s majčinom krvi što omogućuje brzu izmjenu tvari i plinova.

Razvoj i funkcije posteljice regulirani su različitim signalnim molekulama. Jedna od njih je i serotonin, odnosno 5-hidroksitriptamin (5-HT). Serotonin je multifunkcionalna molekula koja može djelovati kao neurotransmiter u živčanom sustavu, autokrino ili parakrino u različitim tkivima te endokrino, poput hormona (Brady i sur., 2012). Ponekad zvan i “hormon sreće”, jer utječe na raspoloženje, serotonin sudjeluje u regulaciji staničnih procesa poput proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze (Azmitia, 2001). Serotoninski neuroni su jedni od prvih neurona moždanog debla – razvijaju se već u šestom tjednu gestacije kod ljudi.

Serotonin se sintetizira iz L-triptofana kroz dva enzimatska koraka, od kojih je prvi kataliziran triptofan hidrosilazom 1 (TPH1) ili 2 (TPH2), a drugi dekarboksilazom aromatskih L-aminokiselina (AADC, od eng. *aromatic L-amino acid decarboxylase*). Razgradnja serotonina do konačnog razgradnog produkta 5-hidroksi-3-indolactene kiseline se također odvija kroz dva enzimatska koraka, od kojih prvi, kataliziran monoamin oksidazom A ili monoamin oksidazom B određuje brzinu čitavog kataboličkog puta. Metabolički put serotonina je prikazan na Slici 1. Svoje djelovanje na stanice serotonin ostvaruje putem serotoninskih receptora koji su smješteni na staničnoj membrani, a kod ljudi ih je utvrđeno čak 14 podtipova. S obzirom na svoj hidrofilni karakter, serotonin ne može prolaziti kroz staničnu membranu, već za to koristi specifične membranske prijenosnike. Ulaskom u stanice serotonin postaje meta kataboličkih enzima. U

nekim vrstama stanica, serotonin se pohranjuje u unutarstanične organele za sekreciju ili skladištenje (npr. u sekretorne granule u enterokromafinim stanicama, guste granule u trombocitima ili sinaptičke mjehuriće u neuronima) (Perić i sur., 2022). Serotonin se iz tih stanica po potrebi oslobađa procesom egzocitoze.



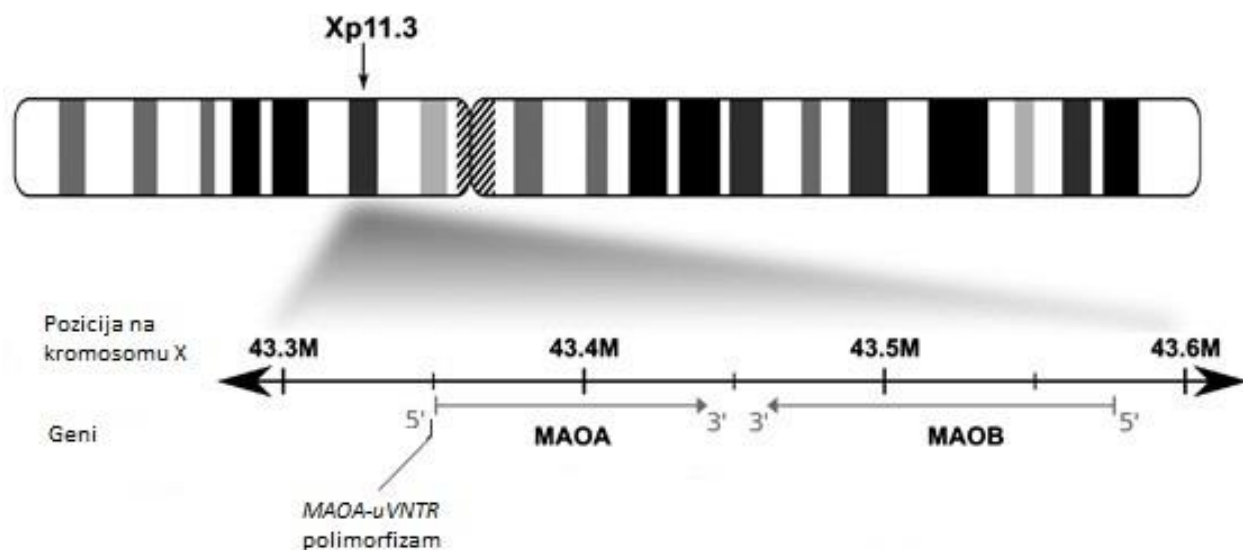
Slika 1. Shematski prikaz metaboličkog puta serotonina unutar stanice. 5-HT – 5-hidroksitriptamin, odnosno serotonin; MAOA/MAOB – izoforma A (MAOA) ili B (MAOB) monoamin oksidaze, L-trp – L-triptofan, TPH1/TPH2 – izoforma 1 (TPH1) ili 2 (TPH2) triptofan hidrosilaze, AADC – dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina, 5-HT – 5-hidroksitriptamin, 5-HIAA – 5-hidroksi-3-indololctena kiselina. Ilustracija je izrađena u programu Biorender.

Serotonin modulira proliferaciju i apoptozu trofoblasta te tako regulira razvoj posteljice (Hadden i sur., 2017; Perić i sur., 2022). Nadalje, serotonin sudjeluje u regulaciji posteljčno-umbilikalnog krvotoka i također regulira endokrine funkcije posteljice (Perić i sur., 2022). Različita istraživanja upućuju da tijekom ranog razvoja, prije početka sinteze serotonina u fetalnim tkivima, posteljica osigurava serotonin potreban za pravilni razvoj fetalnog mozga (Perić i sur., 2022). Pretpostavlja se da postoje dva puta kojima posteljica opskrbljuje fetus serotoninom. Prvi karakterizira proizvodnja serotonina u posteljici iz triptofana dopremljenog majčinim krvotokom (Bonnin i sur., 2011). Drugi ovisi o nizu različitih specifičnih prijenosnika koji svojim koordiniranim radom dopremaju serotonin iz majčinog krvotoka preko stanica posteljice do ploda (Kliman i sur., 2018). Utječući na različite stanične procese, serotonin osigurava funkcionalnost posteljice i dirigira razvoj ploda.

1.2 Monoamin oksidaza

Monoamin oksidaza (MAO) je enzim koji oksidativno deaminira različite amine, a osobito je važan u metabolizmu monoaminskih neurotransmitera. Otkrivena je davne 1928. g. u ekstraktu jetre kunića, zahvaljujući Mary L. C. Hare (Hare, 1928). Iako je prvotno zvana tiramin oksidaza, zbog korištenja tiramina kao supstrata, naknadno je naziv zamjenjen s amin oksidaza kako bi se naglasila sposobnost metaboliziranja amina (Richter, 1937). Produkti enzimskog djelovanja MAO u biološkim sustavima su aldehid, vodikov peroksid (pripadnik reaktivnih kisikovih vrsta) te amonijak. MAO pripada skupini flavoenzimima jer joj djelovanje ovisi o kofaktoru FAD (flavin adenin dinukleotid) koji je kovalentno vezan uz proteinski dio enzimskog kompleksa. MAO je pronađena kod raznih organizama unutar potkoljena kralježnjaka, od pastrva (Chen i sur., 1994) pa do čovjeka, no njezina biološka uloga je najviše istraživana među sisavcima. Do sada su poznate dvije izoforme MAO kod sisavaca: monoamin oksidaza A (MAOA) i monoamin oksidaza B (MAOB). Obje izoforme su lokalizirane na vanjskoj membrani mitohondrija. Geni za MAOA i MAOB se nalaze na kraćem kraku kromosoma X kod ljudi (Slika 2.), sadrže 15 egzona te posjeduju identičnu organizaciju egzona i introna (Grimsby i sur., 1991). MAOA i MAOB dijele oko 73 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci, ali se značajno razlikuju u specifičnosti za supstrate i inhibitore: MAOA preferentno deaminira serotonin, adrenalin i noradrenalin te je inhibirana klogilinom (Johnston, 1968), dok je MAOB sklonija deaminirati benzilamin i feniletilamin te se ireverzibilno inhibira

deprenilom (Knoll i Magyar, 1972). Izoforme se ujedno razlikuju i u distribuciji u različitim tkivima ljudi: MAOA je prisutna u posteljici i gastrointestinalnom traktu, MAOB u trombocitima, a obje izoforme su prisutne u mozgu i jetri (no koncentracije MAOB su u njima znatno veće u odnosu na MAOA) (Waller i Sampson, 2018).



Slika 2. Shematski prikaz relativne pozicije gena *MAOA* i *MAOB* na kromosomu X unutar regije Xp11.3, te lokalizacije *MAOA-uVNTR* polimorfizma. Preuzeto i prilagođeno prema Eccles i sur. (2012).

Do sada su utvrđene dvije transkripcijske varijante *MAOA* gena, čije duljine se razlikuju za 1.3 kb. Navedene transkripcijske varijante se razlikuju u 5' netranslatiranoj regiji (5' UTR, od eng. *untranslated region*) i alternativnim egzonima, a translacijom daju dvije varijante proteina MAOA, glavnu od 527 aminokiselina i alternativnu od 394 aminokiselina. Smatra se da je tip transkripta koji će se eksprimirati s *MAOA* gena pod kontrolom varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (VNTR, od eng. *variable number of tandem repeats*) u promotoru gena, polimorfizmom poznatim pod nazivom *MAOA-uVNTR* (Philibert i sur., 2011). *MAOA-uVNTR* se sastoji od osnovne sekvence duge 30 pb čiji broj ponavljanja može iznositi 2, 3, 3.5, 4, 4.5 i 5, po čemu su i aleli polimorfizma *MAOA-uVNTR* dobili ime (Sabol i sur., 1998; Filić, 2004). Konsenzus oko utjecaja *MAOA-uVNTR* na ekspresiju gena *MAOA* još nije postignut. Dok dio znanstvene zajednice smatraju da je *MAOA-uVNTR* cis-regulatorni element ekspresije te da aleli 3.5 i 4 rezultiraju visokom transkripcijskom aktivnošću, a aleli 2, 3 i 5 niskom transkripcijskom aktivnošću (pa ih se stoga naziva alelima

“visoke”, odnosno “niske” aktivnosti) (Sabol i sur., 1998; H. Zhang i sur., 2010; J. Zhang i sur., 2010), drugi dio tvrdi da nema razlike u ekspresiji gena *MAOA* između različitih genotipova (Sun i sur., 2012). Polimorfizam *MAOA-uVNTR* je povezan s različitim poremećajima i stanjima, uključujući migrenu (Filić i sur., 2005), depresiju (Aklillu i sur., 2009; Lung i sur., 2011), autizam (Cohen i sur., 2011) i preeklampsiju (Bîñă i sur., 2022). Unatoč razlici u broju alela polimorfizma *MAOA-uVNTR* između žena i muškaraca (zbog lokalizacije gena *MAOA* na kromosomu X) dosada nisu utvrđene razlike u distribuciji različitih alela među različitim spolovima (Fite i sur., 2020), niti razlike u ekspresiji *MAOA* između žena i muškaraca (Blakeley i sur., 2013). Iako transkripcija gena, kao biokemijski korak koji prethodi translaciji, utječe na sintezu proteina, a sinteza proteina na ukupnu aktivnost proteina u određenom tkivu, još nije ispitano u kojoj mjeri su korelirani ekspresija gena *MAOA* i aktivnosti proteina *MAOA*.

Isključiva prisutnost izoforme *MAOA* u tkivu humane posteljice daje naslutiti da ova izoforma ima važnu ulogu u posteljici. Unutar posteljice, ekspresija *MAOA* je primjećena u sinciciotrofoblastu, citotrofoblastu i fetoplacentalnim endotelnim stanicama (Auda i sur., 1998; Kliman i sur., 2018; Baković i sur., 2023). *MAOA* je uključena u katabolizam serotonina katalizirajući njegovu degradaciju do 5-hidroksi-3-indolacetaldehida (5-HIAL), koji se zatim procesira pomoću NAD⁺-ovisne aldehid dehidrogenaze do konačnog razgradnog produkta 5-hidroksi-3-indoloctene kiseline (5-HIAA, od eng. *5-hydroxy-3-indolacetic acid*). 5-HIAA se oslobađa iz stanica pomoću sustava membranskih transportera u krvotok, te se zatim izlučuje bubrezima. U slučaju fetusa, serotonin se membranskim prijenosnicima prenosi iz fetalne cirkulacije u stanice posteljice, gdje se zatim degradira pomoću *MAOA* do 5-HIAA koji se konačno luči preferentno u majčinu cirkulaciju (Staud i sur., 2023). Ovakav mehanizam omogućuje odražavanje homeostaze serotonina tijekom trudnoće i pravilan razvoj fetusa. Bilo kakav poremećaj u ovom proces koji rezultira povećanom ili smanjenom razinom serotonina može potencijalno rezultirati neuralnim poremećajima fetusa ili komplikacijama trudnoće poput preeklampsije (Rosenfeld, 2020). Afinitet serotonina za *MAOA* je 120 puta veći nego za *MAOB* što govori u prilog važnosti *MAOA* u metabolizmu serotonina (Müller i Jacobs, 2010). Posteljica je vrlo bogat izvor enzima *MAOA* (H. Zhang i sur., 2010). Iako su pronađene i male količine mRNA *MAOB* u tkivu posteljice, na razini proteina prisutna je samo izoforma *MAOA* ovog enzima (Sivasubramaniam, 2002). Navedeno omogućuje ispitivanje

aktivnosti izoforme MAOA u tkivu posteljice bez potrebe za upotrebom inhibitora izoforme MAOB. Do sada prikupljena saznanja o MAOA još uvijek ostavljaju mnogo prostora za ispitivanje moguće povezanosti polimorfizma *MAOA-uVNTR*, ekspresije i aktivnosti MAOA, naročito u kompleksnim fiziološkim uvjetima kakve pronalazimo u posteljici.

2. Cilj istraživanja

Zadaća ovoga rada je bolje razumijevanje svojstava i regulacije MAOA u ljudskoj posteljici. Specifični ciljevi rada su:

1. odrediti genotip polimorfizma *MAOA-uVNTR* kod novorođenčadi na odabranom uzorku;
2. odrediti relativnu razinu mRNA *MAOA* u uzorcima posteljice i ispitati moguće spolne razlike;
3. odrediti kinetičke parametre (V_{\max} i K_M) enzima MAOA u uzorcima posteljice i ispitati moguće spolne razlike;
4. istražiti odnos između polimorfizma *MAOA-uVNTR*, razine mRNA *MAOA* i aktivnosti enzima MAOA u posteljici.

Budući da su sudionici istraživanja slučajno odabrani, očekivali smo da će opažene učestalosti genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* biti u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Iako je poznato da serotoninški sustav pokazuje spolni dimorfizam, taj fenomen nije uvijek prisutan pa nije bilo moguće pretpostaviti hoće li biti razlika među spolovima u razini mRNA *MAOA* i enzimskoj aktivnosti MAOA u posteljici. S obzirom na neujednačene literaturne nalaze o učinku polimorfizma *MAOA-uVNTR* na ekspresiju gena *MAOA*, nije bilo moguće pretpostaviti kakav će biti odnos ovog polimorfizma i razine mRNA *MAOA* u ljudskoj posteljici. Očekivali smo da će više razine mRNA *MAOA* biti povezane s višom enzimskom aktivnosti MAOA.

3. Materijali i metode

3.1 Oprema i pribor

Tehnička oprema i pribor koji sam koristila u provedbi ovog istraživanja su navedeni u nastavku:

- Automatske pipete i propipete Eppendorf (Njemačka) i Gilson (SAD)
- Termomikser LLG-uniTHERMIX1 (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučni dezintegrator (B. Braun Biotech International, Njemačka)
- Električne miješalice (IKA, Njemačka)
- Centrifuga (Eppendorf Research, Njemačka)
- Vaga (Mettler H54AR, Kern, Njemačka)
- Digestor (Tlos, Hrvatska)
- Spektrofotometar NanoPhotometer N60/N50 (Implen GmbH, Munich, Njemačka)
- Uređaji za PCR T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- Uređaj za PCR GeneAmp 2700 PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) (za uhodavanje metode genotipizacije polimorfizma *MAOA-uVNTR*)
- Uređaj za PCR u stvarnom vremenu StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD)
- Transiluminator s digitalnom kamerom UVItec Alliance 4.7 (Cambridge, Velika Britanija)
- pH metar Lab 845 (SI Analytics, Njemačka)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu (Cleaver Scientific, Velika Britanija)
- Magnetska mješalica (IKA Combimag RCH, Njemačka)
- Inkubator Memmert 100-800 (Memmert, Njemačka)
- Inkubator s tresilicom Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih pločica Labsystems Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Čitač mikrotitarskih pločica Tecan INFINITE 200 PRO (Tecan Austria GmbH, Austrija)
- Prozirna polistirenska mikrotitarska pločica s 96 jažica i ravnim dnom (Greiner Bio-one) (za određivanje koncentracije ukupnih proteina)

- Crna polistirenska mikrotitarska pločica s 96 jažica i ravnim dnom (Greiner) (za mjerenje enzimске aktivnosti)
- Nastavci za automatske pipete, filter papir, vata, aluminijska folija, kapaljka, epruvete, mikroepuvete, stalci za epruvete, škarice, špatule, pinceta, menzure, laboratorijske čaše, Erlenmeyerove tikvice, hvataljke, mikropastile.

3.2 Uzorci tkiva posteljice

Istraživanje je provedeno na podskupini novorođenčadi (n = 143; 77 ženskog spola, 66 muškog spola) iz kohorte rođenih PlaNS, uspostavljene u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-6547, pod nazivom „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninški sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina (PlaNS)“. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb (Klasa:8.1–18/162-2, Broj: 02/21 AG) i Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (BEP-8761/2-2018). Sudionice su uključene u istraživanje u Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb. Klinički i demografski podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije i upitnika koje su ispunile sudionice istraživanja. Pisani informirani pristanak prikupljen je od sudionica istraživanja te im je pružena kopija istog. Istraživanje je provedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Uzorci posteljice korišteni u ovome radu su prikupljeni u razdoblju od travnja 2016. g. do listopada 2021. g., prema prethodno opisanoj standardiziranoj proceduri (Blažević i sur., 2017; Horvatiček i sur., 2022). Uzorci za izolacije nukleinskih kiselina su bili pohranjeni na - 80 °C u otopini za konzerviranje nukleinskih kiselina (*RNAlater RNA Stabilization Reagent*, Qiagen, Hilden, Njemačka; u nastavku: otopina RNAlater), dok su uzorci za izolaciju proteina bili pohranjeni u nativnom obliku na - 80 °C.

3.3 Izolacija genomske DNA iz tkiva posteljice

Uzorke tkiva ljudske posteljice sam pripremila za izolaciju genomske DNA na način da sam ih izvadila iz otopine RNAlater, posušila na filter papiru te odvagala oko 12 mg tkiva u novim mikroeprevetama. Za izolaciju genomske DNA koristila sam komplet *GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i pripadajući protokol proizvođača uz dodatni korak tretmana RNazom A. Kako bi homogenizacija tkiva bila uspješnija, tkivo sam

prethodno usitnila čistim dezinficiranim škaricama. Nakon dodatka otopine za lizu T, tkivo sam homogenizirala kružnim pokretima mikropastilom (oko 30 pokreta). Nakon inkubacije na termomikseru na 55 °C u trajanju od 1h, ponovila sam još jednom homogenizaciju mikropastilom. Zatim sam uzorke vorteksirala na električnoj miješalici i kratko centrifugirala u centrifugi kako bi se sadržaj spustio na dno mikroeprevete. Prilikom elucije DNA s kolonice, kolonicu sam inkubirala 10 minuta s otopinom za eluciju kako bih povećala uspješnost elucije DNA. Korak eluiranja sam ponovila kako bih prikupila u drugi eluat preostalu genomsku DNA. Koncentraciju i čistoću izolirane DNA sam provjerila spektrofotometrijski pomoću NanoPhotometer N60/N50 spektrofotometra, mjereći u duplikatima. Izmjerila sam apsorbancije pri 230 nm, 260 nm i 280 nm, pri čemu kao indikator čistoće DNA sam koristila omjer apsorbancija 260/280 koji iznosi oko 1.8 za čistu DNA, te omjer 260/230, kao sekundarna mjera čistoće DNA, koji iznosi između 2.0 i 2.2 za nekontaminiran izolat DNA.

S ciljem određivanja cjelovitosti izolirane DNA provela sam elektroforezu na 0.8 % agaroznom (*Agarosa low EEO*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) gelu uz dodatak boje *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Duren, Njemačka). Za svaki uzorak sam pripremila smjese za nanošenje na gel pomješavši 2 µl uzorka DNA, 0.5 µl pufera za nanošenje (10X, Qiagen, Hilden, Njemačka) i 2.5 µl H₂O tretirane s dietil-pirokarbonatom (DEPC, od eng. *diethyl pyrocarbonate*). Kao molekularnu ljestvicu sam koristila *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) te sam elektroforezu provela na sustavu za horizontalnu elektroforezu. Rezultate elektroforeze sam vizualizirala pomoću transiluminatora s digitalnom kamerom UVItec Alliance 4.7.

3.4 Genotipizacija polimorfizma *MAOA-uVNTR*

Polimorfizam *MAOA-uVNTR* sam genotipizirala tako što sam prvo umnožila varijabilnu regiju gena *MAOA* uz pomoć lančane reakcije polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*). Zatim sam elektroforezom na agaroznom gelu razdvojila dobivene produkte PCR-a i odredila im dužinu. U Tablici 1. su prikazane alelne varijante polimorfizma *MAOA-uVNTR*, gdje naziv alela odgovara broju ponavljanja tandemskog ponavljajućeg slijeda DNA. Očekivane dužine produkata PCR-a za svaki od alela su mi poslužile za određivanje genotipova ovog polimorfizama u uzorcima tkiva humane posteljice.

Tablica 1. Alelne varijante polimorfizma *MAOA-uVNTR*. Nazivi alelnih varijanti odgovaraju broju ponavljanja tandemskog ponavljajućeg DNA slijeda. Navedene veličine produkata lančane reakcije polimerazom (u parovima baza, pb) odgovaraju određenom alelu i poslužile su pri utvrđivanju genotipova ovog polimorfizma.

Alelna varijanta polimorfizma <i>MAOA-uVNTR</i>	Očekivana duljina produkta / pb
2	279
3	309
3.5	324
4	339
4.5	354

Oligonukleotidne početnice koje sam koristila u PCR-u (F: 5'-ACAGCCTGACCGTGGAGAAG-3'; R: 5'-GAACGGACGCTCCATTCGGA-3') su nabavljene od tvrtke Life Technologies (CA, SAD), a sekvence su preuzete iz rada Filić (2004). U početnoj fazi istraživanja, testirala sam protokol za PCR iz navedenog rada (Filić, 2004) te sam ga dodatno prilagodila mijenjajući sastav reakcijske smjese i termalne uvjete PCR-a, s ciljem da povećam specifičnost i prinos produkata. Također sam prilagodila i provedbu elektroforeze s ciljem bolje razlučivosti vrpca na gelu. U radu Filić (2004) elektroforeza je rađena na poliakrilamidnom gelu, a ja sam uhodala protokol za elektroforezu na agaroznom gelu. U uhodavanju navedenih protokola, koristila sam uzorke DNA s poznatim genotipom, određenim u prethodnom istraživanju (Filić, 2004). U nastavku navodim uvjete i protokol za provedbu PCR-a i elektroforeze uz koje sam dobila najbolje rezultate i koje sam koristila u daljnjem određivanju polimorfizma *MAOA-uVNTR* u uzorcima DNA izoliranim iz posteljice. Smjese za PCR sam pripremila sukladno protokolu za pripremu reakcijske smjese prikazanom u Tablici 2. PCR sam provela sukladno termalnim uvjetima prikazanim u Tablici 3. na uređaju za PCR T100 Thermal Cycler. Po završenom PCR-u, pristupila sam provedbi elektroforeze produkata PCR-a na 3.5 % agaroznom gelu volumena 80 ml uz dodatak 4 µl boje *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Duren, Njemačka), u 1X TAE puferu (0.8 M Tris, 0.2 mM octena kiselina, 0.5 M EDTA). Elektroforezu sam provela prvo pri 60 V i 81 mA 10 min, zatim pri

80 V 90 min i onda još 30 min pri 90 V (radi bolje razlučivosti vrpce na gelu). Na gel sam nanosila 10 µl produkta PCR-a pomiješanog s 1 µl pufera za nanošenje *CoralLoad PCR pufer* (10X, Qiagen, Hilden, Njemačka). Kao molekularnu ljestvicu koristila sam *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), koji sam nanosila u volumenu od 3 µl. Na gel sam kao dodatnu kontrolu nanosila i kontrolne uzorke poznatog genotipa, čiji je genotip određen u prethodnom istraživanju (Filić i sur., 2005). Rezultate gel elektroforeze sam vizualizirala pomoću transiluminatora s digitalnom kamerom UVItec Alliance 4.7.

Zbog pojavnosti 3 vrpce na agaroznom gelu kod uzoraka koji imaju 3/4 heterozigotni genotip za polimorfizam *MAOA-uVNTR*, prilikom uhodavanja protokola za genotipizaciju polimorfizma *MAOA-uVNTR* ponovila sam PCR te elektroforezu prema prethodno spomenutim uputama, na način da sam u jednoj reakcijskoj smjesi kombinirala 2 uzorka koji imaju homozigotni genotip 3/3 i 4/4 za polimorfizam *MAOA-uVNTR* (u jednakim omjerima, tako da konačna koncentracija DNA po reakcijskoj smjesi ostane nepromjenjena), s ciljem dokazivanja pojave heterodupleksa dvaju lanaca DNA različite duljine u uzorcima koji imaju heterozigotni genotip 3/4 za polimorfizam *MAOA-uVNTR*.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom u svrhu genotipizacije polimorfizma *MAOA-uVNTR*, gdje c označava konačnu koncentraciju reagensa u smjesi, V volumen pojedinog reagensa po uzorku, V_M volumen smjese svih reagenasa osim genomske DNA, a V_U ukupni volumen reakcijske smjese.

Reagens	c	$V / \mu\text{l}$
H ₂ O		3.18
PCR pufer II 10x (Applied Biosystems)	1.0	1.0
smjesa dNTP (10 nM; 2.5 nM svaki dNTP)	0.2 nM	0.8
MgCl ₂ (25 mM) (Applied Biosystems)	1.5 mM	0.6
Q solution 5x (Qiagen)	1.0	2.0
F početnica (10 μM)	0.2 μM	0.2
R početnica (10 μM)	0.2 μM	0.2
Taq DNA polimeraza (5 U/μl) (Applied Biosystems)	0.01 U/μl	0.02
V_M		8.0
DNA (oko 40 ng/μl)	4.0 ng/μl	2.0
V_U		10.0

Tablica 3. Termalni uvjeti lančane reakcije polimerazom u svrhu genotipizacije polimorfizma *MAOA-uVNTR*, gdje T označava temperaturu pojedinog koraka, a t vrijeme trajanja svakog koraka.

	početna denaturacija	denaturacija	nalijeganje	elongacija	završna elongacija
$T / ^\circ\text{C}$	95	95	59	72	72
t	2 min	30 s	30 s	40 s	7 min
broj ciklusa	1	35			1

3.5 Izolacija RNA

Za potrebe izolacije RNA iz tkiva humane posteljice pripremila sam otopine i pribor za izdvajanje RNA sukladno uputama iz Ambriović Ristov i sur. (2007). Ukratko, s DEPC-om su tretirane mikroeprevete za otapanje i pohranjivanje izdvojene RNA, destilirana voda (deH₂O) i nastavci za

automatske pipete, te zatim autoklavirani. Za izolaciju RNA sam odvagala u čiste mikroeprovete 6-13 mg tkiva humane posteljice pohranjenog u otopini RNAlater. Izolaciju RNA sam provela u digestoru pomoću komercijalnog kompleta *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka) i pripadajućeg protokola proizvođača, uz dodatni korak digestije DNazom na koloni. Prema uputi proizvođača, pripremljen je RTL pufer s β -merkaptetanolom, dodatkom 10 μ l β -merkaptetanola na 1 ml RTL pufera. Dodala sam 700 μ l RTL pufera s β -merkaptetanolom po uzorku te sam zatim razorila tkivo ultrazvučnim dezintegratorom 3 puta po 10 s, uz amplitudu 40-60 μ m, držeći uzorak cijelo vrijeme u ledenoj kupelji. Homogenat sam centrifugirala te sam za daljnji postupak koristila 650 μ l supernatanta. Nakon dodatka vode bez RNaza na kolonu za eluciju RNA kolonu sam inkubirala 10 min pri sobnoj temperaturi kako bih povećala efikasnost elucije RNA. Iz dobivenih izolata RNA sam izdvojila alikvote od 6 μ l za provjeru koncentracije, čistoće i cjelovitosti RNA, dok je ostatak izolata RNA pohranjen pri -80 °C. Koncentraciju i čistoću eluata RNA sam provjerila spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra NanoPhotometer N60/N50, mjereći u duplikatima. Izmjerila sam apsorbancije pri 230 nm, 260 nm i 280 nm, pri čemu kao indikator čistoće RNA sam koristila omjer apsorbancija 260/280 koji iznosi oko 2.0 za čistu RNA, te omjer 260/230, kao sekundarna mjera čistoće izolata RNA, koji iznosi između 2.0 i 2.2 za nekontaminiran izolat RNA. Za provjeru cjelovitosti izolirane RNA provela sam gel elektroforezu na 1.5 % agaroznom gelu uz 2.5 % varikine u 1X TAE puferu pri 60 V i 101 mA kroz 50 min, na sustavu za horizontalnu elektroforezu. U gel volumena 75 ml sam dodala 3.75 μ l boje *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Duren, Njemačka). Smjese uzoraka za nanošenje na gel su sadržavale 0.5 μ l otopine RNA, 1 μ l pufera za nanošenje (10X, Qiagen, Hilden, Njemačka) i 8.5 μ l H₂O tretirane s DEPC. Kao molekularnu ljestvicu sam koristila *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Rezultate gel elektroforeze sam vizualizirala pomoću transiluminatora s digitalnom kamerom UVItec Alliance 4.7.

3.6 Reverzna transkripcija – kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Iz dobivenih izolata RNA iz tkiva humane posteljice sam provela reverznu transkripciju (RT) pomoću seta kemikalija *High-Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD), prema uputama proizvođača. Reakcija je provedena u ukupnom volumenu od 10 μ l, uz 1500 ng RNA po uzorku. Radne otopine cDNA sam pripremila tako da konačna koncentracija cDNA u smjesi

bude 7.5 ng/ μ l. Kao negativna kontrola, pripremljeni su uzorci bez reverzne transkriptaze (RT-). Po završetku reverzne transkripcije, dobivene cDNA uzorke sam pohranila na – 20 °C.

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR) sam provela iz dobivenih uzoraka cDNA korištenjem specifičnih početnica za gene *MAOA* (F-početnica: 5'-GAGCGGCTACATGGAAGGG-3', R-početnica: 5'-TCACCTTCCCGAGACCATTTA-3') i *YWHAZ* (tirozin 3-monooksigenaza/triptofan 5-monooksigenaza aktivacijski protein, zeta polipeptid) (F-početnica: 5'-CCGTTACTTGCTGAGGTTG-3', R-početnica: 5'-AGTTAAGGGCCAGACCCAGT-3'). Gen *YWHAZ* sam odabrala kao referentni gen za određivanje relativne ekspresije *MAOA* mRNA zbog njegove stabilne ekspresije u tkivu humane posteljice (Meller i sur., 2005; Blažević i sur., 2017). Reakcijske smjese su napravljene u duplikatima za svaki uzorak pomoću *Fast SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) smjese za detekciju produkata prema uputama prikazanim u Tablici 4. qPCR sam provela na uređaju za PCR u stvarnom vremenu StepOnePlus Real-Time PCR System. Relativne razine mRNA *MAOA* sam odredila korištenjem metode $\Delta\Delta C_q$. Relativnu razinu mRNA *MAOA* sam odredila u n = 95 uzoraka tkiva humane posteljice.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za qPCR *MAOA* i *YWHAZ*, gdje V označava volumen odgovarajućeg reagensa, a V_U ukupni volumen reakcijske smjese po jednom uzorku.

Reagens	V / μ l
H ₂ O	2.428
Fast SYBR™ Green Master Mix 2x (Applied Biosystems)	5.0
F početnica (10 mM)	0.286
R početnica (10 mM)	0.286
cDNA / RT- (7.5 ng/ μ l)	2.000
V_U	10.0

3.7 Izolacija ukupnih proteina iz tkiva posteljica

Za izolaciju ukupnih proteina sam koristila tkivo humane posteljice pohranjeno u nativnom obliku pri – 80 °C. Odvagala sam oko 50 mg tkiva u mikroepruvetu te dodala hladnog kalij fosfatnog

pufera (0,05 M, pH = 7.6) u omjeru 1:20 (m/V, 20 μ l pufera po mg tkiva). Uzorke sam stavila na led i tkivo homogenizirala ultrazvučnim dezintegratorom 4 puta po 10 s pri amplitudi 40-60 μ m, držeći uzorke cijelo vrijeme u ledu. Uzorke sam zatim centrifugirala 5 min pri 2000 g i 4 °C kako bi se istaložili nehomogenizirani ostaci tkiva. Supernatant sam alikvotirala u nove mikroeprovete te izolate proteina pohranila pri – 80 °C.

3.8 Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentraciju ukupnih proteina u izolatima proteina tkiva humane posteljice sam odredila kolorimetrijskom metodom BCA (bicinhoninska kiselina) uz pomoć seta kemikalija *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) i pripadajućeg protokola proizvođača. Pripremila sam standarde BSA (albumin iz goveđeg seruma, od eng. *Bovine Serum Albumin*) u koncentracijama od: 1500, 1000, 750, 500, 375, 250, 125, 62.5 ng/ μ l koje sam pohranila pri – 20 °C kada nisu u upotrebi. Koncentracije proteina sam određivala u prozirnoj polistirenskoj mikrotitarskoj pločici s 96 jažica i ravnim dnom. Volumen uzoraka, standarda i negativne kontrole, po jažici je iznosio 20 μ l, a razrjeđenje uzoraka je iznosilo 1:10. U svaku jažicu s uzorcima, odnosno standardima i negativnom kontrolom, sam odpipetirala 200 μ l prethodno vorteksirane smjese reagensa A i B nakon čega sam mikropločicu protresla. Pokrivenu i aluminijskom folijom zamotanu pločicu sam inkubirala 30 min pri 37 °C u inkubatoru Memmert 100-800. Nakon inkubacije, pločicu sam ohladila na sobnu temperaturu te sam, uz prethodno miješanje (10 s pri brzini 780), izmjerila apsorbanciju pri 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Labsystems Multiskan MS. Iz dobivenih iznosa mjerenja sam napravila baždarnu krivulju na temelju apsorbancije standarda i negativne kontrole te izračunala koncentracije proteina u uzorcima.

3.9 Mjerenje enzimske aktivnosti MAOA u uzorcima posteljice

Reakcije za određivanje enzimske aktivnosti MAOA u uzorcima tkiva posteljice sam provodila u crnoj polistirenskoj mikrotitarskoj pločici s 96 jažica i ravnim dnom, uz korištenje kinuramina kao supstrata. Pripremila sam seriju razrjeđenja kinuramina iz 3 mM otopine kinuramina, u koncentracijama od 37.5, 75.0, 150.0, 300.0, 600.0 μ M. Konačne koncentracije kinuramina u reakcijskoj smjesi na početku reakcije bile su 0.0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 i 200 μ M. Također sam pripremila i seriju razrjeđenja standarda 4-hidroksi-kinolina iz 0.2 M otopine 4-hidroksi-kinolina

razrjeđivanjem s 0.033 M natrij-boratnim puferom (pH 8.3) u koncentracijama od 0.75, 1.5, 3, 6 i 12 mM. Konačne koncentracije 4-hidroksi-kinolina u inkubacijskoj smjesi bile su 0.0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 i 1 μ M. Na mikrotitarsku pločicu sam u 7 jažica dodala po 150 μ l otopine izoliranih proteina, razrjeđene s 0.33 M natrij-boratnim puferom tako da je konačna masa proteina po jažici iznosila 6 μ g. Sve sam radila na ledenom stalku. Tako naneseni uzorci proteina su inkubirani 10 min pri 37 °C u inkubatoru s tresilicom Heidolph Unimax 1010. Zatim sam u jažice gdje je bila predviđena prazna proba dodala 90 μ l 1 M trikloroacetne kiseline (TCA, od eng. *trichloroacetic acid*). U reakcijske smjese sam multikanalnom pipetom dodala 30 μ l kinuramina u prethodno priređenim serijskim razrjeđenjima te sam pločicu inkubirala 15 min pri 37 °C u inkubatoru s tresilicom Heidolph Unimax 1010. Tijekom inkubacije se odvija enzimska reakcija u kojoj MAOA kao glavni akter koristi supstrat kinuramin za stvaranje produkta 4-hidroksi-kinolina. Reakciju sam prekinula dodatkom 90 μ l 1 M TCA istim redoslijedom i brzinom kojom sam dodavala i kinuramin. Konačni volumen u jažici nakon zaustavljanja reakcije iznosio je 240 μ l. Na mikrotitarsku pločicu sam konačno odpipetirala i po 30 μ l svakog razrjeđenja iz serije razrjeđenja 4-hidroksi-kinolina te po 150 μ l 0.033 M natrij-boratnog pufera i 90 μ l 1 M TCA u svaku jažicu sa standardom. Na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan INFINITE 200 PRO uzorcima sam izmjerila fluorescenciju pri čemu je ekscitacijska valna duljina iznosila 310 nm, emisijska valna duljina 360 nm, propusnost ekscitacije 9 nm, propusnost emisije 20 nm, broj bljeskova 6 i vrijeme integracije 200 μ s. Na temelju apsorbancije standarda sam konstruirala baždarnu krivulju pomoću koje sam izračunala koncentraciju 4-hidroksi-kinolina nastalog po završetku enzimске reakcije. Vrijednosti brzine reakcije pri svakoj koncentraciji supstrata sam izrazila s obzirom na masu ukupnih proteina u reakcijskoj smjesi. Iz izračunatih podataka sam u programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, SAD) odredila vrijednosti kinetičkih parametara enzimске reakcije - maksimalnu brzinu (V_{max}) i Michaelis-Menteninu konstantu (K_M), prema Michaelis-Menteninoj kinetici. Vrijednost V_{200} sam izjednačila sa brzinom reakcije u kojoj je početna koncentracija kinuramina u reakcijskoj smjesi iznosila 200 μ M (najveća korištena koncentracija supstrata), a enzimsku efikasnost MAOA sam izračunala na temelju omjera dobivenih kinetičkih parametara V_{max} i K_M . Kinetičke parametre i efikasnost MAOA sam odredila za 143 uzorka tkiva humane posteljice.

3.10 Statistička obrada podataka

Svi prikupljeni podaci su statistički obrađeni u programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, SAD). Normalnost distribucije dobivenih podataka sam ispitala D'Agostino-Pearsonovim testom za normalnost distribucije. Hi-kvadrat testom sam analizirala usklađenost opaženih frekvencija genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* s Hardy-Weinbergovom ravnotežom, zajednički za muške i ženske uzorke prema uputama za računanje za gene smještene na kromosomu X (Graffelman i Weir, 2016). Moguće spolne razlike u vrijednostima relativne razine mRNA *MAOA* i kinetičkih parametara *MAOA* sam ispitala studentovim t-testom. Vrijednosti enzimske efikasnosti *MAOA* s obzirom na spol sam ispitala Mann-Whitneyevim testom zbog nenormalnosti raspodjele podataka. Odnos između polimorfizma *MAOA-uVNTR* i relativne razine mRNA *MAOA* testirala sam jednosmjernom analizom varijance (ANOVA, od eng. *analysis of variance*) za normalno raspodijeljene vrijednosti i Kruskal-Wallisovim testom za nenormalno raspodijeljene vrijednosti. Odnos između razine mRNA *MAOA* i kinetičkih parametara *MAOA* sam usporedila Pearsonovim testom korelacije za normalno raspodijeljene podatke i Spearmanovim testom korelacije za nenormalno raspodijeljene podatke. Grafički prikazi su izrađeni pomoću programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, SAD).

4. Rezultati

4.1 Demografske i kliničke karakteristike sudionika istraživanja

Demografski i klinički podaci o majkama i njihovoj novorođenčadi uključenima u ovo istraživanje su prikazani u Tablici 5. Sva novorođenčad je rođena zdrava, planiranim carskim rezom u punom terminu trudnoće (gestacijska dob > 37 tjedana). Polimorfizam *MAOA-uVNTR* i aktivnost *MAOA* u posteljici su analizirani u ukupnom uzorku novorođenčadi ($n = 143$; 77 novorođenčadi ženskog spola i 66 novorođenčadi muškog spola; Tablica 5), dok je razina mRNA *MAOA* u posteljici određena u podskupini novorođenčadi ($n = 95$; 48 novorođenčadi ženskog spola i 47 novorođenčadi muškog spola).

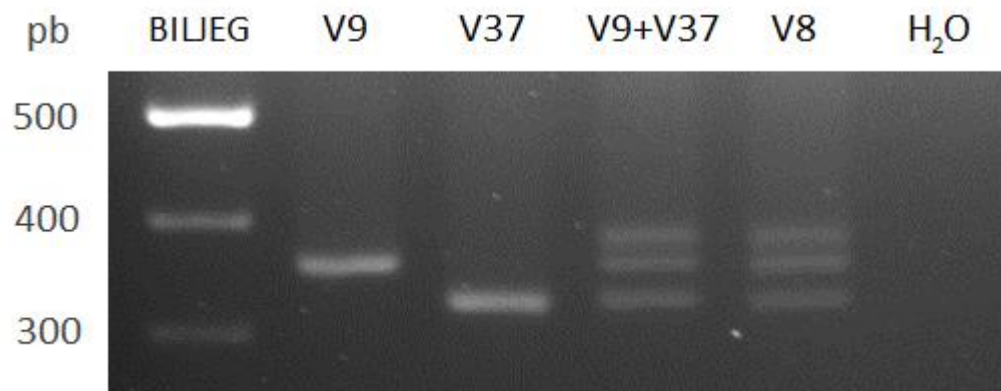
Tablica 5. Demografske i kliničke karakteristike sudionika istraživanja (n = 143).

	Karakteristika	Vrijednost*
MAJKE	Dob prilikom poroda / godine	33.9 (22.4 - 49.4)
	Jednorotkinje/višerotkinje / n (%)	88 (61.5) / 55 (38.5)
	Status tolerancije glukoze: NGT/GDM / n (%)	75 (52.5) / 68 (47.5)
	pITM / kg/m ²	24.6 (16.6 - 51.7)
NOVOROĐENČAD	Spol: ženski/muški / n (%)	77 (53,9) / 66 (46,1)
	Gestacijska dob pri porodu / tjedni	39.1 (37.6 - 41.0)
	Masa pri porodu / g	3430 (2470 - 4400)
	Duljina pri porodu / cm	49.57 (46.0 - 54.0)
	Ponderalni indeks / g/cm ³	2.81 (2.23 - 3.59)

*Za kategorijske varijable prikazani su broj sudionika (n) i postotak (%), dok su za kontinuirane varijable prikazane srednja vrijednost i raspon (minimalna - maksimalna vrijednost). Kratice redom označavaju: NGT = normalna tolerancija glukoze (od eng. *normal glucose tolerance*), GDM = gestacijski dijabetes mellitus, pITM = predtrudnički indeks tjelesne mase.

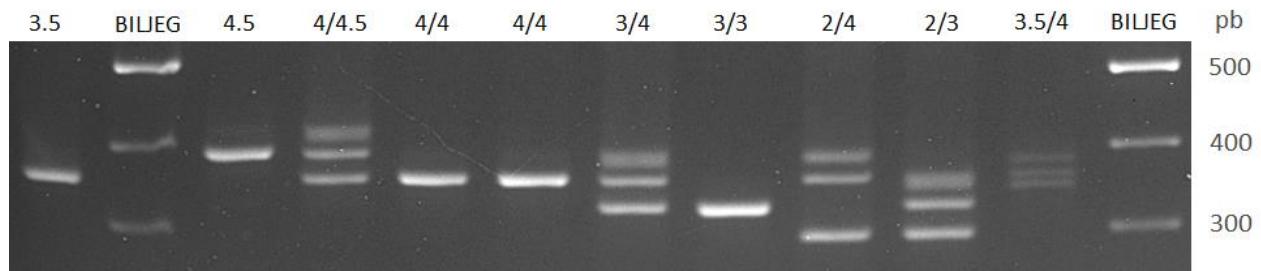
4.2 Polimorfizam *MAOA-uVNTR*

Uzorci genomske DNA s poznatim genotipom *MAOA-uVNTR*, određenim u prethodnom istraživanju (Filić, 2004) su uspješno poslužili kao kontrolni uzorci za utvrđivanje polimorfizma *MAOA-uVNTR* u uzorcima tkiva humane posteljice. Kako bismo rasvijetlili razlog pojave treće vrpce na gelu u uzorcima s genotipom 3/4, napravili smo u istoj reakcijskoj mikroepuveti PCR s uzorkom DNA genotipa 3/3 i genotipa 4/4. Navedeno je prikazano na Slici 3. te je moguće pretpostaviti da treća vrpca koja svojom veličinom nadmašuje veličine očekivanih alelnih varijanti odgovara heterodupleksu dva lanca DNA, koji zbog strukturalnih smetnji sporije putuje tijekom gel elektroforeze te je na gelu prisutan iznad alelnih varijanti.



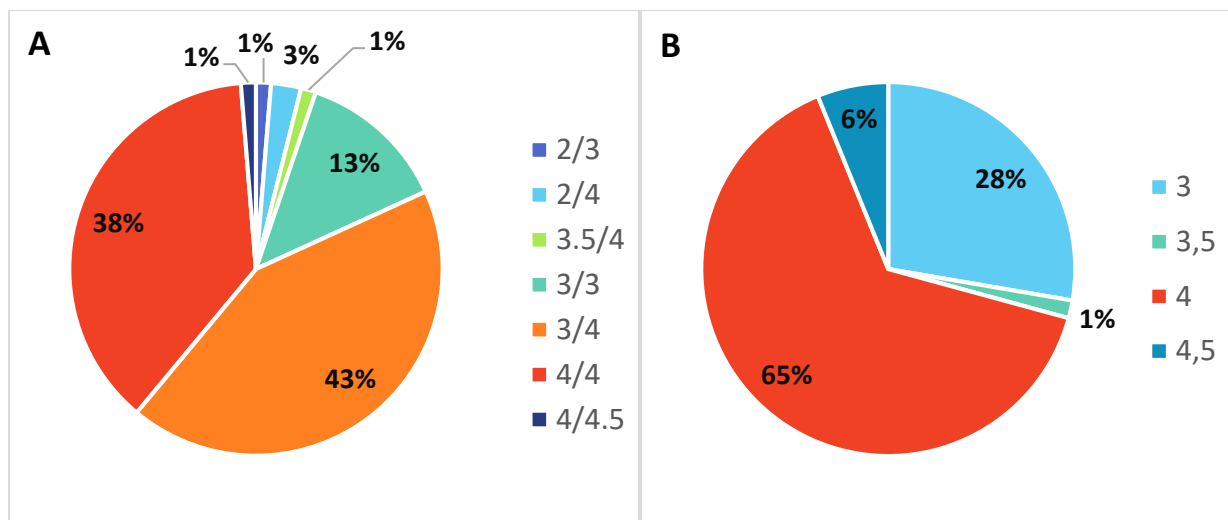
Slika 3. Elektroforeza produkata PCR-a na 3.5 % agaroznom gelu. Produkti PCR-a dobiveni su korištenjem kontrolnih uzoraka DNA s poznatim genotipom polimorfizma *MAOA-uVNTR*, određenim u prethodnom istraživanju (Filić, 2004). Korišteni biljeg je molekularna ljestvica 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), a pb označava broj parova baza biljega. Uzorci redom odgovaraju genotipovima: V9 - 4/4, V37 - 3/3, V8 - 3/4. U jažici V9+V37 su kombinirani uzorci V9 i V37 s ciljem dokazivanja nastajanja heterodupleksa dvaju različitih lanaca DNA kod heterozigotnih uzoraka, odnosno pojave treće vrpce na gelu u heterozigotnom uzorku. U uzorku V8 je također prisutna treća vrpca zbog nastanka heterodupleksa dvaju lanaca DNA koji odgovaraju alelima 3 i 4. U jažici H₂O je korištena voda kao negativna kontrola PCR-a. Elektroforeza je provedena 10 min pri 60 V i 81 mA, zatim 90 min pri 80 V i još 30 min pri 80 V. Za vizualizaciju je korištena boja *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Duren, Njemačka).

Genotip polimorfizma *MAOA-uVNTR* je uspješno utvrđen za 142 od 143 uzorka posteljice, dok za jedan uzorak nije bilo prisutnih vrpca na gelu nakon elektroforeze. Na Slici 4. su prikazani ogledni rezultati gel elektroforeze na 3.5 % agaroznom gelu, s reprezentativnim genotipovima polimorfizma *MAOA-uVNTR* koji su utvrđeni na temelju očekivanih duljina produkta PCR-a, prikazanih u Tablici 1. Dobivene veličine alelnih varijanti približno odgovaraju očekivanim veličinama alelnih varijanti polimorfizma *MAOA-uVNTR*.



Slika 4. Elektroforeza produkata PCR-a polimorfizma *MAOA-uVNTR* na 3.5 % agaroznom gelu. Korišteni biljeg je molekularna ljestvica *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), a pb označava broj parova baza biljega. Genotipovi uzoraka (navedeni iznad slike) su utvrđeni na temelju prethodno poznatih genotipova kontrolnih uzoraka te očekivanih veličina alelnih varijanti prikazanih u Tablici 1. Elektroforeza je provedena 10 min pri 60 V i 81 mA, zatim 90 min pri 80 V i još 30 min pri 80 V. Za vizualizaciju je korištena boja *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Duren, Njemačka).

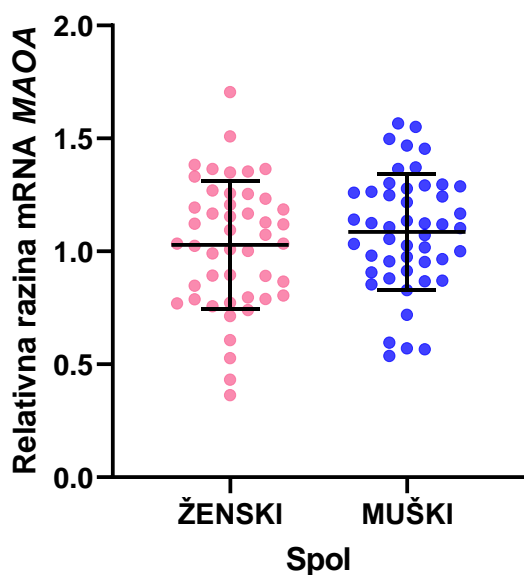
Distribucija genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* u ispitivanoj populaciji ženske ($n = 77$) i muške ($n = 65$) novorođenčadi prikazana je na Slici 5. Nije bilo statistički značajne razlike između opaženih frekvencija genotipova i očekivanih frekvencija genotipova prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (hi-kvadrat test, p -vrijednost > 0.05 , $DF = 19$ (stupnjevi slobode, od eng. *degrees of freedom*)). Učestalosti alela se nisu razlikovale između muške i ženske novorođenčadi (hi-kvadrat test, p -vrijednost > 0.05 , $DF = 4$).



Slika 5. Zastupljenost genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* u ispitivanoj populaciji novorođenčadi (n = 142). S obzirom na smještaj gena *MAOA* na kromosomu X, kod muške novorođenčadi su prisutni hemizigotni genotipovi. A – novorođenčad ženskog spola (n = 77), B - novorođenčad muškog spola (n = 65). Analiza genotipa nije uspjela kod 1 novorođenca muškog spola.

4.3 Relativna razina mRNA *MAOA* u posteljici

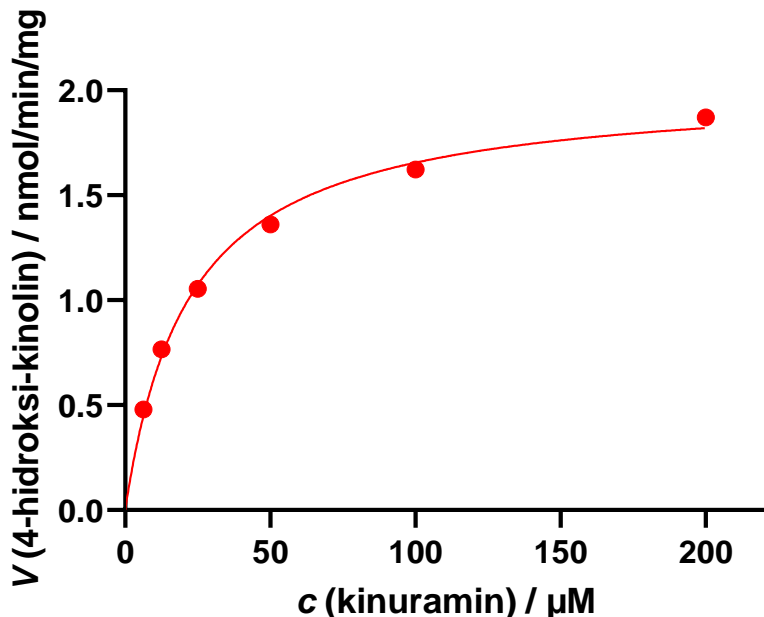
Relativnu razinu mRNA *MAOA* sam odredila u ukupno 95 uzoraka tkiva humane posteljice. Analizirano je 47 uzoraka ženske novorođenčadi te 48 uzoraka muške novorođenčadi. Relativne razine mRNA *MAOA* su dobivene na temelju metode $\Delta\Delta Cq$ uz uporabu gena *YWHAZ* kao referentnog gena. Posteljične razine mRNA *MAOA* s obzirom na spol novorođenčadi su prikazane na Slici 6. Prema D'Agostino-Pearsonovom testu, raspodjela podataka kod oba spola je bila normalna. Srednja vrijednost relativne ekspresije mRNA *MAOA* za žensku novorođenčad je iznosila 1.029 uz standardnu devijaciju 0.282, dok je za mušku novorođenčad iznosila 1.086 uz standardnu devijaciju 0.254. Rezultati nesparenog t-testa pokazuju da nema statističke značajne razlike u relativnoj razini mRNA *MAOA* između posteljica muške i ženske novorođenčadi (p-vrijednost > 0.05).



Slika 6. Relativna razina mRNA *MAOA* u tkivu humane posteljice s obzirom na spol novorođenčadi. Analiza je provedena na uzorcima tkiva posteljice ženske novorođenčadi ($n = 47$; prikazani ružičasto) i muške novorođenčadi ($n = 48$; prikazani plavo). Prikazane su individualne vrijednosti te srednja vrijednost i standardna devijacija za svaku spolnu skupinu. Relativna razina mRNA *MAOA* su dobivene na temelju metode $\Delta\Delta Cq$ uz uporabu gena *YWHAZ* kao referentnog gena.

4.4 Aktivnost MAOA u posteljici

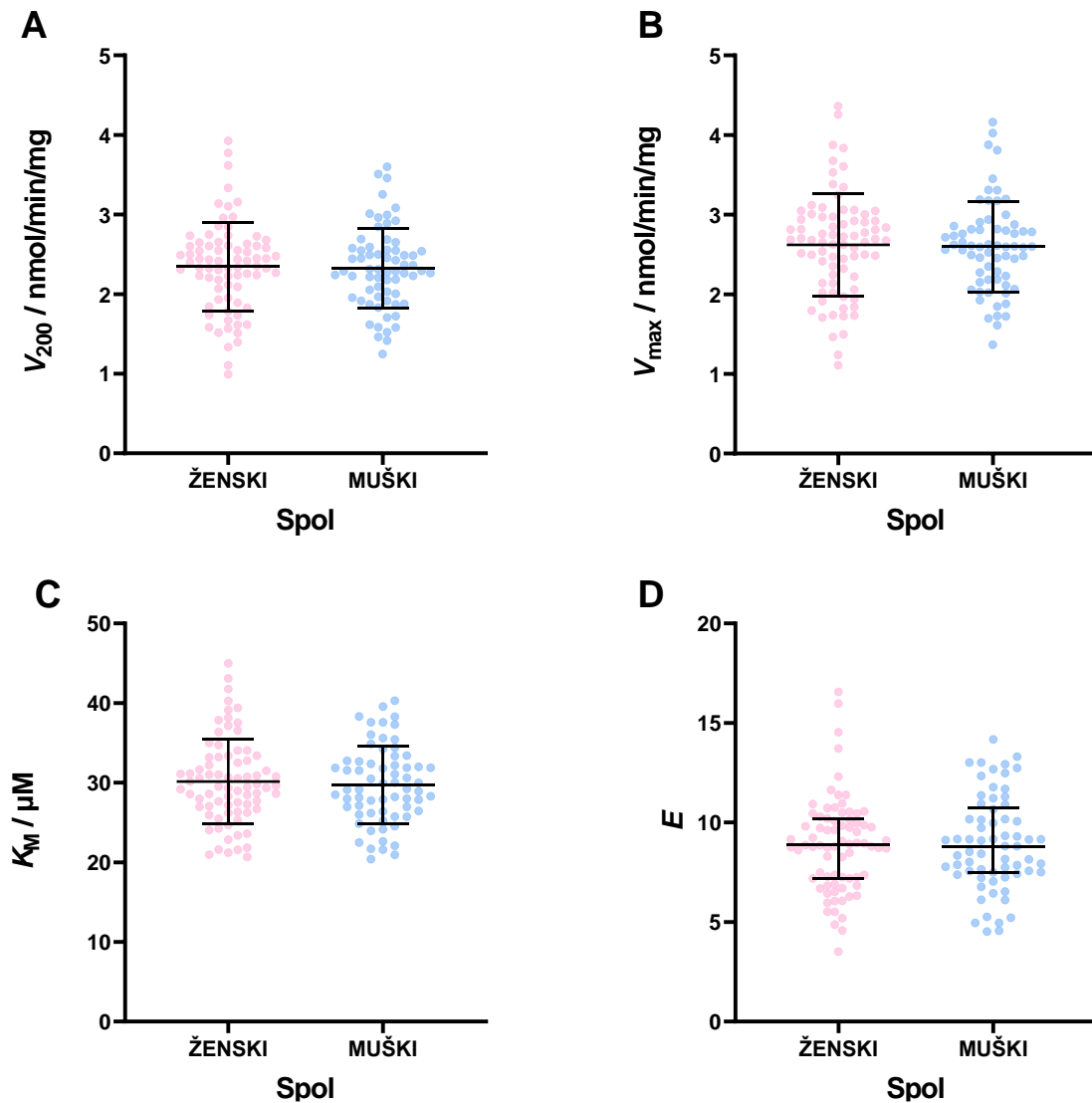
Aktivnost MAOA sam odredila u uzorcima posteljice svih 143 novorođenčadi (77 ženskog spola i 66 muškog spola). Vrijednosti kinetičkih parametara V_{max} i K_M te enzimске efikasnosti (E) MAOA su dobivene analizom izračunatih koncentracija produkata 4-hidroksi-kinolina, nastalog enzimskim djelovanjem MAOA, u programu GraphPad Prism 8, prilagodbom dobivenih podataka Michaelis-Menteninom modelu enzimске kinetike. Krivulja enzimске kinetike po Michaelis-Menteninom modelu enzimске kinetike za jedan od analiziranih uzoraka je prikazana na Slici 7. Moguće je zapaziti da eksperimentalno dobiveni podaci uspješno prate Michaelis-Mentenin model enzimске kinetike.



Slika 7. Reprezentativni prikaz krivulje zasićenja enzimske aktivnosti MAOA u tkivu humane posteljice. Krivulja ovisnosti brzine reakcije, odnosno nastajanja produkta (V (4-hidroksi-kinolin)), o koncentraciji supstrata (c (kinuramin)) prati Michaelis-Mentenin model enzimske kinetike. Vrijednosti kinetičkih parametara i efikasnosti za prikazani uzorak iznose: $V_{\max} = 2.021$ nmol/min/mg, $K_M = 22.07$ μM , $E = 9.157$ i $V_{200} = 1.871$ nmol/min/mg. Podaci su obrađeni u programu GraphPad Prism 8.

Ovisnost kinetičkih parametara (V_{\max} i K_M), enzimske efikasnosti (V_{\max}/K_M) i V_{200} o spolu novorođenčadi je prikazana na Slici 8. D'Agostino-Pearsonovim testom pokazano je da je raspodjela podataka normalna za sve parametre i skupine osim za vrijednosti enzimske efikasnosti kod ženske novorođenčadi. Nisu zamjećene stršće vrijednosti. Srednje vrijednosti i standardne devijacije kod ženske novorođenčadi za V_{\max} iznose 2.622 i 0.64, za K_M iznose 30.14 i 5.32 i za V_{200} iznose 2.347 i 0.558, dok kod muške novorođenčadi iznose 2.596 i 0.565 za V_{\max} , 29.73 i 4.84 za K_M i 2.324 i 0.504 za V_{200} . Medijan i standardna pogreška srednje vrijednosti enzimske efikasnosti za žensku novorođenčad iznose 8.866 i 0.272, dok za mušku novorođenčad iznose 8.809 i 0.291. Rezultati analize ovisnosti kinetičkih parametara V_{\max} , K_M i V_{200} o spolu nesporenim t-testom pokazuju da nema značajne razlike u vrijednostima kinetičkih parametara između muške i ženske ispitivane populacije (p -vrijednost > 0.05). Zbog nenormalnosti raspodjele vrijednosti enzimske efikasnosti MAOA kod ženske novorođenčadi, moguće razlike između spolova su testirane Mann-

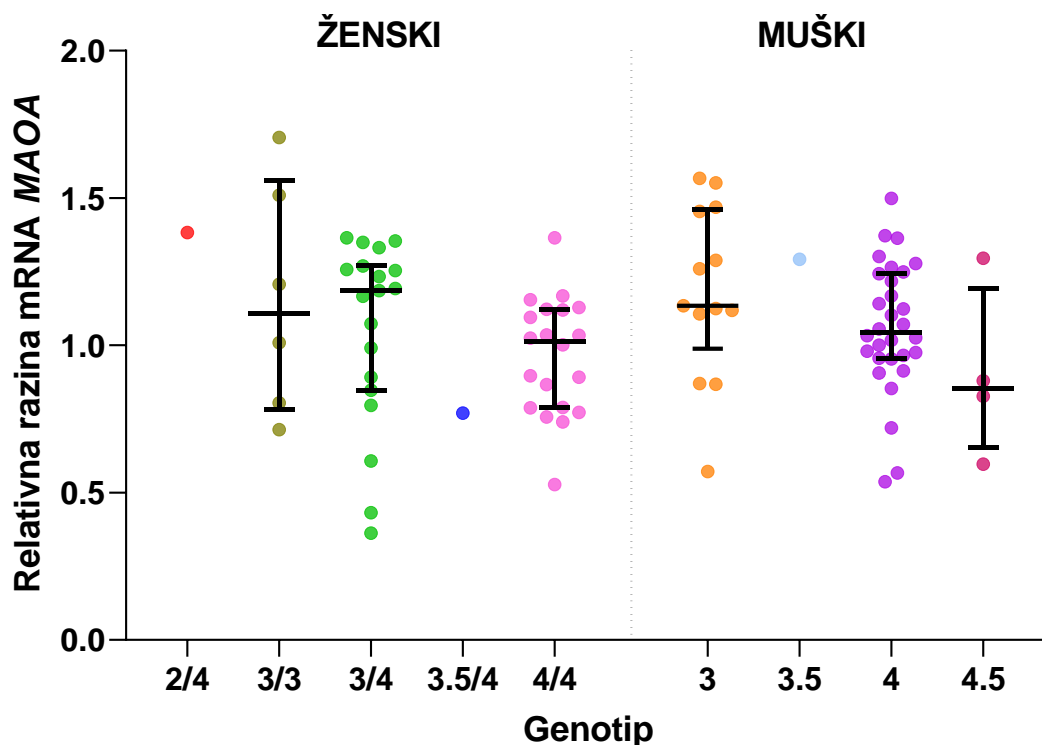
Whitneyjevim testom. Analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike u vrijednostima enzimske efikasnosti između muške i ženske novorođenčadi (p -vrijednost > 0.05).



Slika 8. Prikaz kinetičkih parametara MAOA u tkivu humane posteljice s obzirom na spol novorođenčadi. Slike redom pokazuju: A) brzine reakcije u kojoj je početna koncentracija kinuramina u reakcijskoj smjesi iznosila $200 \mu\text{M}$ (najveća korištena koncentracija supstrata; V_{200}), B) maksimalne brzine reakcije (V_{max}), C) Michaelisove konstante (K_M) i D) enzimske efikasnosti (V_{max}/K_M). Analiza je napravljena na 77 uzorka posteljice ženske novorođenčadi (prikazano ružičasto) i 66 uzorka posteljice muške novorođenčadi (prikazano plavo). Za slike A), B) i C) su prikazani srednja vrijednost i standardna devijacija, dok su za sliku D) prikazani medijan i interkvartilni raspon.

4.5 Odnos između polimorfizma *MAOA-uVNTR* i relativne razine mRNA *MAOA* u humanoj posteljici

Odnos genotipa polimorfizma *MAOA-uVNTR* i relativne razine mRNA *MAOA* je prikazana na Slici 9. Analizirano je 47 uzoraka posteljice ženske novorođenčadi te 48 uzoraka posteljice muške novorođenčadi. Zbog malog broja uzoraka po skupini za genotipove 2/4, 3/3, 3.5/4, 3.5 i 4.5, podaci su analizirani Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov test za višestruke usporedbe. Analiza je pokazala da nema značajne razlike u vrijednostima relativne razine mRNA *MAOA* između različitih genotipova polimorfizama *MAOA-uVNTR* (p -vrijednost > 0.05). S obzirom na veliki broj genotipova polimorfizama *MAOA-uVNTR* s malom učestalošću u ispitivanoj populaciji, koji narušavaju snagu statističke analize, učestali ženski i muški genotipovi su i zasebno analizirani. Kruskal-Wallisovim testom su analizirane vrijednosti relativne razine mRNA *MAOA* za ženske učestale genotipove 3/3, 3/4 i 4/4 te je analiza pokazala da razlike u vrijednostima relativne razine mRNA *MAOA* između navedenih genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* nisu statistički značajne (p -vrijednost > 0.05). Usporedba relativne razine mRNA *MAOA* između učestalih hemizigotnih genotipova 3 i 4 kod muške novorođenčadi je također pokazala da nema značajne razlike u ekspresiji mRNA *MAOA* između navedenih genotipova (p -vrijednost > 0.05 , nesporeni t-test).

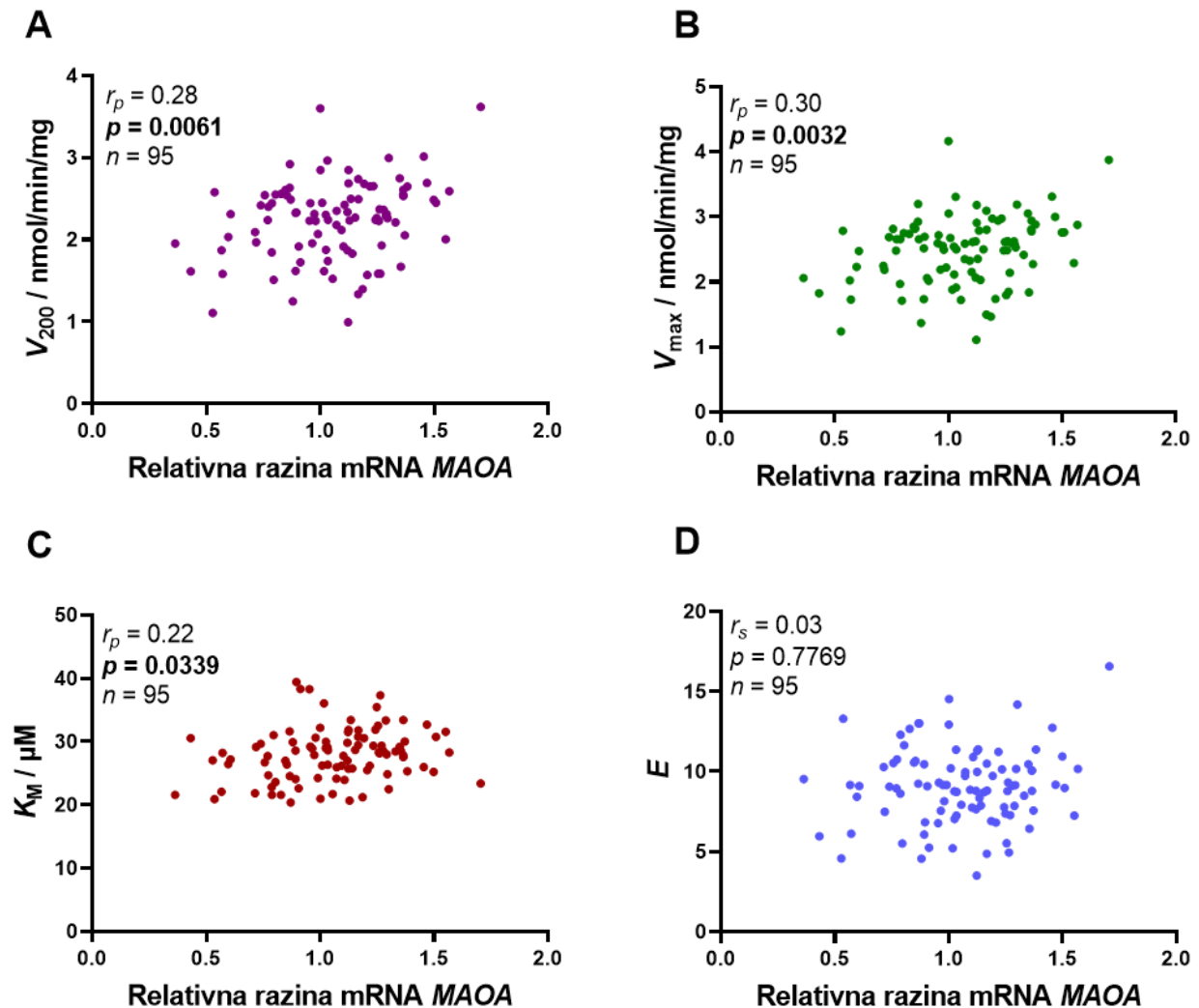


Slika 9. Odnos genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* i relativne razine mRNA *MAOA* u tkivu humane posteljice. Prikazani su rezultati dobiveni u uzorcima posteljice ženske novorođenčadi ($n = 47$; lijevo) i muške novorođenčadi ($n = 48$; desno). S obzirom na smještaj gena *MAOA* na kromosomu X, kod muške novorođenčadi su prisutni hemizigotni genotipovi. Prikazane su individualne vrijednosti te, za genotipne skupine s 4 ili više sudionika, medijan i interkvartilni raspon relativne razine mRNA *MAOA*.

4.6 Odnos između razine mRNA *MAOA* i kinetičkih parametara *MAOA*

Povezanost relativne razine mRNA *MAOA* s kinetičkim parametarima i enzimskom efikasnosti *MAOA* u humanoj posteljici prikazana je na Slici 10. U analizu je uključeno 95 novorođenčadi (47 ženske novorođenčadi i 48 muške novorođenčadi). Za ispitivanje moguće korelacije relativne razine mRNA *MAOA* s vrijednostima V_{max} , K_M i V_{200} izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije, dok je u slučaju testiranja korelacije relativne razine mRNA *MAOA* i enzimске efikasnosti *MAOA* utvrđen Spearmanov koeficijent korelacije zbog nenormalnosti raspodjele vrijednosti enzimске efikasnosti. Korelacija relativne razine mRNA *MAOA* s V_{max} , K_M i V_{200} je bila statistički značajna, s iznosima p-vrijednosti od 0.0032 za V_{max} , 0.0339 za K_M i 0.0061 za V_{200} . Korelacija između relativne razine mRNA *MAOA* i enzimске efikasnosti nije bila statistički značajna (p-vrijednost > 0.05).

Pearsonov koeficijent korelacije između relativne razine mRNA MAOA i V_{\max} iznosi 0.30, a između relativne razine mRNA MAOA i V_{200} iznosi 0.28, što, prema smjernicama za tumačenje vrijednosti koeficijenta korelacije (Udovičić i sur.,2007), upućuje na slabu pozitivnu povezanost relativne razine mRNA MAOA s V_{\max} i V_{200} .



Slika 10. Korelacija relativne razine mRNA MAOA s kinetičkim parametarima i enzimskom efikasnosti MAOA u humano posteljici. Prikazani su rezultati za 95 novorođenčadi (47 ženske novorođenčadi i 48 muške novorođenčadi). Slike redom prikazuju korelaciju relativne razine MAOA mRNA s: A) V_{200} , B) V_{\max} , C) K_M i D) enzimskom efikasnosti (E). Na slikama A), B) i C) su prikazani p-vrijednost (p), Pearsonov koeficijent (r_p) i broj analiziranih uzoraka (n), dok su na slici D) prikazani p-vrijednost, Spearmanov koeficijent (r_s) i broj analiziranih uzoraka. U korelacijama kod kojih je p-vrijednost statistički značajna, ona je masno otisnuta.

5. Rasprava

Posteljica je esencijalni organ koji je neophodan u gestacijskom razvoju sisavaca i koji igra ulogu medijatora između majke i fetusa. Mnoštvo djelatnih tvari prisutnih u posteljici sudjeluju u održavanju homeostaze majke i fetusa. Jedna od njih je monoamin oksidaza A, enzim koji je uključen u katabolizam neurotransmitera i hormona serotonina, a koji je ujedno i predmet ovog istraživanja. Određeni su polimorfizam *MAOA-uVNTR* i razina mRNA gena *MAOA* te aktivnost enzima *MAOA* u tkivu posteljice novorođenčadi rođene u terminu. Također je ispitan međuodnos te moguće spolne razlike između mjerenih parametara. Ispitivanjem je obuhvaćeno 143 novorođenčadi kod kojih nije bilo fetalnih abnormalnosti, dok je 47.5 % majki u ispitivanom uzorku imalo gestacijski dijabetes.

Metoda genotipizacije polimorfizma *MAOA-uVNTR* korištenjem PCR-a prema uvjetima iz Tablice 2. i 3. i elektroforeze na 3.5% agaroznom gelu je uspješno uhodana kako bi se u relativno ekonomičnim uvjetima uspjelo efikasno odrediti genotip polimorfizma *MAOA-uVNTR* u izolatima DNA. Unatoč pojavnosti treće vrpce na gelu u uzorcima koji su heterozigotni za polimorfizam *MAOA-uVNTR*, za koju pretpostavljam da predstavlja heterodupleks dvaju lanaca DNA različite duljine, moguće je uz dovoljno dugotrajnu elektroforezu razlučiti različite alele u heterozigotnim uzorcima čak i kada je razlika u duljini dvaju alela kraća od jedne ponavljajuće jedinice od 30 pb, kao što je to slučaj za alele 3.5 i 4 te 4 i 4.5. Pretpostavljam da se nastajanje heterodupleksa dvaju lanaca alela različite duljine dešava zbog velike sličnosti u DNA sekvenci različitih alela zbog čega se ponavljajući dijelovi sekvence sparuju unatoč nekomplementarnim duljinama jednolančanih molekula DNA. To posljedično usporava njihovu brzinu putovanja tijekom elektroforeze zbog stvaranja strukturalnih distorzija kao rezultata velikog broj nesparenih nukleotidnih baza, za koje je poznato da značajno utječu na mobilnost heterodupleksa tijekom elektroforeze (Cai i sur., 1991; Wang i Griffith, 1991). Genotipizacija polimorfizma *uVNTR* gena *MAOA* je bila uspješna za 142 od 143 uzorka što ide u prilog efikasnosti korištene metode. Varijanta polimorfizama s 5 ponavljanja nije pronađena u ispitivanoj populaciji, što je u skladu s očekivanjima zbog njezine rijetke učestalosti (Kaya i sur., 2021). Dosadašnja istraživanja nisu uključivala učestalosti muških alela, odnosno genotipova, u izračun za Hardy-Weinbergovu ravnotežu kod istraživanja na

populacijama oba spola. Razlog tomu je lokalizacija gena *MAOA* na kromosomu X koji je kod žena prisutan u duplikatu za razliku od muškaraca. Navedeno uzrokuje neravnotežu u količini alela između dvije spolne skupine, pa zbog komplikacija u izračunu se pribjegava testiranju Hardy-Weinbergove ravnoteže samo na jednoj, najčešće ženskoj, skupini. Nerijetko se u tom izračunu isključuju i rijetki aleli (Aklillu i sur., 2009; Lung i sur., 2011) te heterozigotni genotipovi s kombinacijom alela „visoke“ i „niske“ aktivnosti (Cooke i sur., 2018). No ovom prilikom su obuhvaćeni svi muški i ženski podaci zahvaljujući saznanjima Graffelman i Weira (2016) te je pokazano da je odabrana populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Uvjerljivo najučestaliji aleli su oni s 3 i 4 ponavljanja. Aleli s 3 i 4 ponavljanja su zastupljeni u 93% muške populacije, dok su genotipovi 3/3, 3/4 i 4/4 zastupljeni kod 94% ženske populacije. Navedeno je u skladu s dosadašnjim istraživanjima kod kojih su aleli 2, 3.5 i 4.5 bili izrazito rijetki, dok su genotipovi s alelima 3 i 4 najčešće bili zastupljeni u preko 90% ispitivane populacije (Sabol i sur., 1998; Fite i sur., 2020).

Relativna razina mRNA *MAOA* je određena u 95 uzoraka posteljice. Nisu pronađene statistički značajne razlike u razini mRNA *MAOA* s obzirom na spol, što je sukladno dosadašnjim spoznajama (Sun i sur., 2012; Blakeley i sur., 2013). Analiza odnosa polimorfizma *MAOA-uVNTR* i razine mRNA *MAOA* je pokazala da nema statistički značajne povezanosti između dvoje. Sabol i sur. (1998) su u istraživanjima pokazali da stanice s alelima *MAOA-uVNTR* 4 i 3.5 imaju pojačanu transkripcijsku aktivnost gena *MAOA*. U skladu s tim su i istraživanja H. Zhang i sur. (2010), gdje je relativna razina mRNA *MAOA* bila značajno viša u uzorcima posteljice koji posjeduju alel 4 u odnosu na alel 3. Međutim, Sun i sur. (2012) su kod pacijenata s paranoidnom shizofrenijom pokazali da nema značajnog utjecaja polimorfizma *MAOA-uVNTR* na ekspresiju gena *MAOA* u leukocitima periferne krvi, što je u skladu s našim rezultatima u tkivu posteljice. Iz tih nalaza proizlazi da duljina ponavljajućeg slijeda od 30 pb nema utjecaj na transkripcijsku mašineriju koja generira transkript *MAOA* kao što se ranije mislilo. S druge strane, istraživanja pokazuju da bi taj polimorfizam mogao imati ulogu u raznim fizičkim i psihičkim tegobama, kao što je to primijećeno u slučaju migrene (Filić i sur., 2005) i depresije (Aklillu i sur., 2009). Razvoj i funkcije posteljice su snažno regulirani epigenetikom i različite supstance iz majčinog organizma ili iz okoline (poput alkohola, nikotina i ftalata) mogu mijenjati ekspresiju gena u posteljici putem epigenetičkih mehanizama (Maccani i

Marsit, 2009). Također, pravilan rast i razvoj posteljice je značajno uvjetovan pravilnom uspostavom genomskog utiska. Razvoj posteljice nije moguć bez aktivacije očevih utisnutih gena (Surani i sur., 1984), što upućuje na njihovu krucijalnu ulogu u razvoju fetusa. Epigenetička regulacija ekspresije gena u posteljici stoga može biti jedan od razloga zašto u ovom istraživanju nije zamijećena statistički značajna korelacija polimorfizma *MAOA-uVNTR* i razine mRNA *MAOA*. Daljnja istraživanja na većem broju ispitanika su potrebna kako bi se potvrdila saznanja ovog istraživanja.

Spektrofluorimetrijsko određivanje aktivnosti MAOA uz uporabu kinuramina kao supstrata je uspješno poslužilo kao metoda za određivanje kinetičkih parametara V_{max} i K_M . Dobiveni rezultati vrijednosti kinetičkih parametara se učinkovito uklapaju u model Michaelis-Mentenine enzimske kinetike. Nisu uočene razlike u aktivnosti MAOA između muških i ženskih sudionika istraživanja.

U odnosu na naše istraživanje, u prethodnim istraživanjima primijećene su veće brzine reakcije katalizirane s MAOA u uzorcima tkiva posteljice. Konkretno, kada su kao supstrati korišteni serotonin (Sivasubramaniam i sur., 2002) i triptamin (Boulton i sur., 1985), brzine su iznosile 6.29 i 3.28 nmol/min/mg proteina. To se može pripisati boljem afinitetu MAOA za navedene supstrate (Müller i Jacobs, 2010). Unatoč tome, smatram da je upotreba kinuramina kao supstrata za utvrđivanje aktivnosti MAOA sigurnija i elegantnija metoda od korištenja radioaktivno obilježenih supstrata koji zahtijevaju poseban oprez u radu i predstavljaju opasnost za istraživača, a u konačnici i okoliš.

Michaelisova konstanta aktivnosti MAOA kada je kao supstrat korišten kinuramin je iznosila 26 μM za ventrikul štakora, 25 μM za jetru štakora i 39 μM za humani atrij srca u istraživanju Dial i Clarke (1979). Navedene vrijednosti su relativno bliske dobivenim prosječnim vrijednostima K_M u ovom istraživanju na humanoj posteljici, od 30.14 μM za žensku novorođenčad i 29.73 μM za mušku novorođenčad. To govori u prilog relativno stabilnom afinitetu MAOA za kinuramin bez obzira na različite uvjete u različitim tkivima. Vrijednosti enzimske efikasnosti MAOA u različitim tkivima kada je kao supstrat korišten kinuramin je moguće odrediti iz omjera vrijednosti V_{max} i K_M utvrđenih istraživanjima Naoi i Nagatsu (1987a, 1987b) te Weyler i Salach (1985). Efikasnosti enzima MAOA u humanoj posteljici je iznosila 5.96 i 5.17, u humanom mozgu 1.23 i u jetri 6.42

prema istraživanju Naoi i Nagatsua (1987a, 1987b). Prema istraživanju Weyler i Salacha (1985), enzimski efikasnost MAOA u humano posteljici iznosila je između 15.83 i 1417 ovisno o metodi purifikacije, gdje prva vrijednost vrijedi za mitohondrijsku suspenziju pa će ona jedina biti uzeta u obzir jer je po karakteristikama sličnija tkivu humane posteljice od visoko purificiranog enzima za koji vrijedi drugi iznos. S obzirom na dobivene medijalne vrijednosti enzimski efikasnosti MAOA od 8.866 za žensku, odnosno 8.809 za mušku novorođenčad, moguće je primijetiti da navedene vrijednosti se uklapaju u interval primijećenih vrijednosti efikasnosti MAOA u tkivu posteljice u dosadašnjim istraživanjima. Varijacije u vrijednostima efikasnosti za posteljicu se mogu pripisati razlici u metodama izolacije i eksperimentalnim uvjetima mjerenja aktivnosti MAOA. Također se može primijetiti da je efikasnost MAOA u humanom mozgu manja od prethodno zamijećene i trenutno utvrđene efikasnosti u humano posteljici, dok je efikasnost u humano jetri veća od prethodno zamijećene u posteljici, ali manja od trenutno ispitane u posteljici. Navedeno govori u prilog činjenici da je MAOA različito zastupljena u različitim humanim tkivima te da dok u nekim tkivima, poput posteljice, MAOA nosi titulu glavne deaminaze, u drugima, poput mozga, tu ulogu preuzima MAOB.

Utvrđena je slaba pozitivna korelacija između razine mRNA MAOA i (maksimalne) brzine enzimski reakcije MAOA u humano posteljici. Unatoč dosadašnjim saznanjima da ekspresija MAOA nije povezana s aktivnosti MAOA (H. Zhang i sur., 2010) ili količinom proteina MAOA (Sivasubramaniam, 2002), ovim istraživanjem je potvrđena povezanost, iako slaba, ekspresije i aktivnosti u tkivu posteljice. Razlog slabe korelacije može biti prisutnost različitih endogenih inhibitora ili odsutnost endogenih aktivatora u proteinskom izolatu. Kofaktor monomamin oksidaze A, FAD, također može biti limitirajući faktor brzine enzimski reakcije MAOA s obzirom da je esencijalan za njezino funkcioniranje. Sivasubramaniam i sur. (2002) teoretiziraju o mogućem autodestruktivnom djelovanju enzima MAOA u mitohondriju, koji svojim enzimskim djelovanjem, osim monoamina, proizvodi i H_2O_2 , jedan tip reaktivnih kisikovih vrsta. No, valja napomenuti da su i pravilna smotanost proteinske sekvence i adekvatne posttranslacijske modifikacije bitni za enzimski funkcionalnost i aktivnost MAOA. Nepravilnosti u ovim procesima mogu biti uzrok slabe povezanosti ekspresije i aktivnosti u ovom istraživanju, odnosno odsutnosti povezanosti u prethodno spomenutim istraživanjima (Sivasubramaniam, 2002).

Iako demografske i kliničke karakteristike nisu uzete u obzir pri analizi i interpretaciji rezultata u ovom istraživanju, statističke analize će biti odrađene u budućim proširenim istraživanjima, s naglaskom na utjecaj gestacijskog dijabetesa na ekspresiju i aktivnost MAOA.

6. Zaključak

Pronađene učestalosti genotipova polimorfizma *MAOA-uVNTR* se nalaze u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Suprotno nekim prijašnjim nalazima, nije utvrđena povezanost polimorfizma *MAOA-uVNTR* s razinom mRNA *MAOA*. Ovaj rezultat sugerira da polimorfizam *MAOA-uVNTR* nema bitan utjecaj na efikasnost transkripcije s promotora gena *MAOA* u uzorcima humane posteljice. Primijećena je slaba, ali statistički značajna pozitivna korelacija između razine mRNA *MAOA* i enzimske aktivnosti MAOA u uzorcima humane posteljice. Relativno slaba korelacija se potencijalno može pripisati učinku epigenetičkih čimbenika, prisutnosti endogenih modulatora enzimske aktivnosti, limitirajućem efektu kofaktora, nepravilnom smatanju i/ili posttranslacijskim modifikacijama. Spolne razlike u razini mRNA *MAOA* i aktivnosti MAOA iz posteljice nisu utvrđene.

7. Literatura

Akllilu, E., Karlsson, S., Zachrisson, O. O., Ozdemir, V., i Agren, H. (2009). Association of MAOA gene functional promoter polymorphism with CSF dopamine turnover and atypical depression. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(4), 267-275.

Auda, G. R., Kirk, S. H., Billett, M. A., i Billett, E. E. (1998). Localization of monoamine oxidase mRNA in human placenta. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(12), 1393-1400.

Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N. i Vujaklija, D. (ur.) (2007). Priprema otopina i pribora za izdvajanje RNA, U: Hranilović, D. (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 232-233.

Azmitia, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 56(5), 413–424.

Baković, P., Kesić, M., Perić, M., Bečeheli, I., Horvatiček, M., George, M., Čičin-Šain, L., Desoye, G., Wadsack, C., Panzenboeck, U., i Štefulj, J. (2021). Differential Serotonin Uptake Mechanisms at the Human Maternal-Fetal Interface. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7807.

Bînă, A. M., Sturza, A., Iancu, I., Mocanu, A. G., Bernad, E., Chiriac, D. V., Borza, C., Craina, M. L., Popa, Z. L., Muntean, D. M., i Crețu, O. M. (2022). Placental oxidative stress and monoamine oxidase expression are increased in severe preeclampsia: A pilot study. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(12), 2851-2861.

Blakeley, P. M., Capron, L. E., Jensen, A. B., O'Donnell, K. J., i Glover, V. (2013). Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A expression. *Journal of Psychosomatic Research*, 75(4), 341-345.

Blažević, S., Horvatiček, M., Kesić, M., Zill, P., Hranilović, D., Ivanišević, M., Desoye, G., i Štefulj, J. (2017). Epigenetic adaptation of the placental serotonin transporter gene (SLC6A4) to gestational diabetes mellitus. *PLoS One*, 12(6), e0179934

Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S., i Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*, 472(7343), 347-350.

Boulton, A. A., Bieck, P., Maitre, L., i Riederer, P. (1985). Some aspects of the oxidative deamination of tryptamine by MAO-A and MAO-B in different tissues. U: Yu, P. H. (ur.), *Neuropsychopharmacology of the Trace Amines (Experimental and Clinical Neuroscience) (First Edition)*, Humana Press, Clifton, New Jersey, 301–308.

Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., i Price, D. L. (ur.) (2012). Chapter 15 – Serotonin, U: Hensler, J. G. (ur.), *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*, Academic Press, 300-322.

Cai, S.-P., Eng, B., Kan, Y., i Chui, D. K. (1991). A rapid and simple electrophoretic method for the detection of mutations involving small insertion or deletion: application to β -thalassemia. *Human Genetics*, 87(6), 728–730.

Chen, K., Wu, H. F., Grimsby, J., i Shih, J. C. (1994). Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Molecular Pharmacology*, 46(6), 1226-1233.

Cohen, I. L., Liu, X., Lewis, M. E. S., Chudley, A., Forster-Gibson, C., Gonzalez, M., Jenkins, E. C., Brown, W. B., i Holden, J. J. (2011). Autism severity is associated with child and maternal MAOA genotypes. *Clinical Genetics*, 79(4), 355-362.

Cooke, E. M., Armstrong, T., Boisvert, D., Wells, J., Lewis, R. H., Hughes-Stamm, S., i Gangitano, D. (2018). The relationship between the *MAOA-uVNTR* polymorphism, delinquent peer affiliation, and antisocial behavior with a consideration of sex differences. *Psychiatric Quarterly*, 89, 841-853.

Dial, E. J., i Clarke, D. E. (1979). Rat and human cardiac monoamine oxidase: a comparison with other tissues. *European Journal of Pharmacology*, 58(3), 313-319.

Đelmiš, J. (2019). Razvoj posteljice. *Gynaecologia et Perinatologia*, 28 (1-2), 20-26.

Eccles, D. A., Macartney-Coxson, D., Chambers, G. K., i Lea, R. A. (2012). A unique demographic history exists for the MAO-A gene in Polynesians. *Journal of human genetics*, 57(5), 294-300.

Filić, V. (2004) Molekularno-genetička i biokemijska istraživanja monoamin-oksidade A i B u zdravih ispitanika i osoba koje boluju od migrene. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Filić, V., Vladić, A., Štefulj, J., Čičin-Šain, L., Balija, M., Sučić, Z., i Jernej, B. (2005). Monoamine oxidases A and B gene polymorphisms in migraine patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 228(2), 149-153.

Fite, P. J., Brown, S., Hossain, W. A., Manzardo, A., Butler, M. G., i Bortolato, M. (2020). Sex-dimorphic interactions of *MAOA* genotype and child maltreatment predispose college students to polysubstance use. *Frontiers in Genetics*, 10, 1314.

Graffelman, J. i Weir, B. S. (2016). Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity*, 116, 558-568.

Grimsby, J., Chen, K., Wang, L. J., Lan, N. C., i Shih, J. C. (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3637–3641.

Hadden, C., Fahmi, T., Cooper, A., Savenka, A. V., Lupashin, V. V., Roberts, D. J., Maroteaux, L., Hauguel-de Mouzon, S., i Kilic, F. (2017). Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 232(12), 3520–3529.

Hare, M. L. C. (1928). Tyramine oxidase: a new enzyme system in liver. *The Biochemical Journal*, 22, 968–979.

Horvatiček, M., Perić, M., Bečeheli, I., Klasić, M., Žutić, M., Kesić, M., Desoye, G., Nakić Radoš, S., Ivanišević, M., Hranilović, D., i Štefulj, J. (2022). Maternal metabolic state and fetal sex and genotype modulate methylation of the serotonin receptor type 2A gene (HTR2A) in the human placenta. *Biomedicines*, 10(2), 467.

Johnston, J. P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical Pharmacology*, 17(7), 1285-1297.

Kaya, H., Kaya, O. B., Darcin, A. E., Cavus, R. Y., Kahve, A. C., i Dilbaz, N. (2021). Predictors of alcohol use disorder: *MAOA* gene VNTR polymorphism, impulsivity, and personality traits. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 31(1), 9-18.

Kliman, H. J., Quaratella, S. B., Setaro, A. C., Siegman, E. C., Subha, Z. T., Tal, R., Milano, K. M., i Steck, T. L. (2018). Pathway of Maternal Serotonin to the Human Embryo and Fetus. *Endocrinology*, 159(4), 1609–1629.

Knoll, J., i Magyar, K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 5, 393–408

Lung, F. W., Tzeng, D. S., Huang, M. F., i Lee, M. B. (2011). Association of the *MAOA* promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder. *BMC Medical Genetics*, 12, 1-11.

Maccani, M. A., i Marsit, C. J. (2009). Epigenetics in the placenta. *American Journal of Reproductive Immunology*, 62(2), 78–89.

Meller, M., Vadachkoria, S., Luthy, D. A., i Williams, M. A. (2005). Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*, 26(8-9), 601-607.

Müller, C. P., i Jacobs, B. L. (ur.) (2010). CHAPTER 2.4 - The Degradation of Serotonin: Role of MAO. U: Bortolato, M., Chen, K., i Shih, J. C. (ur.) Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin (First Edition), Academic Press, 21, 203–218.

Naoi, M., i Nagatsu, T. (1987a). Quinoline and quinoline as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sciences*, 40(11), 1075-1082.

Naoi, M., i Nagatsu, T. (1987b). Inhibition of monoamine oxidase by 3,4-Dihydroxyphenyl L-alanine and its analogues. *Life Sciences*, 40(4), 321–328.

Perić, M., Bečeheli, I., Čičin-Šain, L., Desoye, G., i Štefulj, J. (2022). Serotonin system in the human placenta—the knowns and unknowns. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1061317.

Philibert, R. A., Wernett, P., Plume, J., Packer, H., Brody, G. H., i Beach, S. R. (2011). Gene environment interactions with a novel variable Monoamine Oxidase A transcriptional enhancer are associated with antisocial personality disorder. *Biological Psychology*, 87(3), 366–371.

Richter, D. (1937). Adrenaline and amine oxidase. *Biochemical Journal*, 31(11), 2022–2028.

Rosenfeld, C. S. (2020). Placental serotonin signaling, pregnancy outcomes, and regulation of fetal brain development. *Biology of Reproduction*, 102(3), 532-538.

Sabol, S. Z., Hu, S., i Hamer, D. (1998). A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics*, 103, 273-279.

Sivasubramaniam, S. D. (2002). Monoamine oxidase expression in non-CNS tissues and pregnancy-induced hypertension. Doktorski rad, Nottingham Trent University, Nottingham, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Sivasubramaniam, S. D., Finch, C. C., Billett, M. A., Baker, P. N., i Billett, E. E. (2002). Monoamine oxidase expression and activity in human placentae from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta*, 23(2-3), 163-171.

Staud, F., Pan, X., Karahoda, R., Dong, X., Kastner, P., Horackova, H., Vachalova, V., Udo R. Markert, U. R., i Abad, C. (2023). Characterization of a human placental clearance system to

regulate serotonin levels in the fetoplacental unit. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), 74.

Sun, Y., Zhang, J., Yuan, Y., Yu, X., Shen, Y., i Xu, Q. (2012). Study of a possible role of the monoamine oxidase A (*MAOA*) gene in paranoid schizophrenia among a Chinese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159(1), 104-111.

Surani, M. A., Barton, S. C., i Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 308(5959), 548–550.

Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L. i Petrovečki, M. (2007). Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochemia Medica*, 17 (1), 10-15.

Waller, D. G., i Sampson, A. P. (2018). 4 - Neurotransmission and the peripheral autonomic nervous system, U: Waller, D. G., i Sampson, A. P. (ur.), *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*, Elsevier, 73-90

Wang, Y. H. i Griffith, J. (1991). Effects of bulge composition and flanking sequence on the kinking of DNA by bulged bases. *Biochemistry*, 30(5), 1358–1363.

Weyler, W., i Salach, J. I. (1985). Purification and properties of mitochondrial monoamine oxidase type A from human placenta. *Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 13199-13207.

Wright, M. L., Goin, D. E., Smed, M. K., Jewell, N. P., Nelson, J. L., Olsen, J., Hetland, M. L., Zoffmann, V., i Jawaheer, D. (2023). Pregnancy-associated systemic gene expression compared to a pre-pregnancy baseline, among healthy women with term pregnancies. *Frontiers in Immunology*, 14, 1161084.

Zhang, H., Smith, G. N., Liu, X., i Holden, J. J. (2010). Association of *MAOA*, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiological Genomics*, 42(1), 85-92.

Zhang, J., Chen, Y., Zhang, K., Yang, H., Sun, Y., Fang, Y., Shen, Y., i Xu, Q. (2010). A cis-phase interaction study of genetic variants within the *MAOA* gene in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, 68(9), 795-800.

8. Životopis

Rođena sam 1998. godine u Zagrebu. Po završetku osnovnoškolskog obrazovanja upisala sam prirodoslovno-matematičku gimnaziju s pojačanim programom matematike koju sam završila s odličnim uspjehom. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sam pokazivala veliki interes prema matematici i prirodnim znanostima te sam pohađala različita natjecanja iz navedenih područja. U 2017. godini sam upisala prijediplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U toku prijediplomskog studija sam volontirala na manifestacijama „Noć biologije“ na Biološkom odsjeku PMF-a, „Dan i noć na PMF-u“ na Kemijskom odsjeku PMF-a te „Smotra Sveučilišta“ u Zagrebu. Također sam pohađala te položila kolegije „Tehnologija vode“ i „Biokemijsko inženjerstvo“ s prijediplomskog studija biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu i laboratorijsku praksu sam odradila na Odjelu za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada te na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Završetkom prijediplomskog studija sam stekla titulu prvostupnika molekularne biologije te sam 2021. godine upisala diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pohađala sam laboratorijsku praksu na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a, tečaj za osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama te obavljala različite studentske poslove. Diplomski rad sam izradila u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.